



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Milton Vieira Costa

**Papel do antioxidante (vitamina C) na modulação da pressão sanguínea em
ratos espontaneamente hipertensos (SHR)**

Rio de Janeiro

2015

Milton Vieira Costa

Papel do antioxidante (vitamina C) na modulação da pressão sanguínea em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C837 Costa, Milton Vieira

Papel do antioxidante (vitamina C) na modulação da pressão sanguínea em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) / Milton Vieira Costa. – 2015.
71 f.

Orientador: Jorge José de Carvalho.

Coorientador: Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Hipertensão - Teses. 2. Vitamina C - Teses. 3. Estresse oxidativo - Teses. 4. Antioxidantes - Teses. 5. Ácido Ascórbico - Teses. 6. Ratos Endogâmicos SHR. I. Carvalho, Jorge José de. II. Mandarim-de-Lacerda, Carlos Alberto. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.12-008.331.1

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Milton Vieira Costa

**Papel do antioxidante (vitamina C) na modulação da pressão sanguínea em ratos
espontaneamente hipertensos (SHR)**

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor, ao
Programa de Pós-graduação em Biologia
Humana e Experimental, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em de de .

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ
Coorientador: Prof. Dr. Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Suzana Côrte-Real Faria
Pesquisadora Titular do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof. Dr. Célio Fernando Rodrigues
Departamento de Anatomia Humana - UFAL

Prof. Dra. Cristiane Matsuura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Ângela de Castro Resende
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Neste longo caminho que tenho percorrido as dificuldades, longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram-lhe o brilho. E, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força. Tenho muito a agradecer.

Aos meus pais, que como sopro se foram... meus olhos quiseram perder o brilho. Foi aí que olhei para dentro de mim e ouvi seus conselhos, orientação e consolo. Neste momento muito importante, desejo tanto a presença de vocês que quase posso senti-los ao meu lado.

Aos meus irmãos, meu referencial de família, que mesmo distante me acompanham diariamente, sempre acreditando em mim e me motivando na busca de meus ideais.

Aos meus padrinhos (Maria Guerra Costa e Theodorico Fernandes da Costa Neto), pelos conselhos, orientações, substituindo às vezes meus pais. Vocês confiaram em mim quando até eu mesmo pensei em duvidar.

Aos primos-irmãos alagoanos sempre presentes (Marcos Guerra Costa e Ana Maria Guerra Costa). Sempre pude contar com vocês irrestritamente nestes duros anos de doutorado.

Às minhas sobrinhas e afilhadas, Sílvia Lígia (sempre me enchendo de orgulho) e Cecília (que me chegou como um presente e logo aprendi a amá-la).

Ao meu sobrinho Fernando Vieira Costa Júnior, grande intelectual! Você tem me ajudado tanto nestas minhas pesquisas que, sem dúvida, essa vitória também é sua! Serei eternamente grato!

A minha namorada Alissandra de Oliveira Lima, que foi chegando devagar e logo se tornou minha grande companheira, sempre me ajudando nas missões importantes de minha vida, compreensiva com minhas longas ausências. Ao invés de me cobrar a presença, você sempre me compreendeu, e me ajudou de todas as formas! Muito obrigado, meu amor!

Ao meu amigo-irmão José Cavalcante e família, que tantas vezes fez questão de me receber em sua casa, evitando que eu me sentisse sozinho no Rio de Janeiro.

Aos meus amigos do peito (Régia Ribeiro, Felipe Cavalcante, Saulo Moura, Bruno Omena, Djalma Olímpio, Guilherme e Patrícia Lemos) que me deram tanta força nesta jornada.

Ao grande amigo Augusto César de Jesus Santos, sempre me socorrendo nas impecáveis correções do inglês.

À Dra. Eliete Dalla Corte Frantz, minha amiga-irmã! Muito obrigado pela troca de conselhos e por se fazer presente em todos os momentos desse meu doutorado.

À amiga Msc. Aline Pena, sempre tão prestativa e capaz, solícita em meus momentos difíceis de longas jornadas de análises técnicas. Eu lhe ofereço minha amizade e meus agradecimentos.

À minha amiga doutoranda Aline Félix, forte, equilibrada, mas sem perder a ternura! Dividimos tantos desafios nestes 4 anos... muito obrigado por tudo!

À amiga e companheira de laboratório Dra. Angélica Garcia, por toda amizade, carinho e companheirismo.

À minha amiga de departamento – irmãzinha caçula – doutoranda Genilza Pereira. Obrigado por todo o companheirismo.

Aos técnicos que tanto me ajudaram: Ana Lúcia Rosa Nascimento, Alan César Nunes e Thatiany de Souza Marinho. Eu não teria conseguido sem vocês!

Aos meus então alunos de Iniciação Científica, hoje e sempre amigos, Tielle Ribeiro e Victor Araújo, pela troca de aprendizado e por toda a ajuda nesta longa caminhada.

Aos amigos Profa. Dra. Vanessa de Souza Mello, Profa. Dra. Sandra Barbosa, doutorandos André Viana, Thereza Bargut, e demais amigos do LMMC com quem sempre pude contar.

Aos amigos do LUBT: Prof. Dr. Vinícios Novaes, Dr. Rodrigo Neto Ferreira, doutoranda Poliana Marinho e Msc. Priscila Yorio.

Às Profas. Dras. Laís de Carvalho, Alessandra Tolle, Carolina Estumbo e Simone de Carvalho, por sempre terem me acolhido e me ajudado, muito obrigado!

À Prof^a. Dr^a Érika Cortez, pela importante colaboração neste doutorado!

Ao Prof. Dr. Euclides Maurício Trindade Filho, meu grande amigo! Você me orientou nos quatro anos de iniciação científica, viu em mim um potencial e me estimulou a perseguir a carreira da ciência. Muito obrigado!!!

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Santa Cruz, por sempre ter me acolhido tão bem na Universidade Estadual de Alagoas.

Ao Prof. Dr. Célio Fernando Sousa-Rodrigues, que confiou em mim e me indicou para um serviço de excelência. E por ter me acompanhado nestes longos seis anos. Seu projeto deu certo, professor (emocionado...). Serei eternamente grato! MUITÍSSIMO Obrigado!

Às agências de fomento (CAPES, FAPERJ e CNPQ) que custearam esta pesquisa.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Mandarin-de-Lacerda, por ter me ajudado, por deixar sempre abertas as portas de seu laboratório para mim. Rendo meus agradecimentos e minhas homenagens.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge José de Carvalho, pela amizade, confiança e acolhimento no doutorado. Por ter sido mais que um orientador, um amigo! O senhor deu-me infra-estrutura, orientação e companheirismo. Será uma honra continuar trabalhando contigo! Muito Obrigado!

Por fim, agradeço a Deus, que nunca me abandonou, que me fez forte quando eu já enfraquecera. Deu-me vista longa e pernas curtas, mas me proveu de força para a longa jornada que percorri. Assim, aprendi a ter raízes e asas!

Se um dia, já homem feito e realizado, sentires que a terra cede a teus pés, que tuas obras desmoronam, que não há ninguém à tua volta para te estender a mão, esquece a tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta à tua infância e balbucia, entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que sempre te restarão na alma: minha mãe, meu pai.

Rui Barbosa

RESUMO

COSTA, Milton Vieira. *Papel do antioxidante (vitamina C) na modulação da pressão sanguínea em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)*. 2015. 71f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A hipertensão essencial humana, bem como a hipertensão desenvolvida em Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR), são caracterizadas pelo desenvolvimento de Pressão Arterial (PA) elevada na medida em que a idade avança, sem identificação da causa primária. Está bem estabelecido que este modelo animal apresenta estresse oxidativo (EOx) concomitante a hipertensão. O mecanismo pelo qual o antioxidante reduz a pressão não está claro, por essa razão, é necessário avaliar o comportamento destas enzimas envolvidas na homeostase da PA. Ratos Wistar-Kyoto (WKY) e SHR machos receberam ácido ascórbico, 200 mg / kg / dia por sonda orogástrica durante cinco semanas. A PA, a Hipertrofia Ventricular Esquerda (HVE), o Sistema Renina-Angiotensina (SRA), o Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) e o EOx foram comparados entre os grupos por pletismografia, estereologia, microscopia confocal de varrimento a laser, microscopia eletrônica de transmissão, western blotting e análise do RT-qPCR. Os SHR tratados com ácido ascórbico reduziram a PA e a HVE. Além disso, as enzimas envolvidas na homeostase da PA, a renina e a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) normalizaram-se, bem como os Receptores tipo 1 de Angiotensina II (AT1). A grande quantidade de grânulos de ANP no grupo SHR foi reduzida pelo tratamento com ácido ascórbico. O balanço oxidativo foi restabelecido nos SHR tratados com este antioxidante. O EOx nos SHR eleva os níveis de renina e de PA. Estas espécies reativas de oxigênio podem ser envolvidas no mecanismo de sinalização para aumentar a expressão de ANP nos miócitos atriais. Estes dados também mostram que o tratamento com o antioxidante (vitamin C) reduz o EOx e normaliza a PA ao menos parcialmente pela redução de taxas de renina.

Palavras-chaves: Vitamina C. Estresse oxidativo. Hipertensão essencial. Rato espontaneamente hipertenso. Sistema renina-angiotensina.

ABSTRACT

COSTA, Milton Vieira. The role of antioxidant (vitamin C) in the modulation of the blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). 2015. 71f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The essential hypertension, as well as the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR), is characterized by the development of high BP (BP) with advancing age, with no identified primary cause. It is well established that this animal model presents OxS concomitant hypertension. The mechanism, by which the antioxidant reduces the pressure, is not clear, for this reason, it is necessary to evaluate the behavior of enzymes involved in the homeostasis of BP. Male Wistar-Kyoto (WKY) rats and SHR received ascorbic acid, 200 mg / kg / day by orogastric gavage with lasted five weeks. The BP, Left Ventricular Hypertrophy (LVH), renin-angiotensin system (RAS), Atrial Natriuretic Peptide (ANP) and OxS results have been extensively compared among groups by plethysmography, stereology, confocal laser scanning microscopy, transmission electron microscopy, western blotting and RT-qPCR analysis. The SHR treated with ascorbic acid reduced BP and LVH. Also, the enzymes involved in the homeostasis of BP, renin and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) normalized, as well as Angiotensin II type 1 receptor (AT1R). The large amount of ANP granules in SHR group was reduced by treatment with ascorbic acid. Oxidative balance was reestablished in SHR treated with this antioxidant. OxS in SHR elevates renin levels and BP. These reactive oxygen species may be involved in the signaling mechanism for increased expression in ANP atrial myocytes. These data also show that treatment with antioxidant (vitamin C) reduces OxS and normalizes BP at least partly by reducing rates of renin.

Keywords: Vitamin C. Oxidative stress. Essential hypertension. Spontaneously hypertensive rat. Renin-angiotensin system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sequência de aminoácidos (ANP)	29
Figura 2 - Esquema das ações fisiológicas do ANP	32
Figura 3 - Análise da pressão arterial sistólica (PAS).....	44
Figura 4 - Análise de renina, ECA, AT1R e beta-actina.....	48
Figura 5 - Análise da renina no miocárdio.....	49
Figura 6 - Análise ultraestrutural e molecular do ANP.	51
Figura 7 - Análise imunohistoquímica do ANP.....	52
Figura 8 - Análise do estresse oxidativo através da expressão protéica	54
Figura 9 - Análise do estresse oxidativo através da expressão gênica	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação e intervenção na pressão arterial para adultos.....	21
Tabela 2 -	Primers RT-qPCR e sequências respectivas.....	43
Tabela 3 -	Ganho de peso corporal, ingestão de alimentos e estereologia.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido ascórbico
ADH: Vasopressina
AGT: Angiotensinogênio
AMP: Monofosfato de adenosina
ANF: Fator natriurético atrial
ANG: Genes do angiotensinogênio
ANP: Peptídeo natriurético atrial
AT1: Receptor tipo I de angiotensina II
ATP: Trifosfato de adenosina
AVE - Acidente vascular encefálico
BNP: Peptide natriurético cerebral
cAMP: AMP cíclico
CAT: Catalase
cDNA: DNA complementar
cGMP: GMP cíclico
cmi: Área seccional média do cardiomiócito
CNP: Peptídeo natriurético tipo C
CS: Citrato sintase
CT: número de ciclos
DCV: Doença cardiovascular
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNase: enzima que cliva o DNA
ECA: Enzima conversora de angiotensina
EOx: Estresse oxidativo
ERN: Espécies reativas de nitrogênio
EROs: Espécies reativas de oxigênio
GMP: monofosfato de guanosina
GPx: Glutathione peroxidase
GR: Glutathione reductase
HAS: Hipertensão Arterial Sistólica

HE: Hipertensão Essencial
HVE: Hipertrofia Ventricular Esquerda
MC: Massa corporal
MC/CT: Massa cardíaca corrigida pelo comprimento da tibia
NPR-A: Receptor para o peptídeo natriurético tipo A
NPR-B: Receptor para o peptídeo natriurético tipo B
NPR-C: Receptor para o peptídeo natriurético tipo C
PA: Pressão arterial
PCR: Reação em cadeia polimerase
PD: Pressão diastólica
Pp: Pontos parciais que tocam a estrutura
PS: Pressão sistólica
PT: Pontos totais do sistema teste
RNA: Ácido ribonucleico
RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro
RQ: Raio de expressão relativa
RT-qPCR: Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real
SHR: Ratos espontaneamente hipertensos
SNS: Sistema nervoso simpático
SOD: Superóxido dismutase
SRA: Sistema renina-angiotensina
SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TFG: Taxa de filtração glomerular
VE/CT: Massa do ventrículo esquerdo corrigida pelo comprimento da tibia
WKY: Ratos Wistar Kyoto

LISTA DE SÍMBOLOS

NaCl - cloreto de sódio

Na⁺ - cátion sódio

O₂ - Molécula do oxigênio

H₂O - Molécula da água

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

O₂⁻ - Radical ânion superóxido

Cu²⁺ - cátion cobre

Zn²⁺ - cátion zinco

Mn²⁺ - cátion manganês

mm Hg - Milímetros de mercúrio

mg - Miligrama

g - Grama

mg/mm - miligrama por milímetro

Vv - Densidade de volume

μm² - micrômetro quadrado

P - índice de significância

K(Ca) - canais de cálcio e potássio

°C - Graus Celsius

°C/s - Graus Celsius por segundo

ΔCt - Diferença entre o número de ciclos (CT) dos genes alvo e o controle endógeno

Ca⁺²-ATPase - Canais ativos de cálcio

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	17
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
1.1	Hipertensão Arterial Sistólica.....	19
1.1.1	<u>Hipertensão Essencial (HE).....</u>	21
1.1.2	<u>Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR).....</u>	22
1.1.3	<u>Sistema Renina-Angiotensina (SRA).....</u>	24
1.1.3.1	Renina.....	25
1.1.4	<u>Peptídeo Natriurético Atrial.....</u>	26
1.1.4.1	Descoberta.....	27
1.1.4.2	Estrutura.....	28
1.1.4.3	Síntese.....	29
1.1.4.4	Receptores.....	30
1.1.4.5	Efeitos Fisiológicos.....	31
1.1.4.6	Manipulação Farmacológica.....	33
1.2	Estresse Oxidativo (EOx).....	33
1.3	Vitamina C.....	36
2	OBJETIVOS.....	38
2.1	Objetivos Gerais.....	38
2.2	Objetivos Específicos.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1	Animais e Tratamento.....	39
3.2	Pressão Sanguínea e Massa Corporal.....	39
3.3	Eutanásia e Preparação Técnica do Material.....	40
3.4	Hipertrofia e Estereologia do Ventrículo Esquerdo.....	40
3.5	Microscopia Confocal com Varrimento a Laser.....	40
3.6	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	41
3.7	Análise do Western Blot.....	41
3.8	Coração RT-qPCR.....	42
3.9	Análise Estatística.....	44
4	RESULTADOS.....	45
4.1	Pressão Arterial e Massa Corporal.....	45

4.2	Hipertrofia Cardíaca	46
4.3	Sistema Renina-Angiotensina	47
4.3.1	<u>Immunoblotting</u>	47
4.3.2	<u>RT-qPCR</u>	48
4.3.3	<u>Microscopia Confocal de Varrimento a Laser</u>	49
4.4	Peptídeo Natriurético Atrial	50
4.4.1	<u>Immunoblotting</u>	50
4.4.2	<u>Microscopia Eletrônica de Transmissão</u>	50
4.4.3	<u>Microscopia Confocal com Varrimento a Laser</u>	50
4.5	Estresse Oxidativo	52
4.5.1	<u>Immunoblotting</u>	52
4.5.2	<u>RT-qPCR</u>	55
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE A - Artigo Científico Submetido à revista <i>Physiological Research</i> ..	68
	APÊNDICE B - Artigo Científico Submetido à revista <i>CLINICS</i>	69
	ANEXO - Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA).....	70

INTRODUÇÃO

A hipertensão é um importante fator de risco que contribui consideravelmente para morbidade e mortalidade por acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, doença coronariana e insuficiência renal [1]. As orientações nacionais e internacionais enfatizam a importância do tratamento efetivo da hipertensão arterial. Além disso, a maior dificuldade no tratamento da hipertensão é o reconhecimento da causa primária, ou ao menos a identificação do mecanismo fisiopatológico presente que possa indicar um tratamento apropriado. O uso de modelos animais tem sido particularmente importante no exame dos mecanismos que envolvem o desenvolvimento e a manutenção da Pressão Arterial (PA) elevada. Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são um modelo genético de hipertensão que se assemelha a hipertensão essencial em humanos [2].

