

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**

**JOSÉ MARCOS GIRARDI**

**Efeitos da rosuvastatina e olmesartana sobre o remodelamento de aorta,  
miocárdio e rim em ratos hipertensos por deficiência crônica da síntese de  
óxido nítrico**

**Juiz de Fora**

**2011**

**JOSÉ MARCOS GIRARDI**

**Efeitos da rosuvastatina e olmesartana sobre o remodelamento de aorta,  
miocárdio e rim em ratos hipertensos por deficiência crônica da síntese de  
óxido nítrico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, área de concentração em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Saúde.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nádia Rezende Barbosa Raposo**

**Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Ferreira**

**Juiz de Fora**

**2011**

**JOSÉ MARCOS GIRARDI**

**Efeitos da rosuvastatina e olmesartana sobre o remodelamento de aorta, miocárdio e rim em ratos hipertensos por deficiência crônica da síntese de óxido nítrico.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, área de concentração em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Saúde.

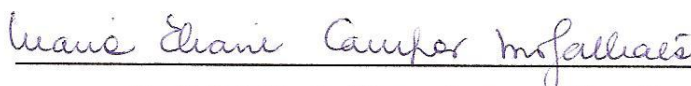
Aprovado em 09 de junho de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Profª Drª Nádia Rezende Barbosa Raposo – Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora



---

Profª Drª Maria Eliane Campos Magalhães  
Universidade Estadual do Rio de Janeiro



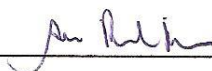
---

Profª Drª Gláucia Maria Moraes de Oliveira  
Universidade Federal do Rio de Janeiro



---

Prof. Dr. Dimas Augusto Carvalho de Araújo  
Universidade Federal de Juiz de Fora



---

Profª Drª Ana Paula Ferreira  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Aos meus queridos e abençoados pais, Nicolau (*in memoriam*) e Inésia; aos tios Nicolino (*in memoriam*) e Nedha, por terem me revelado o caminho da verdade e honestidade, pelo apoio incondicional, exemplos e ensinamentos que nortearam minha vida, meu eterno agradecimento. À minha querida esposa e companheira Flávia, incansável estimuladora, que possibilitou a realização deste sonho, e aos meus adoráveis filhos, Nicolás e Isadora, pela compreensão, alegria e, sobretudo, pelo entusiasmo contagiante. Aos meus pacientes, para os quais estudo. Dedico este trabalho a todos vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, especialmente à Profª Drª Darcília Maria Nagen da Costa e ao Prof. Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral, que, com muito profissionalismo, possibilitaram a realização deste trabalho.

À Profª Drª Nádia Rezende Barbosa Raposo, orientadora deste trabalho, pela concretização deste projeto e à Profª Drª Ana Paula Ferreira, coorientadora, pelo apoio recebido.

A todos aqueles que auxiliaram nos diversos laboratórios onde trabalhei, fornecendo o apoio técnico, especialmente ao Prof. Dr. Rogério Estevam Farias (UFJF), ao Departamento de Genética e aos amigos Raphael Vasconcellos e Charles Branco.

Ao Prof. Dr. Alfredo de Souza Bomfim (UERJ), à Profª Drª Andréa Grabe Guimarães (UFOP) pelos auxílios na qualificação e ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda pela orientação no início desta caminhada.

Aos destacados professores de Cardiologia, Prof. Dr. Antônio Alves de Couto (UFF), pelos primorosos ensinamentos na especialidade; Prof. Dr. Francisco Manes Albanesi Filho (UERJ), pela minha formação profissional e também pelo apoio desde o início da construção deste sonho, ao Professor Dr. Francisco Antônio Helfenstein Fonseca (UNIFESP) e ao Dr. Carlos Manoel de Castro Monteiro (UNIFESP), por darem incentivo ao projeto.

Aos que se omitiram, sinceramente, meu muito obrigado.

## RESUMO

Alterações no remodelamento miocárdico, vascular, inflamatório, proteinúria e inflamação glomerular em ratos deficientes de óxido nítrico (NO), tratados com olmesartana medoxomila (OLM) e/ou rosuvastatina cálcica (ROS) foram estudadas após 28 dias com o objetivo de avaliar o impacto destes fármacos. Veículo (G1), L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME) 30mg/kg/dia (G2), OLM 5mg/kg/dia (G3), ROS 20mg/kg/dia (G4), OLM 0,5mg/kg/dia (G5), ROS 2mg/kg/dia (G6), OLM 0,5+ROS 2mg/kg/dia (G7), OLM 5+ROS 20mg/kg/dia (G8) administrados oralmente a ratos *Wistar*. Pressão sistólica (PS) mensurada semanalmente. Análises hematológica, bioquímica {colesterol total (CT), triglicérides (Tg), aminotransferases (AMT), fosfatase alcalina (FA), creatinina (Cr), nitrito/nitrato (NOx), Interleucina-6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ )}, urinária: {relação albumina/creatinina (RACU)}. Cortes de ventrículo esquerdo, aorta, rins (hematoxilina/eosina e Masson), analisados morfometricamente: análise transversa de cardiomiócitos (ATC), relação média e íntima sobre o lúmen arterial (MILA), fibrose perivascular de arteríolas intramiocárdicas (FPAI). Macrófagos glomerulares (MG) analisados por imunohistoquímica. L-NAME elevou a PS, ATC, MILA, FPVAI, IL-6, MG ( $p < 0,0001$ ), TNF- $\alpha$ , RACU, reduziu NOx ( $p < 0,01$ ). OLM reduziu PS ( $p < 0,001$ ), TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), IL-6, ATC, MILA, FPVAIM ( $p < 0,0001$ ), MG ( $p < 0,01$ ), RACU (G3) ( $p < 0,05$ ). ROS elevou NOx (G6), reduziu TNF- $\alpha$ , RACU (G4) ( $p < 0,05$ ), IL-6, ATC, MILA (G4), FPAI ( $p < 0,0001$ ), MG ( $p < 0,001$ ). ROS potencializou efeito de OLM sobre a RACU. OLM e ROS exercem efeitos benéficos no remodelamento miocárdico, vascular, inflamatório e renal em ratos deficientes de NO. Efeitos pleiotrópicos de ROS independentes da PS e CT, mediados por suas propriedades antioxidantes.

**Palavras-chave:** Hipertensão. L-NAME. Bloqueadores do Receptor Tipo I de Angiotensina II. Inibidores de Hidroximetilglutaril-CoA Redutases.

## ABSTRACT

Changes in myocardial remodeling, vascular inflammation, proteinuria, and glomerular inflammation in nitric oxide (NO)-deficient rats, treated with olmesartan medoxomil (OLM) and / or rosuvastatin calcium (ROS) were studied after 28 days in order to assess the impact of these drugs. Vehicle (G1), nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 30mg/kg/day (G2), OLM 5mg/kg/day (G3), ROS 20mg/kg/day (G4), OLM 0,5mg/kg/day (G5), ROS 2mg/kg/day (G6), OLM 0.5+ROS 2mg/kg/day (G7), OLM 5+ROS 20mg/kg/day (G8) orally administered to *Wistar* rats. Systolic pressure (SBP) measured weekly. Haematological, biochemical {total cholesterol (TC), triglycerides (Tg), aminotransferase (AMT), alkaline phosphatase (ALP), creatinine (Cr), nitrite / nitrate (NO<sub>x</sub>), Interleukin-6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- $\alpha$ )}, urinary {albumin / creatinine ratio (UACR)}. Cuts from the left ventricle, aorta, kidneys (hematoxylin / eosin and Masson) were morphometrically analyzed: cross-sectional area of cardiomyocytes (Acmy), intima-media thickness on the arterial lumen (IMT), perivascular fibrosis of intramyocardial arterioles ratio (PFR). Glomerular macrophages (GM) were analyzed by immunohistochemistry. L-NAME increased the SBP, Acmy, IMT, PFR, IL-6, GM ( $p < 0.0001$ ), TNF- $\alpha$ , UACR reduced NO<sub>x</sub> ( $p < 0.01$ ). OLM reduced SBP ( $p < 0.001$ ), TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ), IL-6, Acmy, IMT, PFR ( $p < 0.0001$ ), GM ( $p < 0.01$ ), UACR (G3) ( $p < 0.05$ ). ROS increased NO<sub>x</sub> (G6), reduced TNF- $\alpha$ , UACR (G4) ( $p < 0.05$ ), IL-6, Acmy, IMT (G4), PFR ( $p < 0.0001$ ), GM ( $p < 0.001$ ). ROS potentiated the effect of OLM on UACR. OLM and ROS exert beneficial effects on myocardial, vascular, inflammatory and renal remodeling in nitric oxide deficient rats. The pleiotropic effects of ROS were independent of SBP and TC, mediated by its antioxidant properties.

**Keywords:** Hypertension. NG-Nitroarginine Methyl Ester. Angiotensin II Type 1 Receptor Blockers. Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Inhibitors .

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>ESQUEMA 1</b>	- Hidrólise de olmesartana medoxomila ao metabólito olmesartana.....	28
<b>ESQUEMA 2</b>	- Estrutura química de rosuvastatina cálcica.....	30
<b>FLUXOGRAMA 1</b>	Fluxograma dos grupos experimentais.....	46
<b>FLUXOGRAMA 2</b>	Fluxograma dos diferentes tratamentos propostos.....	47
<b>GRÁFICO 1</b>	- Pressão Arterial Sistólica (mmHg) dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.....	50
<b>GRÁFICO 2</b>	- Frequência cardíaca (bpm) dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.....	51
<b>GRÁFICO 3</b>	- Relação Albumina/Creatinina Urinária dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.....	54
<b>GRÁFICO 4</b>	- Nitrito/Nitrato plasmático dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.....	55
<b>FOTOGRAFIA 1</b>	- Área transversa dos cardiomiócitos (setas pretas) dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscopia de luz (aumento 1.000X).....	57
<b>FOTOGRAFIA 2</b>	- Cortes transversais de aorta torácica dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscopia de luz (aumento 1.000X).....	58
<b>FOTOGRAFIA 3</b>	- Arteriolas intramiocárdicas demonstrando em azul a área de fibrose perivascular dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, corados com tricrômio de Masson e analisados por microscopia de luz (aumento 1.000X).....	59



**FOTOGRAFIA 4 –** Infiltrado de macrófagos nos glomérulos renais dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscopia de luz (aumento 1.000X)..... 61

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 3</b>	– Colesterol total, triglicérides, aminotransferases, fosfatase alcalina e creatinina dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.....	52
<b>TABELA 4</b>	– Parâmetros hematológicos dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais ao final do protocolo.....	53
<b>TABELA 7</b>	– Interleucina-6 e Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ plasmáticos dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.....	56
<b>TABELA 8</b>	– Área transversa de cardiomiócitos, relação média e íntima sobre o lúmen arterial e fibrose perivascular de arteríolas intramiocárdicas dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.....	60
<b>TABELA 9</b>	– Infiltrado de macrófagos glomerulares e área da superfície glomerular nos rins dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, ao final do experimento.....	62
<b>TABELA 1</b>	– Pressão arterial sistólica (mmHg) dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais ao longo do tempo.....	100
<b>TABELA 2</b>	– Frequência cardíaca (bpm) dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais ao longo do tempo.....	101
<b>TABELA 5</b>	– Relação albumina/creatinina urinária dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.....	102
<b>TABELA 6</b>	– Nitrito/nitrato plasmático dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
Akt	Proteína serina treonina quinase
ALT	Alanina aminotransferase
angio II	Angiotensina II
AST	Aspartato aminotransferase
AT1	receptor de membrana tipo 1 da angiotensina II
ATC	Área transversa de cardiomiócito
CT	Colesterol total
Cr	Creatinina sérica
eNOS	Óxido nítrico constitutivo endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETA	Receptores de endotelina
ET-1	Endotelina 1
FPVAI	Fibrose perivascular de arteríolas intramiocárdicas
FA	Fosfatase alcalina
FC	Frequência cardíaca
gp130	Componente de sinalização da interleucina 6
HMG-CoA	Hidroxi-Metil Glutaril Coenzima A
HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
iNOS	Óxido nítrico indutível
IL-6	Interleucina 6
IL-6R	Componente ligante da interleucina 6
LDL	Lipoproteína de Densidade Baixa
L-NAME	L-nitro-arginina-metil-éster
MAPKs	Proteína quinase ativada por mitógenos
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido Nítrico
NOx	Nitrito/nitrato
OATPs	Polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos
PCR	Proteína C Reativa

PS	Pressão arterial sistólica
RACU	Relação albumina/creatinina urinária
RMILA	Relação média e íntima sobre o lúmen arterial
sIL-6R	Componente solúvel da interleucina 6
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica.....</b>	<b>18</b>
2.1.1	Sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	19
2.1.2	Endotélio e óxido nítrico.....	23
<b>2.2</b>	<b>Modelo experimental de hipertensão por Inibição de óxido nítrico.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Efeitos pleiotrópicos das estatinas sobre o endotélio.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4</b>	<b>Farmacologia da olmesartana e da rosuvastatina.....</b>	<b>28</b>
2.4.1	Olmesartana.....	28
2.4.2	Rosuvastatina.....	30
<b>2.5</b>	<b>Estudos experimentais <i>in vivo</i> com olmesartana e rosuvastatina.....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>Tratamentos.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Coleta de material biológico.....</b>	<b>40</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação de parâmetros fisiológicos e hemodinâmicos.....</b>	<b>40</b>
<b>4.5</b>	<b>Análises laboratoriais.....</b>	<b>41</b>
4.5.1	Análises bioquímica, hematológica e urinária.....	41

4.5.2	Dosagem de óxido nítrico e de citocinas.....	41
4.5.3	Análises histopatológica, morfométrica e imuno-histoquímica.....	42
<b>4.6</b>	<b>Desenho experimental.....</b>	<b>45</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1</b>	<b>Pressão arterial sistólica e frequência cardíaca.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2.</b>	<b>Análises laboratoriais.....</b>	<b>52</b>
5.2.1	Parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	52
5.2.2	Análise urinária da função renal.....	54
5.2.3	Análise dos parâmetros inflamatórios.....	55
5.2.3.1	Óxido nítrico.....	55
5.2.3.2	Citocinas.....	55
<b>5.3</b>	<b>Análises morfométricas.....</b>	<b>56</b>
5.3.1	Área transversa de cardiomiócito.....	56
5.3.2	Análise da relação média e íntima sobre o lúmen de aorta torácica.....	57
5.3.3	Análise da fibrose perivascular de arteríolas intramiocárdicas.....	58
5.3.4	Análise histológica do tecido hepático.....	60
5.3.5	Análise imuno-histoquímica da infiltração de macrófagos nos glomérulos.....	60
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
6.1	Limitações e Implicações Clínicas.....	76
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Hipertensão arterial sistêmica (HAS) está associada com alterações estruturais adversas miocárdicas, vasculares e aumento da atividade inflamatória vascular (TRONC *et al.*, 1996; TOUYZ, 2000), que também podem ser marcadores de doença coronária (ERZEN *et al.*, 2007). Entre os processos celulares subjacentes descritos para estes eventos, alterações no crescimento celular, migração, diferenciação e aumento do depósito na matriz extracelular têm sido descritos (SADOSHIMA e IZUMO, 1993; VILLAREAL *et al.*, 1998; TOKUDA *et al.*, 2004; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; ZHANG *et al.*, 2003; PRACYNK *et al.*, 1998).

A angiotensina II (angio II) é o mais importante peptídeo do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e sua ação sobre receptores de membrana tipo 1 (AT1) implica na fisiopatologia da doença cardiovascular por gerar vasoconstrição, trombose, produção de superóxido, modificações na arquitetura e integridade da parede dos vasos pela modulação do crescimento celular, síntese de componentes da matriz extracelular e estimulação de mediadores hormonais (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; UNGER, 2002; OTSUI *et al.*, 2007).

A angio II promove hipertrofia de músculo liso vascular (BERCK, 2001; USHIO-FUKAI *et al.*, 1996) e de cardiomiócitos (SUDGEN e CLERK, 1998; NAKAMURA *et al.*, 1998) pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), através da ativação de cascatas de sinalização, por exemplo, proteína C quinase e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPKs) (SUDGEN e CLERK, 1998). As EROs têm sido também implicadas na fisiopatologia da doença cardiovascular, como aterosclerose, hipertensão arterial e insuficiência cardíaca (WILCOX, 2002; PARAVICINI *et al.*, 2008; LEE e GRIENDLING, 2008).

Os inibidores da enzima conversora da angio II e antagonistas de receptores AT1 atenuam a hipertrofia cardíaca, tanto em pacientes hipertensos quanto em estudos experimentais (WOLLERT e DREXLER, 1999).

Trabalhos clínicos têm demonstrado que inibidores da hidroximetilglutaril coenzima A (HMGCoA) redutase, conhecidos como estatinas, exercem efeitos benéficos em pacientes com alto risco cardiovascular (WANG; LIU; LIAO, 2008) e diminuem pressão arterial em humanos (GLORIOSO *et al.*, 1999; FERRIER *et al.*, 2002; GOLOMB *et al.*, 2008; TERZOLI *et al.*, 2005) e em experimentos animais (BAYORH *et al.*, 2005; SICARD *et al.*, 2008). Estatinas também atenuam o

remodelamento adverso cardíaco pela prevenção de fibrose e hipertrofia (LEE *et al.*, 2005; BEZERRA e MANDARIM-DE-LACERDA, 2005; ABE *et al.*, 2006), bem como disfunção diastólica ventricular (XU *et al.*, 2008).

Muitos benefícios das estatinas são atribuídos à redução dos níveis de colesterol sérico. Entretanto, ao inibirem a HMGCoA redutase, podem também inibir a síntese de isoprenoides, importantes ativadores da sinalização intracelular de moléculas como Rho e Rac-1 (BYRNE *et al.*, 2003; PRIVRATSKY *et al.*, 2003; MAACH; KARTES; KILLER, 2003). A inibição da isoprenilação e da ativação de Rac-1, componente da nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), maior fonte de EROs (TERZOLI *et al.*, 2005; WASSMANN *et al.*, 2002), e a diminuição da expressão de subunidades da NADPH oxidase (WASSMANN *et al.*, 2002) podem mediar as ações antioxidantes das estatinas.

Portanto, as estatinas exercem muitos efeitos além da redução de colesterol, conhecidos como efeitos pleiotrópicos, incluindo melhora na função endotelial, diminuição da inflamação vascular, inibição da proliferação de músculo liso e imunomodulação (TERZOLI *et al.*, 2005). Estatinas inibem vários sistemas sinalizadores que são ativados pela angio II (vias Rho A/Rho quinase e MAPKs), envolvidas na regulação de fatores pró-fibróticos, como fator de crescimento do tecido conjuntivo e fibrose vascular (RUPEREZ *et al.*, 2007).

Para minimizar o risco cardiovascular associado com dislipidemia, as estatinas estão entre as medicações mais frequentemente prescritas. Na prática clínica, a hipertensão arterial é frequentemente acompanhada por dislipidemia no mesmo indivíduo e o tratamento envolve, muitas vezes, a combinação de antagonistas do SRAA e estatinas (GIRERD e GIRAL, 2004).

A inibição da enzima óxido nítrico sintase pela administração crônica de L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME) induz hipertensão arterial (RIBEIRO *et al.*, 1992; ARNAL; WARIN; MICHEL, 1992), estimula fenômenos pró-inflamatórios (GONZALES *et al.*, 2000; LUYARA *et al.*, 1998) e pró-coagulantes (CORSEAUX *et al.*, 2002). Neste modelo experimental, ocorre um descontrole entre o SRAA e o fator relaxante derivado do endotélio, prevalecendo os efeitos da angio II (LINZ *et al.*, 1999), associada à piora da função endotelial (KUNG *et al.*, 1995), insuficiência renal (ZATZ e DE NUCCI, 1991), desordens metabólicas e hemodinâmicas (BAYLIS *et al.*, 1992).

A olmesartana medoxomila é um recente membro da família de bloqueadores de receptores tipo 1 da angio II (BROUSIL e BURKE, 2003; BALL; WILLIAMS;



STUMPE, 2001). Evidências clínicas demonstram que olmesartana apresenta eficácia anti-hipertensiva igual ou superior a outros antagonistas de receptor AT1 ou mesmo de outras classes terapêuticas (BALL; WILLIAMS; STUMPE, 2001; OPARIL *et al.*, 2001).

Rosuvastatina cálcica é a mais recente estatina sintetizada, apresenta grande afinidade pela HMGCo-A redutase, elevada hidrossolubilidade, mínima distribuição a tecidos extra-hepáticos (SHITARA e SUGYIAMA, 2006).

Embora existam evidências dos efeitos pleiotrópicos das estatinas, escassos são os estudos disponíveis que empregam a rosuvastatina nos experimentos animais de remodelamento cardiovascular e renal, sendo que a associação com olmesartana ainda não foi avaliada. Além disso, alguns resultados são discrepantes.

Susic *et al.* (2003) avaliaram os efeitos pleiotrópicos vasculares da rosuvastatina na hipertensão arterial genética e por inibição crônica da síntese de óxido nítrico (NO), e não constataram redução da hipertrofia ventricular esquerda (HVE) com o tratamento instituído. Já no modelo experimental por deoxicorticosterona associada a cloreto de sódio, Loch *et al.* (2006) relataram que o tratamento com rosuvastatina reduziu a fibrose miocárdica, o prolongamento do potencial de ação ventricular e a hipertrofia cardiovascular. A redução da HVE pelo tratamento com rosuvastatina também foi observada por Habib *et al.* (2007), no modelo de hipertensão em ratos transgênicos Ren2, nos quais a elevação de renina e angio II são os mecanismos patogênicos responsáveis pelo fenótipo cardiovascular. Di Napoli *et al.* (2005) descreveram que a administração crônica de rosuvastatina antes da isquemia miocárdica induzida, reduziu a disfunção miocárdica, a disfunção endotelial, e a as enzimas miocárdicas, em ratos normocolesterolêmicos.

Em ratos, as concentrações plasmáticas de lípidos são geralmente baixas e as estatinas usualmente não modificam este perfil, constituindo-se, assim, excelente modelo para se estudar seus efeitos pleiotrópicos, considerados efeitos independentes da redução de colesterol sérico e da pressão arterial (SUSIC *et al.*, 2003).

Este estudo pretende avaliar, originalmente, o impacto do tratamento isolado e associado de rosuvastatina e olmesartana sobre o remodelamento adverso miocárdico, aórtico, função renal e parâmetros inflamatórios, em modelo experimental de inibição crônica da síntese de NO, baseado na hipótese de que

estes fármacos possam apresentar efeitos benéficos sobre os parâmetros supracitados.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica

A HAS é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

Fatores vasculares, neurais, humorais, renais, genéticos, entre outros, estão envolvidos em sua gênese e sustentação, estabelecendo sua característica multifatorial (KAPLAN, 1994; OPARIL; ZAMAN; CAIHOUN, 2003).

A gênese multifatorial envolve principalmente a presença de fatores de risco como: idade avançada, gênero (prevalência maior entre os homens até os 50 anos, invertendo-se a partir da quinta década) e etnia (duas vezes mais prevalente em indivíduos de cor não branca), excesso de peso e obesidade, ingestão excessiva de sódio, ingestão de álcool por períodos prolongados de tempo, sedentarismo, fatores socioeconômicos, baixa escolaridade e genética (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010; SCHERR e RIBEIRO, 2009).

O controle da pressão arterial envolve ações integradas de vários sistemas que afetam seus maiores determinantes: o débito cardíaco e a resistência vascular periférica. Sugere-se que o controle da excreção de sódio pelo rim seja um mecanismo crítico para tal regulação (GUYTON, 1991). Lifton, Gharavi e Geller (2001) demonstraram que desordens mendelianas com maior impacto na homeostase da pressão arterial são causadas por variações genéticas que afetam a reabsorção de sódio e água pelo néfron distal.

Guyton *et al.* (1992) apresentaram inúmeros dados experimentais e analíticos que dão suporte ao papel central da natriurese pressórica na regulação fisiológica e na patogênese da HAS.

O processo inicia-se por aumento da resistência vascular renal pela constrição da arteríola eferente, mediada por ativação do SRAA (ROMERO *et al.*, 1989). Com a redução do fluxo sanguíneo renal acoplado a aumento da fração de filtração, eleva-se a pressão transglomerular (HALL, 1991), favorecendo a reabsorção de sódio, que

provoca aumento da pressão arterial por expansão extracelular (ICHIKAWA e BRENNER, 1980). A pressão arterial aumentará até ser capaz de desencadear a natriurese. Pacientes que apresentam alterações nesse mecanismo necessitam níveis pressóricos mais altos para deflagrar aumento da excreção de sódio e água (HALL, 1991; GUYTON, 1992).

Brenner, Garcia e Anderson (1988) propuseram que mudanças estruturais primárias nos rins possam determinar HAS e sugerem que a hipertensão esteja associada à menor superfície de filtração nos néfrons, limitando a excreção de sódio. Esta elevação dos níveis pressóricos desencadeia hipertensão glomerular com lesão de outros néfrons e piora da HAS, configurando-se um ciclo vicioso.