Alguns mecanismos importantes que envolvem diretamente a hipertensão essencial são mudanças no Sistema Renina-Angiotensina (SRA) [3], no Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) [4] e no Estresse Oxidativo (EOx) [5].

No estudo do SRA, o aumento da expressão da enzima renina, da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e do Receptor tipo I de Angiotensina II (AT1R) estão em consonância com a elevação da PA, e podem indicar que o SRA induz, ao menos parcialmente, a elevação da PA na cepa de ratos estudados. Alguns experimentos encontraram um aumento nos níveis de renina no SHR, admitindo a contribuição do SRA para a hipertensão e para a indução da Hipertrofia Ventricular Esquerda (HVE) em SHR [6, 7]. Outros estudos, no entanto, têm nestes animais (SHR) um modelo de hipertensão com níveis de renina normais ou até diminuídos [8].

O ANP é um hormônio peptídico produzido, armazenado e liberado pelas células musculares nas câmaras superiores (átrios) do coração (miócitos atriais) em resposta ao estiramento atrial induzido pela hipovolemia ou aumento na PA [9], uma situação esperada na hipertensão essencial. Falta ser observado, no entanto, se a distensão na parede atrial direita – por si só – pode aumentar a secreção deste hormônio. Uma possibilidade é a sugestão de que o EOx seja um fator indutor (pelo menos parcialmente) da hipersecreção de ANP.

O EOx pode estar envolvido na gênese da hipertensão, desde que a causa primária da Hipertensão Arterial Sistólica (HAS) seja uma disfunção endotelial. Conceitualmente, o EOx é um desequilíbrio entre as enzimas antioxidantes e os sistemas pro-oxidantes, o que geralmente causa efeito deletério nas células, tecidos e órgãos em virtude do excesso das

espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN). A avaliação do EOx pode ser feita pela expressão de algumas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) [10] e glutathione reductase (GR) [11].

Muitos estudos têm sugerido um possível envolvimento do ácido ascórbico para a regulação da PA, tanto em humanos [12, 13] como em SHR [14]. Portanto, é necessário investigar o mecanismo preciso que regula a PA pelo ácido ascórbico. Verificar se este antioxidante, por ser um potente regulador do perfil oxidativo, pode estar envolvido na proteção dos danos teciduais, modificando a expressão de enzimas determinantes do SRA e modulando a HAS.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Hipertensão Arterial Sistólica

A hipertensão arterial é uma doença crônica, altamente prevalente em humanos, de elevado custo econômico e social, principalmente em decorrência de suas complicações, e com grande impacto na morbi-mortalidade [15]. O maior fator de risco de doenças cardiovasculares, a HAS acomete aproximadamente 50 milhões de indivíduos nos Estados Unidos e aproximadamente um bilhão de pessoas pelo mundo inteiro [16, 17]. A HAS é diagnosticada em 50% dos indivíduos acima de 55 anos de idade nos países industrializados [18]. As consequências das HAS são as principais causas de morte no mundo, muito embora só tenha causa primária identificável em apenas 5% dos casos [19].

A HAS pode provocar ruptura dos vasos sanguíneos cerebrais, dos vasos renais ou dos vasos de outros órgãos vitais, insuficiência renal, perda da visão e infarto agudo do miocárdio. Por outro lado, também pode representar sobrecarga excessiva para o coração, levando-o a uma insuficiência cardíaca congestiva. Por essas razões, um dos mais importantes problemas da fisiopatologia humana é determinar as causas da HAS e seu tratamento eficaz [20].

Estudos clínicos e experimentais demonstram que a HAS provoca alterações adversas na estrutura cardíaca, como dilatação do átrio esquerdo, hipertrofia do ventrículo esquerdo, fibrose miocárdica e alterações funcionais do ventrículo esquerdo induzidas por fatores hemodinâmicos e não hemodinâmicos [21].

Quanto a sua patogenia, a HAS é resultante principalmente da elevação da resistência periférica. Isso ocorre pela redução do calibre das arteríolas ou pelo aumento do volume circulante. A redução do diâmetro arteriolar é determinado pela combinação, em grau variado, de fatores funcionais e fatores estruturais. A vasoconstrição pode ser causada pela produção excessiva de fatores pressores (angiotensina, vasopressina, endotelina e sistema nervoso simpático etc.), ou pela deficiência dos fatores depressores (óxido nítrico, prostaciclina e ANP) [22].

O componente estrutural é, geralmente, representado pela hipertrofia da camada média que passa a ocupar parte do espaço intravascular. Importante ressaltar que os fatores que, ativamente, contraem ou dilatam os vasos têm, também, efeitos tróficos sobre a camada muscular, estimulando ou inibindo o seu espessamento. A redução da luz das arteríolas pode

resultar, igualmente, de “remodelagem”, quando ocorre redução tanto do diâmetro interno como externo, sem modificações da massa. O componente genético é responsável pela produção dos complexos fatores pressores e depressores que regulam a pressão arterial (PA) [23].

Em um estudo populacional, a PA apresenta uma distribuição normal, com um desvio da curva para a direita. Existe uma forte e positiva correlação contínua entre hipertensão e risco de doença cardiovascular – DCV (acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio e doença coronariana), doença renal e mortalidade, mesmo em indivíduos normotensos. Esta correlação é mais robusta com a pressão sistólica (PS) do que com a diastólica (PD) [24]. Não existe nível específico de BP no qual as complicações cardiovasculares e renais comecem a ocorrer, então, a definição de hipertensão é arbitrária. Mesmo assim, esta definição precisa existir por razões práticas para avaliação e tratamento de pacientes.

O Sétimo Relatório do norte-americano intitulado Comitê Misto Nacional de Prevenção, Detecção, Avaliação e Tratamento da Hipertensão Arterial (do, inglês, *JNC 7*) define e classifica hipertensão em adultos, como mostrado na Tabela 1 [25]. O diagnóstico de hipertensão é feito quando a média de duas ou mais mensurações de pressão diastólica (PD) é ≥ 90 mm Hg ou quando a média de duas ou mais mensurações de pressão sistólica (PS) ≥ 140 mm Hg. Hipertensão sistólica isolada é definida como PS ≥ 140 mm Hg e PD < 90 mm Hg. Indivíduos com PA normal que tendem a manter a pressão elevada apresentam a média da pressão acima da média da população em geral e têm um risco maior para o desenvolvimento de hipertensão definitiva e demais eventos patológicos cardiovasculares [25].

Tabela 1. Classificação e intervenção na pressão arterial para adultos* [25].

Classificação da PA	PAS* mmHg	PSD* mmHg	Modificação do estilo de vida	Terapia medicamentosa inicial	
				Sem completa indicação	Com completa indicação
Normal	< 120	e < 80	Encorajamento	Terapia medicamentosa anti-hipertensiva não indicada	Indicação medicamentosa obrigatória.***
Pré-hipertensão	120-139	ou 80-89	Sim		
Estágio 1 da hipertensão	140-159	ou 90-99	Sim	Diuréticos tipo tiazídicos na maioria dos casos. Pode considerar IECA, BRA, BB, BCC ou combinações.	Drogas de indicação obrigatória.*** Outras drogas anti-hipertensivas (diuréticos, IECA, BRA, BB, CCB) são necessários.
Estágio 2 da hipertensão	≥ 160	≥ 100	Sim	Combinação de duas drogas para a maioria** (usualmente diuréticos tipo tiazídicos e IECA ou BRA ou BB ou BCC).	

Legenda: PSD, Pressão Sanguínea Diastólica; PAS, Pressão Arterial Sistólica.

Abreviação das drogas: IECA, Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina; BRA, Bloqueador do Receptor de Angiotensina; BB, Betabloqueador; BCC, Bloqueador do Canal de Cálcio.

* Tratamento determinado pela categoria da PA mais elevada.

** O tratamento combinado inicial deverá ser aquele que represente o menor fator de risco para a hipotensão ortostática.

*** Tratamento de pacientes com doença renal crônica ou diabetes para manter a PA < 130/80 mmHg.

1.1.1 Hipertensão Essencial (HE)

A Hipertensão Essencial (HE) ou hipertensão primária é a forma de hipertensão onde não há uma causa primária atribuível e identificável. Trata-se de uma doença multifatorial desencadeada pela associação de diversos fatores genéticos e ambientais [26]. Estudos epidemiológicos indicaram que variantes genéticas, inclusive variantes dos genes do angiotensinogênio (ANG) [27], da renina [28], da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) [29], do AT1 [30] e da aldosterona sintetase [31], aumentam o risco de HE. Esta continua sendo um grande risco para as doenças cardiovasculares, apesar de importantes avanços no entendimento de sua fisiopatologia e da variabilidade de estratégias de tratamento. A HE aumenta o risco de DCV em milhões de pessoas em todo o mundo e há evidências de que o problema está piorando cada vez mais. Nas últimas décadas, a incidência de acidente vascular encefálico (AVE) e de doenças coronarianas tem acometido pessoas cada vez mais jovens. Também tem aumentado em pessoas de menos idade a incidência de doenças renais terminais

e a prevalência de insuficiência cardíaca. O principal fator que contribui para gerar esses problemas é o controle inadequado da PA na população hipertensa. O seguimento de pesquisa que trata das bases genéticas da hipertensão e da interação gene e ambiente que pode levar a HAS ainda está em progresso. As informações obtidas a partir do projeto genoma humano e a partir dos estudos em curso de bases genéticas da hipertensão, tanto nas populações humanas como em modelos animais, podem como revolucionar o tratamento da hipertensão através da substituição da terapêutica atual por tratamentos mais específicos e adequados [32].

1.1.2 Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR)

Existe uma busca extenuante, por parte dos pesquisadores, de um modelo experimental que possa melhor caracterizar uma patologia tão importante para o ser humano como a HE. Dentre os modelos genéticos de hipertensão são analisados os ratos com hipertensão espontânea (SHR).

Desde o desenvolvimento do SHR, por Okamoto e Aoki em 1963, na Nova Zelândia [33], esta cepa, se não é o modelo mais estudado na literatura pertinente, certamente está entre os mais estudados. A sua importância tem sido creditada à similaridade da sua fisiopatogenia com a hipertensão essencial (primária) do homem. Trippodo e Frohlich [34], ao afirmarem que o SHR é um excelente modelo da HE no homem, o fazem com as seguintes ressalvas: 1) reconhecimento da improbabilidade de que ambas as formas de hipertensão espontânea (rato e homem) sejam expressões idênticas de uma doença hipertensiva determinada geneticamente; 2) ambas têm origem poligênica e são influenciadas por fatores ambientais; 3) sendo o controle cardiocirculatório multifatorial, certos mecanismos pressores não se expressam, necessariamente, em ambas as situações. Os SHRs começam a desenvolver hipertensão arterial com 5 semanas de vida, já apresentando um nível de pressão considerado como hipertensão espontânea entre a 7 e a 15 semanas, atingindo um platô entorno da 20ª semana, não havendo influência sexual nesse desenvolvimento. Entretanto, fatores ambientais, tais como ingestão exagerada de sódio, estresse, alterações sociais e alterações do ciclo claro/escuro, afetam o desenvolvimento da hipertensão. A hipertensão do SHR adulto está associada a um aumento da resistência periférica total e um débito cardíaco normal ou diminuído [35].

Com o desenvolvimento da hipertensão arterial, o SHR desenvolve uma progressiva hipertrofia cardíaca [36]. O débito cardíaco permanece em níveis normais com o progresso da hipertensão, até que nos estágios finais a função cardíaca começa a ser comprometida, quando então, o débito cardíaco começa a reduzir em função de uma insuficiência cardíaca congestiva [37]. Com relação à frequência cardíaca, esta se encontra mais elevada que nos ratos Wistar Kyoto (WKY) já na 3ª semana de vida e se correlaciona, positivamente, com os níveis de pressão atingidos até a 6ª semana de vida [38]. A taquicardia é considerada como resultado de um aumento na frequência intrínseca do marcapasso cardíaco. É interessante que as elevações precoces da frequência cardíaca nos SHR se constituem num índice altamente preditivo da ocorrência de hipertensão na população estudada [38]. Um achado consistente nos SHRs é o aumento da resistência periférica total [39, 40]. Parece que as pequenas artérias, arteríolas e, possivelmente, os esfíncteres pré-capilares sejam os principais responsáveis pelo aumento da resistência vascular periférica. Acredita-se que tanto processos ativos quanto estruturais sejam responsáveis pelo aumento da resistência periférica. Por exemplo, alteração da geometria vascular [41], alterações da membrana celular da musculatura lisa vascular [42] ou então diminuição da densidade arteriolar da musculatura esquelética [43].

Outros estudos [44] ainda mostraram que nos SHRs as alterações das propriedades funcionais precedem o desenvolvimento da hipertensão arterial e que a redução da distensibilidade e da complacência vascular nos animais jovens resulta de uma hipertrofia da camada média, em vez de alterações intrínsecas das propriedades elásticas dos vasos. A importância dos fatores neurais no desenvolvimento do SHR foi demonstrada por meio da redução da pressão arterial, em resposta à ablação cirúrgica ou farmacológica do sistema nervoso autônomo simpático, da prevenção do desenvolvimento da hipertensão por imunossimpatectomia, da simpatectomia química e outros métodos [34]. Existe, portanto, uma ampla documentação de uma hiperatividade simpática no modelo SHR [45]. Entretanto, a similaridade das respostas pressóricas e de resistência periférica ao hexametônio entre os SHR e os normotensos WKY, sugere algum outro mecanismo, além do simpático, participando na manutenção da hipertensão arterial de SHR jovens e velhos [46].

1.1.3 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

Em 1898, Tiegerstedt e Bergman iniciaram as descobertas do SRA, e, trabalhos posteriores, mais precisamente em 1940 e 1950, reconheceram e demonstraram a sua ação. O SRA foi pensado como um sistema endócrino pelo qual o rim influencia a regulação cardiovascular sistêmica e o balanço hidroeletrólítico [47]. No início da década de 1970 foram descobertos peptídeos que inibem a formação de angiotensina II (ANG II), assim revelando importantes funções fisiológicas e fisiopatológicas desempenhadas pelo SRA, o que permitiu se estender muito além do conceito inicial.

O conceito atual é que o SRA desempenha um importante papel na regulação da pressão arterial (PA), equilíbrio hidroeletrólítico, estruturação e função cardiovascular [48]. A maior parte de suas ações fisiológicas é exercida pela ANG II, um potente peptídeo biológico, que está relacionado com a etiologia da hipertensão arterial e outras formas de doenças cardiovasculares e renais [49]. Várias consequências hemodinâmicas e humorais têm sido relacionadas à ativação do SRA, como isquemia miocárdica, hipertrofia ventricular esquerda, arritmias, aumento do estresse oxidativo, insuficiência cardíaca congestiva, hipertrofia vascular, além, é claro, das alterações renais [50].

Esse sistema corresponde a um mecanismo complexo hormonal e parácrino cujo principal componente, a Ang II, é potente vasoconstrictor que desempenha papel importante na manutenção da homeostasia hidroeletrólítica do organismo e no controle da pressão arterial. O SRA é considerado sistema endócrino cuja substância ativa, o Ang II, é produzida por clivagem sequencial enzimática dupla a partir do substrato angiotensinogênio (AGT) de origem hepática. A produção de renina, uma protease altamente específica, se dá no aparelho justaglomerular renal e sua liberação se faz principalmente em resposta a reduções de pressão arterial na circulação renal, alterações de sal na dieta (queda da concentração de NaCl nas células da mácula densa) e variações da intensidade da estimulação simpática no rim. Na circulação sanguínea a renina converte o Angiotensinogênio (AGT) circulante no decapeptídeo Angiotensina I (ANG I). A conversão de Ang I em Ang II (octapeptídeo) ocorre pela ação da ECA presente, principalmente, nas membranas das células endoteliais da circulação pulmonar [51, 52].

Estão identificados no corpo humano dois diferentes tipos de sistemas renina-angiotensina: o circulante, descrito há já bastante tempo (a partir de Tiegerstedt e Bergman,

no final do séc. XIX) e o local, descrito mais recentemente, que parece desempenhar papel crucial na manutenção da homeostase circulatória [53-55].

No SRA circulante, o AGT é produzido pelo fígado, que requer glicocorticóides do córtex adrenal e estrógeno das gônadas; a renina é liberada pelos rins, enquanto que a ECA é encontrada no endotélio vascular de vários órgãos. Uma vez ativada a cascata, surgem a ANG I e a ANG II, que circulam pelo sangue ativando suas estruturas-alvo: vasos sanguíneos (sobretudo arteríolas e veias sistêmicas), rins, coração, adrenais e o sistema nervoso simpático. A lógica fundamental que preside o funcionamento do sistema é responder à uma instabilidade hemodinâmica e evitar redução na perfusão tecidual sistêmica. Atua de modo a reverter a tendência à hipotensão arterial através indução de vasoconstrição arteriolar periférica e aumento na volemia por meio de retenção renal de sódio (através da aldosterona) e água – através da liberação de vasopressina (ADH). Portanto, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) se soma ao sistema simpático e ao ADH, compondo o trio de sistemas neuro-hormonais de compensação cardiovascular [56, 57].

1.1.3.1 Renina

A Renina merece uma atenção especial por ser responsável pela etapa limitante da síntese de angiotensinas. É a enzima proteolítica que converte AGT em ANG I (transformando uma substância de 411 aminoácidos em outra de 10 aminoácidos) [58]. A pró-renina é o precursor inativo da renina, que usualmente é encontrado em baixas concentrações plasmáticas mas, em diabéticos (tipo I e II) têm sido encontrados níveis elevados a ponto de ter sido proposto como marcador de nefropatia diabética [59-61].