Excesso ou redução do fluxo nos tecidos causa reajuste automático do diâmetro vascular naqueles locais, retornando o fluxo aos níveis normais, fenômeno conhecido como autorregulação, que ocorre em segundos ou minutos, mas, em grande parte, em horas ou dias. A HAS será mantida principalmente pelo aumento secundário da resistência periférica, primeiramente por estreitamento funcional e, posteriormente, espessamento estrutural, precoce e irreversível da parede vascular (FOLKOW, 1982).

### 2.1.1 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

O SRAA é o principal sistema regulador da pressão arterial e homeostase hídrica (CROWLEY;GURLEY;COFFMAN,2007), é considerado um sistema endócrino, com os componentes da cascata enzimática produzidos em locais bem definidos; seu principal efetor, a angio II, exerce suas ações em órgãos-alvo distantes do local de produção, mas também apresenta ações locais, como no coração e sistema nervoso central (HALL;GUYTON; NIZELLE,1990).

A renina é uma protease com dois lobos homólogos que, na sua fenda interna, possui dois resíduos de ácido aspártico com atividade catalítica. Esta protease cliva o angiotensinogênio, gerando angiotensina I, precursora do produto ativo do SRAA, a angio II (CAMPBELL, 1987). Inibidores diretos da renina (representados pelo alisquireno) diminuem a atividade plasmática de renina e também as concentrações de angio I e II. A inibição do SRAA ocorre por inibição direta de renina e prorenina, impedindo o acesso do angiotensinogênio à enzima e redução da expressão do receptor de renina e prorenina (FISCHER *et al.*, 2008).

A angio II é um peptídeo que modula a pressão arterial, a homeostase de sódio e água, a função neuronal e outros sistemas neuro-humorais (TIMMERMANS *et al.*, 1993); está envolvida no desenvolvimento da aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, remodelamento miocárdico, vascular e insuficiência cardíaca congestiva (GRIEDLING; LASSÈGUE; ALEXANDER, 1996; STRAWN; DEAN; FERRARIO, 2000; VAUGHAN, 2000).

Os efeitos da angio II são mediados pelos receptores de membrana AT1 e receptores tipo 2 (AT2) (GRIEDLING; LASSÈGUE; ALEXANDER, 1996; TIMMERMANS *et al.*, 1993).

Receptores AT2 são predominantemente expressos no cérebro e adrenais de tecidos adultos, cujo estímulo leva à vasodilatação e inibição do crescimento de músculo liso. Durante a embriogênese, são expressos nas artérias em desenvolvimento, participam do crescimento da musculatura lisa e do espessamento vascular (CAREY; WANG; SIRAGY, 2000).

Muitos efeitos da angio II são mediados por receptores AT1, expressos no músculo liso, coração, pulmão, cérebro, fígado, rim e glândulas adrenais (SHANMUGAM e SANDBERG, 1996). Apresentam segmentos alfa-helicoidais hidrofóbicos, regulam proteínas intracelulares pela ativação de proteínas ligantes à guanina (TIMMERMANS *et al.*, 1993), são acoplados à superfamília da proteína G e a moléculas sinalizadoras, como fosfolipases A2, C e D, adenil ciclase, canais de cálcio voltagem-dependente e quinases envolvidas nas cascatas de fosforilação (GRIEDLING; LASSÈGUE; ALEXANDER, 1996). A estimulação destas vias pode levar à contração celular, hipertrofia, proliferação e/ou apoptose (GRIEDLING; LASSÈGUE; ALEXANDER, 1996; MALLAT e TEDGUI, 2000).

O bloqueio do SRAA pode ser potencializado por agonistas inversos, que bloqueiam a transdução sinalizadora das proteínas G acopladas ao receptor (MIURA *et al.*, 2006). ZOU *et al.* (2004) demonstraram que receptores AT1 puros podem ser ativados em cultura de miócitos de ratos, sem o envolvimento de angio II, e esta ativação é inibida pelo agonismo inverso. O mesmo estudo também demonstrou que a hipertrofia cardíaca induzida pela constrição de aorta transversa em ratos *knock-out* para angio II foi atenuada pelo agonismo inverso, sugerindo que o receptor AT1 puro é ativado independentemente da angio II, por mecanismo estimulatório

cardíaco *in vivo*. Desta forma, um agonista inverso para receptor AT1 pode ter relevância farmacoterapêutica para o sistema cardiovascular.

A destacada eficácia anti-hipertensiva observada com olmesartana pode ser decorrente de sua potente atividade agonista inversa que interage com dois domínios transmembranares do receptor AT1, entre seus grupos hidroxila e carboxila com Tyr113 e Lys199, His256 do receptor respectivamente (MIURA *et al.*, 2006). O domínio Gln257 do receptor demonstrou ser importante para a interação com olmesartana, mas não para a atividade agonista inversa (MIURA *et al.*, 2006).

Adicionalmente, a ativação do SRAA inclui ações extrarrenais da angio II, estimulação simpática e aumento da liberação de aldosterona (AGUILERA, 1992; HALL, 1986; QUINN e WILLIAMS, 1988), que promove reabsorção de sódio no néfron distal e gera fibrose cardíaca, hipertrofia vascular. Alguns efeitos induzidos pela angio II são mediados via aldosterona, por super-regulação de receptores AT1, efeitos inibidos pela espironolactona (SCHIFFRIN; FRANKS; GUTKOWSKA, 1985).

Culturas celulares, modelos animais e estudos clínicos suportam o conceito de que a ativação AT1 causa liberação de superóxido vascular *in vivo* e *in vitro*, com prejuízo na vasodilatação (LAURSEN *et al.*, 1997), favorecendo a aterosclerose. Estudos demonstram que a ativação destes receptores participa na formação da placa, caracterizada por aumento da oxidação e captação de lipoproteína de baixa densidade (LDL)-colesterol, oxidada por macrófagos, formação de célula espumosa (MORAWIETZ *et al.*, 1999). A expressão de receptor para LDL oxidada está dramaticamente aumentada pela ativação de receptor AT1 (MEHTA e LI, 2002; MORAWIETZ *et al.*, 1999; NICKENIG e HARRISON, 2002 a,b).

A angio II promove estresse oxidativo, que tem papel central na estimulação de crescimento e migração de células do músculo liso vascular para formação da placa ateromatosa (MEHTA e LI, 2001). A ativação de receptor AT1 inicia o processo inflamatório, com produção de interleucina-6 (IL-6) (SCHIEFFER *et al.*, 2000). Apoptose das células de músculo liso, evento inicial da ruptura da placa ateromatosa, é induzida pela angio II e atenuada por seus antagonistas (LEMAY; HAMET; BLOIS, 2000; MALLAT e TEDGUI, 2000).

A angio II aumenta a liberação de endotelina (HERIZE *et al.*, 1998), promove contração de células mesangiais, reduz o coeficiente de ultrafiltração (ARDAILLOU, 1999), efeitos compensados pelo estímulo à produção de prostaglandinas e NO (ARENDSHORST; BRÄNNSTRÖM; RUAN, 1999).

As endotelinas são potentes peptídeos vasoconstritores produzidos por vários tecidos, como a célula muscular lisa e células epicárdicas, porém a principal fonte produtora é o endotélio (INOUE *et al.*, 1989; YANAGISAWA *et al.*, 1988). Suas três isoformas: Endotelinas tipo 1, tipo 2 e tipo 3 (ET-1, ET-2 e ET-3) são estimuladas pelo estiramento vascular (YAMAZAKI; KOMURO; KUDOH, 1996), isquemia e angio II (ITO *et al.*, 1996). Entre os três subtipos de receptores de endotelina conhecidos, receptores de endotelina tipo A, B e C (ETA, ETB e ETC) (SAKURAI *et al.*, 1990), o subtipo ETA apresenta maior afinidade para ET-1, expresso em células do músculo liso vascular e cardíaco, ETB apresenta afinidade para todas as isoformas, é expresso em células endoteliais, renais e músculo liso vascular (RUBANYI e POLOKOFF, 1994). Estes receptores induzem contração, proliferação e hipertrofia celular (DE NUCCI *et al.*, 1988). Receptores ETB endoteliais estimulam ainda a produção de óxido nítrico (NO) e prostaciclina, o que explica a vasodilatação transitória causada pela aplicação intraluminal de endotelina (SCHIFFRIN *et al.*, 1995).

Outras angiotensinas produzidas têm ações específicas, como as angiotensinas III e IV e a angiotensina 1-7 (SANTOS *et al.*, 2000). Esta, formada a partir da angiotensina I ou II, por ação da enzima conversora 2 (ECA2) ou endopeptidases neutras, apresenta ações opostas à angio II. Preferencialmente antagonista de receptores AT1, exerce ação agonista sobre receptores AT2, embora o principal efector seja o receptor *Mas* (SANTOS *et al.*, 2000; VAN DER WOUDE *et al.*, 2006; WALTERS; GASPARI; WIDDOP, 2005). Essa característica permite ao sistema influenciar o crescimento vascular, por exemplo, tanto estimulando (angio II) como inibindo (angiotensina 1-7) (SANTOS *et al.*, 2000).

Além de ser importante sítio para sua formação, o endotélio também é alvo para ações da angiotensina 1-7, que apresenta atividade vasodilatadora; ao ligar-se às células endoteliais, estimula produção de NO, prostaglandinas, fatores relaxantes derivados do endotélio. Exerce ainda efeitos sobre o remodelamento cardíaco e possui atividade antiarritmogênica. Descreve-se ainda aumento de fluxo coronariano, melhora da contratilidade, sendo que, em camundongos *knoc-kout* para *Mas*, ocorre redução da *performance* cardíaca. Antagonista de receptor *Mas* bloqueia todos estes efeitos (SANTOS e FERREIRA, 2007).

O eixo ECA2-Angiotensina (1-7)-receptor Mas é alvo para o desenvolvimento de novos fármacos, em que o agonista de receptor Mas, AVE 0991, poderia ter potencialidade terapêutica (SANTOS e FERREIRA, 2007).

### 2.1.2 Endotélio e óxido nítrico

O endotélio é uma monocamada de epitélio pavimentoso, localizada entre o sangue circulante e a camada média vascular, mantém a homeostase da parede vascular e a regulação da circulação (FURCHGOTT, 1993). O endotélio é um tecido endócrino, parácrino e autócrino, ativo metabolicamente e libera várias substâncias reguladoras do tônus vascular, que modula a coagulação e a inflamação (BRITTEN; ZEIHNER; SCHACHINGER, 1999).

A integridade do endotélio é essencial à proteção contra espasmo, trombose e aterogênese (FURCHGOTT, 1993). Alterações destas propriedades, induzidas por diferentes estímulos e fatores, aumentam as respostas vasoconstritoras, proliferação e migração das células do músculo liso, adesão de plaquetas e monócitos e também a expressão de moléculas de adesão (CARVALHO *et al.*, 1997; SADER e CELERMAJER, 2001; GIANNOTTI *et al.*, 2010).

Os experimentos pioneiros de Furchgott e Zawadzki (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980) demonstraram a existência de um fator relaxante derivado de endotélio que foi identificado como NO (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007), produzido a partir da L-arginina pela ação do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), enzima cálcio-calmodulina dependente (PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988).

O NO é um gás solúvel, com meia-vida de 6 a 30 segundos (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980; IGNARRO *et al.*, 1987), tem a capacidade de se difundir para as células musculares lisas vasculares e ativar a guanilato ciclase, promovendo vasodilatação mediada por guanosina monofosfato (GMP cíclico) (SANTHANAM *et al.*, 2007; DURANTE; JOHNSON, F.; JOHNSON, R., 2007), que, por sua vez, reduz o influxo de cálcio (RAPAPORT; DRAZAIN; MURAD, 1983). Adicionalmente, regula células da parede dos vasos e inibe a atividade de fatores de crescimento (McNAMARA *et al.*, 1993).

Segundo De Caterina *et al.* (1995), o NO apresenta propriedades anti-inflamatórias por inibir a expressão de citocina e moléculas de adesão, efeito que



pode ser mediado pelo fator de transcrição nuclear (fator nuclear  $\kappa$ B), o qual se liga à região promotora de genes e codifica proteínas pró-inflamatórias.

Em condições fisiológicas, o NO desempenha importante papel na manutenção da parede vascular, inibindo a inflamação, proliferação celular e trombose, reduzindo o tônus vascular, a ativação de plaquetas e leucócitos, a proliferação de células musculares lisas, a deposição de matriz extracelular e a morte de células endoteliais (DURANTE; JOHNSON, F.; JOHNSON, R., 2007; DE HAAN *et al.*, 2006).

Substâncias vasoativas, como bradicinina, podem estimular a liberação de NO, por efeitos autócrinos e parácrinos (GROVES *et al.*, 1995). Entretanto, o principal estímulo é o estresse de parede nos vasos, mecanismo não dependente de receptor (RUBANYI e VANHOUTTE, 1986).

O NO é também um radical livre e, quando produzido juntamente com o ânion superóxido, forma uma espécie pró-inflamatória altamente reativa: o ânion peroxinitrito, importante mediador da peroxidação de lipídios, incluindo a oxidação da LDL, evento crucial para a aterogênese (DUSTING; SELEMIDS; JIANG, 2004).

Fisiologicamente, pequena quantidade de ânion superóxido intracelular é requerida para a sinalização normal desempenhada pelo NO. Todavia, seu excesso diminui a biodisponibilidade de NO, reduzindo sua difusão para o músculo liso vascular (NAKATA *et al.*, 2008). A produção crônica de EROs pode exceder a capacidade dos antioxidantes celulares enzimáticos {como a glutationa peroxidase-1 - principal enzima antioxidante no citosol e nas mitocôndrias (DE HAAN *et al.*, 2006) - e as formas de superóxido dismutase ligadas à membrana, responsáveis por dismutar o ânion superóxido em  $H_2O_2$ } e não enzimáticos, contribuindo para a doença vascular por indução da ativação endotelial (LAURSEN *et al.*, 2001; DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007).

Grandes quantidades de ânion superóxido formadas captam a maior parte ou todo o NO, promovendo a formação de ânion peroxinitrito (DURANTE; JOHNSON, F.; JOHNSON, R., 2007). A formação e a eliminação das EROs são balanceadas na parede vascular (WASSMANN *et al.*, 2004), cujo papel-chave é desempenhado pelo endotélio na manutenção do tônus vascular e na pressão sanguínea pela liberação de substâncias vasoativas, como o NO (ÜLKER;McKEOWN; BAYRAKTUTAN, 2003).

Apesar de seu excesso ser tóxico, concentrações fisiológicas dessas espécies agem como sinal mediador de diversas respostas, incluindo migração celular e

crescimento (LAURSEN *et al.*, 2001). Em condições normais, a produção de NO predomina, de modo que este radical retira pequenas quantidades de ânion superóxido formado (LAURSEN *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2008), garantindo o equilíbrio do estado oxidativo orgânico.

## **2.2 Modelo experimental de hipertensão por Inibição de óxido nítrico**

A administração de antagonistas da NO sintase bloqueia a síntese de NO e eleva a pressão arterial em animais de experimentação (COOKE e DZAU, 1987). A administração crônica de L-NAME, por via oral, promove hipertensão persistente e lesão renal caracterizada por glomeruloesclerose, isquemia glomerular e infiltrado intersticial renal (BAYLIS *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1992).

Observa-se, na primeira semana, instalação da hipertensão arterial, dependente da dose de L-NAME, associada à vasoconstrição periférica, aumento da resistência vascular (RIBEIRO *et al.*, 1992), taquicardia por hiperatividade simpática (SOUZA *et al.*, 2001) e possível redução do débito cardíaco (KASSAB *et al.*, 1998). A hiperatividade simpática contribui para a elevação da resistência periférica e consequente hipertensão arterial (CUNHA; CABRAL; VASQUEZ, 1993; SANDER; HANSEN; VICTOR, 1997). Tem sido proposta também uma possível ação simpato-excitatória de origem central (QUADRI; CARRETERO; SCICLI, 1999).

Após alguns dias de instalação da hipertensão, a coadministração de L-arginina, substrato natural da NO sintase, reduz, apenas parcialmente, os níveis pressóricos, sugerindo que outros mecanismos fisiopatológicos estejam envolvidos (RIBEIRO *et al.*, 1992; ZATS e BAYLIS, 1998).

O SRAA contribui para este modelo (POLLOCK *et al.*, 1993), que aumenta as atividades da renina plasmática e da enzima conversora, favorecendo o desenvolvimento de alterações estruturais vasculares e miocárdicas (TAKEMOTO *et al.*, 1997). Tratamentos com inibidores da enzima conversora ou com antagonistas AT1 podem prevenir a instalação ou reverter a lesão renal já estabelecida (POLLOCK *et al.*, 1993; RIBEIRO *et al.*, 1992), indicando a participação do SRAA na gênese e manutenção deste modelo de hipertensão.

O cloreto de sódio também exerce influência neste modelo de hipertensão, sendo que sobrecarga salina agrava e restrição sódica previne o desenvolvimento da hipertensão arterial e lesão renal (ZATS e BAYLIS, 1998).

Após algumas semanas de inibição da NO sintase, observa-se nefroesclerose, isquemia, necrose glomerular segmentar, infiltrado intersticial, alterações microvasculares renais e albuminúria progressiva (ZATS e BAYLIS, 1998). Em fases mais avançadas, nota-se depressão da função renal e microangiopatia renal com características funcionais e morfológicas de hipertensão maligna (RIBEIRO *et al.*, 1992). Constata-se, ainda, hipertrofia cardíaca, perda de cardiomiócitos e alterações na microcirculação miocárdica (PEREIRA e MANDARIM-DE-LACERDA, 2001).

### **2.3 Efeitos pleiotrópicos das estatinas sobre o endotélio**

As estatinas, por conterem um componente de estrutura análoga à da HMG-CoA redutase, inibem esta enzima competitivamente, limitando a síntese de LDL-colesterol (McFARLANE *et al.*, 2002), sendo utilizadas na redução do risco cardiovascular (SHITARA e SUGIYAMA, 2006).

Lovastatina, sinvastatina e pravastatina são derivadas de produtos fúngicos; fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina são sintéticas, exercendo efeitos mais potentes (ENDO, 1992).

O transporte para o tecido hepático é influenciado pelos polipetídicos transportadores de ânions orgânicos (OATPs), transportadores expressos em vários órgãos. No fígado, o OATP-C, membro específico desta família, é expresso na membrana basolateral do hepatócito (KONIG *et al.*, 2000). Interações farmacológicas capazes de reduzir a disponibilidade deste receptor ou polimorfismos genéticos que diminuam sua expressão podem reduzir a efetividade de algumas estatinas (LAU *et al.*, 2006; SHITARA e SUGIYAMA, 2006).

O colesterol também é sintetizado em tecidos extra-hepáticos e é crucial na função celular e biosíntese de hormônios esteroides (CORSINI *et al.*, 1999). A exposição de estatinas a tecidos extra-hepáticos pode suprimir a função celular e ocasionar efeitos adversos, como instabilidade da membrana e dano celular, possivelmente contribuindo para miotoxicidade (SIRTORI, 1993).

A inibição da HMG-Co A redutase reduz a biosíntese de farnesil pirofosfato, metabólito intermediário de ubiquinona/coenzima Q10, isoprenoide relacionado à transdução de energia celular no sistema de transporte mitocondrial, gerando estabilização da membrana (MILES *et al.*, 2005). Segundo Lalani *et al.* (2005), uma redução desta coenzima pode causar miotoxicidade.

A redução de LDL-colesterol determina super-regulação de receptores LDL para manter a homeostase intracelular (LENNERNAS e FAGER, 1977). Entretanto, a isoenzima 7A1 do citocromo P450 (CYP7A1, colesterol 7 $\alpha$  hidroxilase), específica do fígado, transforma o colesterol intracelular em ácido biliar, reduzindo-o no hepatócito (BROWN e GOLDSTEIN, 1986).

As estatinas são predominantemente biotransformadas pelas enzimas do citocromo P450 (CYP450) - composto por cerca de 30 isoenzimas (LENNERNAS, 2003). A isoenzima CYP3A4 metaboliza grande número de fármacos em humanos, incluindo a lovastatina, a sinvastatina e a atorvastatina. A rosuvastatina não apresenta substancial metabolismo pelo CYP450 (WHITE, 2002). Substâncias de caráter lipofílico são mais susceptíveis ao metabolismo oxidativo por este sistema e estatinas biotransformadas pelo CYP450 são mais propensas a produzir toxicidade muscular (SHITARA e SUGIYAMA, 2006; THOMPSON *et al.*, 2003).

Na rota de síntese do colesterol, compostos intermediários são formados, apresentando funções biológicas adicionais. Os isoprenóides, farnesil pirofosfato e geranylgeranyl-pirofosfato, se ligam a proteínas sinalizadoras, modificando-as, processo conhecido como prenilação (LIBBY, 2002; SHITARA e SUGIYAMA, 2006). Os fixadores lipídicos, Ras, Rho, Rab, Rac, Ral ou Rap, determinam estresse oxidativo, disfunção endotelial e aterosclerose; estatinas bloqueiam a prenilação (LIBBY, 2002; VAN AELST e D'SOUZA-SCHOREY, 1997). A redução de proteínas sinalizadoras acarreta menor expressão de substâncias inflamatórias ou relacionadas com a aterogênese, como a IL-6, moléculas de adesão de monócitos, proteínas relacionadas com a hemostasia, como o inibidor do plasminogênio tecidual (McFARLANE *et al.*, 2002), inibidor endógeno do ativador do plasminogênio tecidual (WOLFRUM; JENSEN; LIAO, 2003).

Exposição do endotélio à LDL oxidada favorece a liberação de ET-1 (MARTIN-NIZARD *et al.*, 1991) e a expressão de receptores AT1, sendo que as estatinas modulam a expressão de RNA mensageiro de preproendotelina-1 (HERNANDEZ-PERERA *et al.*, 2000) e atenuam a função biológica da angiotensina II (WASSMANN *et al.*, 2001).

Estatinas exercem ainda ação antioxidante sobre o endotélio (WOLFRUM; JENSEN; LIAO, 2003), ativam proteína serina treonina quinase (Akt), que acarreta inibição de apoptose e aumento da produção de NO em cultura de células endoteliais (KUREISHI *et al.*, 2000).

Observa-se, nas análises de dados dos estudos citados, que alguns dos efeitos benéficos associados com estatinas são independentes da redução sérica de colesterol, conhecidos como efeitos pleiotrópicos, que têm gerado profundo interesse sobre o potencial impacto na doença cardiovascular, como estabilização da placa e o benefício na sobrevivência pelo uso de estatina na síndrome coronária aguda (PARADISO-HARDY *et al.*, 2003), na mobilização de células progenitoras endoteliais (LIEVADOT *et al.*, 2001), na inibição de células progenitoras de músculo liso (KUSUYAMA *et al.*, 2006) e redução do risco absoluto de doença cerebrovascular e acidente vascular encefálico (SEVER *et al.*, 2003).

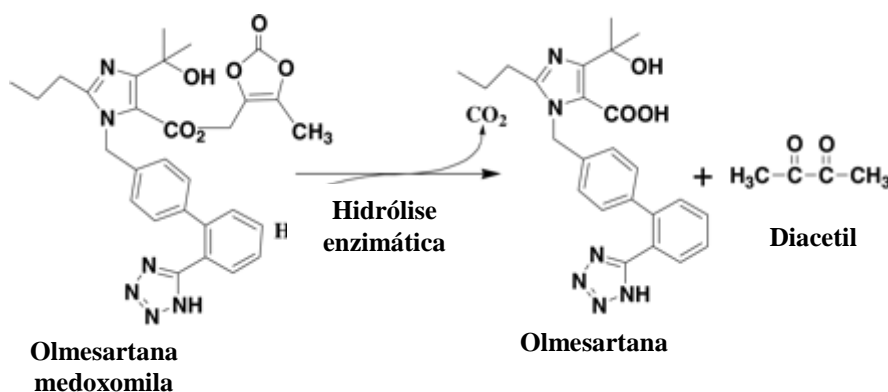
## 2.4 Farmacologia da olmesartana e da rosuvastatina

### 2.4.1 Olmesartana

A olmesartana medoxomila [(5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il) metoxi-4-(1-hidroxil-1-metiletil)-2-propil-1-{4-[2-(tetrazol-5-il)-fenil] fenil} metilimidazol-5-carboxilato] é um pró-fármaco, hidrolizado rápida e completamente no tubo gastrointestinal ao metabólito ativo, olmesartana, sem futura metabolização (MA *et al.*, 2005; MIZUNO *et al.*, 1995).

Sua estrutura química, representada principalmente pelos grupos hidroxila e carboxila, é importante para promover a atividade agonista inversa, explicando a potente ação bloqueadora sobre o receptor AT1 (MIRE;SILFANI; PUGSLEY, 2005).

#### ESQUEMA 1 Hidrólise de olmesartana medoxomila ao metabólito olmesartana.



A olmesartana medoxomila é rapidamente absorvida, apresenta pico de concentração máxima entre 1 a 3 horas, a partir do trato gastrointestinal e a meia-vida de eliminação plasmática é de 10 a 15 horas (KOIKE, 2001). Sua biodisponibilidade é de 25,6% após a administração oral (BRUNNER, 2004; MIZUNO *et al.*, 1995).