A quantidade de renina liberada pelos rins é o principal determinante da taxa de produção de ANG II. A renina é sintetizada, armazenada e secretada na circulação arterial renal pelas células justaglomerulares situadas nas paredes das arteríolas aferentes. Vale salientar que outros órgãos como cérebro, coração e útero podem produzir renina. A forma ativa da renina é uma glicoproteína que contém 340 aminoácidos [62].

A secreção de renina pelas células justaglomerulares é controlada por três mecanismos, dois que agem predominantemente no rim, e o terceiro, que age através do SNC e é mediado pela liberação de noradrenalina pelos nervos noradrenérgicos renais.

O primeiro mecanismo intra-renal que controla a liberação de renina é denominado mecanismo da mácula densa. Aumentos do fluxo de NaCl através da mácula densa inibem a liberação de renina, e reduções do fluxo de NaCl estimulam a liberação de renina [63].

O segundo mecanismo intra-renal que controla a liberação de renina é denominado mecanismo barorreceptor intra-renal. Aumentos e reduções da pressão sanguínea nos vasos pré-ganglionares inibem e estimulam a liberação de renina, respectivamente. Acredita-se que o estímulo imediato para a secreção seja uma redução da tensão da parede da arteríola aferente o que, talvez, controle, em parte, o mecanismo barorreceptor intra-renal [64].

O terceiro mecanismo, denominado mecanismo do receptor β -adrenérgico, é mediado pela liberação de noradrenalina das terminações dos nervos simpáticos pós-ganglionares. Ativação dos receptores β_1 adrenérgicos por esta catecolamina, nas células justaglomerulares, aumenta a secreção de renina. Vale à pena salientar que receptores β -adrenérgicos renais também podem mediar a secreção de renina [65].

Os três mecanismos que regulam a secreção de renina estão interligados constituindo rede fisiológica. Elevações na secreção de renina aumentam a formação de ANG II que, interagindo com seus receptores renais, inibe nas células justaglomerulares a liberação de renina. Este sistema foi denominado mecanismo de *feedback* negativo de alça curta. Além disso, aumentos da pressão sanguínea inibem a liberação de renina: (1) ativando os barorreceptores carotídeos e aórticos, portanto reduzindo o tônus simpático renal; (2) aumentando a pressão nos vasos pré-ganglionares; e (3) reduzindo a absorção de NaCl no túbulo proximal (natriurese pressórica), o que aumenta a liberação tubular de NaCl pela mácula densa. A inibição da liberação de renina devida a aumentos da pressão sanguínea induzidos pela Ang II foi denominada de mecanismo de *feedback* negativo de alça longa [66].

1.1.4 Peptídeo Natriurético Atrial

O peptídeo natriurético atrial (ANP), fator natriurético atrial, hormônio natriurético atrial ou peptídeo atrial é um hormônio protéico (polipeptídeo) secretado pelas células musculares atriais. Está envolvido no controle homeostático de sódio, potássio e água corporal [67]. O ANP é liberado pelas células musculares da câmara superior direita (átrio direito) do coração (miócitos atriais) em resposta a elevação da pressão sanguínea ou

hipervolemia [68]. A principal função do ANP é reduzir sódio e água do organismo, e como consequência diminuir a pressão arterial sanguínea [69].

1.1.4.1 Descoberta

Em 1964, Jamieson e Palade [70] publicaram seus estudos de caracterização morfológica de grânulos atriais específicos, concluindo que fibras musculares atriais “formam e armazenam uma população de grânulos”. Mais adiante foi postulado que o átrio está envolvido na regulação de volume extracelular [71]. A partir de então, trabalhando em diferentes linhas de evidência, vários pesquisadores foram procurando por um hormônio natriurético [72]. Mais de 15 anos se passaram até que De Bold *et al* [67] relataram o experimento decisivo mostrando que o átrio de mamíferos realmente continham um fator natriurético. Neste experimento foi verificado que a administração intravenosa em *bolus* de extrato atrial leva a uma brusca natriurese, caliurese e diurese de início muito rápido (1 a 2 min) e de duração relativamente curta (10 a 20 min). O pico da excreção de sódio alcançado foi de 30 a 40 vezes o nível basal, uma magnitude de ação que imediatamente situou o peptídeo natriurético atrial como a mais poderosa substância natriurética endógena descrita até a data. Além disso, um outro estudo [73] verificou que a administração de extrato atrial diminui a pressão sanguínea logo após ao efeito natriurético. Subsequentemente, o ANP foi identificado no coração de diversos mamíferos, incluindo o homem. A descoberta de grânulos em células musculares cardíacas atriais que continham o peptídeo natriurético atrial deu ao coração a importância endócrina, além daquela de simples bomba propulsora de sangue [74].

Nos anos seguintes à descoberta, os estudos se concentraram principalmente em identificação, função e propriedades do ANP. Num curto período de tempo de 3 anos, o ANP foi identificado como um peptídeo ou um grupo de peptídeos com ações vasculares diretas, bem como efeitos natriuréticos. Esse peptídeos foram purificados, sequenciados e sintetizados e a sequência inteira do precursor do ANP foi estabelecida [75]. Seguiram-se então pesquisas buscando identificar os efeitos do ANP no rim [76, 77], musculatura lisa [78, 79] e até no tecido adiposo [80]. Os últimos estudos têm avaliado a ação molecular dos receptores do ANP [81, 82], com uma busca incessante da produção de um fármaco que aumentem os níveis de ANP plasmático [83, 84].

1.1.4.2 Estrutura

Depois que foi estabelecida a natureza peptídica do ANP, diversos laboratórios trabalharam independentemente para obter preparações altamente purificadas de peptídeos atriais com propriedades natriuréticas e vasoativas similares aquelas do extrato atrial. Diversos grupos purificaram peptídeos de humanos e ratos para obter um homogenado e determinar sua sequência de aminoácidos. Baseado na sequência de aminoácidos, peptídeos sintéticos foram obtidos, um desenvolvimento que teve um impacto considerável nos estudos da natureza química e funcional do ANP. O gene codificador do ANP está localizado no cromossomo 1 em humanos. O hormônio possui originalmente 151 aminoácidos, sendo chamado de pré-pró-ANP. Após a retirada de 25 aminoácidos de sua sequência sinal, a cadeia passa a se chamar pró-ANP, que será levada ao complexo de Golgi. Antes de ser exocitada, o ANP é novamente clivado por proteínas de membrana, em uma cadeia funcional de ANP, com 28 aminoácidos e um fragmento aminoterminal de 58 aminoácidos, o NT-pró-ANP. Apenas o ANP na sua forma ativa, com 28 aminoácidos, é exocitado para a circulação. Esse hormônio, em fetos e neonatais, é produzido em grande parte pelos ventrículos, sendo essa atividade diminuída gradativamente após o nascimento, e os átrios assumindo esse papel [75]. A Figura 1 mostra a sequência de diversos peptídeos atriais, vários nomes foram sugeridos para estes peptídeos, incluindo cardionitrina I [85], auriculina [86] ou atriopentina [87]. Os estudos tem então avançado a fim de mapear a estrutura do ANP em diversas espécies animais [88-90] ou na busca de estruturas similares [91].

molécula ativa, bem como o local preciso onde esse fenômeno ocorre. É sugerido que uma enzima lisossomal denominada de catepsina B seja a responsável pela clivagem da pró-forma de ANP, originando o ANP na sua forma ativa [93]. A catepsina B é uma protease cisteína densamente localizada nas células mioendócrinas atriais. A evidência da participação dessa enzima protease na clivagem do ANP foi bem caracterizada através de dupla marcação imunocitoquímica onde as partículas de ouro indicaram coexistência de ANP e catepsina-P nas células mioendócrinas atriais.

Além de produzido, o ANP também é armazenado e liberado pelos miócitos dos átrios cardíacos. É liberado em resposta ao estiramento atrial [94], à hipertensão [95] e a uma variedade de outros sinais que induzem hipervolemia, como exercícios [96] ou restrição calórica.

Podemos dizer que o ANP é produzido principalmente em resposta a:

Distensão atrial [94];

Hipóxia [97];

Aumento da concentração de sódio (hipernatremia) [98];

Elevação dos níveis de Angiotensina II [99];

Endotelina, um importante vasoconstrictor [100].

1.1.4.4 Receptores

Três receptores de superfície de membrana foram relacionados com os peptídeos natriuréticos (ANP, BNP e CNP). Estes receptores são: NPR-A, NPR-B e NPR-C. Tratando-se do ANP em específico, os dois receptores que atuam neste peptídeo são o NPR-A e o NPR-C [101].

A ação fisiológica do ANP é exercida por ação do receptor NPR-A. Este foi localizado principalmente na vasculatura de coração, rins, glândulas adrenais e pulmões [102]. Como outros peptídeos, o ANP liga-se a sítios estereoespecíficos da superfície celular para evocar respostas fisiológicas nas células alvo. Essa interação hormônio-receptor, por sua vez, ativa a guanilato ciclase associada à membrana celular, convertendo o monofosfato de guanosina (GMP) em monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). O cGMP por sua vez, estimula “proteínas kinases” dependentes de cGMP, que são as responsáveis pela fosforilação de um grande número de proteínas intracelulares, evento bioquímico que é essencial para a

expressão das ações fisiológicas do ANP. Além disso, o ANP também inibe a atividade da adenilatociclase em alguns tecidos, o que indica a possibilidade que alguns efeitos fisiológicos do ANP sejam devidos à interação com agonistas estimuladores de AMP cíclico (cAMP) [103].

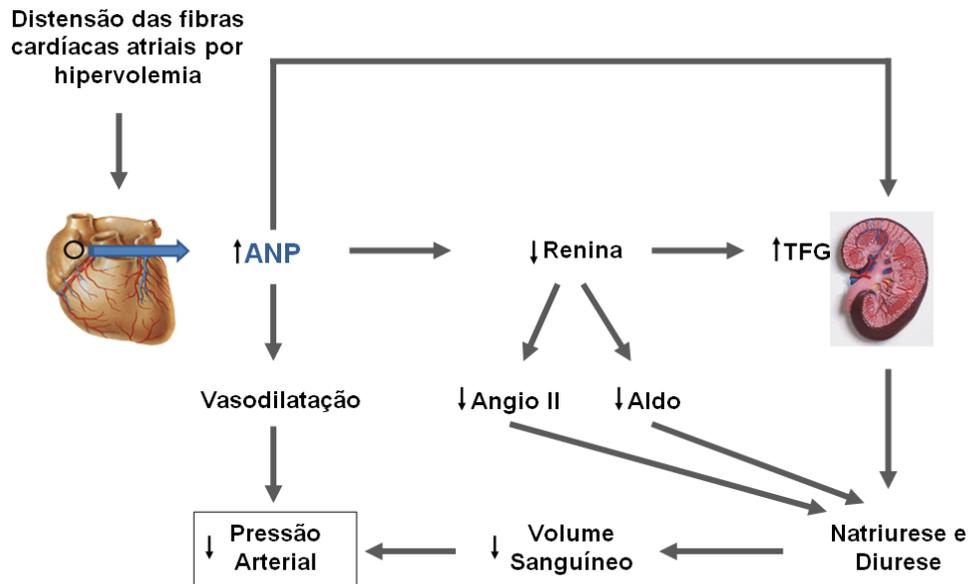
A degradação do ANP se dá por intermédio do NPR-C. Este tem a função de sequestrar o peptídeo da circulação, reduzindo sua taxa séria. O NPR-C é uma enzima de superfície de membrana que internaliza o ANP e depois o degrada [82]. A endopeptidase neutra também faz parte da inativação dos peptídeos natriuréticos. O conhecimento do mecanismo de ação desse receptor ainda é limitado e uma enorme atenção tem sido dada a este tema, visto que um grande investimento vem sendo feito na indústria farmacêutica na tentativa de inibir a ação desse receptor [83].

1.1.4.5 Efeitos Fisiológicos

O ANP liga-se aos seus receptores e causa redução do volume sanguíneo, redução do débito cardíaco e, portanto, da pressão arterial sanguínea. A lipólise é aumentada e a reabsorção renal de sódio é diminuída. Os efeitos gerais do ANP sobre o corpo tendem a conter o aumento do volume e da pressão sanguínea causados pelo SRA.

Montamos um esquema para ilustrar as ações fisiológicas do ANP (Figura 2). Tal esquema pode ser comparado com o texto que segue, além dos conhecimentos abordados até então.

Figura 2: Esquema com ações fisiológicas do ANP.



Legenda: O ANP pode ter sua produção estimulada por mecanismos que distendem suas fibras produtoras. A elevação sérica atua de diversos modos, na maioria deles aumentando a natriurese e a diurese. Todos os sentidos apresentam um fim comum, a diminuição da Pressão Arterial.

A partir da figura, podemos entender várias ações do ANP:

Aumento da taxa de filtração glomerular (TFG) – através da dilatação da arteríola glomerular aferente, constrição da arteríola glomerular eferente e relaxamento das células mesangiais. Isto aumenta a pressão dos capilares glomerulares e a TFG, resultando em grande excreção de sódio e água;

Diminuição da reabsorção de sódio – diminuição da reabsorção de sódio pelo túbulo contorcido distal e ducto coletor do néfron via cGMP. Verifica-se uma elevação na excreção renal de Na^+ e água, através da inibição da bomba de $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ e dos canais de sódio epiteliais;

Inibição da secreção de renina – o que inibe o SRA;

Redução da secreção de aldosterona – inibição diretamente no córtex da adrenal [104].

Assim, diversos órgãos sofrem a ação direta do ANP:

Vasos - relaxamento da musculatura lisa vascular das arteríolas e vênulas por elevação do cGMP da musculatura lisa vascular mediado pelo receptor de membrana e por inibição do efeito das catecolaminas [102].

Coração: há inibição da hipertrofia adaptativa – animais destituídos de receptores para ANP (NPR-A) apresentaram aumento da massa cardíaca, fibrose severa e morte súbita. A reexpressão deste do gene que viabiliza NPR-A reduziu esse fenótipo [105].

Tecido adiposo: aumento da liberação de ácidos graxos livres do tecido adiposo – a concentração de glicerol e ácidos graxos são aumentados por infusão endovenosa de ANP em humanos. Além disso, o aumento dos níveis de cGMP intracelular no tecido adiposo induz a fosforilação da lipase sensível ao hormônio [106].

1.1.4.6 Manipulação Farmacológica

A endopeptidase neutra é uma enzima que metaboliza os peptídeos natriuréticos [107]. A associação de uma droga capaz de inibir simultaneamente ECA e NEP parece ser uma alternativa em curto prazo, visto que os experimentos com modelos animais já estão bem avançados, sendo indicados para tratar uma série de manifestações clínicas, desde hipertensão [108-110], insuficiência cardíaca [111, 112], a obesidade e neuropatia diabética [84, 113]. Mais estudos são necessários para o emprego seguro em humanos.

1.2 Estresse Oxidativo (EOx)

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de radicais livres e espécies reativas não radicais é resultante do metabolismo de oxigênio. O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e espécies reativas não radicais. Esse sistema usualmente é dividido em enzimático (SOD, CAT e GPx e GR) e não-enzimático (substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética) [114].

A geração de radicais livres constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; fertilização do óvulo; ativação de genes; e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos [115]. A produção contínua de radicais livres

durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes [116, 117].

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos. A cronicidade do processo em questão tem relevantes implicações sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades crônicas não transmissíveis, entre elas a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer [118]. Ferrari [119], em estudo de revisão, ratifica que a geração de radicais livres desencadeia eventos patológicos que, por sua vez, estão envolvidos nos processos cardiovasculares, carcinogênicos e neurodegenerativos.

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Tais mecanismos podem, especialmente, ser favorecidos pelos íons ferro e cobre [120]. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres [118].

Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O_2) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Os restantes 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e ainda por reações químicas de oxidação direta. Na mitocôndria, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase. Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, a referida enzima oxida quatro moléculas de citocromo c removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados ao O_2 para formar água. A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres [121].

A exposição do organismo aos radicais livres, provenientes de diversas fontes, levou o organismo a desenvolver uma série de mecanismos de defesa para eliminar estes radicais livres [122]. Estas defesas foram a resposta da evolução à inevitabilidade da existência de radicais de oxigênio em condições de vida aeróbia. Estas defesas podem ser enzimáticas ou

não enzimáticas. As defesas antioxidantes enzimáticas são em grande número e encontram-se espalhadas por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular.

Estas defesas enzimáticas (SOD, CAT e GPx e GR) podem atuar diretamente contra as ERO e ERN ou, ainda, reparar os danos causados ao organismo por essas espécies. Um exemplo é a catalase (CAT) que converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e O_2 . Outras são capazes de eliminar a molécula ou a unidade dessa que se encontra danificada, como por exemplo as enzimas responsáveis pela excisão das bases nitrogenadas danificadas e substituição por outras intactas [123]. São conhecidos três sistemas enzimáticos antioxidantes: o primeiro é composto por dois tipos de enzimas SOD, que catalisam a destruição do radical ânion superóxido (O_2^-) convertendo-o em O_2 e H_2O_2 . A decomposição do O_2^- ocorre naturalmente porém, por ser uma reação de segunda ordem, necessita que ocorra colisão entre duas moléculas de O_2^- , de forma que há necessidade de maior concentração do O_2^- . A presença da enzima SOD favorece essa dismutação tornando a reação de primeira ordem, eliminando a necessidade da colisão entre as moléculas. A ação desta enzima permite a eliminação do O_2^- , mesmo em baixas concentrações. Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como centros redox e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. A segunda contém Mn^{2+} como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo [123]. O segundo sistema de prevenção é muito mais simples, sendo formado pela enzima catalase que atua na dismutação do H_2O_2 em O_2 e H_2O . O terceiro sistema é composto pela glutathiona, em conjunto com duas enzimas GPx e GR. Esse sistema também catalisa dismutação do H_2O_2 em O_2 e H_2O , sendo que a glutathiona opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida.