A principal via de excreção é nas fezes (60% da dose absorvida), com os remanescentes 40% excretados na urina. A dupla excreção tem implicação prática em situações de disfunção hepática ou renal (KOIKE, 2001).

Considera-se baixo o risco de interações com olmesartana, devido ao fato de não ser biotransformada pelo sistema citocromo P450, ao contrário de muitos fármacos utilizados na clínica (BRUNNER, 2004).

Existem evidências de que olmesartana apresente eficácia anti-hipertensiva superior a outros medicamentos desta classe terapêutica. Oparil, Zaman e Caihoun (2003) observaram em estudo comparativo que, após 8 semanas de tratamento, a redução na pressão arterial média obtida com olmesartana foi superior às obtidas com losartan e valsartan, mas não houve diferença significativa com irbesartana.

Estudos clínicos com olmesartana avaliaram não apenas a eficácia anti-hipertensiva, mas também seus efeitos sobre marcadores de inflamação vascular (EUTOPIA - *European Trial on Olmesartan and Pravastatin in Inflammation and Atherosclerosis*). Trata-se de um estudo multicêntrico, randomizado, placebo controlado, em que se avaliou a significativa redução de parâmetros inflamatórios pela olmesartana (FLISER; BUCHHOLZ; HALLER, 2004). Outro estudo objetivou avaliar a eficácia de olmesartana em aumentar a regeneração do número de células progenitoras endoteliais em pacientes diabéticos não dependentes de insulina (BAHLMANN *et al.*, 2005).

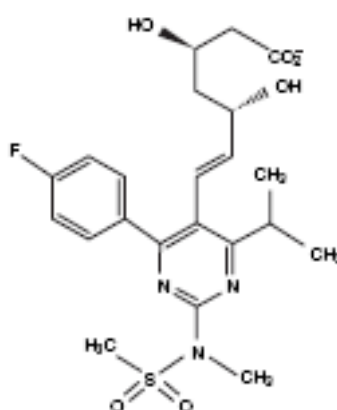
O estudo MORE (*Multicentre, Olmesartan, atherosclerosis Regression Evaluation*) analisou os efeitos de olmesartana sobre lesões ateroscleróticas, sugerindo um efeito redutor no tamanho da placa de ateroma (STUMPE *et al.*, 2007). Observou-se, ainda, efeito benéfico na microcirculação coronária com melhora da dilatação coronariana dependente do endotélio (NAYA *et al.*, 2007). O estudo VIOS (*Vascular Improvement with Olmesartan medoxomil Study*) demonstrou o benefício do tratamento com olmesartana sobre o remodelamento vascular em pacientes hipertensos não diabéticos (SMITH *et al.*, 2008).

O impacto do tratamento com olmesartana na doença renal foi avaliado por dois estudos multicêntricos, que incluíam pacientes diabéticos não insulino-dependentes: ROADMAP (*Randomized Olmesartan and Diabetes Microalbuminuria Prevention Study*) (HALLER *et al.*, 2010) e ORIENT (*Olmesartan Reducing Incidence of End Stage Disease in Diabetic Nephropathy Trial*) (IMAI *et al.*, 2006). O primeiro incluiu pacientes com fatores de risco para doença cardiovascular, sem nefropatia. Pacientes receberam olmesartana ou outro anti-hipertensivo que não atuasse no SRAA. O objetivo primário foi identificar no grupo com olmesartana o retardo no início da microalbuminúria. O segundo estudo incluiu pacientes com nefropatia diabética e o objetivo foi avaliar a progressão da doença renal. Ambos os estudos demonstraram nefroproteção para o grupo com olmesartana.

#### 2.4.2 Rosuvastatina

A rosuvastatina cálcica 7- [4- (4- pfluorofenil)- 6 -isopropil- 2 -(N-metilmetanesulfonamido)- 5 -pirimidinil- 3,5 - dihidroxi- 6 - heptenoato] é a mais recente estatina sintetizada com capacidade inibitória da HMGCoA redutase (SCHACHTER, 2005; SHITARA e SUGYIAMA, 2006).

**ESQUEMA 2** Estrutura química de rosuvastatina cálcica.



Fonte: CAMPO e CARVALHO, 2007.

São atingidas concentrações plasmáticas máximas de rosuvastatina aproximadamente 5 horas após a administração oral. Sua biodisponibilidade absoluta é de aproximadamente 20%. Captada pelo fígado, apresenta ligação de 90% com proteínas plasmáticas, principalmente albumina (SCHACHTER, 2005).

Estudos *in vitro* demonstram mínimo metabolismo da rosuvastatina em hepatócitos, sendo que este ocorre predominantemente pela CYP2C9 e com menor participação pela CYP2C19 (SHITARA e SUGYIAMA, 2006).

O principal metabólito formado, o N-desmetil rosuvastatina, possui 50% da atividade inibitória do componente ativo; produz ainda o metabólito lactona (cl clinicamente inativo). Há pouco ou nenhum metabolismo via CYP3A4, indicando reduzido potencial para interações com substâncias metabolizadas por esta enzima (NEZASA *et al.*, 2004).

Cerca de 90% das doses administradas são excretados sob a forma inalterada nas fezes (consistindo em substância ativa absorvida e não absorvida) e o remanescente excretado na urina, sendo que 5% são excretados sob a forma inalterada na urina. A meia-vida de eliminação plasmática é de aproximadamente 19 horas (SHITARA e SUGYIAMA, 2006).

A rosuvastatina está indicada para tratamento de hiperlipidemia primária e dislipemia mista por reduzir os níveis elevados de colesterol total, LDL-colesterol, Apolipoproteína B, e triglicéridos; para aumentar o HDL-colesterol, para tratamento da hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia familiar homozigótica. Indica-se também para alentececer a progressão da placa arterial de ateroma. Ao inibir a HMG-CoA, rosuvastatina reduz os níveis de colesterol total, LDL-colesterol, triglicérides e promove aumento moderado de HDL-colesterol (SCHACHTER, 2005; SHITARA e SUGYAMA, 2006).

Estudos clínicos sobre rosuvastatina compõem o Programa GALAXY (SCHUSTER, 2007), projeto multicêntrico que incluiu 55 países e objetivou realizar vários estudos sobre rosuvastatina, com foco principal sobre perfis lipídicos aterogênicos e marcadores da inflamação, efeitos sobre a placa de aterosclerose e impacto na morbimortalidade cardiovascular. Neste projeto, patrocinado pela empresa farmacêutica Astra-Zéneca, analisaram-se efeitos da rosuvastatina sobre os perfis lipídicos aterogênicos e marcadores da inflamação vascular. Entre estes, citamos alguns estudos, como o COMETS (*COmparative study with rosuvastatin in subjects with METabolic Syndrome*). Estudo randomizado, duplo cego de 12



semanas de duração que compara o efeito da rosuvastatina com atorvastatina e placebo sobre os níveis de colesterol LDL em pacientes com síndrome metabólica e baixo risco cardiovascular (STALENHOEF *et al.*, 2004).

O ECLIPSE (*An Evaluation to Compare Lipid lowering effects of rosuvastatin and atorvastatin In force titrated subjects: a Prospective Study of Efficacy and tolerability*) é um estudo randomizado de 24 semanas de duração, que compara a eficácia de rosuvastatina e atorvastatina em pacientes com hipercolesterolemia primária e alto risco cardiovascular (FAERGEMAN; SOSEF; DUFFIELD, 2006).

Citamos também MERCURY I e II (*Measuring Effective Reductions in Cholesterol Using Rosuvastatin therapy*). Estudos randomizados abertos de 16 semanas de duração, que comparam a eficácia e a segurança de rosuvastatina frente à atorvastatina, pravastatina e sinvastatina em pacientes com hipercolesterolemia primária (STENDER *et al.*, 2005; BALLANTYNE *et al.*, 2005).

Há ainda POLARIS (*Prospective Optimisation of Lipids by Atorvastatin or Rosuvastatin Investigated in high-risk Subjects with hypercholesterolaemia*). Estudo randomizado duplo cego de 26 semanas de duração, que compara a eficácia e segurança da rosuvastatina e a atorvastatina em pacientes com hipercolesterolemia e alto risco cardiovascular (LEITER *et al.*, 2005).

Já o PULSAR (*Prospective study to evaluate the Utility of Low doses of the Statins Atorvastatin and Rosuvastatin*), é um estudo randomizado aberto, que compara a segurança e eficácia de rosuvastatina e atorvastatina a baixas doses em pacientes com hipercolesterolemia e alto risco cardiovascular (CLEARFIELD *et al.*, 2005).

Citamos também STELLAR (*Statin Therapies for Elevated Lipid Levels compared Across doses to Rosuvastatin*). Estudo randomizado, que compara a eficácia de rosuvastatina com a atorvastatina, pravastatina e sinvastatina em pacientes com hipercolesterolemia primária (JONES *et al.*, 2003).

Outro estudo que também devemos ressaltar é DISCOVERY (*Direct Statin Comparison of LDL-C Values: an Evaluation of Rosuvastatin therapy*). Estudo randomizado, aberto, de 12 semanas de duração, desenhado para avaliar a eficácia da rosuvastatina frente a outras estatinas em pacientes com hipercolesterolemia primária (STRANDBERG; FEELY; SIGURDSSON, 2005).

O estudo ORBITAL (*Open label primary care study: Rosuvastatin Based compliance Initiatives linked to achievement of LDL goals*) é randomizado, aberto, de

24 semanas de duração, e avalia a eficácia de rosuvastatina isolada e em associação em pacientes com hipercolesterolemia primária (WILLICH *et al.*, 2004).

E por ultimo, não menos importante, citamos URANUS (*The Use of Rosuvastatin versus Atorvastatin in type 2 diabetes mellitus*). Estudo randomizado, duplo cego, que compara em pacientes diabéticos tipo II a resposta do LDL-colesterol com o tratamento com rosuvastatina ou atorvastatina (BERNE e SIEWERT, 2005).

Outros estudos objetivaram avaliar os efeitos da rosuvastatina sobre a placa de aterosclerose: ASTEROID (*A Study To Evaluate the effect of Rosuvastatin On Intravascular ultrasound-Derived coronary atheroma burden*). Estudo aberto, de 24 meses de duração, desenhado para avaliar os efeitos de rosuvastatina sobre a espessura da placa de ateroma coronaria (NISSEN, 2003; STEVE e NISSEN, 2006); METEOR (*Measuring Effects on intima média Thickness: an Evaluation Of Rosuvastatin*). Estudo randomizado, duplo cego, de 24 meses de duração, que avalia o efeito da rosuvastatina sobre a placa de ateroma carotídea em pacientes assintomáticos com hipercolesterolemia de baixo risco (CROUSE *et al.*, 2007) e ORION (*Outcome of Rosuvastatin treatment on carotid artery atheroma: a magnetic resonance Imaging Observation*). Estudo randomizado, duplo cego, de 24 meses de duração, avalia o efeito da rosuvastatina sobre a placa carotídea de ateroma em pacientes hipercolesterolêmicos assintomáticos (HATSUKAMI *et al.*, 2001).

O efeito da rosuvastatina sobre a morbimortalidade cardiovascular foi observada nos estudos:

CORONA (*Controlled Rosuvastatin MultiNational Trial in Heart Failure*). Estudo randomizado, duplo cego, que avalia o efeito da rosuvastatina em 5.016 pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica (NYHA II-IV) com tratamento convencional (KJEKSHUS *et al.*, 2006).

JUPITER (*Justification for the Use of statins in Primary prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin*). Estudo randomizado, duplo cego, que avalia a eficácia da rosuvastatina na prevenção primária de doenças cardiovasculares, versus placebo (RIDKER *et al.*, 2003).

AURORA (*A study evaluating the Use of Rosuvastatin in patients requiring Ongoing Renal dialysis: an Assessment of survival and cardiovascular events*). Estudo de 2.775 pacientes com insuficiência renal terminal e submetidos a

hemodiálise comparando os eventos cardiovasculares do grupo que utiliza rosuvastatina contra placebo (FELLSTROM *et al.*, 2006).

Outros estudos paralelos, não incluídos originalmente no programa GALAXY, comparam rosuvastatina com outros fármacos utilizados no tratamento da dislipidemia. Entre eles, destacam-se os estudos: ANDROMEDA (*A randomized, Double-blind study to compare Rosuvastatin [10 e 20mg] and atorvastatin [10 e 20mg] in patients with type II Diabetes*) (BETTERIDGE;GIBSON, 2007) e SOLAR (*Satisfying Optimal LDL-C ATP III goals with Rosuvastatin* (INSULL *et al.*, 2007).

## 2.5 Estudos experimentais *in vivo* com olmesartana e rosuvastatina

Furuhashi *et al.* (2004) administraram olmesartana (0,1 mg/kg/dia) a ratos *Sprague-Dawley* hipertensos e resistentes à insulina e verificaram reduções pressóricas com duas semanas de tratamento. Na dosagem de 0,3 mg/kg/dia observou-se também efeito favorável sobre a produção de radicais livres de oxigênio (YOSHIDA *et al.*, 2004). Já na dose de 0,6 mg/kg/dia Mizuno *et al.* (2002) observaram melhora na proteinúria, hipoalbuminemia e hiperlipidemia, efeitos estes dose-dependentes.

Em doses mais elevadas (1, 3, 5 e 10 mg/kg/dia), olmesartana atenuou a hipertrofia e fibrose cardíaca, a expressão de peptídeo natriurético cerebral (KIM-MITSUYAMA *et al.*, 2004); os danos renais e a proteinúria na nefropatia diabética (NANGAKU *et al.*, 2003). Segundo XU *et al.* (2001), a administração de olmesartana (3 a 10 mg/kg/dia) proporcionou melhora significativa da esclerose glomerular, efeito este considerado dose-dependente.

Outro estudo (KADOWAKI *et al.*, 2009) objetivou avaliar a relação entre a atividade antioxidante de olmesartana e suas ações farmacológicas, tais como efeitos redutores da pressão arterial e efeitos nefroprotetores em ratos nefrectomizados. Nestes animais, a relação albumina oxidada/não oxidada, pressão arterial sistólica e diastólica, creatinina plasmática e excreção urinária de proteína estão elevadas. A olmesartana significativamente suprimiu todos estes parâmetros, após oito semanas de tratamento. A olmesartana também aumentou a remoção de radicais livres do plasma. Observou-se uma boa correlação entre a relação de albumina oxidada e a função renal, enquanto que nenhuma correlação foi encontrada relacionada com a pressão arterial. Baseado nestes achados, os autores

concluíram que as propriedades antioxidantes de olmesartana possam estar relacionadas aos seus efeitos nefroprotetores de forma mais importante que seus efeitos anti-hipertensivos.

Em estudos experimentais, a rosuvastatina foi administrada a ratos em dosagens que variaram de 0,2 a 20 mg/kg/dia. Na dose de 0,2 mg/kg/dia apresentou redução do dano miocárdico, da hipermeabilidade vascular e redução de lesão endotelial (DI NAPOLI *et al.*, 2005); com 0,25 e 1,25 mg/kg/dia, melhorou a derivada de pressão ventricular sobre o tempo, efeito bloqueado com inibidor da NO sintase (IKEDA; YOUNG; LEFER, 2003). Atenuou processo inflamatório associado com doença cerebrovascular, na dosagem de 1 e 10mg/kg/dia (SIRONI *et al.*, 2005). A rosuvastatina (2 mg/kg/dia) melhorou a resposta vasodilatadora coronária (MILLER; TULBERT; BUSIJA, 2004) e a disponibilidade de NO (DI NAPOLI *et al.*, 2005).

Di Napoli *et al.* (2005) demonstraram que a rosuvastatina (doses de 0,2 e 2 mg/kg/dia) reduziu a injúria celular, a permeabilidade vascular e o dano mitocondrial após reperfusão miocárdica. No entanto, na dosagem de 20 mg/kg/dia, estes efeitos não foram observados, provavelmente, decorrente da perda de efeitos benéficos da substância sobre a expressão de NO sintases (indutível e constitutível), associado a maior dano mitocondrial e disfunção da microcirculação coronária. Kim, S.; Kim, C.; Vaziri (2005) verificaram que a rosuvastatina (20 mg/kg/dia) melhorou o perfil lipídico e reduziu a proteinúria.

Os resultados do estudo de Susic *et al.* (SUSIC *et al.*, 2003) demonstram que rosuvastatina reduziu a pressão arterial em ratos geneticamente hipertensos decorrente da redução da resistência vascular periférica. Estes achados hemodinâmicos foram independentes da redução de colesterol plasmático. Ratos tratados com L-NAME apresentaram marcada redução do fluxo coronário com consequente isquemia ventricular, depressão da função sistólica e redução do débito cardíaco. Entretanto, nestes animais, a rosuvastatina não reduziu a pressão arterial, mas diminuiu significativamente a resistência vascular. Simultaneamente, atenuou a redução do débito cardíaco induzido por L-NAME, em parte decorrente do aumento do retorno venoso e pelo aumento do fluxo sanguíneo coronário, mantendo a pressão arterial inalterada. Em conclusão, rosuvastatina reduziu a resistência vascular periférica em ambos os modelos experimentais, o que pode ser decorrente da melhora da função endotelial observada no modelo induzido por L-NAME.

Ratos (n = 60) em insuficiência cardíaca foram tratados durante 17 meses com rosuvastatina isolada e associada à terapia clássica para insuficiência cardíaca (quinapril, torasemide e carvedilol) (GÓMEZ-GARRE *et al.*, 2010). Todos os fármacos foram administrados na água de beber. O tratamento clássico para insuficiência cardíaca inibiu a dilatação ventricular esquerda, hipertrofia cardíaca, fibrose e inflamação, comparativamente aos animais não tratados. Rosuvastatina (10 mg/kg/dia), isoladamente, preveniu a dilatação ventricular esquerda e inflamação cardíaca, mas não modificou a pressão arterial ou a hipertrofia miocárdica. Entretanto, ao ser adicionada à terapia clássica, a rosuvastatina preveniu a dilatação ventricular esquerda, preservou a função cardíaca e normalizou a inflamação. Estes dados mostram que a adição de rosuvastatina ao esquema clássico para tratamento de insuficiência cardíaca pode aumentar o benefício sobre o remodelamento cardíaco neste modelo animal. Todos estes efeitos observados com rosuvastatina foram independentes da redução dos níveis plasmáticos de colesterol e podem ser atribuídos à redução na inflamação miocárdica.

Neto-Ferreira *et al.* (2010) analisaram a eficácia do tratamento com rosuvastatina (20mg/kg/dia, via oral) durante cinco semanas sobre o remodelamento aórtico no modelo de hipertensão arterial por deficiência crônica da síntese de óxido nítrico. Espessamentos das camadas média e íntima de aorta torácica foram observados no grupo hipertenso por L-NAME, sendo que rosuvastatina preveniu estas alterações. Alterações ultraestruturais promovidas por L-NAME, como presença de vesículas intracelulares, alteração na morfologia da membrana em células endoteliais, deposição na matriz extracelular e projeções citoplasmáticas das células de músculo liso para a lâmina elástica interna, foram atenuadas pela rosuvastatina, neste modelo animal. Estes achados não foram acompanhados de redução da pressão arterial.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

Avaliar os efeitos dos tratamentos (isolado e associado) de olmesartana e rosuvastatina sobre o remodelamento miocárdico, vascular, inflamatório e função renal em ratos *Wistar* hipertensos induzidos pela inibição crônica da síntese de óxido nítrico.

### **3.2 Específicos**

- Avaliar a pressão arterial e a frequência cardíaca nos animais durante o período de tratamento dos grupos experimentais;

- Analisar os parâmetros bioquímicos, hematológicos, análise urinária e fatores inflamatórios como: NO e citocinas;

- Identificar o desenvolvimento de processo inflamatório em tecido renal através da presença de infiltração de macrófagos, empregando a análise imuno-histoquímica;

- Verificar a presença de hipertrofia ventricular esquerda;

- Determinar a ocorrência de remodelamento adverso miocárdico e vascular através de análise morfométrica e morfológica das estruturas e o impacto dos tratamentos sobre o mesmo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados oitenta ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) machos, com cerca de 5 semanas de vida e peso corporal variando de 160 a 180 gramas, oriundos do Biotério da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Os oitenta animais foram alojados em grupos de cinco por gaiola de polipropileno de 30 cm de largura, 60 cm de profundidade e 20 cm de altura, forradas com maravalha artificial (não esterilizada). As mesmas foram mantidas em ambientes climatizados, com temperatura média de 23°C e umidade média de 80%.

A alimentação sólida (peletizada) era composta de ração comercial Nuvilab CR1 (Nuvital®, Brasil), cujas características estão descritas no Anexo 1, foi fornecida diariamente na proporção de 10-15 gramas/dia e água filtrada, *ad libitum*.

Todos os procedimentos seguiram os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados sob o número 016/2007 pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF.

### 4.2 Tratamentos

Os animais receberam L-NAME diluído na água de beber, na proporção média de 1mg da substância/5 mL de água, e tiveram o consumo de água monitorado diariamente, a fim de garantir a ingestão da substância na dosagem pré-estabelecida (30 mg/kg/dia). A confirmação da indução do modelo de hipertensão foi verificada através da avaliação semanal da pressão arterial.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos, sendo que em um destes houve apenas a administração de veículo (água destilada) por via oral (gavage) (G1 – CONT - controle negativo). Nos outros sete grupos, foi administrada solução de L-NAME (*Sigma*), durante quatro semanas, na dosagem de 30 mg/Kg/dia (BARBUTO et al., 2004), diluída na água de beber. Esta solução foi preparada e administrada diariamente para evitar degradação. O primeiro, entre estes sete

grupos de ratos, recebeu apenas L-NAME (G2 – LN - controle positivo), sendo que os outros seis grupos, identificados como G3 (LN+OLM5), G4 (LN+ROS20), G5 (LN+OLM0,5), G6 (LN+ROS2), G7 (LN+OLM0,5+ROS2) e G8 (LN+OLM5+ROS20) foram tratados diariamente com olmesartana (*Sankyo*), e/ou rosuvastatina (*Astra-Zeneca*), durante quatro semanas. A administração destes fármacos foi realizada em cada um dos animais, por via oral (gavage), diariamente, pela manhã.

Os comprimidos de olmesartana e rosuvastatina foram triturados e diluídos em água destilada, diariamente, iniciando-se com o primeiro dia da administração de L-NAME, nas dosagens conforme especificadas:

Grupo G3 (LN+OLM5) recebeu durante quatro semanas L-NAME e olmesartana na dose de 5mg/Kg/dia;

Grupo G4 (LN+ROS20) recebeu L-NAME e rosuvastatina na dose de 20mg/Kg/dia;

Grupo G5 (LN+OLM0,5) recebeu L-NAME e olmesartana na dose de 0,5mg/Kg/dia;

Grupo G6 (LN+ROS2) recebeu L-NAME e rosuvastatina na dose de 2mg/Kg/dia;

Grupo G7 (LN+OLM0,5+ROS2) recebeu L-NAME e olmesartana na dose de 0,5mg/Kg/dia associada a rosuvastatina na dose de 2mg/Kg/dia;

Grupo G8 (LN+OLM5+ROS20) recebeu L-NAME e olmesartana na dose de 5mg/Kg/dia associada a rosuvastatina na dose de 20mg/Kg/dia.

No vigésimo oitavo dia após o início do experimento, os animais foram eutanasiados mediante anestesia profunda com pentobarbital sódico (*Thiopental, Cristália, Brasil*) administrado intraperitoneal na dose de 50mg/kg de peso corpóreo (HIGASHIURA *et al.*, 2000).



### **4.3 Coleta de material biológico**

Após anestesia profunda, o tórax e o abdome dos animais foram abertos através de incisão mediana ventral e as amostras biológicas de interesse foram coletadas.

Amostras de sangue foram coletadas por punção no ventrículo direito para a realização das análises de interesse, empregando-se um tubo contendo citrato e outro EDTA como anticoagulantes e, ainda, outra alíquota sem anticoagulante para a obtenção do soro. O plasma citratado e o soro foram obtidos por centrifugação a 1811 x g, a temperatura de 4°C durante 15 minutos. Alíquotas de ambos foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da análise. O sangue total (contendo EDTA) foi empregado para a realização das análises hematológicas.

Amostras de urina foram obtidas por punção de bexiga para determinar o parâmetro de função renal (relação albumina/creatinina).

O átrio direito foi aberto e o catéter de perfusão introduzido no ventrículo esquerdo para perfundir o sistema cardiovascular, primeiramente com solução fisiológica e, posteriormente, com solução fixadora contendo formol tamponado a 10% pH=7,4. Os órgãos (rim, fígado, coração e aorta) foram imediatamente retirados e, fragmentos foram mantidos em solução de formol tamponado a 10% até o processamento.

### **4.4 Avaliação de parâmetros fisiológicos e hemodinâmicos**

Os grupos foram avaliados diariamente para análise do consumo de água, diluição e administração dos fármacos. O peso corpóreo e pressão arterial foram mensurados semanalmente. Os parâmetros do tempo controle foram realizados antes do início do experimento, após os animais estarem totalmente condicionados ao procedimento, com o objetivo de minimizar o estresse.

#### **a- Peso corpóreo**

Foi utilizada balança de precisão para aferição da massa corpórea, ao longo do experimento.

#### **b- Pressão arterial sistólica e frequência cardíaca**

Foi utilizada a medida indireta da pressão arterial com o método não invasivo de pletismografia da artéria da cauda com alta equivalência com a medida direta (LE 5001, Panlab, Espanha), avaliando-se a pressão arterial sistólica (PS) e frequência cardíaca (FC). Este procedimento foi realizado após o animal estar completamente adaptado ao procedimento, necessário para minimizar o estresse. Foram considerados os valores das médias das medidas pressóricas, obtendo-se pelo menos seis valores de cada animal por semana. As verificações da PS e da FC foram realizadas pela manhã em todos os grupos.

Valores de PS e de FC foram obtidos no início do experimento e no final de cada semana, para todos os animais em todos os grupos, perfazendo cinco momentos de análise (basal, semanas 1, 2, 3 e 4).

## **4. 5 Análises laboratoriais**

### 4.5.1 Análises bioquímica, hematológica e urinária

No soro dos animais foram quantificados os níveis de colesterol total (CT), triglicérides (Tg), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), creatinina (Cr). Análises bioquímicas foram realizadas, utilizando-se o equipamento *Cobas Mira, Roche (Kit Biotécnica)*.

No sangue total foram avaliados os parâmetros hematológicos (hemograma e plaquetas) empregando sistema automatizado.

Foi determinada na urina a relação albumina/creatinina, de acordo com protocolos de rotina.

### 4.5.2 Dosagem de óxido nítrico e de citocinas

O NO foi avaliado pelos produtos oriundos de quebra enzimática do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) através do método de *Griess* (GREEN *et al.*, 1982). O nível de nitrito/nitrato (NOx) foi determinado como descrito previamente por Saleh *et al.* (1999). As amostras foram homogeneizadas com ácido tricloroacético 50% e centrifugadas a 14.000 rpm (em g) por 10 minutos. Após centrifugação, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra e 100  $\mu\text{L}$  do reagente de *Griess* a cada poço da placa. Foi preparado o branco o qual continha 100  $\mu\text{L}$  de

água destilada e 100 µL do reagente de *Griess*. Solução de nitrato de sódio (NaNO<sub>2</sub>) foi utilizada com padrão para a construção da curva de calibração (concentração: 0,012 – 200 µM). A concentração de nitrito/nitrato foi estimada através de reação colorimétrica, com auxílio de leitor de placa (*Organon Technica, Roseland, NJ, USA*) em comprimento de onda fixo de 540 nm. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos como µM.

Os parâmetros de atividade inflamatória foram avaliados no plasma dos animais pela análise de Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α) *OptEIA, BD* pelo método ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), de acordo com instruções do fabricante. Nessa técnica, um anticorpo monoclonal específico foi adsorvido à placa. Após adição da amostra de soro na qual se encontra o mediador a ser dosado, procedeu-se à incubação, ocasião em que as moléculas de antígenos se fixaram aos anticorpos adsorvidos à placa. Por meio de lavagem, todo o material não-fixado foi eliminado. A seguir, adicionou-se novo anticorpo, com especificidade para um determinante antigênico ligado à placa, obtendo-se o complexo anticorpo-antígeno-anticorpo-enzima (técnica de sanduíche). Nova lavagem foi feita para remoção dos anticorpos não-ligados. A seguir, acrescentou-se substrato que tem a propriedade de, quando em contato com a enzima, assumir coloração diferente, proporcional à quantidade de mediador presente na amostra (antígeno). A leitura foi feita em leitora de placas (*BioRad*) em comprimento de onda fixo de 450 nm e comparada a uma curva padrão obtida com concentrações conhecidas dos mediadores recombinantes.

#### 4.5.3 Análises histopatológica, morfométrica e imuno-histoquímica

Amostras de tecidos (coração, aorta, fígado e rim) foram fixadas em formol tamponado a 10% (pH=7,0) por um período mínimo de 24 horas. Após a fixação, as amostras foram desidratadas gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico (70 a 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina, conforme métodos histopatológicos de rotina. Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados utilizando-se micrótomo (*American Optical Co. "820", Spence, EUA*), obtendo-se seções de 3 micra de espessura. As lâminas histopatológicas foram mantidas em estufa para secagem, e os cortes, posteriormente, submetidos à

coloração por hematoxilina e eosina para análise morfológica e tricrômio de *Masson*, para análise das estruturas intersticiais conjuntivais.

Todas as análises histológicas foram realizadas pelo mesmo observador sem conhecimento prévio de qual grupo pertencia os animais.

Imagens histológicas foram obtidas pelas objetivas de 4x a 100x do microscópio de luz (*BX51, OLYMPUS, EUA*), fotografadas com câmara digital (*COOLSNAP-PRO COLOR, Media Cybernetics, EUA*) e avaliadas em um sistema computadorizado de captura de imagens *Image Pro-Plus*. As análises morfométricas foram realizadas a seguir. Os perímetros das fibras cardíacas foram avaliados a partir de cortes transversais e comparados entre os animais dos diferentes grupos experimentais com o objetivo de detectar aumento do diâmetro, caracterizando hipertrofia de miócito cardíaco. Cortes circulares ou próximos a circulares de aorta torácica de cada grupo foram selecionados aleatoriamente e analisados histomorfometricamente, para cálculo da relação média e íntima/lúmen (*WANG et al., 2007*), indicativa de hipertrofia vascular. Esta relação foi obtida através de planimetria, realizando-se a mensuração da área da camada média e íntima e a área do lúmen arterial, obtendo-se, assim, a relação média e íntima / lúmen.

Áreas de deposição de fibrose perivascular foram quantificadas por morfometria e relacionadas às áreas totais dos vasos da microcirculação miocárdica.

No tecido hepático foi analisada a presença de alterações histopatológicas com a finalidade de avaliar hepatotoxicidade.

No tecido renal foi realizada análise morfológica dos túbulos (para pesquisa de dilatação tubular), vasos sanguíneos (para identificar fibrose intimal, microtrombose, necrose fibrinóide), glomérulos (para análise de glomeruloesclerose, atrofia glomerular) e compartimento intersticial para detectar alterações no colágeno e pesquisa de células inflamatórias (400X), com o objetivo de graduar as possíveis alterações vigentes. Área da superfície glomerular foi analisada morfometricamente para determinar a área ( $\mu\text{m}^2$ ) de pelo menos 50 glomérulos por animal (*TU et al., 2008*). Também no tecido renal foi realizada imuno-histoquímica em parafina para detectar o número de macrófagos nos glomérulos dos animais, utilizando-se anticorpo monoclonal contra macrófagos/monócitos de ratos (*CD68, code MCA3414GA, lot 131107, Serotec, Oxford, UK*) (*HARTNER et al., 2005*). O número de glomérulos foi determinado contando-se aleatoriamente 100 glomérulos nos campos microscópios com aumento de 400X. A preparação do material foi realizada

pelo laboratório Anticorpos, Niterói, Rio de Janeiro, adotando-se a técnica descrita abaixo.

Cortes histológicos com 4 micra de espessura foram pré-tratadas com 10Mm de tampão citrato / pH 6,0 em banho-maria durante 40 minutos a 95-99°C para recuperação antigênica por calor. Após esfriar por 20 minutos, seguiram-se lavagens em água corrente. A seguir, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% em metanol a 70% (ou solução comercial de água oxigenada a 3% = 10 volumes), em um banho de 20 minutos; seguindo-se lavagens em água corrente. Após o bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído na proporção 1:100 (1 parte de anticorpo para 100 partes de solução tampão fosfato, conforme descrito a seguir) por 1 hora em temperatura ambiente.

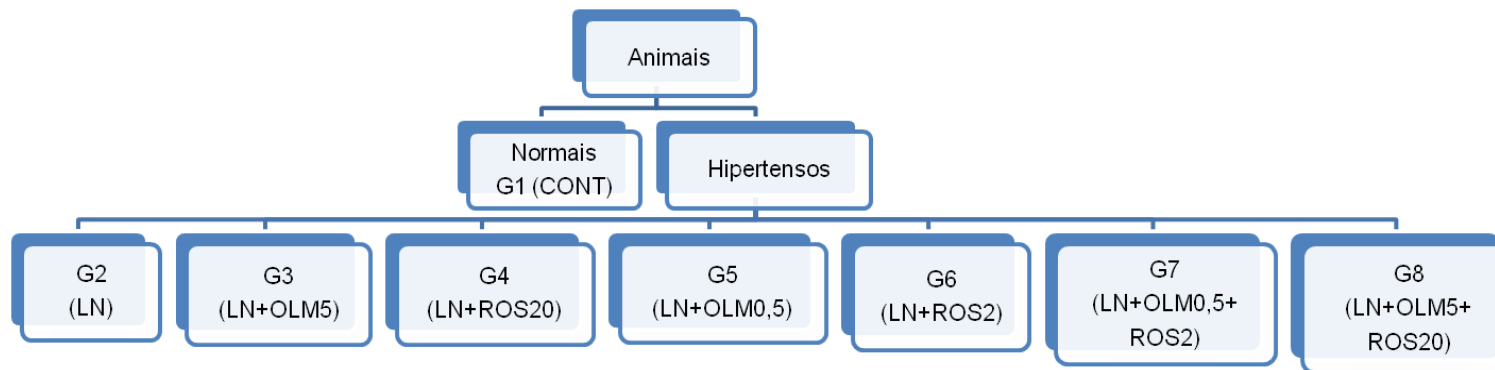
Solução tampão fosfato 7,6 (tampão de lavagem):

Cloreto de sódio p.a. (NaCl) .....	8,17g;
Fosfato de sódio dibásico anidro p.a.(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	1,05g;
Fosfato de sódio monobásico p.a.(NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O).....	0,31g;
Água destilada, q.s.p.....	1000ml.

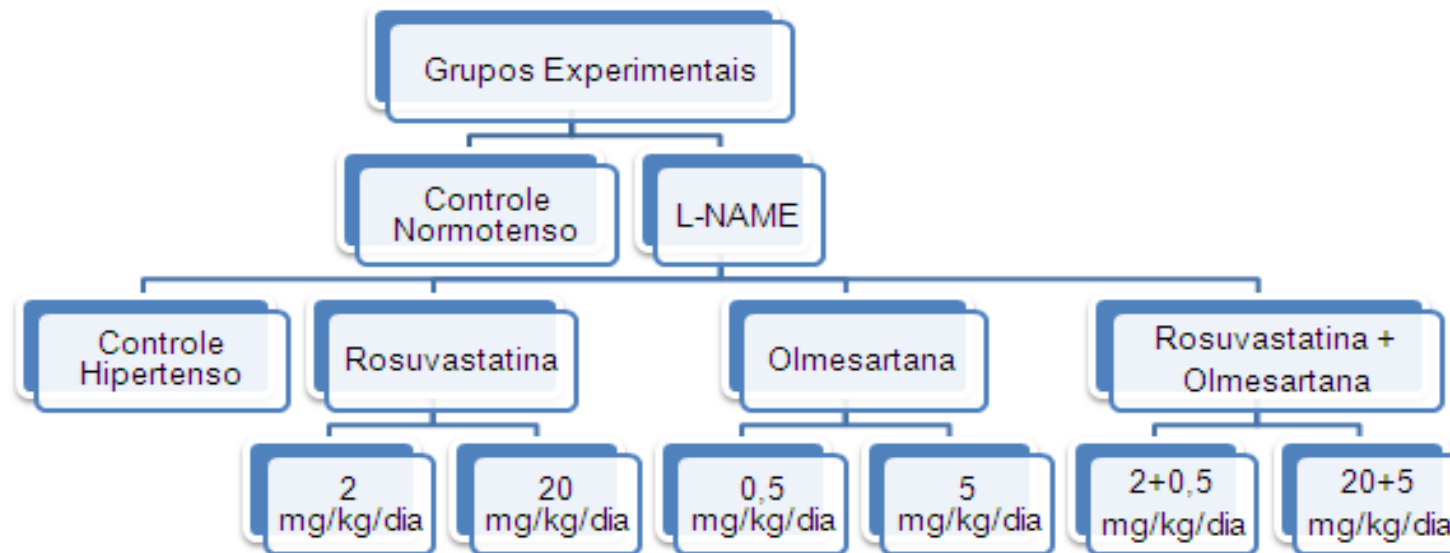
Após incubação das lâminas com anticorpo específico, iniciou-se a reação da estreptavidina-biotina-peroxidase (*EasyPath Super ABC KIT*, Brasil), da forma como se segue: lavagem das lâminas com solução tampão PBS; incubação com anticorpo secundário biotilado, diluído em PBS, durante 30 minutos à temperatura ambiente; lavagem com solução tampão PBS; incubação com complexo ABC/StreptABC diluído em tampão PBS, durante 30 minutos à temperatura ambiente; revelação e montagem (incubação das lâminas em solução substrato - diaminobenzidina - DAB marca Dako código K3466 -, durante 30 segundos a 2 minutos, lavagem com água corrente quando o corte histológico adquirir coloração marrom; contracoragem com hematoxilina de *Harris* por 20 segundos a 1 minuto e lavagem em água corrente; desidratação das lâminas (álcool e xilol); montagem das lâminas com bálsamo de Damar (goma de Damar diluída em xilol) para leitura em microscopia óptica comum.

#### **4.6 Desenho experimental**

O fluxograma dos grupos experimentais e o fluxograma dos diferentes tratamentos propostos estão esquematizados à seguir:

**FLUXOGRAMA 1** Fluxograma dos grupos experimentais.

**FLUXOGRAMA 2** Fluxograma dos diferentes tratamentos propostos.





#### 4.7 Análise estatística

As variáveis morfométricas, os parâmetros fisiológicos, bioquímicos, hematológicos e imuno-histoquímicos foram submetidos à análise estatística descritiva e inferencial mediante submissão dos mesmos à análise de variância (ANOVA – *one way*) seguida pelo teste *pos-hoc* de *Tukey* ou à análise de *Kruskall-Wallis* seguida pelo teste de *Tamhane*, quando aplicáveis. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.). O nível de significância adotado foi de 5 % ( $p < 0,05$ ).

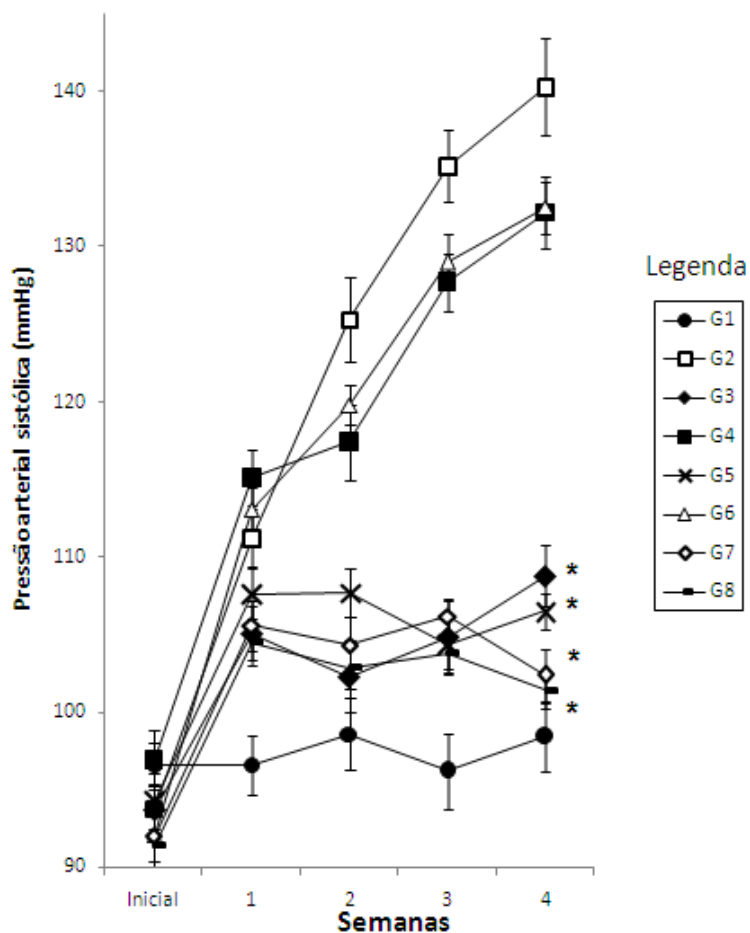
Análises e gráficos foram realizados utilizando-se pacote estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 13.0 e *GraphPad Prism* versão 5.01 para *Windows*.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Pressão arterial sistólica e frequência cardíaca**

Os valores iniciais da pressão arterial sistólica foram semelhantes em todos os grupos. Ao final da primeira semana de tratamento com L-NAME, o grupo G2 (LN) exibiu elevação da PS em relação ao controle (G1 - CONT) ( $p < 0,0001$ ). Ao final da segunda semana de tratamento, os grupos de animais tratados com rosuvastatina 20 ou 2mg/kg/dia mantinham-se hipertensos, padrão que se manteve até o final do experimento, na quarta semana (Gráfico 1 e Tabela 1 em Anexo A).

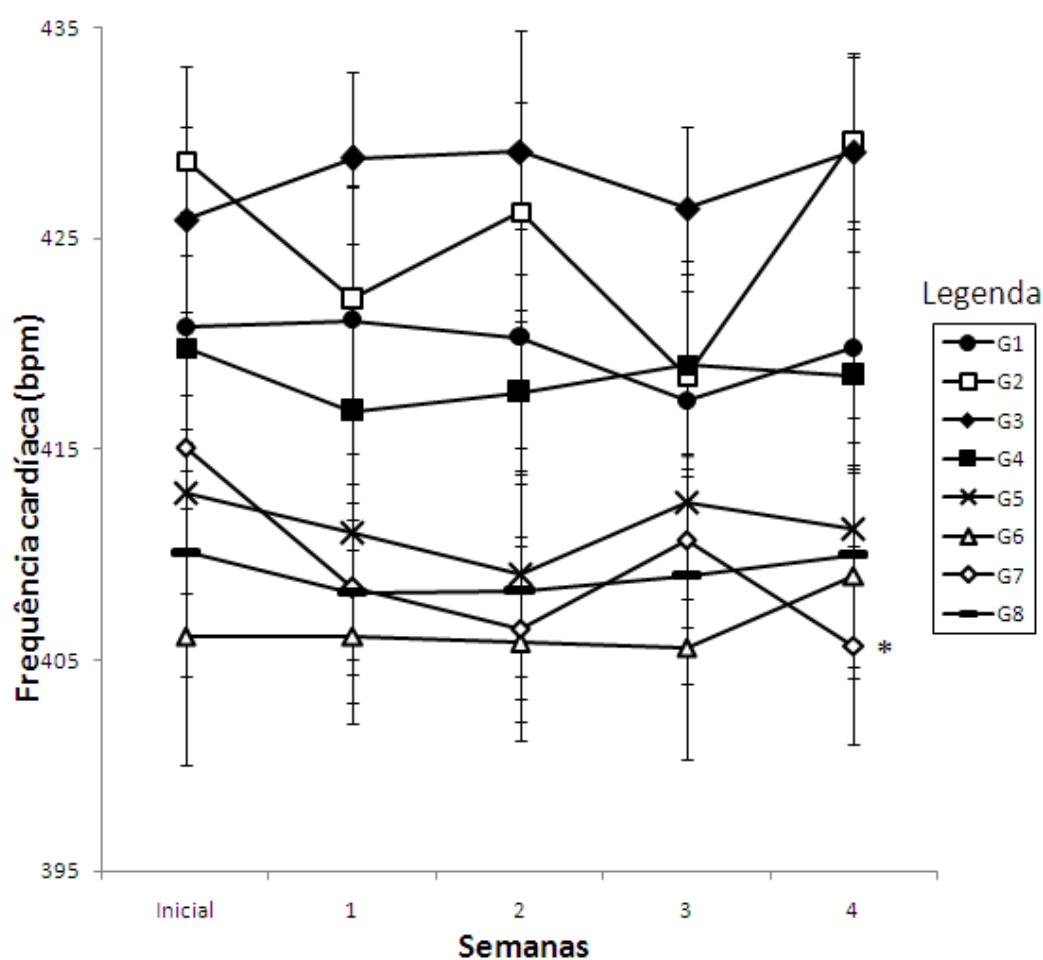
**GRÁFICO 1** Pressão Arterial Sistólica (mmHg) dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.



G1=grupo controle; G2=grupo L-NAME; G3=grupo olmesartana 5mg/kg/dia; G4=grupo rosuvastatina 20mg/kg/dia; G5=grupo olmesartana 0,5mg/kg/dia; G6=grupo rosuvastatina 2mg/kg/dia; G7=grupo olmesartana 0,5mg/kg/dia + rosuvastatina 2mg/kg/dia; G8=grupo olmesartana 5mg/kg/dia + rosuvastatina 20mg/kg/dia. ANOVA seguida de Tukey (\*p < 0,0001). Análises estatísticas realizadas entre G2 e os diferentes grupos experimentais.

Os valores da FC do grupo L-NAME (G2 - LN) mantiveram-se inalterados em relação ao grupo controle (G1 - CONT), durante todo o experimento. No final do estudo, apenas o grupo olmesartana 0,5mg/kg/dia + rosuvastatina 2mg/kg/dia (G7 - LN+OLM0,5+ROS2) demonstrou redução da FC comparativamente ao grupo L-NAME (G2 - LN) ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 2 e Tabela 2 em Anexo B).

**GRÁFICO 2** Frequência cardíaca (bpm) dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.



G1=grupo controle; G2=grupo L-NAME; G3=grupo olmesartana 5mg/kg/dia; G4=grupo rosuvastatina 20mg/kg/dia; G5=grupo olmesartana 0,5mg/kg/dia; G6=grupo rosuvastatina 2mg/kg/dia; G7=grupo olmesartana 0,5mg/kg/dia + rosuvastatina 2mg/kg/dia; G8=grupo olmesartana 5mg/kg/dia + rosuvastatina 20mg/kg/dia. ANOVA seguida de Tukey (\* $p < 0,0001$ ). Análises estatísticas realizadas e entre G2 e os diferentes grupos experimentais.

## 5.2 Análises laboratoriais

### 5.2.1 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Os diversos grupos experimentais apresentaram valores semelhantes para CT, Tg, AST, ALT, FA e Cr, quando comparados ao grupo controle (G1 - CONT) (Tabela 3).

**TABELA 3** Colesterol total, triglicérides, aminotransferases, fosfatase alcalina e creatinina dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

	<b>CT (mg/dL)</b>	<b>TG</b>	<b>AST (U/L)</b>	<b>ALT (U/L)</b>	<b>FA (mg/dL)</b>	<b>Cr mg/dL)</b>
<b>G1</b>	71,0±6,3	73,7±5,8	250,3±45,1	102,3±12,1	236,0±14,6	1,1±0,04
<b>G2</b>	74,1±4,4	89,2±6,8	222,4±7,8	112,5±3,5	254,2±10,2	0,9±0,03
<b>G3</b>	88,5±4,7	90,7±6,2	199,7±17,9	104,3±10,1	277,3±27,6	0,9±0,07
<b>G4</b>	82,5±7,0	78,7±15,7	227,3±13,1	116,0±4,0	259,9±23,5	1,0±0,09
<b>G5</b>	88,6±2,7	92,8±6,4	192,0±14,7	96,4±5,2	257,1±13,7	0,9±0,03
<b>G6</b>	72,8±3,9	72,6±4,5	186,1±13,2	99,2±2,4	236,7±15,3	1,0±0,07
<b>G7</b>	74,5±3,9	73,1±3,1	174,8±2,9	93,6±6,2	254,1±10,5	1,0±0,07
<b>G8</b>	87,9±2,6	78,1±2,1	182,4±3,6	103,0±2,4	263,1±9,0	0,9±0,03

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (n=10 animais/grupo) e analisados estatisticamente através de ANOVA seguida de *Tukey* ( $p > 0,05$ ). G1=grupo controle; G2=grupo L-NAME; G3=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia; G4=grupo rosuvastatina 20 mg/kg/dia; G5=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia; G6=grupo rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G7=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia+rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G8=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia+rosuvastatina 20 mg/kg/dia. CT (colesterol total), Tg (triglicérides), AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), FA (fosfatase alcalina), Cr (creatinina). Os parâmetros bioquímicos dos diferentes grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas.

Os animais pertencentes ao Grupo 2 (LN) apresentaram elevação da contagem global dos leucócitos em relação aos animais do Grupo 1 (CONT) ( $p = 0,007$ ). Este aumento no número global de leucócitos promovido por L-NAME não foi observado nos animais tratados simultaneamente com rosuvastatina 20 mg/kg/dia (G4 - LN+ROS20) ( $p = 0,002$ ).

Na análise diferencial da série branca e nos demais parâmetros hematológicos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Tabela 4).