Dentre os antioxidantes biológicos de baixo peso molecular, podem ser destacados os carotenóides, a bilirrubina, a ubiquinona e o ácido úrico. Porém, as mais importantes macromoléculas no combate ao estresse oxidativo são os tocoferóis e o ácido ascórbico (vitamina C) [123].

1.3 Vitamina C

A vitamina C ou, simplesmente, ácido ascórbico (AA) é uma vitamina hidrossolúvel e termolábil. Os seres humanos e outros primatas são os únicos mamíferos incapazes de sintetizar o AA. Neles, a deficiência, geneticamente determinada, da gulonolactona oxidase impede a síntese do ácido L-ascórbico a partir da glicose [124]. A dose recomendada para manutenção de nível de saturação da vitamina C no organismo é de cerca de 100mg por dia. Em situações diversas, tais como infecções, gravidez e amamentação, e em tabagistas, doses ainda mais elevadas são necessárias [125]. A vitamina C encontra-se na natureza sob duas formas: reduzida ou oxidada (ácido deidroascórbico); ambas são igualmente ativas, porém a forma oxidada está muito menos difundida nas substâncias naturais. A transformação do AA em ácido deidroascórbico ocorre normalmente no interior do organismo e é reversível, permitindo que uma de suas substâncias possa sempre ser transformada na outra. Essa capacidade de transformação funciona como um sistema oxidorreduzidor capaz de transportar hidrogênio nos processos de respiração, no nível celular. O ácido ascórbico participa dos processos celulares de oxirredução, como também é importante na biossíntese das catecolaminas. Previne o escorbuto, é importante na defesa do organismo contra infecções e fundamental na integridade das paredes dos vasos sanguíneos. É essencial para a formação das fibras colágenas existentes em praticamente todos os tecidos do corpo humano [126].

Tem-se concordado que o ácido ascórbico desempenha funções em muitas reações e processos celulares e ainda está envolvido em muitas etapas bioquímicas [127]. Esta vitamina é necessária também no metabolismo de vários outros aminoácidos, além de ser um co-fator muito importante nas reações de hidroxilação, onde o cobre e o ferro devem permanecer reduzidos. A presença da vitamina C aumenta a absorção do ferro não-heme mesmo na presença de fatores inibidores (fitatos, polifenóis, fosfatos, carbonatos e taninos) nas refeições. A deficiência de vitamina C exerce ação sobre a mobilização das reservas de ferro do baço, mas não sobre suas reservas hepáticas. A suplementação de vitamina C acelera a mobilização do ferro. As propriedades dessa vitamina são importantes na prevenção da anemia. No osso nota-se que, na ausência desta vitamina, a porção orgânica da matriz óssea ou osteóide não é produzida ou quando produzida é escassa e imperfeita, e embora continue a haver deposição cálcica, as alterações do osteóide impedem o processo de ossificação normal [128].

A vitamina C é essencial para seres humanos, age como antioxidante, elimina radicais livres e nutre as células, protegendo-as de danos causados pelos oxidantes. Tem sido igualmente sugerido na literatura que as vitaminas antioxidantes em geral têm um importante papel na prevenção da hipertensão, já que níveis séricos de vitamina C mostram-se significativamente associados a menores níveis de pressão arterial [13, 129]. Resta-nos entender os mecanismos pelos quais a vitamina C consegue influenciar a homeostasia da pressão arterial, podendo em algumas condições evitar uma elevação ou até reduzi-la aos níveis normais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Entender os mecanismos pelos quais a vitamina C consegue influenciar a homeostasia da pressão arterial, analisando se há correlação do uso deste antioxidante com o sistema renina angiotensina e com o peptídeo natriurético atrial, em ratos espontaneamente hipertensos.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o comportamento do ANP e dos componentes do SRA no modelo SHR através de técnicas de biologia molecular (Western blot e RT-PCR) estabelecendo as possíveis alterações no SRA e no ANP após o tratamento com vitamina C;
- Avaliar a PAS e a HVE no modelo SHR antes e depois do tratamento com vitamina C;
- Visualizar as possíveis alterações de elementos do SRA e do ANP por técnicas imunohistoquímicas e visualização de microscopia confocal com varrimento a laser;
- Quantificar as enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GR) – através de biologia molecular (Western blot e RT-PCR) – para conhecer o perfil oxidativo dos animais hipertensos ou não, tratados e não tratados com vitamina C)
- Mapear alterações (ultra)estruturais no miocárdio de SHR e a possível reversão após tratamento com antioxidante vitamina C.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Tratamento

Foram utilizados ratos machos Wistar-Kyoto (WKY) e Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) com três meses de idade. Os animais foram divididos em quatro grupos, com 10 animais cada: grupos sem tratamento (WKY e SHR), que receberam placebo e grupos SHR e WKY tratados, que receberam Vitamina C (Ácido Ascórbico, 200 mg/kg Sigma-Aldrich Chemical) por sonda orogástrica. Os animais foram mantidos em uma instalação com temperatura e umidade controladas, sendo expostos a um ciclo 12h claro/escuro. Os animais receberam água e ração padrão (Nuvilab, Paraná, Brasil) *ad libitum*. As investigações estão de acordo com o “Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório” publicado pelo *US National Institute of Health* (NHI Publication No. 85-23, revised 1996) e foi aprovado pelo comitê local (Número de Protocolo CEA/03/2012). O experimento durou cinco semanas.

3.2 Pressão Sanguínea e Massa Corporal

A Pressão arterial (PA) e massa corporal foram verificadas semanalmente. A PAS foi medida em ratos conscientes com método não-invasivo da pletismografia da artéria da cauda (Letica LE 5100, Panlab, Spain). A média de três medidas foi utilizada. Duas semanas antes do experimento, os animais foram submetidos a pletismografia para adaptação e assim minimizar o estresse causado pelo procedimento.

3.3 Eutanásia e Preparação Técnica do Material

Um dia antes da eutanásia, os animais foram privados de alimento por 12h, quando foram anestesiados (pentorbbatal de sódio, intraperitoneal, 150 mg/kg). O coração foi imediatamente pesado, dissecado, seccionado no septo atrioventricular e fixados para imunohistoquímica, morfologia ultraestrutural e biologia molecular.

3.4 Hipertrofia e Estereologia do Ventrículo Esquerdo

A hipertrofia cardíaca foi analisada pela massa cardíaca corrigida pelo comprimento da tíbia (MC/CT), massa do ventrículo esquerdo corrigida pelo comprimento da tíbia (VE/CT) e estereologia.

Para estereologia, fragmentos do miocárdio ventricular esquerdo foram obtidos através do método *Orientalator* [130] e foi colocado dentro do recém preparado formaldeído 1.27 mol/L (0.1 M de tampão fosfato, pH 7.2) por 48h. Fragmentos aleatórios do ventrículo esquerdo (VE) foram incluído em Paraplast plus (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), seccionados (5 μ m) e corados com hematoxilina e eosina. Os cortes foram analisadas no microscópio de luz (Leica DMRBE microscope, Wetzlar, Germany, videocamera Infinity, Media cybernetics, Silver Spring, MD, USA). A área seccional média do cardiomiócito (cmi) foi estimada por: $A[\text{cmi}, \text{VE}] = Vv[\text{cmi}, \text{VE}]/2QA[\text{cmi}, \text{VE}]\mu\text{m}^2$. A densidade de volume dos cardiomiócitos ($Vv[\text{cmi}]$) foi estimada por contagem de pontos: $Vv[\text{cmi}, \text{VE}] = Pp[\text{cmi}, \text{VE}]/PT$, onde Pp é o número de pontos que incidem nos cardiomiócitos e PT é o número total de pontos da área teste. A densidade de perfis por área teste ($QA[\text{cmi}]$) foi estimada como:

$QA[\text{cmi}] = N[\text{cmi}]/AT$, onde N é o número de perfis encontrados dentro do sistema teste (considerando a linha proibida e sua extensão), e AT é a área do quadro de teste [131].

3.5 Microscopia Confocal com Varrimento a Laser

O ventrículo esquerdo foi analisado por imunofluorescência para renina e o átrio direito para peptídeo natriurético atrial (ANP). A recuperação antigênica foi realizada com a utilização de tampão citrato, pH 6.0 a 60°C, e em seguida bloqueado com cloreto de amônio, 2% glicina, e tampão fosfato, pH 7.4 (PBS). Os cortes foram incubados com um anticorpo primário específico para renina em rato e ANP, na concentração de 1:100 (38 kDa, sc-137252 e 17 kDa, sc-18811, respectivamente, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) durante toda a noite a 4°C. Em seguida, as amostras foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com um anticorpo secundário de burro anti-rato conjugado com fluoróforo anti-IgG-Alexa 488, na concentração de 1:100 (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). Após lavagem em PBS, as lâminas foram montadas com DAPI a fim de corar ácidos nucleicos e com um Antifade SlowFade que evita ou lentifica o decaimento (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). A imunofluorescência indireta foi observada com o microscópio confocal com varrimento a laser – LSM 510 Meta, Alemanha.

3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Fragmentos do VE foram cortados e fixados em glutaraldeído a 2,5%, com tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 por 2 horas em temperatura ambiente e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, os fragmentos foram desidratados por uma série crescente de acetona e incluídos em Epon. Cortes ultrafinos de 70 nanômetros foram obtidos utilizando um ultramicrótomo Leica ultracut e coletados em uma grade de cobre. Todos os fragmentos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio Zeiss EM 906.

3.7 Análise do Western Blot

Proteínas totais do coração foram extraídas e homogeneizadas em tampão com inibidores de protease. Depois, o homogenato foi centrifugado a 5,000 g por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi coletado. A quantidade total de proteína na amostra foi quantificada através do kit BCA (Thermo Scientific, #23225, Rockford, IL, USA). As proteínas foram

desnaturadas em tampão contendo SDS (5 min a 100°C) e 60µg de proteína de cada amostra foram separadas por eletroforese (SDS/PAGE). Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de transferência de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J., USA). A transferência foi visualizada pela solução de coloração Ponceau. A membrana foi bloqueada por incubação com leite em pó desnatado em solução tampão salina e Tris contendo 0,05% de Tween 20. Sequencialmente incubada durante toda a noite a 4°C com os seguintes anticorpos primários: Renina (anti-rato, SC137252; Santa Cruz Biotechnology; 1:500), ECA (anti-coelho, ab11734; Abcam; 1:500), AT1R (anti-coelho, SC579; Santa Cruz Biotechnology; 1:1000), Catalase (anti-coelho, SC50508; Santa Cruz Biotechnology; 1:500), SOD (anti-coelho, SC30080; Santa Cruz Biotechnology; 1:500), GPx-1/2 (anti-rato, SC133160; Santa Cruz Biotechnology; 1:500), Glutathiona redutase (anti-rato, SC133245; Santa Cruz Biotechnology; 1:500) e ANP (anti-rato, SC18811; Santa Cruz Biotechnology; 1:500). Seguindo a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário durante 1h em temperatura ambiente. A membrana foi desenvolvida utilizando reagentes de detecção ECL western blotting, e imagens do blot foram obtidas com o sistema de imagem molecular Bio-Rad ChemiDOC XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A intensidade da banda quimioluminescente foi quantificada utilizando o software Image J, versão 1.44 (NIH, imagej.nih.gov/ij, USA). Os blots foram expostos novamente e sondados por beta actina (anti-rato, SC81178; Santa Cruz Biotechnology; 1:1000) como um controle para normalizar os dados do blot.

3.8 Coração RT-qPCR

O RNA total foi extraído de aproximadamente 50mg do tecido do coração (ventrículo esquerdo) utilizando reagente Trizol (Invitrogen, CA, USA). A quantidade de RNA foi determinada utilizando espectroscopia com Nanovue (GE Life Sciences) e 1 µg de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen). A síntese da primeira sequência de cDNA foi feita utilizando Oligo (dT) primers para RNA Superscript III transcriptase reversa (ambos Invitrogen). Para a reação em cadeia polimerase em tempo real (RT-qPCR) foi utilizando um termociclador Biorad CFX96 e a mistura SYBR Green (Invitrogen). Os primers para qPCR foram designados usando o software online Primer 3, como listado na Tabela 2. Foi utilizado

o controle endógeno TBP (proteína de ligação TATA) para normalizar a expressão dos genes selecionados. As eficiências do RT-qPCR para o gene alvo e para o controle de endógenos foram aproximadamente iguais, calculadas através de séries de diluição de DNAc. Reações de PCR em tempo real foram conduzidas como segue: depois do programa de pré-desnaturação e ativação da polimerase (4 min a 95°C), quarenta e quatro ciclos, cada um consistindo de 95°C por 10s e 60°C por 15s foram seguidos por um programa de curva de Melting (60 a 95°C com taxa de aquecimento de 0.1°C/s). Os controles negativos consistiram de poços nos quais cDNA foi substituído por água deionizada. O raio de expressão relativa (RQ) de mRNA foi calculado pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, na qual $-\Delta Ct$ expressa a diferença entre o número de ciclos (CT) dos genes alvo e o controle endógeno.

Tabela 2. Primers RT-qPCR e sequências respectivas.

Nome	5-3'	Primers
Renina	FW	GCTTTGGACGAATCTTGCTC
Renina	RV	ATGAATTCACCCCATTCAGC
ACE 1	FW	CCAACATCACGGAGGAGAAT
ACE 1	RV	CATACAGCTCCTTGGCCTTC
AT1	FW	GGAAACAGCTTGGTGGTGAT
AT1	RV	ATAAGTCAGCCAAGGCGAGA
Catalase	FW	CCTGTTGAAGAGGCAGGAAG
Catalase	RV	AGGATGGGTAATTGCCACTG
SOD	FW	GGCCAAGGGAGATGTTACAA
SOD	RV	GCTTGATAGCCTCCAGCAAC
GPx	FW	TGAGAAGTGCGAGGTGAATG
GPx	RV	CGGGGACCAAATGATGTACT
GR	FW	CAATTGGCATGTCATCAAGG
GR	RV	CTTCGATGTGGGACTTGGTT
β -Actin	FW	AGCCATGTACGTAGCCATCC
β -Actin	RV	ACCCTCATAGATGGGCACAG

Legenda: Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA 1); Receptor Tipo I de angiotensina II (AT1); Superóxido Dismutase (SOD); Glutathiona Peroxidase (GPx); Glutathiona Reductase (GR).

3.9 Análise Estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade das variâncias pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. As diferenças entre os grupos foram testadas pela análise de variância one-way (ANOVA), seguida pelo pós teste de Holm-Sidak. Em todos os casos, $P < 0.05$ foi estatisticamente considerado significativo (GraphPad Prism versão 6.02 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Pressão Arterial e Massa Corporal

No começo do experimento, não havia diferença estatisticamente significativa na PA entre os ratos normotensos, WKY (130.0 ± 2.2 , pressão arterial sistólica \pm desvio padrão) ou entre os ratos hipertensos, SHR ($143,8 \pm 1.7$, pressão arterial sistólica \pm desvio padrão). A única diferença estatística ocorreu entre os ratos normotensos, WKY e os ratos hipertensos, SHR ($P < 0,05$). Contudo, 2 semanas depois os animais hipertensos tratados com vitamina C (SHR + VC) tornaram-se normotensos, sem diferença significativa com os grupos normotensos WKY e WKY + VC. No início do experimento, os animais tiveram uma massa corporal similar. Ao fim, não existiam diferença na massa corpórea entre os grupos. Da mesma forma, não houve diferença na ingestão de alimentos entre eles (Figura 3 e Tabela 3).

Figura 3. Análise da pressão arterial sistólica (PAS).

Pressão Sistólica (mmHg)

Legenda: Animais hipertensos (SHR) iniciaram o experimento com diferenças estatísticas na PAS em comparação com seus controles (WKY), ($P < 0.05$). Duas semanas depois, os ratos hipertensos que receberam vitamina C mostraram uma PA similar aos animais controle. A partir da segunda semana, o grupo SHR mostrou diferenças estatísticas significantes dos outros três grupos, WKY, WKY + VC e SHR + VC, ($P < 0.05$). Este nível de pressão foi mantido por todo o experimento. Não existiram diferenças entre os grupos WKY e WKY + VC. Os casos marcados com um asterisco indicam $P < 0.05$. (One-way ANOVA e teste *post-hoc* do Holm-Sidak, $n = 10$ por grupo). Grupos: WKY, ratos Wistar Kyoto; WKY + VC, ratos Wistar Kyoto que receberam vitamina C; SHR, ratos espontaneamente hipertensos e SHR + VC, ratos espontaneamente hipertensos que receberam vitamina C.

4.2 Hipertrofia Cardíaca

A análise da hipertrofia é mostrada na tabela 3. Em todos os parâmetros, a hipertrofia do VE foi observada em ratos hipertensos (SHR) e o tratamento com vitamina C foi eficiente para diminuir a espessura desta parede. Assim, a área do cardiomiócito mostrou um acréscimo de 87,5% no grupo SHR, em comparação com o grupo WKY ($P < 0.05$) e os animais hipertensos tratados com vitamina C mostraram a área do cardiomiócito similar a dos animais controle (WKY).

Tabela 3. Ganho de peso corporal, ingestão de alimentos e estereologia.