**TABELA 4** Parâmetros hematológicos dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais ao final do protocolo.

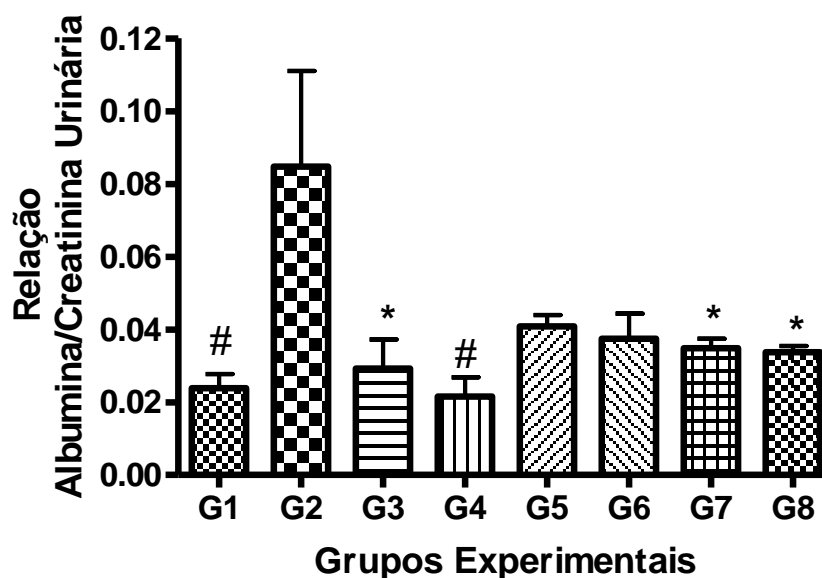
Parâmetros hematológicos	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	P
Segmentados (%)	16,63±0,56	17,13±2,02	16,13±1,94	13,63±1,32	16,25±0,67	15,63±1,44	13,50±1,21	15,25±1,63	>0,05
Linfócitos (%)	65,50±1,75	67,75±1,33	70,38±1,31	67,63±1,18	66,25±1,49	67,13±0,97	69,75±0,92	66,38±0,89	
Monócitos (%)	18,13±1,72	15,13±2,03	13,63±0,80	18,88±1,90	17,5±1,58	17,25±1,71	15,0±0,96	20,13±1,65	
Hematimetria (milhões/mm <sup>3</sup> )	7,188±0,11	7,52 ±0,05	7,463±0,08	7,334±0,18	7,200±0,08	7,46 ±0,07	7,413±0,08	7,300±0,18	
Hematócrito (%)	43,16±1,20	44,5±0,73	44,77±0,74	42,41±1,06	43,22±1,11	44,14±0,72	44,18±0,51	42,60±0,92	
Hemoglobina (g/dL)	15,02±0,52	14,66±0,29	14,97±0,26	14,41±0,36	14,47±0,37	14,52±0,28	14,55±0,23	14,23±0,35	
Plaquetas (mil/mm <sup>3</sup> )	641,0±30,8	620,1±27,1	703,6±30,18	651,0±37,38	642,1±28,6	658,9±14,3	700,4±25,6	655,9±25,9	
Leucometria global (mil/mm <sup>3</sup> )	6,09±0,32*	7,09±0,22	6,93±0,38	5,96±0,45*	6,31±0,23	7,13±0,19	6,83±0,29	6,40±0,23	<0,01

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (n=10 animais/grupo) e analisados estatisticamente através de ANOVA seguida de Tukey (p<0,05). G1=grupo controle; G2=grupo L-NAME; G3=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia; G4=grupo rosuvastatina 20 mg/kg/dia; G5=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia; G6=grupo rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G7=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia+rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G8=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia+rosuvastatina 20 mg/kg/dia. Análises estatísticas realizadas entre G2 e os diferentes grupos experimentais.

### 5.2.2 Análise da proteinúria

O grupo hipertenso (G2 - LN) evidenciou aumento da relação albumina/creatinina urinária (RACU) em relação ao grupo controle normotenso (G1 - CONT) ( $p = 0,009$ ). Os grupos tratados com olmesartana 5 mg/kg/dia (G3 - LN+OLM5), rosuvastatina 20 mg/kg/dia (G4 - LN+ROS20) e as associações destes fármacos exibiram menores RACU ( $p = 0,022$ ;  $p = 0,002$  e  $p = 0,022$ , respectivamente) (Gráfico 3 e Tabela 5 em Anexo C).

**GRÁFICO 3** Relação Albumina/Creatinina Urinária dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.



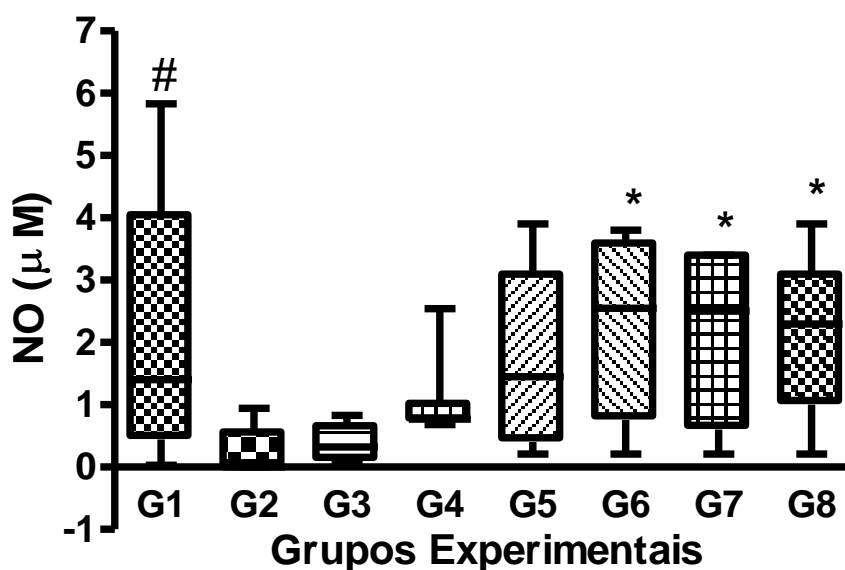
G1=grupo controle; G2=grupo L-NAME; G3=grupo olmesartana 5mg/kg/dia; G4=grupo rosuvastatina 20mg/kg/dia; G5=grupo olmesartana 0,5mg/kg/dia; G6=grupo rosuvastatina 2mg/kg/dia; G7=grupo olmesartana 0,5mg/kg/dia + rosuvastatina 2mg/kg/dia; G8=grupo olmesartana 5mg/kg/dia + rosuvastatina 20mg/kg/dia. ANOVA seguida de *Tukey* (\* $p < 0,05$ ; # $p < 0,01$ ). Análises estatísticas realizadas entre G2 e os diferentes grupos experimentais.

### 5.2.3 Análise dos parâmetros inflamatórios

#### 5.2.3.1 Óxido nítrico

Os animais pertencentes ao grupo L-NAME (G2 - LN) apresentaram redução significativa de NOx em relação ao controle ( $p = 0,005$ ). Apenas os animais pertencentes ao grupo rosuvastatina 2 mg/kg/dia (G6 - LN+ROS2) e as associações de olmesartana e rosuvastatina (G7 - LN+OLM0,5+ROS2 e G8 - LN+OLM5+ROS20) evidenciaram elevação significativa de NO em relação ao grupo L-NAME (G2 - LN) ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 4 e Tabela 6 em Anexo D).

**GRÁFICO 4** Nitrito/Nitrato plasmático dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.



G1=grupo controle; G2=grupo L-NAME; G3=grupo olmesartana 5mg/kg/dia; G4=grupo rosuvastatina 20mg/kg/dia; G5=grupo olmesartana 0,5mg/kg/dia; G6=grupo rosuvastatina 2mg/kg/dia; G7=grupo olmesartana 0,5mg/kg/dia + rosuvastatina 2mg/kg/dia; G8=grupo olmesartana 5mg/kg/dia + rosuvastatina 20mg/kg/dia. *Kruskal-Wallis*, seguido de *Tamhane*(\* $p < 0,05$ ; # $p < 0,01$ ).

#### 5.2.3.2 Citocinas

Os animais pertencentes ao grupo L-NAME (G2 - LN) apresentaram elevação plasmática significativa de IL-6 em relação aos animais pertencentes ao grupo controle (G1 - CONT) ( $p < 0,0001$ ). Todos os tratamentos instituídos inibiram



igualmente a elevação induzida por L-NAME ( $p < 0,0001$ ). O grupo L-NAME (G2 - LN) exibiu elevação plasmática significativa de TNF- $\alpha$  em relação ao controle (G1 - CONT) ( $p = 0,008$ ). Os animais pertencentes ao grupo rosuvastatina 2mg/kg/dia (G6 - LN+ROS2), e os demais tratamentos instituídos, inibiram a elevação induzida por L-NAME ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente) (Tabela 7).

**TABELA 7** Interleucina-6 e Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  plasmáticos dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

	IL-6 (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)
G1	7,4 $\pm$ 0,4	25,5 $\pm$ 1,8#
G2	25,3 $\pm$ 2,0	35,3 $\pm$ 4,7
G3	6,9 $\pm$ 0,6*	26,4 $\pm$ 1,5+
G4	8,7 $\pm$ 0,1*	26,1 $\pm$ 1,4+
G5	6,9 $\pm$ 0,6*	27,4 $\pm$ 1,0+
G6	10,2 $\pm$ 0,5*	25,4 $\pm$ 1,2&
G7	8,6 $\pm$ 0,4*	27,1 $\pm$ 0,7+
G8	9,3 $\pm$ 0,2*	26,9 $\pm$ 0,8+

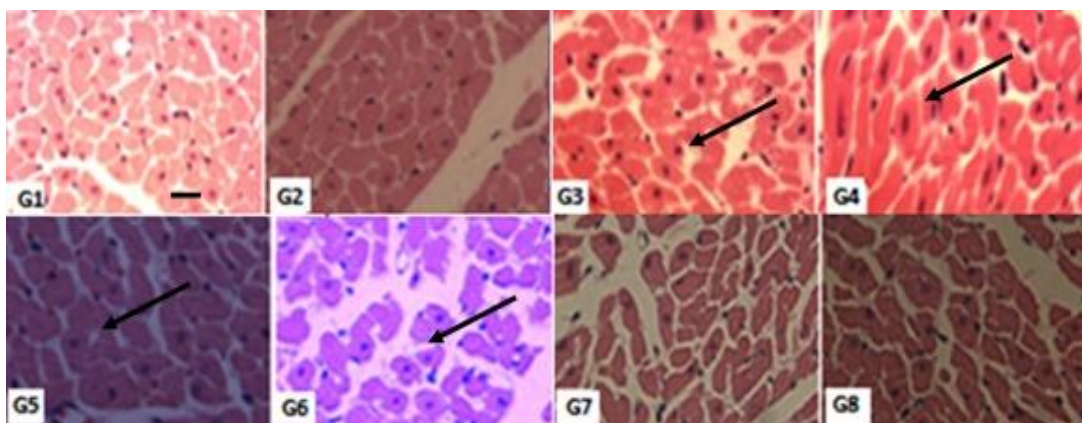
Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média ( $n=10$  animais/grupo) e analisados estatisticamente através de ANOVA seguida de *Tukey* ( $*p < 0,001$ ;  $\#p < 0,01$ ;  $\&p < 0,001$ ;  $+p < 0,05$ ). IL-6=interleucina-6; TNF-  $\alpha$ =fator de necrose tumoral-alfa; G1=grupo controle; G2=grupo L-NAME; G3=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia; G4=grupo rosuvastatina 20 mg/kg/dia; G5=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia; G6=grupo rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G7=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia+rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G8=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia+rosuvastatina 20 mg/kg/dia. Análises estatísticas realizadas entre G2 e os diferentes grupos experimentais.

### 5.3 Análises histológicas e morfométricas

#### 5.3.1 Área transversa de cardiomiócito

Os animais pertencentes ao grupo L-NAME (G2 - LN) apresentaram maior área transversa dos cardiomiócitos (Fotografia 2), indicativo de hipertrofia miocárdica, em relação ao grupo controle (G1 - CONT) ( $p < 0,0001$ ). Todos os tratamentos instituídos inibiram significativamente o desenvolvimento de hipertrofia miocárdica ( $p < 0,0001$ ) Fotografia 1 – Tabela 8.

**FOTOGRAFIA 1** Área transversa dos cardiomiócitos (setas pretas) dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscopia de luz (aumento 1.000X).

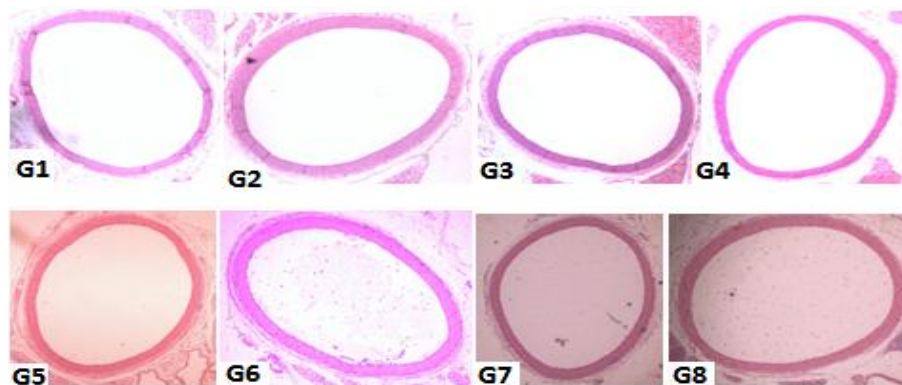


Área transversa dos cardiomiócitos (setas pretas) dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscopia de luz (aumento 1.000x). Legenda: G1 = grupo controle, G2 = grupo L-NAME (G2), G3 = grupo olmesartana 5 mg/kg/dia, G4 = grupo rosuvastatina 20 mg/kg/dia, (G5) = grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia, (G6) = grupo rosuvastatina 2 mg/kg/dia, G7 = grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia associado a rosuvastatina 2 mg/kg/dia, (G8) = grupo olmesartana 5 mg/kg/dia associado a rosuvastatina 20 mg/kg/dia. Barra corresponde a 5  $\mu$ m.

### 5.3.2 Análise da relação média e íntima sobre o lúmen de aorta torácica

Os animais pertencentes ao grupo L-NAME (G2 - LN) apresentaram maior relação média e íntima sobre o lúmen de aorta torácica (Fotografia 2), denotando hipertrofia vascular em relação aos animais pertencentes ao grupo controle (G1 - CONT) ( $p < 0,0001$ ). Os animais pertencentes aos demais grupos de tratamento não apresentaram hipertrofia vascular em relação aos animais do grupo L-NAME, exceto os animais tratados com rosuvastatina isoladamente na dosagem de 2 mg /kg/dia (G6 - LN+ROS2). Rosuvastatina na dosagem de 20 mg/kg/dia potencializou o efeito de olmesartana sobre a hipertrofia vascular (G8 - LN+OLM5+ROS20) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 8).

**FOTOGRAFIA 2** Cortes transversais de aorta torácica dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscopia de luz (aumento 1.000X).

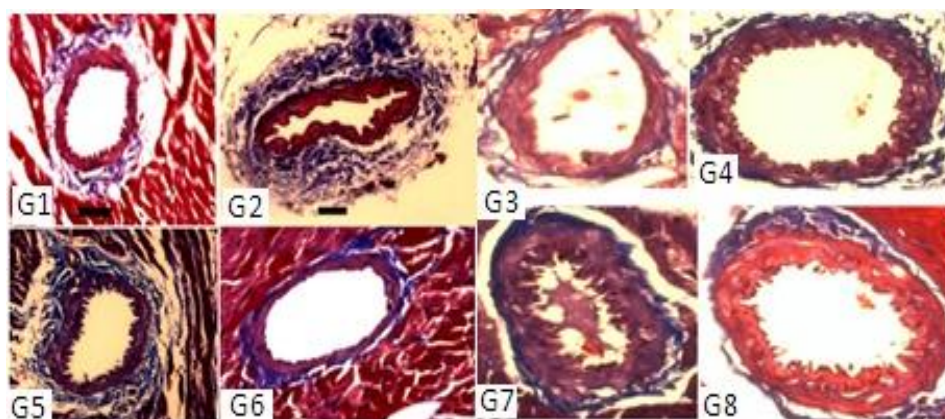


Cortes transversais de aorta torácica dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscopia de luz (aumento 1.000X). Legenda: G1 = grupo controle, G2 = grupo L-NAME (G2), G3 = grupo olmesartana 5 mg/kg/dia, G4 = grupo rosuvastatina 20 mg/kg/dia, (G5) = grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia, (G6) = grupo rosuvastatina 2 mg/kg/dia, G7 = grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia associado a rosuvastatina 2 mg/kg/dia, (G8) = grupo olmesartana 5 mg/kg/dia associado a rosuvastatina 20 mg/kg/dia.

### 5.3.3 Análise da fibrose perivascular de arteríolas intramiocárdicas

Os animais pertencentes ao grupo L-NAME (G2 - LN) apresentaram significativo aumento do percentual de fibrose perivascular nas arteríolas intramiocárdicas (Fotografia 3), em relação ao grupo controle (G1 - CONT) ( $p < 0,0001$ ). Todos os tratamentos instituídos resultaram em menor percentual de fibrose perivascular de arteríolas intramiocárdicas ( $p < 0,0001$ ) Fotografia 3 – Tabela 8.

**FOTOGRAFIA 3** Arteriolas intramiocárdicas demonstrando em azul a área de fibrose perivascular dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, corados com tricrômio de Masson e analisados por microscopia de luz (aumento 1.000X).



Arteriolas intramiocárdicas demonstrando em azul a área de fibrose perivascular dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, corados com tricrômio de Masson e analisados por microscopia de luz (aumento 1.000X). Legenda: G1 = grupo controle, G2 = grupo L-NAME (G2), G3 = grupo olmesartana 5 mg/kg/dia, G4 = grupo rosuvastatina 20 mg/kg/dia, (G5) = grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia, (G6) = grupo rosuvastatina 2 mg/kg/dia, G7 = grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia associado a rosuvastatina 2 mg/kg/dia, (G8) = grupo olmesartana 5 mg/kg/dia associado a rosuvastatina 20 mg/kg/dia. Barra corresponde a 5 µm.

**TABELA 8** Área transversa de cardiomiócitos, relação média e íntima sobre o lúmen arterial e fibrose perivascular de arteríolas intramiocárdicas dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

Grupos	ATC ( $\mu\text{m}^2$ )	RMILA	FPVAI
G1	43,8 $\pm$ 1,5	0,3 $\pm$ 0,02	0,5 $\pm$ 0,03
G2	61,9 $\pm$ 1,7	0,4 $\pm$ 0,01	1,6 $\pm$ 0,15
G3	48,1 $\pm$ 1,3*	0,3 $\pm$ 0,01*	0,4 $\pm$ 0,02*
G4	46,7 $\pm$ 1,7*	0,3 $\pm$ 0,01*	0,7 $\pm$ 0,05*
G5	50,4 $\pm$ 0,9*	0,3 $\pm$ 0,01*	0,4 $\pm$ 0,04*
G6	47,0 $\pm$ 0,9*	0,4 $\pm$ 0,02	0,7 $\pm$ 0,03*
G7	43,5 $\pm$ 0,5*	0,3 $\pm$ 0,01*	0,5 $\pm$ 0,02*
G8	39,6 $\pm$ 0,8*	0,2 $\pm$ 0,01*	0,5 $\pm$ 0,05*

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (n=10 animais/grupo) e analisados estatisticamente através de ANOVA seguida de *Tukey* (\*p < 0,0001). ATC=área transversa de cardiomiócito; RMILA=relação média e íntima sobre o lúmen arterial; FPVAI=fibrose perivascular de arteríolas intramiocárdicas. G1=grupo controle; G2=grupo L-NAME; G3=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia; G4=grupo rosuvastatina 20 mg/kg/dia; G5=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia; G6=grupo rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G7=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia+rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G8=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia+rosuvastatina 20 mg/kg/dia. Análises estatísticas realizadas entre G2 e os diferentes grupos experimentais.

#### 5.3.4 Análise histológica do tecido hepático

Os tecidos hepáticos dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais não demonstraram anormalidades histológicas (dados não mostrados).

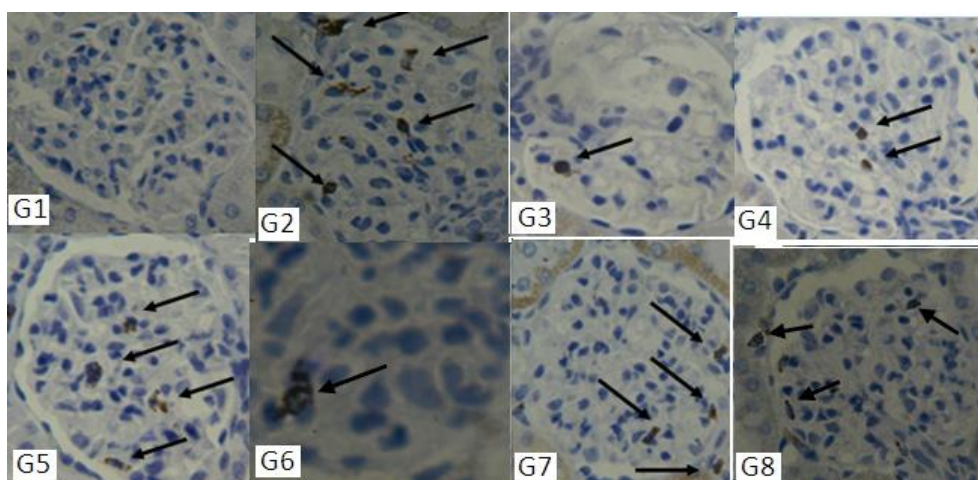
#### 5.3.5 Análise histológica renal e análise imuno-histoquímica da infiltração de macrófagos nos glomérulos

Análise histológica em tecido renal não revelou alterações nos grupos de ratos nas colorações hematoxilina-eosina ou tricômio de *Masson*, nos compartimentos analisados. Áreas de superfícies glomerulares foram similares em todos os grupos experimentais (Tabela 9).

O grupo L-NAME (G2 - LN) evidenciou aumento do número de macrófagos nos glomérulos renais (Fotografia 4) em relação ao grupo G1 (CONT) ( $p < 0,0001$ ).

Todos os animais dos diferentes grupos experimentais exibiram menor infiltrado de macrófagos em relação ao grupo G2 (LN) – Tabela 9.

**FOTOGRAFIA 4** Infiltrado de macrófagos nos glomérulos renais dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscopia de luz (aumento 1.000X).



Infiltrado de macrófagos nos glomérulos renais dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscopia de luz (aumento 1.000X). Legenda: G1 = grupo controle, G2 = grupo L-NAME (G2), G3 = grupo olmesartana 5 mg/kg/dia, G4 = grupo rosuvastatina 20 mg/kg/dia, (G5) = grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia, (G6) = grupo rosuvastatina 2 mg/kg/dia, G7 = grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia associado a rosuvastatina 2 mg/kg/dia, (G8) = grupo olmesartana 5 mg/kg/dia associado a rosuvastatina 20 mg/kg/dia.

**TABELA 9** Infiltrado de macrófagos glomerulares e área da superfície glomerular nos rins dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, ao final do experimento.

Grupos	Macrófagos (%)	Área glomerular ( $\mu\text{m}^2$ )
G1	39 $\pm$ 3*	3833 $\pm$ 61
G2	107 $\pm$ 4	3673 $\pm$ 64
G3	46 $\pm$ 3*	3731 $\pm$ 35
G4	56 $\pm$ 4*	3688 $\pm$ 83
G5	92 $\pm$ 4#	3699 $\pm$ 57
G6	45 $\pm$ 6*	3911 $\pm$ 75
G7	60 $\pm$ 3*	3812 $\pm$ 56
G8	70 $\pm$ 4*	3798 $\pm$ 66

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (n=10 animais/grupo) e analisados estatisticamente através de *Kruskall-Wallis* seguida de *Tamhane* (\*p < 0,0001; #p < 0,01). G1=grupo controle; G2=grupo L-NAME; G3=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia; G4=grupo rosuvastatina 20 mg/kg/dia; G5=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia; G6=grupo rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G7=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia+rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G8=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia + rosuvastatina 20 mg/kg/dia. Análises estatísticas realizadas entre G2 e os diferentes grupos experimentais.

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou os efeitos de rosuvastatina e olmesartana, isolados e associados, sobre o remodelamento adverso do miocárdio, da aorta torácica, sobre a função renal e a resposta aos marcadores de inflamação vascular no modelo experimental de inibição crônica da síntese de óxido nítrico.

O modelo de inibição crônica da síntese de NO por L-NAME em ratos produz disfunção endotelial, hipertrofia vascular e cardíaca, fibrose, aterosclerose, inflamação perivascular, insuficiência renal, e aumento da resposta vascular aos estímulos adrenérgicos. Vários outros fatores, incluindo o SRAA, fatores constritores endoteliais, remodelamento arterial e sistema nervoso simpático estão envolvidos em sua gênese (RIBEIRO *et al.*, 1992; PECHÁŇOVÁ *et al.*, 1999; HSIEH *et al.*, 2004; PAULIS *et al.*, 2008).