Dados	Grupos			
	WKY	WYK+VC	SHR	SHR+VC
Massa corporal inicial (g)	257,6±11.9	249.0±20.9	258.1±10.9	254.4±19.6
Massa corporal final (g)	293.7±13.5	287.3±16.1	295.0±19.0	290.4±12.6
Ingestão (g/dia/rato)	23.4±1.9	23.0±1.8	22.7±1.4	23.2±1.6
MC/CT, (mg/mm)	30.3±2.1	32.0±3.4	37.6±3.13 ^[ab]	33.0±0.8 ^[c]
VE/CT, (mg/mm)	17.4±0.9	17.4±1.6	21.4±2.0 ^[ab]	17.8±2.1 ^[c]
V _{v[ct]} , (%)	25.2±6.9	26.2±4.7	36.7±2.9 ^[ab]	29.0±2.5 ^[c]
Área do cardiomiócito (µm ²)	359.0±111.2	327.4±51.9	673.2±94 ^[ab]	449.9±32.1 ^[bc]

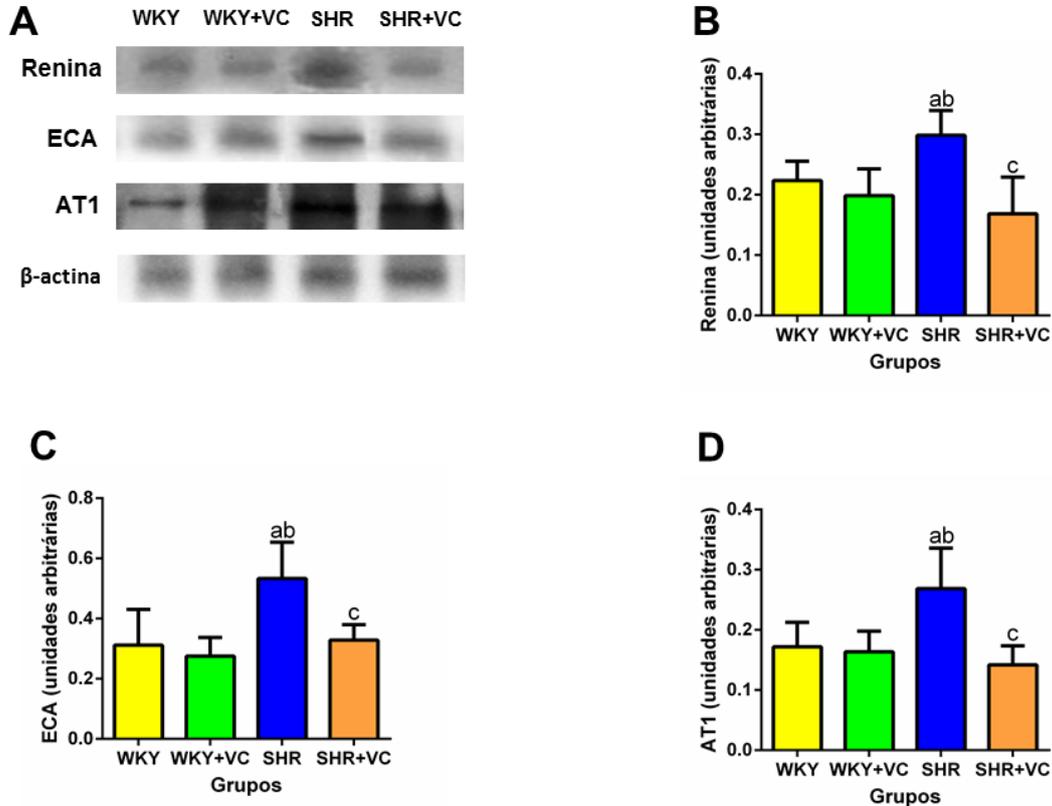
Legenda: Massa corporal inicial (g), massa corporal final (g), ingestão de alimento, massa cardíaca corrigida pelo comprimento da tibia (MC/CT), massa do ventrículo esquerdo corrigida pelo comprimento da tibia (VE/CT), densidade de volume do cardiomiócito (V_{v[ct]}) e área média do cardiomiócito. No decorrer do experimento, os animais tiveram um ganho de peso corporal similar. Não houve diferença na ingestão de comida entre os grupos. Os animais hipertensos (SHR) mostraram hipertrofia no ventrículo esquerdo em comparação aos seus homólogos(WKY) ($P < 0.05$). Os ratos hipertensos que receberam vitamina C mostraram uma massa no ventrículo esquerdo similar, comparando com seus homólogos (WKY) ($P > 0.05$). Os dados são apresentados em média e erro padrão da média. As diferenças foram analisadas com one-way ANOVA e com o teste post hoc do Holm-Sidak ($n = 10$ por grupo). Nos casos assinalados, $P < 0.05$, ^a quando comparado com WKY; ^b comparado com WKY + VC; ^c comparado com SHR. Grupos: WKY, ratos Wistar Kyoto; WKY + VC, ratos Wistar Kyoto que receberam vitamina C; SHR, ratos espontaneamente hipertensos e SHR + VC, ratos espontaneamente hipertensos que receberam vitamina C.

4.3 Sistema Renina-Angiotensina

4.3.1 Immunoblotting

A expressão da enzima renina (Figura 4) foi significativamente maior nos ratos hipertensos, grupo SHR (mais 34.1%, comparado com o grupo WKY, $P = 0.040$). Os ratos do grupo SHR + VC apresentaram redução desta enzima ($P < 0.001$, em comparação com o grupo SHR). Similarmente, a expressão da enzima ECA foi significativamente maior no grupo SHR (mais 70.8%, em comparação com o grupo WKY, $P = 0.0003$). O grupo SHR + VC apresentou um decréscimo na expressão desta enzima ($P = 0.005$, em comparação com o grupo SHR). A expressão da enzima AT1R foi significativamente maior no grupo SHR (56.6% a mais, comparado com o grupo WKY, $P = 0.006$). O grupo SHR + VC apresentou um decréscimo na expressão desta enzima ($P < 0.001$, em comparação com o grupo SHR).

Figura 4. Análise de renina, ECA, AT1R e beta-actina.



Legenda: Bandas representativas de *Western blot* para renina, ECA, AT1R e beta-actina (A) e suas análises de densitometria (B – renina; C – ECA e D – AT1).

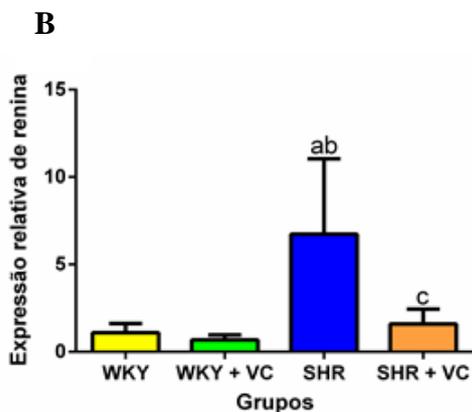
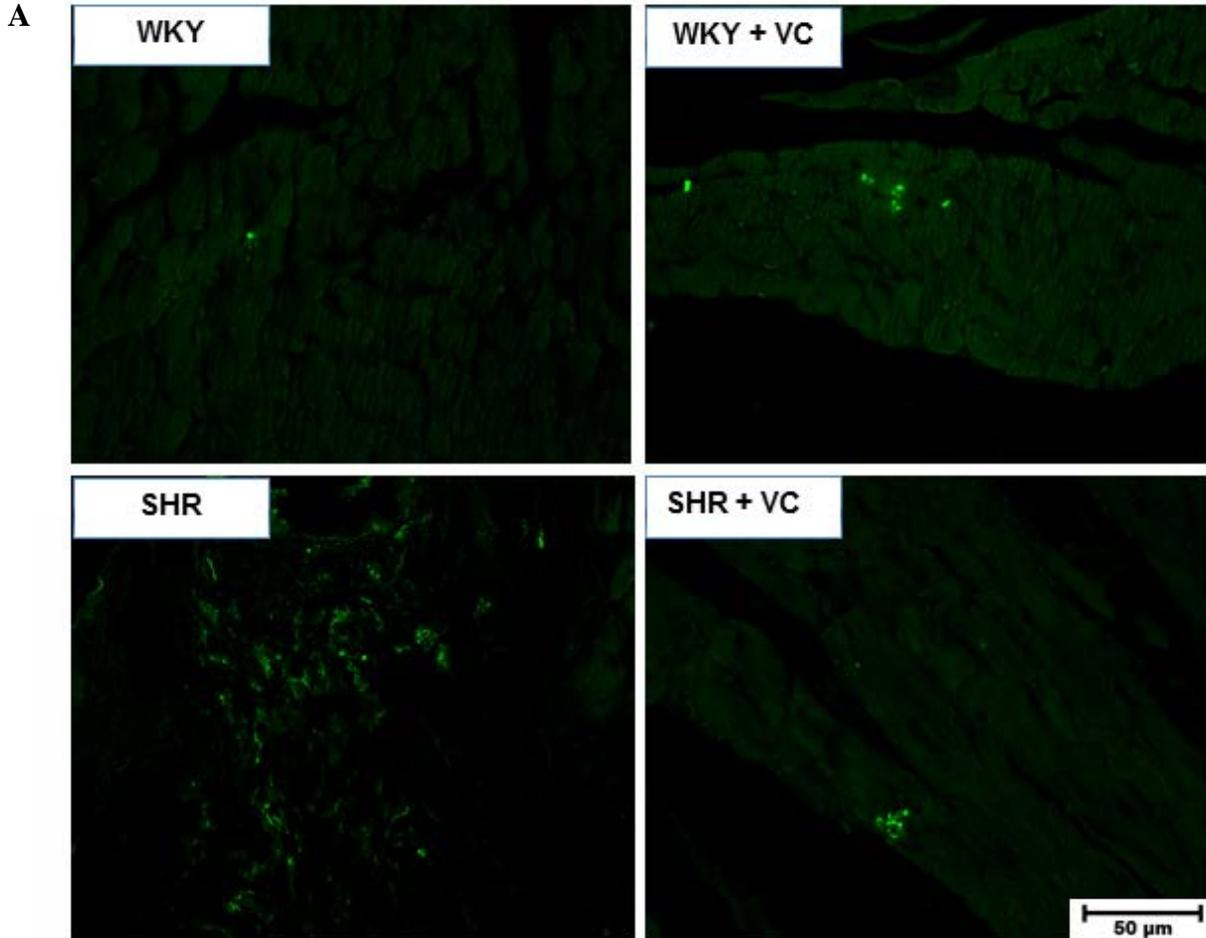
Nota: Os dados são mostrados como média e desvio padrão da média. As diferenças foram analisadas com one-way ANOVA e com o pós-teste de Holm-Sidak ($n = 6$ por grupo). Nos casos assinalados, $P < 0.05$, ^a quando comparado com WKY; ^b comparado com WKY + VC; ^c comparado com SHR. Grupos: WKY, ratos Wistar Kyoto; WKY + VC, ratos Wistar Kyoto que receberam vitamina C; SHR, ratos espontaneamente hipertensos e SHR + VC, ratos espontaneamente hipertensos que receberam vitamina C.

4.3.2 RT-qPCR

Considerando a expressão relativa de RNAm para renina, foi encontrado uma expressão elevada deste gene no grupo SHR ($P = 0.001$, comparado com o grupo WKY). O tratamento antioxidante foi eficiente em reduzir a expressão deste gene, deixando-o no mesmo nível do grupo WKY (Figura 5).

4.3.3 Microscopia Confocal de Varrimento a Laser (Fig. 5)

Figura 5. Análise da renina no miocárdio.



Legenda: Análise do miocárdio para expressão de renina por técnicas de RT-qPCR (A) e de Microscopia confocal de varrimento a laser (B).

Nota: Os valores médios foram medidos, e um carregamento igual de proteína foi confirmado pelos blots com anticorpos de beta-actina. Os dados são mostrados como média e desvio padrão da média. As diferenças foram analisadas com one-way ANOVA e com o teste post hoc do Holm-Sidak ($n = 6$ por grupo). Nos casos assinalados, $P < 0.05$, ^a quando comparado com WKY; ^b comparado com WKY + VC; ^c comparado com SHR. Grupos: WKY, ratos Wistar Kyoto; WKY + VC, ratos Wistar Kyoto que receberam vitamina C; SHR, ratos espontaneamente hipertensos e

A Imunofluorescência para renina no coração confirmou as descobertas do WB e PCR, nos quais a renina está elevada no grupo SHR mas não no SHR + VC (Figura 5).

4.4 Peptídeo Natriurético Atrial

4.4.1 Immunoblotting

A expressão de peptídeo natriurético atrial (Figura 6) foi significativamente maior em ratos hipertensos, grupo SHR (mais 103,4%, comparado com o grupo WKY, $P < 0.001$). Os ratos do grupo SHR + VC apresentaram decréscimo na expressão desta enzima ($P < 0.001$, em comparação com o grupo SHR).

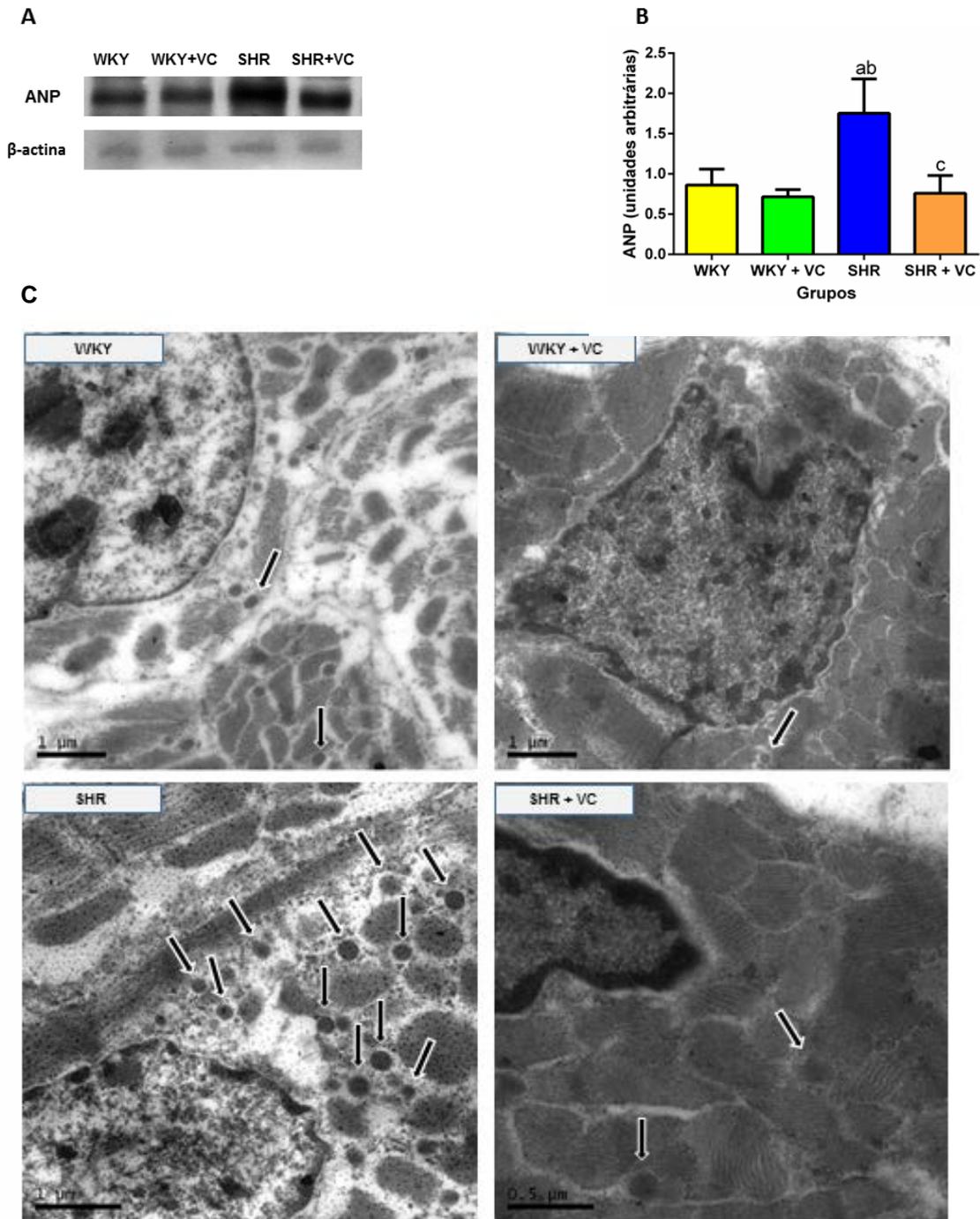
4.4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A ultraestrutura mostrou grande quantidade de grânulos ANP no grupo SHR e o tratamento com vitamina C foi efetivo em reduzir estes grânulos (Figura 6).

4.4.3 Microscopia Confocal com Varrimento a Laser

A imunofluorescência do ANP no miocárdio atrial direito confirmou as descobertas do miocárdio para a expressão de ANP do WB, onde o ANP se manteve elevado em SHR mas não no grupo SHR + VC (Figura 7).

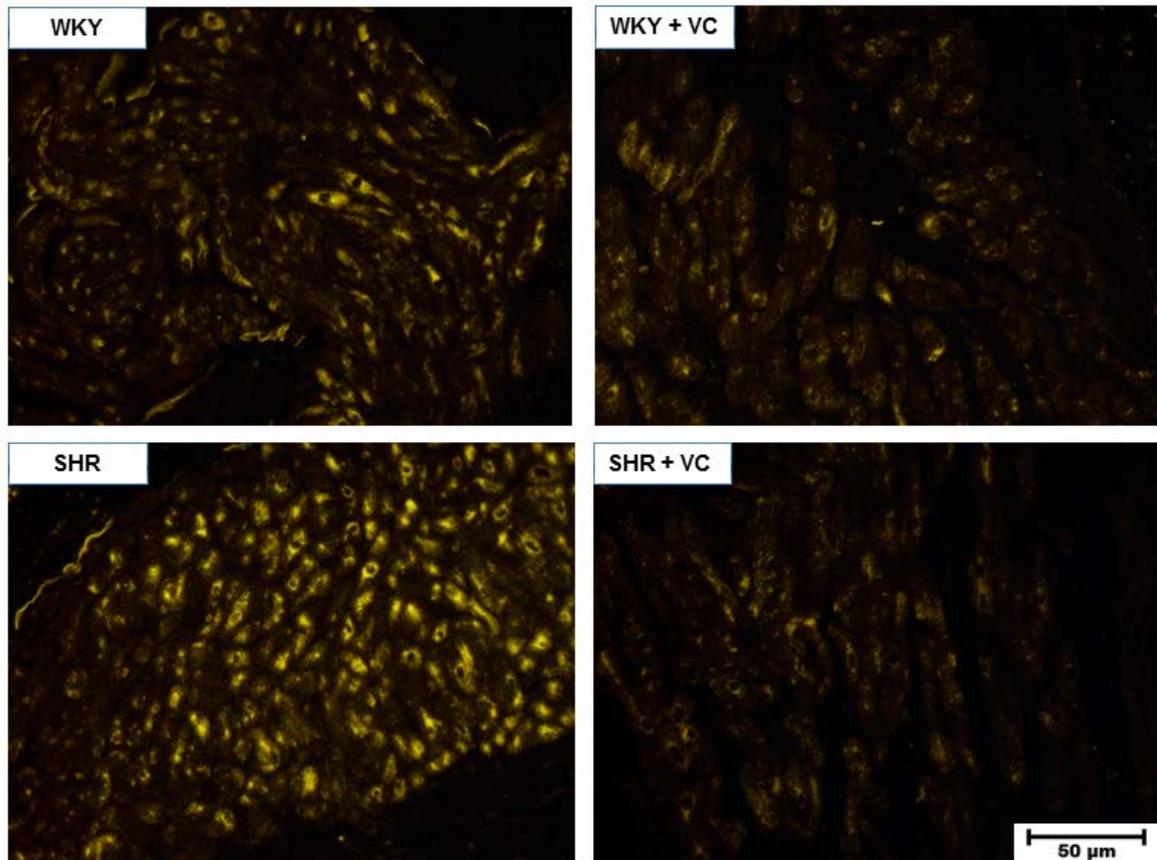
Figura 6. Análise ultraestrutural e molecular do ANP.



Legenda: Bandas representativas de *Western blot* para ANP e beta-actina (A), análise de densitometria de ANP (B) e Eletromicrografias dos cardiomiócitos da aurícula direita com grânulos de ANP (C).

Nota: Um acréscimo na densidade de grânulos ANP (setas) foi observado no grupo SHR. Os dados são mostrados como média e desvio padrão da média. As diferenças foram analisadas com one-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak (com $n = 6$, por grupo). Nos casos assinalados, $P < 0.05$, ^a quando comparado com WKY; ^b comparado com WKY + VC; ^c comparado com SHR. Grupos: WKY, ratos Wistar Kyoto; WKY + VC, ratos Wistar Kyoto que receberam vitamina C; SHR, ratos espontaneamente hipertensos e SHR + VC, ratos espontaneamente hipertensos que receberam vitamina C.

Figura 7. Análise Imunohistoquímica do ANP.



Legenda: Microscopia confocal de varrimento a laser de ANP nos cardiomiócitos da aurícula direita.

Nota: Um acréscimo na densidade de grânulos ANP (setas) foi observado no grupo SHR ($n = 6$, por grupo). Grupos: WKY, ratos Wistar Kyoto; WKY + VC, ratos Wistar Kyoto que receberam vitamina C; SHR, ratos espontaneamente hipertensos e SHR + VC, ratos espontaneamente hipertensos que receberam vitamina C.

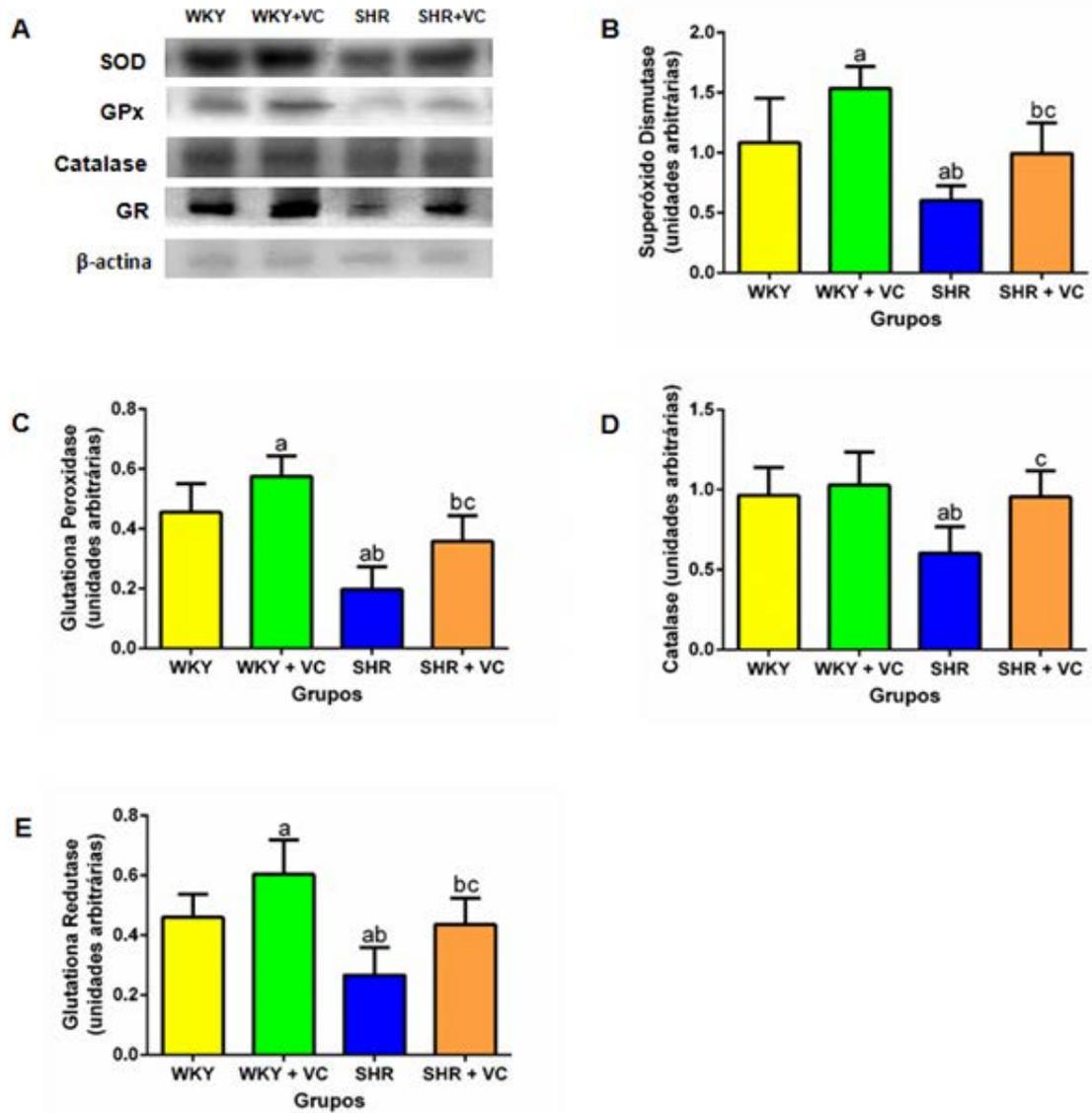
4.5 Estresse Oxidativo

4.5.1 Immunoblotting

A expressão da enzima superóxido dismutase (Figura 8) foi significativamente menor em ratos hipertensos, grupo SHR (44.3% a menos, em comparação ao grupo WKY, $P = 0.013$). Ambos os grupos tratados apresentaram elevação na expressão desta enzima ($P = 0.015$ para o grupo WKY + VC em comparação ao grupo WKY e $P = 0.026$ para o grupo SHR + VC em comparação ao grupo SHR). Similarmente, a expressão da enzima citrato sintase foi significativamente menor em ratos hipertensos, grupo SHR (63.3% a menos, se

comparado ao grupo WKY, $P = 0.037$). Ambos os grupos tratados apresentaram uma elevação na expressão desta enzima ($P = 0.037$ para o grupo WKY + VC em comparação com o grupo WKY e $P < 0.001$ para o grupo SHR + VC em comparação com o grupo SHR). Além disso, a expressão da enzima glutathiona peroxidase foi significativamente menor em ratos hipertensos, grupo SHR (56.5% menor, comparado ao grupo WKY, $P < 0.001$). Ambos os grupos tratados apresentaram uma elevação na expressão desta enzima ($P = 0.039$ para o grupo WKY + VC em comparação ao grupo WKY e $P = 0.009$ para o grupo SHR + VC em comparação com o grupo SHR). A expressão da enzima catalase foi significativamente menor em ratos hipertensos, grupo SHR (37.6% a menos, comparado ao grupo WKY, $P = 0.011$). Os ratos hipertensos tratados com vitamina C (grupo SHR + VC) apresentaram uma elevação na expressão da enzima catalase ($P = 0.011$, em comparação com o grupo SHR). Também, a expressão da enzima glutathiona reduase foi significativamente menor em ratos hipertensos, grupo SHR (64.2% menor, comparado com o grupo WKY, $P = 0.010$). Ambos os grupos tratados apresentaram elevação na expressão desta enzima ($P = 0.031$ para o grupo WKY + VC em comparação com o grupo WKY e $P < 0.023$ para o grupo SHR + VC em comparação com o grupo SHR).

Figura 8. Análise do estresse oxidativo através da expressão protéica.



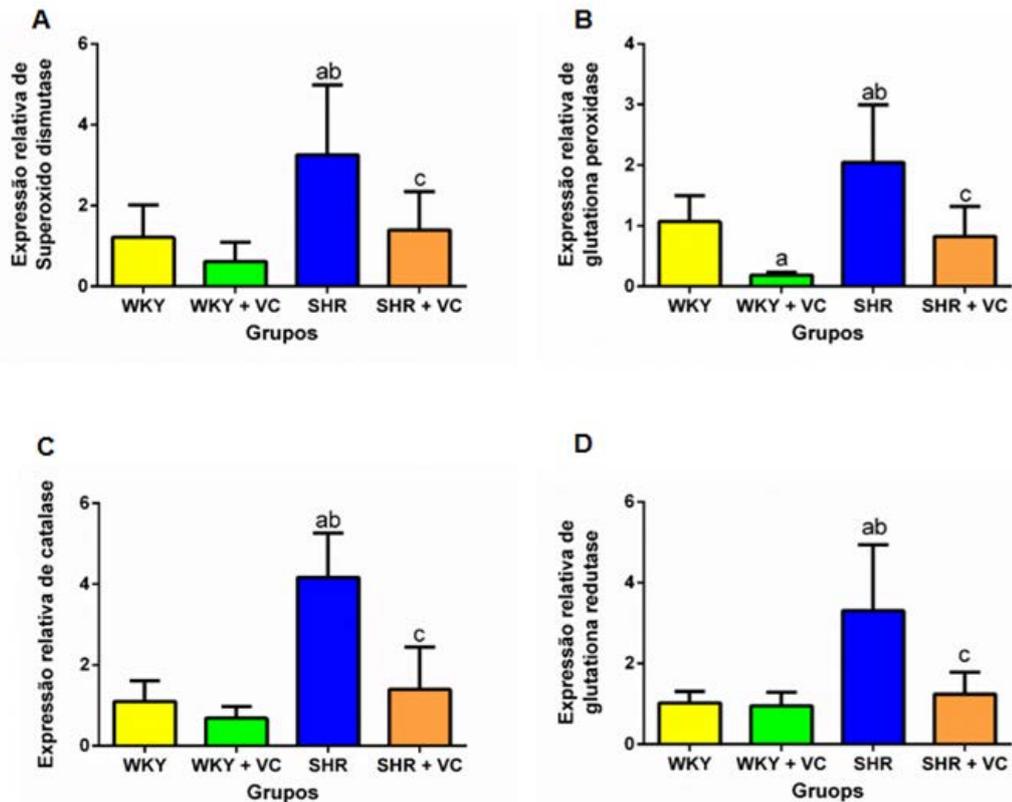
Legenda: Bandas representativas de *Western blot* para beta-actina (A) e suas análises de densitometria (B – Superóxido Dismutase; C – Glutaciona Peroxidase; D – Catalase e E – Glutaciona Redutase).

Nota: Os dados são mostrados como média e desvio padrão da média. As diferenças foram analisadas com one-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak ($n = 6$ por grupo). Nos casos assinalados, $P < 0.05$, ^a quando comparado com WKY; ^b comparado com WKY + VC; ^c comparado com SHR. Grupos: WKY, ratos Wistar Kyoto; WKY + VC, ratos Wistar Kyoto que receberam vitamina C; SHR, ratos espontaneamente hipertensos e SHR + VC, ratos espontaneamente hipertensos que receberam vitamina C.

4.5.2 RT-qPCR

Considerando a expressão relativa de RNAm das enzimas superóxido dismutase, citrato sintase, glutathiona peroxidase, catalase e glutathiona redutase (Figura 9), foi verificada uma expressão elevada deste gene nos grupos SHR ($P = 0.020$, $P = 0.002$, $P = 0.032$, $P < 0.001$ e $P = 0.001$, respectivamente, comparado com seus respectivos homólogos, grupos WKY). O tratamento antioxidante foi efetivo em reduzir a expressão destes genes, deixando-os no mesmo do WKY.

Figura 9. Análise do estresse oxidativo através da expressão gênica.



Legenda: Reação de Cadeia Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) de coração para Superoxide Dismutase (A), Glutathione Peroxidase (B), Catalase (C), and Glutathione Reductase (F).

Nota: A taxa de expressão relativa (RQ) do mRNA foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, na qual $-\Delta Ct$ expressa a diferença entre o número de ciclos (CT) dos genes alvo e o controle endógeno. As diferenças foram analisadas com one-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak ($n = 6$ por grupo). Nos casos assinalados, $P < 0.05$, ^a quando comparado com WKY; ^b comparado com WKY + VC; ^c comparado com SHR. Grupos: WKY, ratos Wistar Kyoto; WKY + VC, ratos Wistar Kyoto que receberam vitamina C; SHR, ratos espontaneamente hipertensos e SHR + VC, ratos espontaneamente hipertensos que receberam vitamina C

5 DISCUSSÃO

Este experimento estudou os elementos do SRA e do ANP em SHR, indicando as mudanças depois do tratamento com o antioxidante Vitamina C. O tratamento antioxidante foi eficiente na normalização da PA no SHR, reduziu a área média do cardiomiócito, evitou a HVE e o aumento da MC. O RNAm que codifica a renina, bem como sua expressão de renina mostraram-se estar elevados em SHR. Além disso, foi identificado um acréscimo da enzima ECA e do receptor AT1. Os ratos tratados com antioxidante reduziram a renina, a ECA e o nível de AT1. Os grânulos de ANP aumentaram em ratos hipertensos, e o tratamento com vitamina C foi eficaz para reduzi-lo ao nível normal. A expressão das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GR mostrou-se reduzida, embora seu RNAm tenha sido elevado. O tratamento com vitamina C normalizou tanto o RNAm quanto expressão das enzimas.

O grupo SHR revelou PA elevada, em comparação com o grupo WKY. A razão para a HAS é, provavelmente, multifatorial, sem uma causa primária definida. Alterações genéticas nesta cepa parecem induzir um acréscimo da pressão modulada pela vasoconstrição arteriolar [132] e uma mudança no fluxo renal [133]. Este efeito pode ser investigado através do mecanismo do óxido-nítrico [134, 135], pela contribuição dos canais K(Ca) [132], do SRA [136], do sistema nervoso simpático cardíaco [7], do EOx [137], do ANP [138] e dezenas de outras proteínas envolvidas na regulação da PA [139]. Contudo, está bem estabelecido que a hipertrofia cardíaca e o aumento da área do cardiomiócito, por vezes também relatados em experimentos prévios [140, 141], são resultantes da sobrecarga de PA. O elevado consumo de enzimas antioxidantes observado neste experimento já é capaz de explicar, ao menos parcialmente, a elevação da pressão arterial em animais espontaneamente hipertensos. A natureza altamente reativa das EROs apresenta efeitos potenciais deletérios na estrutura e integridade celular, e o aumento do EOx contribui para o desenvolvimento e progressão de numerosas DCV, incluindo hipertensão [142]. O tratamento com ácido ascórbico diminuiu o EOx, reduzindo EROs, o que implica em proteção tecidual. Esta proteção reduz a vasoconstrição e a HAS. Em baixos níveis de pressão arterial, não se encontrou HVE. Estes estudos estão de acordo com experimentos prévios [143, 144].