Este modelo de hipertensão arterial se caracteriza ainda por ser de fácil manuseio e os animais submetidos ao tratamento com L-NAME apresentam baixa mortalidade (DOGGRELL e BROWN, 1998).

Em humanos, embora a hipertensão arterial, na maioria das vezes, seja de natureza multifatorial, o quadro hipertensivo pode ser parcialmente revertido pela administração de L-arginina em pacientes hipertensos. Este fato demonstra que o NO parece ter importante papel no processo hipertensivo em humanos (FRANÇA, 1995). Além disso, o transporte de L-arginina é alterado na hipertensão arterial e no estresse. Como a L-arginina é um aminoácido precursor do NO, é possível que o controle da pressão arterial e a redução do estresse aumentem a produção de NO, trazendo benefícios para o hipertenso, devido aos seus efeitos vasodilatadores (MALAGRIS, 2004).

Estudos de fluxo sanguíneo e resistência em circulação regional, sem modificação da pressão arterial, demonstraram em humanos normotensos (VALLANCE; COLLIER; MONCADA, 1989) e hipertensos (TOLLNSM *et al.*, 1990) a importância do NO para o controle do tônus vascular de repouso (basal).

Em ratos, as concentrações plasmáticas dos lípides são geralmente baixas e as estatinas usualmente não modificam este perfil, constituindo-se assim um excelente modelo para se estudarem seus efeitos pleiotrópicos (SUSIC *et al.*, 2003). Comparativamente, as maiores doses de rosuvastatina e olmesartana utilizadas neste estudo são muito mais elevadas que aquelas empregadas na medicina



humana, ou seja, as deste estudo são 10 a 20 vezes maiores do que a dose máxima recomendada para pacientes, o que poderia trazer uma possível questão de relevância fisiológica no presente estudo. Entretanto, sabemos que, em geral, doses de vários fármacos utilizados em estudos com ratos são 50 a cem vezes maiores do que aquelas utilizadas em medicina humana.

Assim, a dose efetiva de hidroclorotiazida em ratos é 80 mg/kg *versus* cerca de 1mg/kg em pacientes; a dose de metoprolol em ratos é 150 mg/kg *versus* 1 a 2 mg/kg em pacientes; a dose de lisinopril em ratos é 20 mg/kg *versus* 0,1 a 0,5 mg/kg em humanos (SUSIC *et al.*, 2003). Desta forma, por inferência, o fato de estas doses de rosuvastatina e olmesartana serem altas não poderá, por si só, abolir a relevância de nossos dados.

Adicionalmente, as doses de olmesartana e rosuvastatina foram escolhidas de acordo com estudos prévios em ratos, necessários para se avaliarem os efeitos destas substâncias em modelos animais (SANADA *et al.*, 2001; SUSIC *et al.*, 2003; Di NAPOLI *et al.*, 2005; OTTO *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2007; MONETTI *et al.*, 2007; HABIB *et al.*, 2007).

Os dados obtidos neste estudo demonstram que, neste modelo experimental, ocorreu elevação persistente da PS desde a primeira semana de indução e, ainda, que o tratamento com olmesartana (em ambas as doses avaliadas), é eficaz em atenuar seu desenvolvimento.

O efeito das estatinas sobre a pressão arterial pode ser dose dependente em alguns modelos animais, como em ratos geneticamente hipertensos (ZHAI; GAO; WU, 2008), sal-sensível (ZHOU; JAIMES; RAIJ, 2004) e dependente de angio II (DELBOSC *et al.*, 2002), onde moderadas ou elevadas doses reduziram a pressão arterial em diferentes modelos de hipertensão.

Nossos resultados não demonstram redução da PS com rosuvastatina, quer seja na dosagem de 2 ou de 20mg/kg/dia, ratificando os achados de Susic *et al.* (2003). Em nosso presente estudo, todos os tratamentos instituídos com olmesartana foram eficazes na redução da PS.

A inibição da síntese de NO endotelial parece não ser o único mecanismo de elevação da pressão arterial neste modelo. Sabe-se que a estimulação simpática e o SRAA têm participação crucial (CUNHA; CABRAL; VASQUEZ, 1993; POLLOCK *et al.*, 1993; SANDER; HANSEN; VICTOR, 1997). Antagonistas de receptores AT1 ou inibidores da enzima conversora previnem o desenvolvimento da hipertensão por L-

NAME, fato este constatado após a segunda semana de tratamento com olmesartana (0,5 e 5 mg/Kg/dia).

Os valores da FC do grupo G2 (LN) mantiveram-se inalterados em relação ao grupo G1 (CONT) durante todo o experimento. Na primeira semana de administração de L-NAME, foi descrito um aumento da FC, ocorrendo, a seguir, bradicardia (WHEAL *et al.*, 2007). A manutenção da FC ao longo do tratamento com L-NAME, sem redução evolutiva, também foi relatada (RUIZ *et al.*, 2008), aspecto também evidenciado em nosso estudo.

O NO regula a permeabilidade do epitélio intestinal, portanto, a inibição crônica de sua síntese poderá predispor o intestino à inflamação. Miller *et al.* (1994) relataram que a elevação de leucócitos na corrente sanguínea induzida por L-NAME é dose e tempo dependentes. Estes autores observaram que, após uma semana de administração de L-NAME (100 µg/mL), houve desenvolvimento de leucocitose, mas a contagem diferencial manteve-se inalterada, e atribuíram este achado à inflamação intestinal. Em nosso estudo, o grupo L-NAME também promoveu leucocitose, dado que somente foi constatado ao final de 28 dias, no momento da eutanásia. A contagem diferencial também esteve inalterada em todos os grupos experimentais.

Segundo Naito *et al.* (2006), a rosuvastatina apresenta efeito protetor contra inflamação e isquemia intestinal em ratos e reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Nossos resultados demonstram que a rosuvastatina administrada na dose de 20mg/kg/dia (G4 - LN+ROS20) atenuou a ocorrência de leucocitose induzida por L-NAME, fato este não observado com animais dos outros grupos de tratamentos.

A rosuvastatina demonstrou atividades anti-inflamatórias e antiaterotrombóticas em camundongos deficientes de apolipoproteína E na ausência de efeito redutor de colesterol (MONETTI *et al.*, 2007). No nosso estudo, observou-se que os tratamentos com rosuvastatina e/ou olmesartana não alteraram os níveis plasmáticos de CT, aminotransferases, FA e Cr, apesar do tratamento instituído com rosuvastatina, potente fármaco hipolipemiante. Isto pode ser atribuído ao fato de que, em ratos, as concentrações plasmáticas de lipídios são geralmente baixas e as estatinas usualmente não modificam este perfil (SUSIC *et al.*, 2003).

Além disso, os tratamentos instituídos não modificaram parâmetros bioquímicos de função hepática e também não observamos modificações histológicas nos tecidos hepáticos dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

O endotélio tem importância central na homeostase vascular através da liberação de substâncias vasoativas e trombogênicas, moléculas de sinalização e fatores de crescimento (RAITAKARI *et al.*, 2000). Desde os estudos de Furchgott (1999), conhece-se que o NO é uma das mais importantes substâncias derivadas do endotélio, responsável por muitos dos efeitos protetores da parede vascular (DAVIGNON e GANZ, 2004). A redução na biodisponibilidade de NO é o principal mecanismo para disfunção endotelial, geralmente resultante do aumento do estresse oxidativo, que, posteriormente, pode levar à redução na produção de NO e/ou aumento na sua degradação (DAVIGNON e GANZ, 2004).

A disfunção endotelial é considerada um marcador precoce da aterosclerose, frequentemente, antecedendo evidências clínicas de placas ateroscleróticas (DAVIGNON e GANZ, 2004). Em geral, a disfunção endotelial é caracterizada pela redução da concentração plasmática dos principais metabólitos de NO, NOx, e/ou piora na vasodilatação dependente do endotélio em resposta a estímulos fisiológicos ou farmacológicos.

A produção de NO pode ser avaliada pela mensuração de NOx, como produtos oxidados estáveis finais de seu metabolismo (MOSHAGES *et al.*, 1995; WATANABE *et al.*, 2000). A presença de NOx em fluidos biológicos tem demonstrado ser bom indicador da formação de NO, bem como em várias condições fisiopatológicas (MISONOU *et al.*, 2006; ZUNIC *et al.*, 2000; ZUNIC *et al.*, 2005).

Em alguns casos, apenas o nitrito tem sido mensurado como metabólito de NO (GORDON *et al.*, 2001). Por outro lado, nitratos não são apenas produtos finais da oxidação de NO via nitritos, mas poderiam também ser produzidos a partir de peroxinitritos (GRISHAM *et al.*, 1999). Evidências sugerem que nitrito por si só é uma molécula sinalizadora fisiológica, com papel no transporte endócrino intravascular de NO, vasodilatação hipóxica, sinalização e citoproteção (GONZALES *et al.*, 2008).

Tem sido sugerido que, em decorrência de os níveis plasmáticos de NOx poderem não refletir NO biologicamente ativo e não serem apenas endotélio-dependentes, sua análise deveria ser acompanhada de avaliação de parâmetros funcionais (TINA *et al.*, 2009). Neste estudo, entretanto, nossa análise comparativa

foi realizada a partir do grupo controle (G1), basal, o que não inviabiliza nossos dados.

Di Napoli et al. (2005) avaliaram a ação de rosuvastatina sobre a injúria de reperfusão em coração de ratos. Estes autores utilizaram as dosagens de 0,2; 2 e 20 mg/kg/dia, porém observaram que, com 2 mg/kg/dia, a rosuvastatina significativamente aumentou a expressão de RNA mensageiro de NO constitutivo {endotelial - (eNOS)}, comparativamente ao grupo não tratado, e inversamente reduziu a expressão de RNA mensageiro de NO indutível (iNOS). Estes efeitos foram mais evidentes do que na dosagem de 0,2 mg/kg/dia. Entretanto, a maior dosagem utilizada (20mg/kg por dia) não resultou em cardioproteção, e os autores atribuíram este fato à perda dos efeitos benéficos de rosuvastatina sobre a expressão de eNOS e iNOS, associada com maior dano mitocondrial e disfunção microcirculatória.

No presente estudo, ocorreu atenuação da resposta inibitória sobre NOx nos tratamentos instituídos com rosuvastatina (G6 - LN+ROS2) ou com rosuvastatina (2mg/kg/dia e 20mg/kg/dia) associada com olmesartana (0,5mg/kg/dia e 5mg/kg/dia – respectivamente grupos G7 e G8) em relação ao grupo G2 (LN).

A rosuvastatina na dosagem de 20mg/kg/dia (G4 - LN+ROS20) não alterou os níveis plasmáticos de NOx, em relação ao grupo G2 (LN). Porém, parâmetros inflamatórios plasmáticos, IL-6 e TNF- $\alpha$  foram diminuídos em todos os tratamentos associados com L-NAME.

Até o momento, através das buscas realizadas em periódicos especializados, não foram encontrados dados sobre o papel da associação de rosuvastatina e olmesartana sobre a biodisponibilidade de NO em modelo de hipertensão arterial induzida por L-NAME. Assim, é possível que o impacto destas terapias e seus efeitos subsequentes sobre a homeostase endotelial possam ser sinérgicos. Desta forma, a associação destes fármacos parece ter papel aditivo, efeito de potencial importância nos pacientes com disfunção endotelial, como ocorre em muitas situações em medicina, como na hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia e aterosclerose.

De acordo com Miller *et al.* (1994), a administração de L-NAME inibe as duas formas de óxido nítrico sintase, a constitutiva e a indutível. O tratamento por longo prazo com estatinas super-regula a expressão e a atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial e aumenta a biodisponibilidade de NO, resultando em sub-

regulação de enzimas oxidativas e eliminação do ânion superóxido. Como a produção de espécies reativas de oxigênio está aumentada em várias condições clínicas, tais como hipercolesterolemia, diabetes e hipertensão arterial, o aumento da expressão de NO endotelial pelas estatinas poderá representar um importante mecanismo dos efeitos protetores destas substâncias (OTTO *et al.*, 2006).

As estatinas super-regulam e ativam a síntese de eNOS na vasculatura sistêmica através do bloqueio da Rho geranilgeranilação (LAUFS e BÖHM, 2005), bem como pela ativação da fosfatidilinositol quinase 3/via Akt (NAITO *et al.*, 2006). É bem estabelecida na aterosclerose uma íntima relação da piora da função endotelial vascular, causada pela redução na síntese de NO e aumento de sua inativação, pelo superóxido. Portanto, a disfunção da enzima óxido nítrico sintase e a ativação de NADPH oxidase, geradora de superóxido, têm papel central na disfunção endotelial e remodelamento vascular (YAMAMOTO *et al.*, 2007).

Recentemente, o estudo clínico JUPITER avaliou indivíduos sem hiperlipidemia e na ausência de prévia manifestação de aterosclerose, mas com níveis elevados de proteína C reativa (PCR) de alta sensibilidade, rosuvastatina reduziu significativamente a incidência dos principais eventos cardiovasculares, confirmando a importância do aspecto inflamatório na doença cardiovascular (RIDKER *et al.*, 2008). Neste estudo foram incluídos homens e mulheres, aparentemente saudáveis, com idade maior ou igual a 50 ou 60 anos, respectivamente. Deve-se considerar que extrapolações dos resultados para outras populações nem sempre são adequadas. Algumas críticas têm sido feitas a este estudo, em relação a sua metodologia. Uma análise cuidadosa revela que uma proporção não desprezível apresentava importantes fatores de risco cardiovascular: mais de 50% apresentavam obesidade ou sobrepeso. A prevalência de síndrome metabólica foi de 41%, de tabagismo 16% e 12% tinham histórico familiar para doença coronária prematura. Além disso, a demonstração de maior benefício entre os participantes deste estudo que obtiveram níveis mais baixos de ambos LDL-colesterol e PCR de alta sensibilidade, fica a indagação de quanto deste benefício pode ser atribuído à queda de LDL-colesterol e quanto à redução da PCR de alta sensibilidade.

Estudos experimentais têm documentado que níveis elevados da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  podem causar remodelamento, desenvolvimento (LI *et al.*, 2000; BOURRAINDELOUP *et al.*, 2009) e progressão (MANN, 2002) de disfunção ventricular esquerda. O TNF- $\alpha$  reduz a biodisponibilidade de NO, tanto por diminuir

sua produção (GOODWIN *et al.*, 2007; PICCHI *et al.*, 2006; AHMAD *et al.*, 2002; GREENBERG *et al.*, 2002) quanto por facilitar a sua remoção (GAO *et al.*, 2007) também estimula a geração endotelial de EROs pela ativação de NADPH oxidase, provavelmente pelas subunidades gp91<sup>phox</sup>, NOX-1, p47<sup>phox</sup> e p22<sup>phox</sup> e ativa a transcrição de NF-κB, que regula a expressão de genes envolvidos na inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial (DELA PAZ *et al.*, 2007; RIMBACH *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2004).

O bloqueio da atividade de TNF-α suprime a formação neointimal após transplante cardíaco em coelhos (CLAUSELL *et al.*, 1994). A inibição da expressão de IL-6 induzida por TNF-α, observada com telmisartana, e não com valsartana, sugere que este efeito pode não ser dependente de classe terapêutica (TIAN *et al.*, 2009).

A IL-6 é importante citocina inflamatória implicada na fisiopatologia e no curso clínico da aterosclerose (BLAKE e RIDKER, 2001; YUDKIN *et al.*, 2000). Esta citocina exerce suas ações biológicas através de um complexo receptor, que consiste de duas membranas glicoproteicas, um componente ligante (IL-6R) e um componente de sinalização (gp130) (MODUR *et al.*, 1997). Embora IL-6 possa se ligar à IL-6R e iniciar resposta biológica, também ativa a IL-6R solúvel (sIL-6R). O complexo IL-6/sIL-6R tem sido implicado no estímulo ao recrutamento de leucócitos e promoção da resposta inflamatória endotelial (ROMANO *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 1999).

A IL-6 favorece o crescimento de músculo liso vascular (IKEDA *et al.*, 1991), aumenta a produção do fator quimiotático de monócito-1 (WATANABE *et al.*, 2004) e é também um biomarcador útil na predição de futuros eventos cardiovasculares (KOENIG e KHUSEYINOVA, 2007). Estudos demonstram que a PCR é um regulador fisiológico de sIL-6R e aumenta a formação do complexo sIL-6R/IL-6 (JONES *et al.*, 1999). A PCR aumenta a secreção de IL-6 de células endoteliais, que, por sua vez, é potente estímulo hepático para PCR. Assim, o aumento na produção vascular pode representar um mecanismo de *feedback* positivo para a contínua produção de PCR pelo fígado (VERMA *et al.*, 2002).

Em geral, em estudos clínicos ou experimentais, medicamentos anti-hipertensivos são analisados entre duas ou mais classes terapêuticas, com fármacos capazes de reduzir a HAS, mas sem efeito metabólico. Neste estudo, ao avaliarmos comparativamente um potente anti-hipertensivo antagonista de receptor

tipo 1 da angio II, olmesartana, com estatina, rosuvastatina, identificamos possíveis efeitos pleiotrópicos exercidos pela rosuvastatina.

Nossos resultados demonstram que todos os tratamentos instituídos reduziram níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- $\alpha$ , indicando que tanto olmesartana quanto rosuvastatina (em ambas as doses, isoladas e associadas) podem atenuar a inflamação vascular. Este efeito observado não foi dose dependente, e a inibição promovida pela rosuvastatina foi independente da resposta pressórica e da redução de colesterol sérico.

Os ratos tratados com L-NAME representam um atrativo modelo de remodelamento adverso ventricular esquerdo (PAULIS *et al.*, 2008; KASAL *et al.*, 2008). Embora a hipertrofia ventricular esquerda seja considerada resposta adaptativa ao aumento da sobrecarga hemodinâmica, esta também se associa com aumento da morbidade e mortalidade cardiovasculares (ALFAKIH *et al.*, 2006; CUSPIDI *et al.*, 2006; MANCIA *et al.*, 2008), sendo importante sua reversão com o tratamento instituído.

O aumento da massa ventricular esquerda poderá preservar sua natureza adaptativa se a homogeneidade estrutural do miocárdico for mantida e a fibrose prevenida (PAULIS *et al.*, 2008). É bem conhecido que o remodelamento vascular na HAS é influenciado pelo estresse oxidativo, que aumenta o depósito de componentes da matriz extracelular, entre outros efeitos (PARAVICINI e TOUYZ, 2008; LEE e GRIENGLING, 2008).

A HVE constitui um indicador de dano cardíaco e é caracterizada por um grande aumento na massa do ventrículo esquerdo, correlacionando-se com risco aumentado de eventos cardiovasculares, incluindo acidente vascular encefálico, coronariopatia, insuficiência cardíaca; reduções na HVE foram associadas com diminuição na mortalidade cardiovascular (NUSSBERGER e KOIKE, 2004; ITO *et al.*, 2007).

Recentes investigações implicam o SRAA na promoção de disfunção cardíaca por induzir estresse oxidativo, inflamação e resistência à insulina, acarretando hipertrofia cardíaca, remodelamento ventricular adverso e disfunção ventricular (ITO *et al.*, 2007). A angio II é conhecida por seus efeitos pressóricos, proliferativos, profibróticos e ações pró-inflamatórias. Adicionalmente, a angio II modula o crescimento e a diferenciação celular, o metabolismo e o remodelamento tissular (HABIB *et al.*, 2007).

Determinadas classes de anti-hipertensivos, como os antagonistas de angio II, podem alterar a história natural da doença hipertensiva, através de efeitos antioxidantes, acarretando redução de HVE (SEKO, 2006; ITO *et al.*, 2007). Antagonistas dos receptores AT1 são poderosos agentes anti-hipertensivos e apresentam características que os diferem de outras classes terapêuticas, por apresentarem efeitos pleiotrópicos protetores aos órgãos-alvo, independentes da redução da pressão arterial, e excelente tolerabilidade (ASMAR, 2006).

A olmesartana regula fatores de transcrição, a expressão de citocinas e moléculas de adesão, as quais têm importância no desenvolvimento de inflamação (SEKO, 2006). Portanto, a olmesartana apresenta efeitos anti-hipertensivos e pleiotrópicos que diferem daqueles exercidos pelas estatinas (YAMAMOTO *et al.*, 2007).

Yamamoto *et al.* (2007) demonstraram que a olmesartana e a pravastatina melhoraram a injúria vascular na hipertensão experimental sal-sensível, independentemente da modificação dos valores de pressão arterial ou níveis de lípides plasmáticos; exercendo efeitos sobre o remodelamento coronário. Estes últimos autores observaram que olmesartana normalizou a atividade de NADPH oxidase, de superóxido e de peroxinitrito em maior extensão do que pravastatina; por outro lado, a pravastatina significativamente melhorou a fosforilação Akt, ao contrário de olmesartana.

Em modelo animal de insuficiência cardíaca, rosuvastatina (10 mg/kg/dia) (GÓMEZ-GARRE *et al.*, 2010) preveniu a dilatação ventricular esquerda e inflamação cardíaca, mas não modificou a pressão arterial ou a hipertrofia miocárdica. Todos estes efeitos observados com rosuvastatina foram independentes da redução dos níveis plasmáticos de colesterol e podem ser atribuídos à redução na inflamação miocárdica.

Em nosso estudo, demonstrou-se que, através de efeitos pleiotrópicos, a rosuvastatina (em ambas as doses avaliadas) foi eficaz em prevenir o desenvolvimento de HVE, avaliada pela análise planimétrica da área transversa de cardiomiócitos de ratos, independentemente da redução pressórica e sérica de colesterol. Este achado foi constatado após 28 dias do início do experimento. As estatinas exercem ações diretas e benéficas sobre a função cardíaca, decorrentes da redução da produção de espécies reativas de oxigênio em vários tecidos, originadas da ativação de NADPH oxidase, ativadas pela prenilação de Rac1, que



determina translocação de membrana em seu domínio regulatório (LIBBY, 2002). A Rac1 tem papel crítico na hipertrofia cardíaca mediada pela angio II.

As estatinas, além de reduzirem os níveis séricos de colesterol, também reduzem os níveis de isoprenoides e inibem a isoprenilação, atuando no remodelamento cardíaco inverso (VAN AELST e D'SOUZA-SCHOREY, 1997; LIBBY, 2002). Na clínica médica, a rosuvastatina melhora o perfil lipídico, reduz a inflamação e o estresse oxidativo através da diminuição dos níveis séricos de IL-6, TNF- $\alpha$  e aumento de superóxido dismutase (GÓMEZ-GARCIA *et al.*, 2007).

Ressaltamos ainda que as estatinas inibem vários sistemas sinalizadores intracelulares (vias Rho/RhoA e MAPK) ativados pela angio II (RUPEREZ *et al.*, 2007), envolvidos na regulação dos fatores pró-fibróticos, fator de crescimento de tecido conjuntivo, depósito de componentes da matriz extracelular e são moduladas pelo processo redox (RUPEREZ *et al.*, 2007).

Os resultados de nosso estudo demonstram que tanto olmesartana quanto rosuvastatina, nas dosagens avaliadas, foram eficazes em inibir a HVE induzida por L-NAME. Em corações hipertrofiados, usualmente, ocorre remodelamento vascular, por mecanismos dependentes e independentes da pressão arterial (NUSSBERGER e KOIKE, 2004; SEKO, 2006; ITO, 2007).

Nossos dados evidenciaram que a relação média e íntima sobre o lúmen da aorta torácica encontrou-se elevada no grupo G2 (LN), comparativamente ao grupo G1 - CONT), indicativo de hipertrofia vascular. Os tratamentos com olmesartana (G3 - LN+OLM5) e rosuvastatina (G4 - LN+ROS20) reduziram significativamente este achado. Porém, a hipertrofia vascular não foi inibida pelo tratamento instituído com rosuvastatina na dosagem de 2mg/kg/dia - G6 - LN+ROS2), embora tenha ocorrido neste grupo redução de parâmetros inflamatórios no plasma dos animais.

Neto-Ferreira *et al.* (2010) relataram efeito benéfico do tratamento com rosuvastatina (20 mg/kg/dia, via oral – cinco semanas) sobre o espessamento das camadas média e íntima de aorta torácica no modelo de hipertensão arterial induzida por L-NAME. As alterações ultraestruturais promovidas pela inibição crônica da síntese de NO foram atenuadas pela rosuvastatina neste modelo animal. Estes achados não foram acompanhados de redução da pressão arterial.

Foram avaliados os efeitos do tratamento com estatina sobre a fibrose cardíaca em recente estudo. Camundongos com dez semanas de idade receberam infusão contínua subcutânea de angio II (2 mg/kg/dia durante 14 dias) e foram aleatorizados

para administração de pitavastatina ou tempol (reduzidor de radicais livres) diluídos na água de beber, ou veículo. A pitavastatina e tempol atenuaram a hipertrofia de cardiomiócito induzida por angio II, a fibrose intersticial miocárdica e a fibrose perivascular de artérias coronárias no átrio esquerdo. O grupo que recebeu pitavastatina apresentou proteção contra o remodelamento atrial induzido pela angio II, através da atenuação do estresse oxidativo mediado pela proteína sinalizadora rac 1 (YAGI *et al.*, 2010).