Quando as enzimas renina e ECA e o receptor AT1 estão elevados, é um indício de que o SRA foi quem induziu a HAS. Isto pode então indicar que o SRA induz, ao menos parcialmente, a HAS em SHR. Para confirmar a robustez dos dados, foi realizada a avaliação do RNAm para a renina (RT-PCR), quantificação (western blot) e visualização (microscopia

confocal de varrimento a laser) de sua expressão proteica. Todos confirmaram o aumento de renina em animais SHR. Existe um estudo clássico que também encontrou aumento na concentração, atividade e reatividade da renina plasmática em SHR [6]. Além disso, um trabalho mais recente também admite a contribuição do sistema renina-angiotensina na indução de hipertensão em SHR, resultados estes que sugerem que o sistema nervoso simpático (SNS) o SRA em SHR podem contribuir para a patogênese da hipertensão e do HVE em estágios precoces e tardios, respectivamente [7]. A renina não apenas permaneceu elevada em animais SHR, mas foi reduzida em terapia anti-hipertensiva [145]. Outro estudo, analisando o efeito diferencial do ácido tetradeciltioacético e do SRA na pressão arterial em SHR e em ratos do modelo de hipertensão de 2 rins um clipe (2R1C), encontrou níveis normais ou reduzidos de renina em SHR [8]. Altos níveis de renina, bem como outros elementos fundamentais no SRA podem explicar, ao menos parcialmente, a manutenção da pressão arterial elevada. Mas é provável que este aumento na renina não seja a causa primária da hipertensão, mas um efeito colateral de vasoconstrição, que é desencadeada primeiramente pelos canais ativos de cálcio (Ca^{2+} -ATPase) da membrana plasmática, entendimento já aventado em um trabalho prévio com SHR [146]. O mecanismo pode ser assim explicado: O estresse oxidativo agride o endotélio, inclusive o Ca^{2+} -ATPase. Isso provoca o influxo de na membrana das células do músculo liso, provocando despolarização que induz a contração arteriolar. Isto, por si mesmo, é suficiente para elevar a PA. Mas a vasoconstrição renal pode induzir a produção de renina devido ao baixo fluxo na mácula densa. Este mecanismo justificaria o aumento da produção e expressão de renina pelo complexo justaglomerular, resultando uma maior expressão do ECA e AT1.

A redução dos níveis de renina no SHR tratado com AA evidencia a ação protetora do antioxidante sobre o endotélio. Em estudos para avaliar a constrição arterial e suplementação de vitamina C, foi observado no SHR uma redução do relaxamento endotelial modulado pela acetilcolina quando comparado com seu controle Kyoto. Contudo, esse relaxamento endotelial modulado pela acetilcolina foi normalizado em SHR tratado com vitamina C [147]. A ação vasodilatadora induz tanto uma redução direta da PA, quanto aumenta o fluxo sanguíneo renal, contribuindo para a redução de renina e a normalização da HAS.

Atualmente tem sido feito uma forte associação entre ANP e EOX. As EROs desempenham um importante papel em DCV, tal como hipertensão e insuficiência cardíaca [4]. O que ainda se tem questionado é em que condições o EOX é capaz de contribuir para a produção de ANP pelo cardiomiócito. Nossos resultados mostraram inequivocamente um acréscimo significativo do hormônio hipotensor em animais hipertensos com EOX. Os

grânulos de ANP foram reduzidos pelo tratamento com vitamina C. Estes resultados mostram-nos dois fatos importantes: Primeiro, que o EOX pode estar representando parte de uma sinalização química para a produção de ANP pelo cardiomiócito; Segundo, está claro que em SHR o ANP não contribui para hipertensão, mas tenta atenuá-la. Nossos resultados corroboram outros estudos investigando o papel endógeno das EROs na hemodinâmica atrial, na secreção ANP nos batimentos dos átrios isolados perfundidos de ratos. Ambos concluindo que o EOX aumenta a secreção do ANP nos átrios isolados de ratos [148].

Houve um aumento significativo na produção de enzimas antioxidantes, visto pelo aumento do seu RNAm. Entretanto, a expressão enzimática se encontra substancialmente reduzida. Este resultado aponta para um alto consumo de enzimas antioxidantes, um importante fator de proteção para o corpo. Alguns estudos, inclusive este, avaliando o comportamento destas enzimas em situações de estresse, têm convergindo ao entendimento de que estas enzimas têm uma alta produção para evitar oxidação excessiva das membranas celulares [143]. Isto reduz a HAS, pelo menos parcialmente, por diminuir a expressão das enzimas clássicas do SRA (renina e ECA) e do receptor AT1.

6 CONCLUSÃO

O estresse oxidativo nos SHR representou a inabilidade das enzimas antioxidantes em evitar uma ação nociva nos tecidos. Esta defesa debilitada do antioxidante provocou hipertrofia cardíaca, aumentou a pressão arterial sistólica e os níveis de renina e de ANP. Em ratos espontaneamente hipertensos, o estresse oxidativo precede a hipertensão, pois as espécies reativas de oxigênio provocaram aumento da secreção de renina e os altos níveis desta enzima podem justificar a hipertensão e a hipertrofia cardíaca. Os resultados também mostraram que o tratamento com antioxidante (vitamina C) reduziu o estresse oxidativo e normalizou a PA, pelo menos parcialmente, pela redução da taxa de renina. Este estresse oxidativo pode está envolvidas no mecanismo de sinalização para o aumento da expressão de ANP nos miócitos atriais. Neste modelo de hipertensão, o ANP atua de forma homeostática, abrandando a elevação da pressão arterial.

REFERÊNCIAS

1. Zhang, B., et al., The Association between the Polymorphisms in a Sodium Channel Gene SCN7A and Essential Hypertension: A Case-Control Study in the Northern Han Chinese. *Ann Hum Genet*, 2015. 79(1): p. 28-36.
2. Wu, Z., et al., Maternal treatment of spontaneously hypertensive rats with pentaerythritol tetranitrate reduces blood pressure in female offspring. *Hypertension*, 2015. 65(1): p. 232-7.
3. Ferrari, M.F., M.K. Raizada, and D.R. Fior-Chadi, Differential regulation of the renin-angiotensin system by nicotine in WKY and SHR glia. *J Mol Neurosci*, 2008. 35(2): p. 151-60.
4. De Vito, P., et al., Atrial natriuretic peptide and oxidative stress. *Peptides*, 2010. 31(7): p. 1412-9.
5. Simao, S., et al., Age-related changes in renal expression of oxidant and antioxidant enzymes and oxidative stress markers in male SHR and WKY rats. *Exp Gerontol*, 2011. 46(6): p. 468-74.
6. Bagby, S.P., W.J. McDonald, and R.D. Mass, Serial renin-angiotensin studies in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. Transition from normal- to high-renin status during the established phase of spontaneous hypertension. *Hypertension*, 1979. 1(4): p. 347-54.
7. Dang, A., et al., The role of the renin-angiotensin and cardiac sympathetic nervous systems in the development of hypertension and left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*, 1999. 22(3): p. 217-21.
8. Bivol, L.M., R.K. Berge, and B.M. Iversen, Differential effect of tetradecythioacetic acid on the renin-angiotensin system and blood pressure in SHR and 2-kidney, 1-clip hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. 293(3): p. F839-45.
9. Costa, M.V., et al., Diets rich in saturated fat and/or salt differentially modulate atrial natriuretic peptide and renin expression in C57BL/6 mice. *Eur J Nutr*, 2012. 51(1): p. 89-96.
10. Zhan, C.D., et al., Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. *J Hypertens*, 2004. 22(10): p. 2025-33.
11. Dong, X., et al., MiR-214 promotes the alcohol-induced oxidative stress via down-regulation of glutathione reductase and cytochrome P450 oxidoreductase in liver cells. *Alcohol Clin Exp Res*, 2014. 38(1): p. 68-77.
12. Duffy, S.J., et al., Treatment of hypertension with ascorbic acid. *Lancet*, 1999. 354(9195): p. 2048-9.
13. Donpunha, W., et al., Protective effect of ascorbic acid on cadmium-induced hypertension and vascular dysfunction in mice. *Biometals*, 2011. 24(1): p. 105-15.
14. Miloradovic, Z., et al., Comparative effects of L-arginine and vitamin C pretreatment in SHR with induced postischemic acute renal failure. *Gen Physiol Biophys*, 2009. 28 Spec No: p. 105-11.
15. Roush, G.C., et al., Prognostic impact of sex-ambulatory blood pressure interactions in 10 cohorts of 17 312 patients diagnosed with hypertension: systematic review and meta-analysis. *J Hypertens*, 2015. 33(2): p. 212-20.
16. FitzGerald, R.J., B.A. Murray, and D.J. Walsh, Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr*, 2004. 134(4): p. 980S-8S.

17. Bernstein, R.S., et al., Diabetes and hypertension prevalence in homeless adults in the United States: a systematic review and meta-analysis. *Am J Public Health*, 2015. 105(2): p. e46-60.
18. Modan, M., et al., Cardiovascular disease in men. *Circulation*, 1992. 85(3): p. 1220.
19. Mayet, J. and A. Hughes, Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. *Heart*, 2003. 89(9): p. 1104-9.
20. Jones, D.W. and J.E. Hall, Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure and evidence from new hypertension trials. *Hypertension*, 2004. 43(1): p. 1-3.
21. Kenchaiah, S. and M.A. Pfeffer, Cardiac remodeling in systemic hypertension. *Med Clin North Am*, 2004. 88(1): p. 115-30.
22. Zheng, Z., et al., A systematic review and meta-analysis of aliskiren and angiotension receptor blockers in the management of essential hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2010.
23. Zhang, K., et al., Catecholamine storage vesicles: role of core protein genetic polymorphisms in hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 2011. 13(1): p. 36-45.
24. Mourad, J.J. and S. Le Jeune, Evaluation of high dose of perindopril/indapamide fixed combination in reducing blood pressure and improving end-organ protection in hypertensive patients. *Curr Med Res Opin*, 2009. 25(9): p. 2271-80.
25. Chaturvedi, S., The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7): is it really practical? *Natl Med J India*, 2004. 17(4): p. 227.
26. Gupta, S., et al., Correlation of renin angiotensin system (RAS) candidate gene polymorphisms with response to Ramipril in patients with essential hypertension. *J Postgrad Med*, 2015. 61(1): p. 21-6.
27. Jeunemaitre, X., et al., Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*, 1992. 71(1): p. 169-80.
28. Hasimu, B., et al., Haplotype analysis of the human renin gene and essential hypertension. *Hypertension*, 2003. 41(2): p. 308-12.
29. Bonnardeaux, A., et al., Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension*, 1994. 24(1): p. 63-9.
30. Nalogowska-Glosnicka, K., et al., Angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism is associated with the increased risk of pregnancy-induced hypertension. *Med Sci Monit*, 2000. 6(3): p. 523-9.
31. Davies, E., et al., Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2. *Hypertension*, 1999. 33(2): p. 703-7.
32. Carretero, O.A. and S. Oparil, Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*, 2000. 101(3): p. 329-35.
33. Okamoto, K. and K. Aoki, Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, 1963. 27: p. 282-93.
34. Trippodo, N.C. and E.D. Frohlich, Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res*, 1981. 48(3): p. 309-19.
35. Potts, J.T., K.P. McKeown, and A.A. Shoukas, Reduction in arterial compliance alters carotid baroreflex control of cardiac output in a model of hypertension. *Am J Physiol*, 1998. 274(4 Pt 2): p. H1121-31.
36. Atef, M.E. and M.B. Anand-Srivastava, Enhanced expression of Gqalpha and PLC-beta1 proteins contributes to vascular smooth muscle cell hypertrophy in SHR: role of endogenous angiotensin II and endothelin-1. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014. 307(1): p. C97-106.

37. Frohlich, E.D., The adrenergic nervous system and hypertension state of the art. *Mayo Clin Proc*, 1977. 52(6): p. 361-8.
38. Dickhout, J.G. and R.M. Lee, Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*, 1998. 274(3 Pt 2): p. H794-800.
39. Judy, W.V., et al., Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res*, 1976. 38(6 Suppl 2): p. 21-9.
40. Nakagaki, T., et al., Role of angiotensin-(1-7) in rostral ventrolateral medulla in blood pressure regulation via sympathetic nerve activity in Wistar-Kyoto and spontaneous hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*, 2011. 33(4): p. 223-30.
41. Folkow, B., et al., Importance of adaptive changes in vascular design for establishment of primary hypertension, studied in man and in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*, 1973. 32: p. Suppl 1:2-16.
42. Overbeck, H.W., Vascular responses to cations, osmolality, and angiotensin in renal hypertensive dogs. *Am J Physiol*, 1972. 223(6): p. 1358-64.
43. le Noble, J.L., et al., Microvascular alterations in adult conscious spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1990. 15(4): p. 415-9.
44. van Gorp, A.W., et al., In spontaneously hypertensive rats alterations in aortic wall properties precede development of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. 278(4): p. H1241-7.
45. Lundin, S., S.E. Ricksten, and P. Thoren, Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. *Acta Physiol Scand*, 1984. 120(2): p. 265-72.
46. Touw, K.B., et al., Contribution of the sympathetic nervous system to vascular resistance in conscious young and adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1980. 2(4): p. 408-18.
47. Dzau, V.J. and R.E. Pratt, Renin-angiotensin system: biology, physiology and pharmacology, in *Handbook of Experimental Cardiology*, E. Haber, et al., Editors. 1986, Raven Press: New York. p. pp. 1631-61.
48. Bader, M. and D. Ganten, Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med*, 2008. 86(6): p. 615-21.
49. Peach, M.J., Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiological reviews*, 1977. 57(2): p. 313-70.
50. Dinh, D.T., et al., Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)*, 2001. 100(5): p. 481-92.
51. Ames, R.P., Insights from Laragh's review course: the role of the renin-angiotensin system in blood pressure regulation. *Am J Hypertens*, 2002. 15(7 Pt 1): p. 653-4.
52. Hirata, Y., D. Fukuda, and M. Sata, [Critical role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis]. *Nippon Rinsho*, 2011. 69(1): p. 55-9.
53. van Kats, J.P., et al., Use of a biological peptide pump to study chronic peptide hormone action in transgenic mice. Direct and indirect effects of angiotensin II on the heart. *J Biol Chem*, 2001. 276(47): p. 44012-7.
54. van Kats, J.P., et al., Subcellular localization of angiotensin II in kidney and adrenal. *J Hypertens*, 2001. 19(3 Pt 2): p. 583-9.
55. van Kats, J.P., et al., Intrarenal angiotensin II: interstitial and cellular levels and site of production. *Kidney Int*, 2001. 60(6): p. 2311-7.
56. Berl, T., Review: renal protection by inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2009. 10(1): p. 1-8.
57. Cleland, S.J. and J.L. Reid, The renin-angiotensin system and the heart: a historical review. *Heart*, 1996. 76(3 Suppl 3): p. 7-12.

58. Carey, R.M. and H.M. Siragy, Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*, 2003. 24(3): p. 261-71.
59. Fegan, P.G., et al., Renin-angiotensin-aldosterone system blockade and urinary albumin excretion in community-based patients with Type 2 diabetes: The Fremantle Diabetes Study. *Diabet Med*, 2011.
60. Eyileten, T., et al., Effect of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) blockade on visfatin levels in diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*, 2010. 15(2): p. 225-9.
61. Campbell, D.J., Critical review of prorenin and (pro)renin receptor research. *Hypertension*, 2008. 51(5): p. 1259-64.
62. Meade, T., Review: Plasma renin and the incidence of cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2010. 11(2): p. 91-8.
63. Jackson, E.K., R.A. Branch, and J.A. Oates, Participation of prostaglandins in the control of renin release. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 1982. 10: p. 255-76.
64. Beierwaltes, W.H., D.L. Potter, and E.G. Shesely, Renal baroreceptor-stimulated renin in the eNOS knockout mouse. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. 282(1): p. F59-64.
65. Desaulles, E., et al., Effect of catecholamines on renin release in vitro. *Biomedicine*, 1975. 22(5): p. 433-9.
66. Sadjadi, J., et al., Angiotensin II exerts positive feedback on the intrarenal renin-angiotensin system by an angiotensin converting enzyme-dependent mechanism. *J Surg Res*, 2005. 129(2): p. 272-7.
67. de Bold, A.J., et al., A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci*, 1981. 28(1): p. 89-94.
68. Zhao, D., K.N. Pandey, and L.G. Navar, ANP-mediated inhibition of distal nephron fractional sodium reabsorption in wild-type and mice overexpressing natriuretic peptide receptor. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010. 298(1): p. F103-108.
69. Axelsson, J., A. Rippe, and B. Rippe, Transient and sustained increases in glomerular permeability following ANP infusion in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011. 300(1): p. F24-30.
70. Jamieson, J.D. and G.E. Palade, Specific Granules in Atrial Muscle Cells. *J Cell Biol*, 1964. 23: p. 151-72.
71. Gauer, O.H., J.P. Henry, and H.O. Sieker, Cardiac receptors and fluid volume control. *Prog Cardiovasc Dis*, 1961. 4: p. 1-26.
72. De Wardener, H.E., et al., Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the administration of intravenous saline in the dog. *Clin Sci*, 1961. 21: p. 249-58.
73. Garcia, R., et al., Relationship of specific granules to the natriuretic and diuretic activity of rat atria. *Experientia*, 1982. 38(9): p. 1071-3.
74. Yamada, H., et al., Immunohistochemical localization of atrial natriuretic polypeptide (ANP) in human atrial and ventricular myocardiocytes. *Histochemistry*, 1988. 89(5): p. 411-3.
75. Maack, T., et al., Atrial natriuretic factor: structure and functional properties. *Kidney Int*, 1985. 27(4): p. 607-15.
76. Hamet, P. and J. Tremblay, Atrial natriuretic factor, the kidney and high blood pressure. *Clin Invest Med*, 1989. 12(5): p. 329-35.
77. Lieberthal, W., Effects of atrial natriuretic factor in ischemic renal injury: studies in the isolated erythrocyte-perfused rat kidney. *Clin Res*, 1991. 39(2): p. 157-65.

78. Winkvist, R.J., The relaxant effects of atrial natriuretic factor on vascular smooth muscle. *Life Sci*, 1985. 37(12): p. 1081-7.
79. Baldini, P.M., et al., Atrial natriuretic factor inhibits mitogen-induced growth in aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 2002. 193(1): p. 103-9.
80. Moro, C., et al., Atrial natriuretic peptide inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetologia*, 2007. 50(5): p. 1038-47.
81. Dickey, D.M., et al., Differential regulation of membrane guanylyl cyclases in congestive heart failure: natriuretic peptide receptor (NPR)-B, Not NPR-A, is the predominant natriuretic peptide receptor in the failing heart. *Endocrinology*, 2007. 148(7): p. 3518-22.
82. Yuan, K., et al., Upregulation of ANP and NPR-C mRNA in the kidney and heart of eNOS knockout mice. *Peptides*, 2010. 31(7): p. 1319-25.
83. Oltman, C.L., et al., Role of the effect of inhibition of neutral endopeptidase on vascular and neural complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*, 2011. 650(2-3): p. 556-62.
84. Davidson, E.P., et al., Effect of Treatment of Sprague Dawley Rats with AVE7688, Enalapril, or Candoxatril on Diet-Induced Obesity. *J Obes*, 2011. 2011.
85. Flynn, T.G., M.L. de Bold, and A.J. de Bold, The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983. 117(3): p. 859-65.
86. Atlas, S.A., et al., Purification, sequencing and synthesis of natriuretic and vasoactive rat atrial peptide. *Nature*, 1984. 309(5970): p. 717-9.
87. Currie, M.G., et al., Purification and sequence analysis of bioactive atrial peptides (atriopeptins). *Science*, 1984. 223(4631): p. 67-9.
88. Mifune, H., et al., Fine structure of atrial natriuretic peptide (ANP)-granules in the atrial cardiocytes in the hamster, guinea pig, rabbit, cat and dog. *Jikken Dobutsu*, 1992. 41(3): p. 321-8.
89. Mifune, H., et al., Fine structure of atrial natriuretic peptide (ANP)-granules in the atrial cardiocytes of the mouse, rat and Mongolian gerbil. *Jikken Dobutsu*, 1991. 40(2): p. 183-93.
90. Mifune, H., et al., Fine structure of atrial natriuretic peptide(ANP)-granules in the atrial cardiocytes in the pig, cattle and horse. *J Vet Med Sci*, 1991. 53(4): p. 561-8.
91. Konno, M., et al., Modeling of tRNA-assisted mechanism of Arg activation based on a structure of Arg-tRNA synthetase, tRNA, and an ATP analog (ANP). *FEBS J*, 2009. 276(17): p. 4763-79.
92. Gama, E.F., E.A. Liberti, and R.R. de Souza, Effects of pre- and postnatal protein deprivation on atrial natriuretic peptide- (ANP-) granules of the right auricular cardiocytes. An ultrastructural morphometric study. *Eur J Nutr*, 2007. 46(5): p. 245-50.
93. Watanabe, T., et al., An immunocytochemical study on co-localization of cathepsin B and atrial natriuretic peptides in secretory granules of atrial myoendocrine cells of rat heart. *J Histochem Cytochem*, 1989. 37(3): p. 347-51.
94. Schiebinger, R.J. and K.M. Greening, Interaction between stretch and hormonally stimulated atrial natriuretic peptide secretion. *Am J Physiol*, 1992. 262(1 Pt 2): p. H78-83.
95. Cavallero, S., et al., Ventricular function and natriuretic peptides in sequentially combined models of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. 298(4): p. H1290-9.

96. Wisen, A.G., et al., Plasma ANP and BNP during exercise in patients with major depressive disorder and in healthy controls. *J Affect Disord*, 2010.
97. Casserly, B., et al., Cardiac atria are the primary source of ANP release in hypoxia-adapted rats. *Life Sci*, 2010. 87(11-12): p. 382-9.
98. Widecka, K., et al., [Effect of intravenous sodium chloride load on levels of atrial natriuretic peptide (ANP) and 3'5' guanosine monophosphate (cGMP) in plasma of patients with uncomplicated sodium-sensitive arterial hypertension maintained on different dietary sodium intake]. *Pol Arch Med Wewn*, 1993. 89(2): p. 117-24.
99. Olsson, K., L. Eriksson, and M. Josater, Angiotensin II-induced pressure natriuresis is exaggerated by ANP in conscious goats. *Acta Physiol Scand*, 1990. 139(1): p. 245-7.
100. Kim, S.H., et al., Accentuation of ANP secretion to endothelin-1 in hypertrophied atria. *Regul Pept*, 2001. 102(1): p. 21-9.
101. Vives, D., et al., Atrial natriuretic peptides and urodilatin modulate proximal tubule Na(+)-ATPase activity through activation of the NPR-A/cGMP/PKG pathway. *Peptides*, 2010. 31(5): p. 903-8.
102. Woodard, G.E. and J.A. Rosado, Recent advances in natriuretic peptide research. *J Cell Mol Med*, 2007. 11(6): p. 1263-71.
103. Levin, E.R., D.G. Gardner, and W.K. Samson, Natriuretic peptides. *N Engl J Med*, 1998. 339(5): p. 321-8.
104. Silver, M.A., The natriuretic peptide system: kidney and cardiovascular effects. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006. 15(1): p. 14-21.
105. Munagala, V.K., J.C. Burnett, Jr., and M.M. Redfield, The natriuretic peptides in cardiovascular medicine. *Curr Probl Cardiol*, 2004. 29(12): p. 707-69.
106. Garruti, G., et al., Expression and secretion of the atrial natriuretic peptide in human adipose tissue and preadipocytes. *Obesity (Silver Spring)*, 2007. 15(9): p. 2181-9.
107. Maguer-Satta, V., R. Besancon, and E. Bachelard-Cascales, Concise Review: Neutral Endopeptidase (NEP/CD10): A Multifaceted Environment Actor in Stem Cells, Physiological Mechanisms and Cancer. *Stem Cells*, 2011.
108. Dai, Z.K., et al., Protective effects of a dual endothelin converting enzyme/neutral endopeptidase inhibitor on the development of pulmonary hypertension secondary to cardiac dysfunction in the rat. *Pediatr Pulmonol*, 2010. 45(11): p. 1076-85.
109. Sansoe, G., et al., Neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in cirrhotic liver: a new target to treat portal hypertension? *J Hepatol*, 2005. 43(5): p. 791-8.
110. Tabrizchi, R., Ilesatriptil (AVE-7688), a vasopeptidase inhibitor for the treatment of hypertension. *Curr Opin Investig Drugs*, 2008. 9(3): p. 301-9.
111. Wang, T.L. and C.R. Hung, Enhanced endothelin-1 degradation by intravenous morphine in patients with congestive heart failure: role of neutral endopeptidase 24.11. *Heart*, 2003. 89(2): p. 211-2.
112. Maki, T., et al., Direct inhibition of neutral endopeptidase in vasopeptidase inhibitor-mediated amelioration of cardiac remodeling in rats with chronic heart failure. *Mol Cell Biochem*, 2003. 254(1-2): p. 265-73.
113. Coppey, L., et al., Vasopeptidase inhibitor ilepatril (AVE7688) prevents obesity- and diabetes-induced neuropathy in C57Bl/6J mice. *Neuropharmacology*, 2011. 60(2-3): p. 259-66.
114. Sies, H., Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, 2015. 4C: p. 180-183.
115. Margaritelis, N.V., et al., Blood reflects tissue oxidative stress: a systematic review. *Biomarkers*, 2015: p. 1-12.
116. Che, Y., et al., Chronic unpredictable stress impairs endogenous antioxidant defense in rat brain. *Neurosci Lett*, 2015. 584: p. 208-13.

117. Gumral, N., et al., Juniperus communis Linn oil decreases oxidative stress and increases antioxidant enzymes in the heart of rats administered a diet rich in cholesterol. *Toxicol Ind Health*, 2015. 31(1): p. 85-91.
118. Lin, M.T. and M.F. Beal, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 2006. 443(7113): p. 787-95.
119. Ferrari, C.K., Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. *Biogerontology*, 2004. 5(5): p. 275-89.
120. Barilli, A., et al., Oxidative stress induced by copper and iron complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives causes paraptotic death of HeLa cancer cells. *Mol Pharm*, 2014. 11(4): p. 1151-63.
121. Tapia, E., et al., Curcumin prevents maleate-induced nephrotoxicity: relation to hemodynamic alterations, oxidative stress, mitochondrial oxygen consumption and activity of respiratory complex I. *Free Radic Res*, 2014. 48(11): p. 1342-54.
122. Cadenas, E., Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 1997. 6(4): p. 391-7.
123. Babior, B.M., Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res*, 1997. 30(2): p. 141-55.
124. Pinnel, S.R., S. Murad, and D. Darr, Induction of collagen synthesis by ascorbic acid. A possible mechanism. *Arch Dermatol*, 1987. 123(12): p. 1684-6.
125. Hornig, D., Metabolism and requirements of ascorbic acid in man. *S Afr Med J*, 1981. 60(21): p. 818-23.
126. Welch, R.W., et al., Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. *J Biol Chem*, 1995. 270(21): p. 12584-92.
127. Padh, H., Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. *Nutr Rev*, 1991. 49(3): p. 65-70.
128. Szarfarc, S.C., et al., [The health status of children in the municipality of Sao Paulo, SP (Brazil), 1984/1985. X. Food intake]. *Rev Saude Publica*, 1988. 22(4): p. 266-72.
129. Sato, K., et al., Effects of ascorbic acid on ambulatory blood pressure in elderly patients with refractory hypertension. *Arzneimittelforschung*, 2006. 56(7): p. 535-40.
130. Mattfeldt, T., et al., [New methods for the morphometric analysis of anisotropic tissues]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 1990. 74: p. 220-4.
131. Mandarim-de-Lacerda, C.A., C. Fernandes-Santos, and M.B. Aguila, Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol Biol*, 2010. 611: p. 211-25.
132. Albarwani, S., et al., Lisinopril alters contribution of nitric oxide and K(Ca) channels to vasodilatation in small mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res*, 2014.
133. Hultstrom, M., Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 2012. 30(6): p. 1087-91.
134. Kim, Y.H., et al., NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 Activation Reduces Blood Pressure Through Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Acetylation in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Hypertens*, 2015. 28(1): p. 50-7.
135. Chien, S.J., et al., Two different approaches to restore renal nitric oxide and prevent hypertension in young spontaneously hypertensive rats: l-citrulline and nitrate. *Transl Res*, 2014. 163(1): p. 43-52.
136. Ngo, D.H., et al., Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from antihypertensive skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem*, 2015. 174: p. 37-43.
137. Nabha, L., et al., Vascular oxidative stress precedes high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*, 2005. 27(1): p. 71-82.

138. Alvarez, M.C., et al., Is cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats the cause or the consequence of oxidative stress? *Hypertens Res*, 2008. 31(7): p. 1465-76.
139. Li, Y., et al., [Analysis of renal protein expressions of spontaneously hypertensive rat intervention by three different Chinese medicine compounds for hypertension]. *Zhong Yao Cai*, 2014. 37(5): p. 833-40.
140. Fernandes-Santos, C., L. de Souza Mendonca, and C.A. Mandarim-de-Lacerda, Favorable cardiac and aortic remodeling in olmesartan-treated spontaneously hypertensive rats. *Heart Vessels*, 2009. 24(3): p. 219-27.
141. Fu, M., et al., Olmesartan attenuates cardiac hypertrophy and improves cardiac diastolic function in spontaneously hypertensive rats through inhibition of calcineurin pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014. 63(3): p. 218-26.
142. de Champlain, J., et al., Oxidative stress in hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 2004. 26(7-8): p. 593-601.
143. Carillon, J., et al., Endogenous antioxidant defense induction by melon superoxide dismutase reduces cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Int J Food Sci Nutr*, 2014. 65(5): p. 602-9.
144. Yoshioka, M., K. Aoyama, and T. Matsushita, Effects of ascorbic acid on blood pressure and ascorbic acid metabolism in spontaneously hypertensive rats (SH rats). *Int J Vitam Nutr Res*, 1985. 55(3): p. 301-7.
145. Yu, Z., et al., Antihypertensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide RVPSL on spontaneously hypertensive rats by regulating gene expression of the renin-angiotensin system. *J Agric Food Chem*, 2014. 62(4): p. 912-7.
146. Roufogalis, B.D., et al., The plasma membrane Ca(2+)-ATPase in spontaneously hypertensive rats. *Ann N Y Acad Sci*, 1997. 834: p. 673-5.
147. Ajay, M., et al., Direct effects of quercetin on impaired reactivity of spontaneously hypertensive rat aortae: comparative study with ascorbic acid. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006. 33(4): p. 345-50.
148. Shah, A., et al., Oxidative stress augments the secretion of atrial natriuretic peptide in isolated rat atria. *Peptides*, 2011. 32(6): p. 1172-8.

APÊNDICE A - Artigo Científico Submetido à revista *Physiological Research*

Submitting a manuscript

Jorge José de Carvalho, Ms, PhD
Head of the Laboratory of Ultrastructure and Tissue Biology

Attn: Prof. Jaroslav Kuneš Editorial director of *PHYSIOLOGICAL RESEARCH*

Dear Prof. Jaroslav Kuneš,

Please find here attached the manuscript entitled "Treatment with antioxidant (ascorbic acid) prevents the elevation of renin levels and arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats", which we are submitting for publication as a research article in the *PHYSIOLOGICAL RESEARCH*.

Although studies have demonstrated the effect of ascorbic acid supplementation on blood pressure, both in humans and in SHR, little is known about mechanisms by which ascorbic acid reduces blood pressure. Our study found that the renin-angiotensin system is crucial in SHR hypertension and vitamin C normalizes blood pressure by decreasing renin levels.

I should like to inform you that this manuscript has not been published previously, is not under evaluation for publication elsewhere, and that all authors seen and approved its content.

Looking forward to hearing from you,

Sincerely yours,

Jorge José de Carvalho, Ms, PhD

RE: Submitting a manuscript 933029

Manuscript Ref. No.: **933029**

Title: "**Ascorbic acid prevents the elevation of renin levels and arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats**"

Author(s): **Costa M.V. and de Carvalho J.J.**

Dear Dr. Costa and Dr. de Carvalho,

I acknowledge your submission of the paper above (7 files) to our Editorial Office for possible publication in *Physiological Research* journal.

Please, wait for further information from us.

Refer to the above Manuscript Ref. No. in all your future correspondence with us related to this paper.

Yours sincerely,

Hynek Moravec
Executive Editor
Physiological Research

PHYSIOLOGICAL RESEARCH
Videnska 1083
142 20 Prague 4
Czech Republic
Fax: +420 24106 2164
www.biomed.cas.cz/physiolres

CLINICS



Atrial natriuretic peptide, not the renin, secretion rate change to minimize hypertension in spontaneously hypertensive rats

Journal:	CLINICS
Manuscript ID:	CLINICS-2015-0061
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	14-Feb-2015
Complete List of Authors:	Costa, Milton; State University of Rio de Janeiro, Histology and Embriology; UERJ, Histologia e Embriologia Carvalho, Jorge Jose; State University of Rio de Janeiro, Histology and Embriology; UERJ, Histologia e Embriologia
Keyword - Click here to find your MeSH terms.:	Atrial natriuretic peptide, Spontaneously Hypertensive Rats, Renin, Oxidative Stress, Hypertension

SCHOLARONE™
Manuscripts

Only

ANEXO - Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA)



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

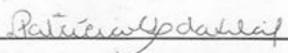


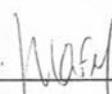
COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/003/2012 sobre "Análise da produção do peptídeo natriurético atrial e de seus receptores renais (NPR-A e NPR-C mRNA) em ratos hipertensos (modelo L-NAME) tratados com inibidor de estresse oxidativo (vitamina E)", sob a responsabilidade de Jorge José Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em 17/01/2012. Este certificado expira em 17/01/2016.

Rio de Janeiro, 17 de Janeiro de 2012.

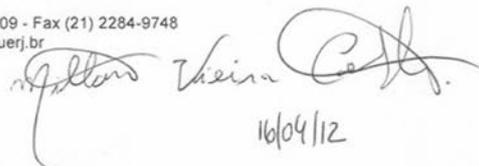

Prof. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ


Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

Prof. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Sub-Chefe do Deptº de Ciências Fisiológicas
IBRAG/UERJ - Mat. 34765-8

/ass

(21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br


16/04/12



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



DECLARAÇÃO

A Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ atesta sua concordância com a mudança do projeto intitulado "Análise da produção do peptídeo natriurético atrial e de seus receptores renais (NPR-A e NPR-C mRNA) em ratos hipertensos (modelo L-NAME) tratados com inibidor de estresse oxidativo (vitamina E)", certificado CEUA 003/2012. Após pequenas alterações, o estudo atual intitulado "Análise da produção do peptídeo natriurético atrial e de seus receptores renais (NPR-A e NPR-C mRNA) em ratos hipertensos (SRH) tratados com inibidor de estresse oxidativo (vitamina C)" permanece com o mesmo número de certificado e com mesma previsão de término (17/01/2016)

Rio de Janeiro, 26 de Janeiro de 2015.

Prof. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dra. Elaine de Oliveira
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Dr. Sylvio Claudio Neto
CEUA/IBRAG/UERJ

/s/s