Nossos dados demonstram que a fibrose perivascular nas arteríolas intramiocárdicas foi igualmente inibida por olmesartana e rosuvastatina nas dosagens avaliadas.

O modelo de hipertensão arterial em ratos, induzida pela inibição crônica da síntese de NO, é útil para o estudo tanto do desenvolvimento quanto do tratamento de lesões renais, por se assemelhar ao encontradado em humanos, uma doença associada com piora generalizada e precoce da função endotelial. Neste modelo, ocorrerá redução no fluxo sanguíneo renal, na excreção de água e sódio, alterando a curva de natriurese-pressórica para a direita e elevação da pressão arterial (JOVER e MIMRAN, 2001).

A ocorrência de proteinúria, albuminúria e inflamação renal (avaliada pela infiltração renal de macrófagos) indica progressão da nefropatia. Já a redução da albuminúria se correlaciona com menor risco de doença renal terminal e eventos cardiovasculares em pacientes com hipertensão arterial (DE ZEEUW, 2004).

Estudo clínico demonstrou a eficácia de olmesartana na dosagem de 40mg/dia (n=2.232) *versus* placebo (n=2.215) na prevenção de microalbuminúria em pacientes diabéticos não insulino-dependentes, sem nefropatia (HALLER *et al.*, 2010).

O tratamento atual da nefropatia crônica, como a que pode ser desenvolvida pela HAS, é limitado aos inibidores da enzima conversora da angiotensina e bloqueadores de receptores AT1, mas existem evidências de que as estatinas possam ter papel terapêutico (BAE *et al.*, 2010). Embora seja difícil distinguir os efeitos que são dependentes ou independentes da redução do colesterol em ensaios clínicos, existem evidências de que a ação renoprotetora oferecida pelas estatinas é devido às suas propriedades pleiotrópicas e anti-inflamatórias (BAE *et al.*, 2010).

Estudo duplo-cego, randomizado, investigou os efeitos da pravastatina sobre a proteinúria em pacientes normocolesterolêmicos e concluiu que a redução da

proteinúria ocorreu independentemente da redução de colesterol, pela inibição da síntese renal de ET-1, um potente agente pró-inflamatório (LEE; SU; TSAI, 2002). Em outro estudo prospectivo e randomizado, envolvendo 91 pacientes com doença renal crônica, observou-se que o tratamento com rosuvastatina na dosagem de 10mg/dia durante 20 semanas reduziu substancialmente os níveis do biomarcador inflamatório PCR de alta sensibilidade e aumentou a taxa de filtração glomerular (VERMA *et al.*, 2005).

Glomeruloesclerose, isquemia glomerular e fibrose intersticial foram encontradas na histopatologia renal de ratos deficientes de NO submetidos à dieta rica em sódio (VIEIRA *et al.*, 2005). Modificações na densidade glomerular e na densidade vascular pela análise esteriológica, também foram relatadas neste modelo (PEREIRA *et al.*, 2004). Os níveis de PS atingidos nos animais destes estudos foram 212 e 200 a 225 mmHg, respectivamente. Entretanto, Lecian *et al.* (2006) não encontraram anormalidades histológicas nos rins dos animais tratados com inibidor da síntese de NO, e estes animais apresentaram níveis pressóricos de 175 mmHg. Em nosso estudo, o grupo hipertenso atingiu cifras de 140 mmHg *versus* 98 mmHg do grupo controle, o que poderia explicar a ausência de anormalidades histológicas renais em nossos resultados.

Os dados atuais demonstram que ocorreu significativo aumento de acúmulo de macrófagos nos glomérulos renais de ratos hipertensos induzidos por L-NAME. Adicionalmente, ocorreu também disfunção renal traduzida pela elevação da RACU neste grupo (G2 - LN). Todos os tratamentos instituídos foram eficazes na redução da infiltração de macrófagos glomerulares, indicativo de melhora do padrão inflamatório.

Em relação à olmesartana, este efeito foi dose-dependente, pois houve maior redução de macrófagos glomerulares na dosagem de 5 mg/kg por dia (G3 - LN+OLM5). A rosuvastatina reduziu o infiltrado de macrófagos glomerulares e este efeito foi mais evidente na dosagem de 2 mg/kg/dia (G6 - LN+ROS2), superior ao encontrado na dosagem de 20 mg/kg/dia (G4 - LN+ROS20). Desta forma, é possível que a rosuvastatina atenua a inflamação por reduzir a expressão de citocinas inflamatórias no rim de ratos hipertensos. Este mecanismo poderá inibir a progressão da doença renal.

Nossos dados demonstram que a redução na RACU foi evidenciada nos tratamentos instituídos com olmesartana (G3 - LN+OLM5) e com rosuvastatina (G4 -

LN+ROS20 e G6 - LN+ROS2), além das associações destes fármacos (G7 - LN+OLM0,5+ROS2 e G8 - LN+OLM5+ROS20).

Em ratos espontaneamente hipertensos, o tratamento com rosuvastatina (1 e 10 mg/kg/dia) reduziu a transcrição de proteína quimiotática de monócitos-1, fator de crescimento  $\beta$ 1, interleucina 1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (rins) P-selectina (artérias cerebrais) e aumentou NO sintase endotelial (aorta) destes animais. A excreção urinária de proteínas de fase aguda aumentou ao longo do tempo em animais tratados com veículo, mas não apresentou modificação significativa nos animais tratados com rosuvastatina. Estes efeitos observados foram independentes das modificações nos parâmetros fisiológicos. Os tratamentos realizados com sinvastatina (2 e 20mg/kg/dia) não exerceram efeito protetor (SIRONI *et al.*, 2005).

Em síntese, este estudo demonstrou que olmesartana (0,5 e 5 mg/kg/dia) e rosuvastatina (2 e 20 mg/kg/dia), isoladas e associadas, atenuaram efeitos adversos observados na hipertensão arterial em ratos por inibição crônica da síntese de NO induzida por L-NAME. O grupo de animais hipertensos (G2 - LN) desenvolveu hipertensão arterial desde o final da primeira semana de indução; ao final do experimento, observou-se redução dos níveis plasmáticos de NOx, elevação de parâmetros inflamatórios (IL-6 e TNF- $\alpha$ ), HVE, fibrose perivascular nas arteríolas intramiocárdicas, infiltração de macrófagos em glomérulos renais e disfunção renal.

Os animais tratados simultaneamente com L-NAME e olmesartana apresentaram inibição destes parâmetros, excetuando-se a RACU na dosagem de 0,5 mg/kg/dia (G5 - LN+OLM0,5). A rosuvastatina (2mg/kg/dia) potencializou o efeito protetor de olmesartana (0,5 mg/kg/dia) sobre a proteinúria (G7 - LN+OLM0,5+ROS2). O tratamento com rosuvastatina resultou em aumento de NOx (somente na menor dosagem avaliada, 2 mg/kg/dia - G6 - LN+ROS2) e inibição dos parâmetros inflamatórios induzidos por L-NAME. Nas dosagens de 20 e 2 mg/kg por dia (G4 - LN+ROS20 e G6 - LN+ROS2, respectivamente), a rosuvastatina inibiu proteinúria. Tratamentos associados com olmesartana e rosuvastatina (G7 - LN+OLM0,5+ROS2 e G8 - LN+OLM5+ROS20) inibiram todos os parâmetros induzidos por L-NAME.

Portanto, nossos dados sugerem que olmesartana e rosuvastatina podem atuar benéficamente na prevenção de lesão de órgão-alvo em ratos hipertensos por inibição crônica da síntese de NO por L-NAME. O dado mais importante deste estudo, demonstrado pela primeira vez, é que, nas dosagens analisadas,

rosuvastatina apresenta similaridade em relação à olmesartana, potente antagonista de receptor AT1 da angio II, na proteção do remodelamento adverso miocárdico, vascular, inflamatório e renal, neste modelo experimental. Todos os efeitos encontrados com rosuvastatina foram independentes da redução da pressão arterial e do colesterol séricos, decorrentes de suas propriedades anti-inflamatórias.

Futuros estudos mecanísticos poderão avaliar a totalidade destes achados, no que diz respeito aos mecanismos moleculares envolvidos em todos estes efeitos.

### 6.1 Limitações e implicações clínicas:

Este estudo demonstra, principalmente, efeitos protetores de olmesartana e rosuvastatina sobre o remodelamento miocárdico, vascular, parâmetros inflamatórios, inflamação renal e proteinúria. Porém, avaliamos apenas o modelo experimental de hipertensão arterial por inibição crônica da síntese de óxido nítrico. Além disto, não temos dados mecanísticos que mostrem com clareza a forma com que estes achados acontecem. Em relação às dosagens utilizadas, poderíamos aventar as possibilidades de novos ensaios com diferentes doses dos mesmos medicamentos, ou mesmo associações das maiores doses de um fármaco com as menores doses do outro e vice-versa. O tempo de indução do modelo experimental utilizado foi suficiente para gerar as alterações descritas, porém, com um período de observação mais prolongado outros dados poderiam ser avaliados, bem como para a análise da toxicidade dos fármacos. Todas estas limitações poderão ser respondidas à medida que novas pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de tornar claras estas questões.

As implicações clínicas deste estudo podem ser direcionadas para aqueles pacientes de alto risco cardio-vascular, portadores de hipertensão arterial e dislipidemia entre outras co-morbidades, como diabetes *mellitus*, e que requerem a associação de fármacos para tratamento destas entidades. O efeito sinérgico entre rosuvastatina e olmesartana evidenciado neste estudo poderá beneficiar este tipo de paciente, reduzindo seu risco por inibir o remodelamento estrutural de órgãos-alvo e também o aspecto inflamatório.

## 7 CONCLUSÕES

Conclui-se, com base nos resultados do presente estudo que:

O L-NAME induziu hipertensão arterial, leucocitose, redução dos níveis plasmáticos de NOx, elevação de parâmetros inflamatórios (IL-6 e TNF- $\alpha$ ), hipertrofia ventricular esquerda, fibrose perivascular de arteríolas intramiocárdicas, infiltração de macrófagos em glomérulos renais e proteinúria. A FC não foi modificada pelo L-NAME.

A olmesartana e a rosuvastatina atenuaram estes efeitos adversos.

A rosuvastatina (2 e 20 mg/kg/dia) exerceu efeitos independentes da redução da pressão arterial e do colesterol séricos, decorrentes de suas propriedades antiinflamatórias.

A olmesartana (0,5 e 5 mg/kg/dia) e a rosuvastatina (2 e 20 mg/kg/dia) associadas inibiram todos os parâmetros induzidos por L-NAME.

A olmesartana (0,5 mg/kg/dia) não melhorou a proteinúria.

A rosuvastatina (2 mg/kg/dia) aumentou NOx, não inibiu a hipertrofia vascular e nas dosagens de 20 e 2 mg/kg/dia inibiu proteinúria.

A rosuvastatina (2 e 20 mg/kg/dia) potencializou o efeito protetor de olmesartana sobre a proteinúria.

Nas dosagens analisadas, a rosuvastatina apresentou similaridade em relação a olmesartana na proteção do remodelamento nefro-cardiovascular neste modelo experimental.

## REFERÊNCIAS

- ABE, Y. et al. Pravastatin prevents myocardium from ischemia-induced fibrosis by protecting vascular endothelia cells exposed to oxidative stress. **Cardiovasc. Drug Ther.**, v. 20, p. 273-280, 2006.
- AGUILLERA, G. Role of angiotensin II receptor subtypes on the regulation of aldosterone secretion in the adrenal glomerulosa zone in the rat. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.90, p. 53-60, 1992.
- AHMAD, M. et al. Role of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase in tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulation of expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, p.759–764, 2002.
- ALFAKIH, K. et al. The assessment of left ventricular hypertrophy in hypertension. **J. Hypertens.**, v. 24, p.1223-1230, 2006.
- ARDAILLOU, R. Angiotensin II receptors. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.10, p.30-39, 1999.
- ARENDSHORST, W. J.; BRÄNNSTRÖM, K.; RUAN, X. Actions of angiotensin II on the renal microvasculature. **J Am Soc Nephrol**, v. 10, p. 149-161, 1999.
- ARNAL ,J. F.; WARIN, L.; MICHEL, J. B. Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. **J. Clin. Invest**, v. 90, p. 647-652, 1992.
- ASMAR, R. Targeting effective blood pressure control with angiotensin receptor blockers. **Int J Clin Pract**, v. 60, p. 315-320, 2006.
- BAE, E. H. et al. Renoprotective effect of rosuvastatin in DOCA–salt hypertensive rats. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 25, n. 4, p. 1051-1059, 2010.
- BAHLMANN, F. H. et al. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. **Hypertension**, v. 45, n.4, p. 526-529, 2005.
- BALL, K. J.; WILLIAMS, P. A.; STUMPE, K. O. Relative efficacy of an angiotensin II antagonist compared with other antihypertensive agents. Olmesartan medoxomil versus antihypertensives. **J. Hypertens. Suppl.**, v. 19, p. 49–56, 2001.
- BALLANTYNE, C. M. et al. Effect of switching high-and very high-risk patients to rosuvastatin from atorvastatin or simvastatin on achievement of new ATP III goals: MERCURY II. **Atheroscler. Suppl.**, v. 6, n. 1, p. 101, 2005.
- BARBUTO, N. et al. Renal cortex remodeling in nitric oxide deficient rats treated with enalapril. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 8, p. 102-108, 2004.

BAYLIS, C. et al. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **J. Clin. Invest.**, v.90, p.278-281, 1992.

BAYORH, M. A. et al. Simvastatin and losartan enhance nitric oxide and reduce oxidative stress in salt-induced hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v.18, p.1496-1502, 2005.

BERCK, B. C. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. **Physiol. Rev.**, v. 81, p. 999-1030, 2001.

BERNE, C.; SIEWERT, A. Comparison of rosuvastatin and atorvastatin for lipid lowering in patients with type 2 diabetes mellitus: results from the URANUS study. **Cardiovascular Diabetology**, v.4, p. 7-17, 2005.

BETTERIDGE, D. J.; GIBSON, J. M. Effects of rosuvastatin on lipids, lipoproteins and apolipoproteins in the dyslipidaemia of diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 24, n. 5, p. 541-549, 2007.

BEZERRA, D. G.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Beneficial effect of simvastatin and pravastatin treatment on adverse cardiac remodeling and glomeruli loss in spontaneously hypertensive rats. **Clin. Sci. (Lond)**., v.108, p. 349-355, 2005.

BLAKE, G. J.; RIDKER, P. M. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. **Circ Res.**, v.89, p. 763-771, 2001.

BOURRAINDELOUP, M. et al. *N*-Acetylcysteine Treatment Normalizes Serum Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Level and Hinders the Progression of Cardiac Injury in Hypertensive Rats. **Circulation.**, v. 110, p.2003-2009, 2004.

BRENNER, B. M; GARCIA, D. L; ANDERSON, S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? **Am. J. Hyperten.**, v.1, p. 335-347,1988.

BRITTEN, M. B.; ZEIHNER, A. M.; SCHACHINGER, V. Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options. **J. Intern. Med.**, v. 245, p. 315-327, 1999.

BROUSIL, J. A.; BURKE, J. M. Olmesartan medoxomil: an angiotensin II-receptor blocker. **Clin. Ther.**, v. 25, p.1041-1055, 2003.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science.**, v. 232, n.4 , p. 34-47, 1986.

BRUNNER, H.B. Clinical Efficacy and Tolerability of Olmesartan. **Clin Ther.**, v. 26, suppl A, p. 28-32, 2004.

BYRNE, J. A. et al. Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. **Circ. Res.**, v. 93, p. 802-805, 2003.



CAMPBELL, D. J. Circulating and tissue angiotensin system. **J. Clin. Invest.**, v.79, p.1-6, 1987.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Quim. Nova**, v.30, p.425-430, 2007.

CAREY, R. M.; WANG, Z. Q.; SIRAGY, H. M. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. **Hypertension**, v.35, p.155-163, 2000.

CARVALHO, M. H. C. et al. The role of thromboxane A2 in the altered microvascular reactivity in two-kidney, one-clip hypertension. **Endothelium**, v.5, p.167-178, 1997.

CLAUSELL, N. et al. In vivo blockade of tumor necrosis factor-alpha in cholesterol-fed rabbits after cardiac transplant inhibits acute coronary artery neointimal formation. **Circulation.**, v. 89, p. 2768-2779, 1994.

CLEARFIELD, M. et al. Efficacy and safety of rosuvastatin 10mg contra atorvastatin 20mg: Results of the PULSAR study. **Atheroscler Suppl**, v. 6, n.1, p. 104-108, 2005.

COOKE, J. P.; DZAU, V. J. Nitric oxide synthase: role in the Genesis of vascular disease. **Ann Rev Med**, v.48, p. 489-509, 1987.

CORSEAU, D. et al. Hemostasis imbalance in experimental hypertension. **Mol. Med.**, v. 8, p. 169-178, 2002.

CORSINI, A. et al. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacol. Ther.**, v. 84, n. 3, p. 413-428, 1999.

CROUSE, J. R. et al. METEOR Study Group. Effect of rosuvastatin on progression of carotid intima-média thickness in low-risk individuals with subclinical atherosclerosis: the METEOR Trial. **JAMA**, v. 297, p.1344-1253, 2007.

CROWLEY, S. D.; GURLEY, S. B.; COFFMAN, T. M. AT1 receptors and control of blood pressure: the kidney and more. **Trends. Cardiovasc. Med.**, v.17, p. 30-34, 2007.

CUNHA, R. S.; CABRAL, A. M.; VASQUEZ, E. C. Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L-NAME-induced hypertension in conscious rats. **Am. J. Hypertens.**, v.6, p. 806-809, 1993.

CUSPIDI, C. et al. Left ventricular hypertrophy and cardiovascular risk stratification: impact and costeffectiveness of echocardiography in recently diagnosed essential hypertensives. **J. Hypertens.**, v. 24, p.1671-1677, 2006.

DAVIGNON, J.; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis **Circulation**, v.109, p.27-32, 2004.

DE CATERINA, R. et al. Nitric oxide decreases cytokine-reduced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **J. Clin. Investig.**, v. 96, p. 60-68, 1995.

DE HAAN, J. B. et al. Lack of the antioxidant glutathione peroxidase-1 does not increase atherosclerosis in C57BL/J6 mice fed a high-fat diet. **J Lipid Res.**, v. 47, p. 1157-1167, 2006.

DE NUCCI, G. et al. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 85, p. 9797-9800, 1988.

DE ZEEUW, D. Albuminuria, not only a cardiovascular/renal risk marker, but also a target for treatment? **Kidney. Int. Suppl.**, v. 92, p. 2-6, 2004.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, v.115, p.1285-1295, 2007.

DELA PAZ, N. G. et al. Regulation of NF- $\kappa$ B-dependent gene expression by the POU domain transcription factor Oct-1. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 8424-8434, 2007.

DI NAPOLI, P. et al. Chronic treatment with rosuvastatin modulates nitric oxide synthase expression and reduces ischemia-reperfusion injury in rat hearts. **Cardiovasc. Research.**, v.66, p. 462-471, 2005.

DOGGRELL, S. A.; BROWN, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. **Cardiovasc. Research.**, v. 39, p. 89-105, 1998.

DURANTE, W.; JOHNSON, F. K.; JOHNSON, R. A. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 34, p. 906-11, 2007.

DUSTING, G. J.; SELEMIDS, S.; JIANG, F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, supl.1, p. 97-103, 2004.

ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **J. Lipid. Res.**, v.33, n. 11, p. 1569-82, 1992.

ERZEN, B. et al. Endothelial dysfunction, intima-media thickness, ankle-brachial pressure index, and pulse pressure in young post-myocardial infarction patients with various expressions of classical risk factors. **Heart Vessels.**, v. 22, p. 215-222, 2007.

FAERGEMAN, O. U.; SOSEF, F; DUFFIELD, E. On behalf of the ECLIPSE Study Investigators. Efficacy and tolerability of rosuvastatin and atorvastatin when force-titrated in high-risk patients: results from the ECLIPSE Study. **Atheroscler. Suppl.**, v. 7, p. 580, 2006.

FELLSTRÖM, B. et al. Effect of rosuvastatin on outcomes in chronic haemodialysis patients — baseline data from the AURORA study. **Atheroscler. Suppl**, v.7, n.3, p. 578, 2006.

FERRIER, K. E. et al. Intensive cholesterol reduction lowers blood pressure and large artery stiffness in isolated systolic hypertension. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 39, p. 1020-1025, 2002.

FISHER, N. D. L. et al. Renal and Hormonal Responses to Direct Renin Inhibition With Aliskiren in Healthy Humans. **Circulation**, v. 117, p. 3199-3205, 2008.

FLISER, D.; BUCHHOLZ, K.; HALLER, H. Antiinflammatory effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade in hypertensive patients with microinflammation. **Circulation**, v. 110, n. 9, p. 1103-1107, 2004.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiol. Ver.**, v. 62, p. 347-504, 1982.

FRANÇA, M. F. **Efeitos da L-arginina por via endovenosa sobre a pressão arterial, sistema renina-angiotensina, hemodinâmica renal e excreção de sódio em hipertensos essenciais.** 1995. 121 f. Dissertação (Mestrado em Endocrinologia)-Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FURCHGOTT, R. F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. **Biosci. Rep.**, v. 19, p. 235-251, 1999.

\_\_\_\_\_. The discovery of endothelium-dependent relaxation. **Circulation**, v.87, supl. 5, p.3-8, 1993.

\_\_\_\_\_.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

FURUHASHI, M. et al. Blockade of the renin-angiotensin system decreases adipocyte size with improvement in insulin sensitivity. **J Hypertens**, v.22, p.1977-1982, 2004.

GAO, X. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces endothelial dysfunction in *Lepr<sup>db</sup>* mice. **Circulation**, v. 115, p. 245–254, 2007.

GIANNOTTI, G. et al. Impaired Endothelial Repair Capacity of Early Endothelial Progenitor Cells in Prehypertension: Relation to Endothelial Dysfunction. **Hypertension**, v. 55, p. 1389-1397, 2010.

GIRERD, X.; GIRAL, P. Risk stratification for the prevention of cardiovascular complications of hypertension. **Curr. Med. Res. Opin.**, v.20, n. 7, p.1137-1142, 2004.

GLORIOSO, N. et al. Effect of the HMG-CoA reductase inhibitors on blood pressure in patients with essential hypertension and primary hypercholesterolemia. **Hypertension**, v. 34, p.1281-1286, 1999.

GOLOMB, B. A. et al. Reduction in blood pressure with statins: results from the UCSD Statin Study, a randomized trial. **Arch. Intern. Med.**, v. 168, p. 721-727, 2008.

GÓMEZ-GARCIA, A. et al. Rosuvastatina y metformina reducen La inflamación y El estrés oxidativo em pacientes com hipertensión y dislipemia. **Rev. Esp. Cardiol.**, v.60, p. 1242-1249, 2007.

GÓMEZ-GARRE, D. et al. Rosuvastatin added to standard heart failure therapy improves cardiac remodelling in heart failure rats with preserved ejection fraction. **Eur J Heart Fail**, v. 12, n.9, p 903-912, 2010.

GONZALES, F. M. et al. Nitrite anion provides potent cytoprotective and antiapoptotic effects as adjunctive therapy to reperfusion for acute myocardial infarction, **Circulation**, v. 117, n.23, p. 2986-2994, 2008.

GONZALES, W. et al. Molecular plasticity of vascular wall during N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation of proinflammatory signals, **Hypertension**, v. 36, p. 103-109, 2000.

GOODWIN, B. L. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 293, p. 1115-1121, 2007.

GORDON, S. A. et al. Nitric oxide induces murine thymocyte apoptosis by oxidative injury and a p53-dependent mechanism. **J. Leukoc. Biol.** v. 70, p. 87-95, 2001.

GREEN, L. C. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GREENBERG, S. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits endothelium-dependent relaxation. **J. Appl. Physiol.**, v. 74, p. 2394-2403, 1993.

GRIEDLING, K. K.; LASSÈGUE, B.; ALEXANDER, R. W. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 36, p. 281-306, 1996.

GRISHAM, M. et al. Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol**, v. 276, p. 315–321, 1999.

GROVES, P. et al. Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control. **Circulation**, v. 92, p. 3424-3430, 1995.

GUYTON, A. C. Blood pressure control: special role of the kidneys and body fluids. **Science**, v. 252, p. 1813-1816, 1991.

\_\_\_\_\_. Kidneys and fluids in pressure regulation. Small volume but large pressure changes. **Hypertension**, v.19, supl.1, p.2-8, 1992.

HABIB, J. et al. Rosuvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, decreases cardiac oxidative stress and remodeling in Ren2 transgenic rats. **Endocrinology**, v. 148, p. 2181-2188, 2007.

HALL, J. E. Control of sodium excretion by angiotensin II: intrarenal mechanisms and blood pressure regulation. **Am. J. Physiol.**, v.250, p.R960-972,1986.

\_\_\_\_\_. The renin-angiotensin system: renal actions and blood pressure regulation. **Comprehensive Therapy**, v.17, p. 8-17, 1991.

\_\_\_\_\_. ; GUYTON, A. C.; NIZELLE, H. L. Role of the renin-angiotensin system in control of sodium excretion and arterial pressure. **Acta. Physiol. Scand. Suppl.**, v. 591, p. 48-62, 1990.

HALLER, H. et al. Prevention of microalbuminuria in Type 2 Diabetes (Roadmap Trial) 6 A. 02. **Journal of Hypertension**, v. 28, p. e233, jun. 2010.

HARTNER, A. et al. Effects os diabetes and hypertension on macrophage infiltration and matrix expansion in the rat kidney. **BMC Nephrology.**, v. 6, n. 6, 2005.

HATSUKAMI, T.S. et al. Study design for a randomized, double-blind trial to assess the effect of 24 months of dosing with rosuvastatin on progression of carotid artery atheroma in moderately hypercholesterolemic patients with asymptomatic carotid stenosis. **Atheroscler. Suppl.**, v. 2, n. 2, p. 47-48, 2001.

HERIZE, A. et al. Prevention of the cardiovascular and renal effects of angiotensin II by endothelin blockade. **J. Auton. Pharmacol.**, v.31, p. 10-14, 1998.

HERNANDEZ-PERERA, O. et al. Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. **Circ. Res.**, v. 87, p. 616-622, 2000.

HIGASHIURA, K. et al. The effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and na angiotensin II receptor antagonist on insulin resistance in fructose-fed rats. **Am. J. Hypertens.**, v.13, p. 290-297, 2000.

HSIEH, N. K. et al. Nitric oxide inhibition accelerates hypertension and induces perivascular inflammation in rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 31, p. 212-218, 2004.

ICHIKAWA, I.; BRENNER, B. M. Importance of efferent arteriolar vascular tone in regulation of proximal tubule fluid reabsorption and glomerulotubular balance in the rat. **J. Clin. Invest.**, v. 65, p. 1192-1201,1980.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.84, p. 9265-9269, 1987.

IKEDA, U. et al. Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner. **Am. J. Physiol.**, v. 260, p. 1713–1717, 1991.

IKEDA, Y.; YOUNG, L. H; LEFER, A. M. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, protects ischemic reperfused myocardium in normocholesterolemic rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 41, p. 649-656, 2003.

IMAI, E. et al. Olmesartan Reducing Incidence of Endstage Renal Disease in Diabetes Nephropathy Trial (ORIENT): Rationale and Study Design. **Hypertension Research**, v. 29, p. 703-709, 2006.

INOUE, A. et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 2863-2867, 1989.

INSULL, W. Jr. et al. SOLAR Study Group. Achieving low-density lipoprotein cholesterol goals in high-risk patients in managed care: comparison of rosuvastatin, atorvastatin, and simvastatin in the SOLAR trial. **Maio. Clin. Proc.**, v. 82, n. 5, p. 543-550, 2007.

ITO, H. et al. Mild hypoxia induces hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible endogenous endothelin-1-mediated mechanism. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.28, p.1271-1277, 1996.

ITO, N. et al. Renin-angiotensin inhibition reverses advanced cardiac remodeling in aging spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Hyperten.**, v. 20, p. 792-799, 2007.

JONES, P. et al. Comparison of the Efficacy and Safety of Rosuvastatin Contra Atorvastatin, Simvastatin, and Pravastatin Across Doses (STELLAR Trial). **Am. J. Cardiol.**, v. 92, p. 152-160, 2003.

JONES, S. A. et al. C-reactive protein: a physiological activator of interleukin 6 receptor shedding. **J. Exp. Med.**, v.189, p. 599-604, 1999.

JOVER, B.; MIMRAN, A. Nitric oxide inhibition and renal alterations. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 38, suppl. 2, p. 65-70, 2001.

KADOWAKI, D. et al. Evaluation for antioxidant and renoprotective activity of olmesartan using nephrectomy rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, n. 12, p. 2041-2045, 2009.

KAPLAN, N. M. Primary hypertension: pathogenesis. In: \_\_\_\_\_. **Clinical Hypertension**, 6. ed, Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, p.47-108.

KASAL, D. A. et al. Allopurinol attenuates L-NAME induced cardiomyopathy comparable to blockade of angiotensin receptor. **Histol. Histopathol.**, v. 23, p.1241-1248, 2008.

KASSAB, S. et al. Systemic hemodynamics and regional blood flow during chronic nitric oxide synthesis inhibition in pregnant rats. **Hypertension**, v.31, p.315-320, 1998.

KIEKSHUS, J. et al. A statin in the treatment of heart failure? Controlled rosuvastatin multinational study in heart failure (COROA): Study design and baseline characteristics. **Eur. J. Heart. Failure.**, v. 7, p.1059-1069, 2006.

KIM, S.; KIM, C. H.; VAZIRI, N. D. Upregulation of hepatic LDL receptor-related protein in nephrotic syndrome: response to statin therapy. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.288, p. 813-817, 2005.

KIM-MITSUYAMA, S. et al. Additive beneficial effects of the combination of a calcium channel blocker and an angiotensin blocker on a hypertensive rat-heart failure model. **Hypertens. Res**, v.27, p. 771-779, 2004.

KOENIG, W.; KHUSEYINOVA, N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.27, p.15-26, 2007.

KOIKE, H. New Pharmacologic aspects of CS-866, the Newest Angiotensin II Receptor Antagonist. **Am. J. Cardiol.**, v.87, p. 33-36, 2001.

KONIG, J. et al. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 278, p.156-164, 2000.

KUMAR, A. et al. Nuclear factor- $\kappa$ B: its role in health and disease. **J. Mol. Med.**, v. 82, p. 434–448, 2004.

KUNG, C.F. et al. L-NAME hypertension alters endothelial and smooth muscle function in rat aorta. Prevention by trandolapril and verapamil. **Hypertension**, vol. 26, p.744–751, 1995.

KUREISHI, Y. et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. **Nat Med**, v.6, p.1004-1010, 2000.

KUSUYAMA, T. et al. The Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitor on Vascular Progenitor. **Cells. Journal of Pharmacological Sciences.**, v. 101, p. 344-349, 2006.

LALANI, S. R. et al. Isolated mitochondrial myopathy associated with muscle coenzyme Q10 deficiency. **Arch. Neurol.**, v. 62, n. 2, p. 317-320, 2005.

LAU, Y. Y. et al. Multiple transporters affect the disposition of atorvastatin and its two active hydroxy metabolites: application of in vitro and ex situ systems. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, n. 2, p. 762-771, 2006.

LAUFS, U.; BÖHM, M. Cardiac effects of statins: advancements and open questions. **Cardiovasc. Res.**, v.66, p.427-429, 2005.

LAURSEN, J. B. et al. Endothelial regulation of vasomotion in ApoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. **Circulation**, v. 103, p.1282-1288, 2001.

\_\_\_\_\_. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. **Circulation**, v.95, p.588-593,1997.

LECIAN, D. et al. Renal effects of HMG-CoA Reductase Inhibition in a rat model of chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **Kidney Blood Press Res.**, v. 29, p. 135-143, 2006.

LEE, M. Y.; GRIENDLING, K. K. Redox signaling, vascular function, and hypertension. **Antioxid. Redox. Signal.**, v.10, p.1045-1059, 2008.

LEE, T. M. et al. Effect of pravastatin on development of left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v. 289, p. 220–227, 2005.

LEE, T. M.; SU, S. F.; TSAI, C. H. Effect of pravastatin on proteinuria in patients with well-controlled hypertension. **Hypertension**, v.40, p. 67–73, 2002.

LEITER, A. et al. Rosuvastatin 40 mg contra atorvastatin 80 mg in high-risk patients with hypercholesterolaemia: results of the POLARIS study at 8 and 26 weeks. **Eur Heart J**, v. 26, p.581, 2005.

LEMAY, J.; HAMET, P.; BLOIS, D. Losartan-induced apoptosis as a novel mechanism for the prevention of vascular lesion formation after injury. **JRAAS**, v.1, p.46-50, 2000.

LENNERNAS, H.; FAGER, G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 32, n. 5, p. 403-425, 1997.

LI, Y. Y. et al. Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor  $\alpha$  can be modulated by anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  therapy. **Natl Acad Sci USA**, v. 97, p.12746–12751, 2000.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v.420, p.868-874, 2002.

LIEVADOT, J. et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow: derived endothelial progenitor cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 399-405, 2001.

LIFTON, R. P; GHARAVI, A. G; GELLER, D. S. Molecular mechanisms of human hypertension. **Cell**, v.104, p.546-556,2001.

LINZ, W. et al. Interactions among ACE, kinins and NO. **Cardiovasc Res**, v. 43, p.549-561, 1999.

LOCH, D. et al. Rosuvastatin attenuates hypertension-induced cardiovascular remodeling without affecting blood pressure in DOCA-salt hypertensive rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 47, n. 3, p. 396-404, 2006.



LUYARA, G. et al. Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotensin II antagonism. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.18, p.1408-1416, 1998.

MA, S. et al. Hydrolysis of angiotensin II receptor blocker prodrug olmesartan medoxomil by human serum albumin and identification of its catalytic active sites. **Drug Metab Dispos**, v.33, n.12, p.1911-1919, 2005.

MAACH, C.; KARTES, T.; KILLER, H. Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of Rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. **Circulation**, v. 108, p.1567-1574, 2003.

MALAGRIS, L. E. N. **A via L-arginina-óxido nítrico e o controle do stress em pacientes com hipertensão arterial sistêmica.** 2004. 103 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental)-Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MALLAT, Z.; TEDGUI, A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. **Br. J. Pharmacol.**, v.130, p.947-962, 2000.

MANCIA, G. et al. Long-term risk of diabetes, hypertension and left ventricular hypertrophy associated with the metabolic syndrome in a general population. **J. Hypertens.**, v. 26, p.1602-1611, 2008.

MANN, D. L. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. **Circ. Res.**, v.91, p.988-998, 2002.

MARTIN-NIZARD, F. et al. Modified low density lipoproteins activate human macrophages to secrete immunoreactive endothelin. **FEBS Lett**, v.293, p.127-130, 1991.

MCFARLANE, R. et al. Pleiotropic effects of statins: Lipid reduction and beyond. **J Clin Endocrinol Metab**, v.87, p.1451-1458, 2002.

MCNAMARA, D. B. et al. L-arginine inhibits balloon catheter-induced hyperplasia. **Biochem Biophys Res Commun**, v.193, p.291-296, 1993.

MEHTA, J. L; LI, D. Facilitative interaction between angiotensin II and oxidized LDL in cultured human coronary artery endothelial cells. **J. Renin. Angiotensin Aldosterone Syst.**, v.2, p.70-76, 2001.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Identification, regulation and function of a novel lectin like oxidized low-density lipoprotein receptor. **J Am Coll Cardiol**, v.39, p.1429-1435, 2002.

MILES, L. et al. Muscle coenzyme Q: a potential test for mitochondrial activity and redox status. **Pediatr. Neurol.** v. 32, n. 5, p.318-324, 2005.

MILLER, A. W; TULBERT, C. D; BUSIJA, D. W. Rosuvastatin treatment reverses impaired coronary artery vasodilation in fructose-fed, insulin-resistant rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.287, p.157-160, 2004.

MILLER, M. J. et al. Inhibition of calcium-dependent nitric oxide synthase causes ileitis and leukocytosis in guinea pigs. **Dig Dis Sci.**, v. 39, p.1185-92, 1994.

MIRE, D. E; SILFANI, T. N; PUGSLEY, M. K. A Review of the structural and functional features of olmesartan medoxomil, an angiotensin receptor blocker. **Cardiovasc. Pharmacol.**, v.46, n.5, p.585-593, 2005.

MISONOU, M. et al. Acrolein produces nitric oxide through the elevation of intracellular calcium levels to induce apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: implications for smoke angiopathy, **Nitric Oxide**, v.14, n. 2, p.180-187, 2006.

MIURA, S. et al. Molecular Mechanism Underlying Inverse Agonist of Angiotensin II Type 1 Receptor. **J. Biol. Chemistry**, v. 281, p 19288–19295, 2006.

MIZUNO, M. et al. Pharmacology of CS-866, a novel nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, v.285, p.181-188, 1995.

\_\_\_\_\_. Renoprotective effects of blockade of angiotensin II AT1 receptors in an animal model of type 2 diabetes. **Hypertens Res.**, v.25, p. 271-278, 2002.

MODUR, V. et al. Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor  $\alpha$ . **J. Clin. Invest.**, v.100, p. 2752–2756, 1997.

MONETTI, M. et al. Rosuvastatin displays anti-atherothrombotic and anti-inflammatory properties in apoe-deficient mice. **Pharmacol. Res.**, v.55, p.441-449, 2007.

MORAWIETZ, H. et al. Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. **Circulation**, v.100, p.899-902,1999.

MOSHAGES, H. et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Clin. Chem.**, v.41, p.892–896, 1995.

NAITO, Y. et al. Rosuvastatin reduces rat intestinal ischemia-reperfusion injury associated with the preservation of endothelial nitric oxide synthase protein. **World J. Gastroenterol.**, v.12, p.2024-2030, 2006.

NAKAMURA, K. et al. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  and angiotensin II. **Circulation**, vol. 98, p .794-799,1998.

NAKATA, S. et al. Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. **Circulation**, v. 117, p. 2211-2223, 2008.

NANGAKU, M. et al. Anti-hypertensive agents inhibit in vivo the formation of advanced glycation end products and improve renal damage in a type 2 diabetic nephropathy rat model. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.14, p.1212-1222, 2003.

NAYA, M. et al. Olmesartan, but not amlodipine, improves endothelium-dependent coronary dilation in hypertensive patients. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.50, n.12, p.1144–1149, 2007.

NETO-FERREIRA, R. et al. Beneficial effects of rosuvastatin on aortic adverse remodeling in nitric oxide-deficient rats. **Exp. Toxicol. Pathol. in press.**, May, 2010.

NEZASA, K. et al. Liver-Specific distribution of rosuvastatin in rats: comparison with pravastatin and simvastatin. **Drug Metabolism and Disposition**, v.30, n.11, p.1158-1163, 2004.

NICKENIG, G.; HARRISON, D. G. The AT1-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: Part I: Oxidative stress and atherogenesis. **Circulation**, v.105, p.393-396, 2002.

\_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_. The AT1-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: Part II: AT1 receptor regulation. **Circulation**, v.105, p.530-536, 2002 b.

NISSEN, S. Design and methodology of a study to evaluate the effect of rosuvastatin on intravascular ultrasound-derived coronary atheroma burden: the ASTEROID study. **Atherosclerosis Supplements**, v. 4, n. 2, p.27, 2003.

NUSSBERGER, J; KOIKE, H. Antagonizing the angiotensin II subtype I receptor: a focus on olmesartan medoxomil. **Clin. Ther**, v.26, suppl. A, p.12-20, 2004.

OPARIL, S. et al. Comparative efficacy of olmesartan, losartan, valsartan, and irbesartan in the control of essential hypertension. **J. Clin. Hypertens**, vol. 3, n.5, p.283–291, 2001.

OPARIL, S.; ZAMAN, M. A; CAIHOUN, D. A. Pathogenesis of Hypertension. **Ann Intern Med**, v.139, p.761-776, 2003.

OTSUI, K. et al. Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries. **Heart Vessels**, vol. 22, p.416–422, 2007.

OTTO, A. et al. Rosuvastatin treatment protects against nitrate-induced oxidative stress in eNOS knockout mice: implication of the NAD(P)H oxidase pathway. **Br J Pharmacol**, v.148, p.544-552, 2006.

PALMER, R. M. J; ASHTON, D. S; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v.333, p.664-666, 1988.

PARADISO-HARDY, F. L. et al. The importance of in-hospital statin therapy for patients with acute coronary syndromes. **Pharmacotherapy.**, v. 23, p. 506-513, 2003.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care.**, v.31, p. 170-180, 2008.

PAUL, M.; MEHR, A. P.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol Rev**, v. 8, n. 6, p.747–803, 2006.

PAULIS, L. et al. Melatonin prevents fibrosis but not hypertrophy development in the left ventricle of NG-nitro-L-arginine-methyl ester hypertensive rats. **Journal of Hypertension.**, v. 27, suppl.6, p.11–16, 2009.

PAULIS, L. et al. Regression of L-NAME-induced hypertension: the role of nitric oxide and endothelium-derived constricting factor. **Hypertens. Res.**, v. 31, p. 793-803, 2008.

PECHÁŇOVÁ, O. et al. L-NAME-induced protein remodeling and fibrosis in the rat heart. **Physiol Res**, vol. 48, p.353-362, 1999.

PEREIRA, L. M. M.; ALMEIDA, J. R.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Kidney adaptation in nitric oxide-deficient Wistar and spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 74, p. 1375-1386, 2004.

\_\_\_\_\_. ; \_\_\_\_\_. The effect of enalapril and verapamil on the left ventricular hypertrophy and the left ventricular cardiomyocyte numerical density in rats submitted to nitric oxide inhibition. **Int. J. Exp. Path.**, v.82, p.115-122, 2001.

PICCHI, A. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. **Circ. Res.**, v. 99, p.69–77, 2006.

POLLOCK, D. M. et al. Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition. **Hypertension**, v.21, p.660-666, 1993.

PRACYK, J. B. et al. Requirement for the Rac1 GTPase in the signal transduction pathway leading to cardiac myocyte hypertrophy. **J. Clin. Invest**, v.102, p. 929–937, 1998.

PRIVRATSKY, J. R. et al. Renin-angiotensin blockade prevents glucose-induced cardiac dysfunction in ventricular myocytes: role of the AT1 receptor and NADPH oxidase. **Hypertension.**, v. 42, p.206–212, 2003.

QUADRI, F.; CARRETERO, A. O.; SCICLI, A. G. Centrally produced neuronal nitric oxide in the control of baroreceptor reflex sensitivity and blood pressure in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Jap J Pharmacol**, v.81, p.279-285, 1999.

QUINN, M. J. F.; WILLIAMS, G. H. Regulation of aldosterone secretion. **Ann Rev Physiol**, v.50, p.409-426, 1988.

RAITAKARI, O. T.; CELERMAJER, D. S. Testing for endothelial dysfunction. **Ann. Med.** v. 32, p. 293–304, 2000.

RAPAPORT, R. M; DRAZAIN, M. B; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature**, v.306, p.174-176, 1983.

RIBEIRO, M. O. *et al.* Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension**, v. 20, p.298–303, 1992.

RIDKER, P. M. *et al.* JUPITER Study Group. **N. Engl. J. Med.**, v.359, p.2195-207, 2008

RIDKER, P. M. Rosuvastatin in the Primary Prevention of Cardiovascular Disease Among Patients With Low Levels of Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Elevated High-Sensitivity C-Reactive Protein: Rationale and Design of the JUPITER Trial. **Circulation**, v. 108, p. 2292–2297, 2003.

RIMBACH, G. *et al.* Macrophages stimulated with IFN- $\gamma$  activate NF- $\kappa$ B and induce MCP-1 gene expression in primary human endothelial cells. **Mol. Cell. Biol. Res. Commun.**, v. 3, p. 238–242, 2000.

ROMANO, M. *et al.* Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. **Immunity.**, v. 6, p. 315–325, 1997.

ROMERO, J. C. *et al.* Alterations in blood pressure by derangement of the mechanisms that regulate sodium excretion. **Mayo Clin Proceedings**, v.64, p.1425-1435, 1989.

RUBANYI, G. M; POLOKOFF, M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. **Pharmacol Rev**, v.46, p.328-415, 1994.

\_\_\_\_\_; VANHOUTTE, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **Am J Physiol**, v.250, p.822-827, 1986.

RUIZ, A. *et al.* The effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on systolic pressure, diastolic pressure and pulse pressure according to the initial level of blood pressure. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, p.45-52, 2008.

RUPEREZ, M. *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors decrease angiotensin II-induced vascular fibrosis: role of RhoA/ROCK and MAPK pathways. **Hypertension.**, v. 50, p.377–383, 2007.

SADER, M. A; CELERMAJER, D. S. Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system. **Cardiov. Res.**, v.53, p.597-604, 2001.

SADOSHIMA, J; IZUMO, S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. **Circ. Res.**, v.73, p.413–423, 1993.

SAKURAI, T. et al. Cloning of a c-DNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. **Nature**, v.348, p.732-735, 1990.

SANADA, S. et al. Differential subcellular actions of ACE inhibitors and AT1 receptor antagonists on cardiac remodeling induced by chronic inhibition of NO synthesis in rats. **Hypertension**, v.38, p.404-411, 2001.

SANDER, M.; HANSEN, J.; VICTOR, R. G. The sympathetic nervous system is involved in the maintenance but not initiation of the hypertension induced by N-nitro-L-arginine methyl ester. **Hypertension**, v.30, p.64-70, 1997.

SANTHANAM, L. et al. Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. **Circ Res.**, v. 101, p. 692-702, 2007

SANTOS, R. A. S; FERREIRA, A. J. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens**, v.16, p.122-128, 2007.

SANTOS, R. A; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J; ANDRADE, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. **Regul Pept**, v.91, p.45-62, 2000.

SCHACHTER, M. Chemical, Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v.19, n.1, p.117-125, 2005.

SCHERR, C.; RIBEIRO, J. P. Gênero, idade, nível social e fatores de risco cardiovascular: considerações sobre a realidade brasileira. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 93, n.3, p.54-56, 2009.

SCHIEFFER, B. et al. Expression of angiotensin II and interleukin-6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. **Circulation**, v.101, p.1372-1378, 2000.

SCHIFFRIN, E.L. et al. Antihypertensive effect of an endothelin receptor antagonist in DOCA-salt spontaneously hypertensive rats. **Br. J. Pharmacol.**, v.115, p.1377-1381, 1995.

SCHIFFRIN, E. L; FRANKS, D. J; GUTKOWSKA, J. Effect of aldosterone on vascular angiotensin II receptors in the rat. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.63, p.1522-1527, 1985.

SCHUSTER, H. The GALAXY Program: an update on studies investigating efficacy and tolerability of rosuvastatin for reducing cardiovascular risk. **Expert Rev. Cardiovasc. Ther.**, v. 5, n. 2, p.177-193, 2007.

SEKO, Y. Effect of the angiotensin II receptor blocker olmesartan on the development of murine acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. **Clin. Science**, v.110, p.379-386, 2006.

SEVER, P. et al.; ASCOT INVESTIGATORS. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-

average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. **The Lancet.**, v. 361, p. 1149-1158, 2003.

SHANMUGAM, S; SANDBERG, K. Ontogeny of angiotensin II receptors. **Cell Biol Int**, v.20, p.169-176,1996.

SHITARA, Y.; SUGYIAMA, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug–drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. **Pharm and Therap**, v.112, p.71-105, 2006.

SICARD, P. et al. Antihypertensive effects of Rosuvastatin are associated with decreased inflammation and oxidative stress markers in hypertensive rats. **Free Radic Res.**, v. 42, p. 226-236, 2008.

SIRONI, L. E. et al. Rosuvastatin, but not simvastatin, provides end-organ protection in stroke-prone rats by antiinflammatory effects. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.**, v.25, p.598-603, 2005.

SIRTORI, C. R. Tissue selectivity of hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase inhibitors. **Pharmacol. Ther.**, v.60, n. 3, p. 431-459, 1993.

SMITH, R. et al. Reversal of vascular hypertrophy in hypertensive patients through blockade of angiotensin II receptors. **JASH**, v.2, n.3, p.165–172, 2008.

SOUZA, H. C. D. et al. Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-NAME hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v.280, p.844-850, 2001.

STALENHOEF, A. F. H. et al. A Comparative study with rosuvastatin in subjects with METabolic Syndrome: results of the COMETS study. **Diabetologia**, v. 47, p.1147, 2004.

STENDER, S. et al. Comparison of rosuvastatin with atorvastatin, simvastatin and pravastatin in achieving cholesterol goals and improving plasma lipids in hypercholesterolaemic patients with or without the metabolic syndrome in the MERCURY I trial. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 7, n. 4, p. 430-438, 2005.

STEVEN, E. et al. The ASTEROID Trial. Effect of Very High-Intensity Statin Therapy on Regression of Coronary Atherosclerosis. **JAMA**, v.295, p.1556–1565, 2006.

STRANDBERG, T. E.; FEELY, J.; SIGURDSSON, O. DISCOVERY: A comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin and atorvastatin in high-risk subjects with hypercholesterolaemia. **International Journal Clinical Practice**, v. 59, suppl.148, p. 1387-1394, 2005.

STRAWN, W. B.; DEAN, R. H.; FERRARIO, C. M. Novel mechanisms linking angiotensin II and early atherogenesis. **J. Renin. Angiotensin. Aldosterone Syst.** , v. 1, n. 1, p.11-17, 2000.

STUMPE, K. et al. Carotid intima-media thickness and plaque volume changes following 2-year angiotensin II-receptor blockade. The multicentre olmesartan atherosclerosis regression evaluation (MORE) study. **Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.**, vol.1, n.2, p.97–106, 2007.

SUGDEN, P. H; CLER, K. A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. **J. Mol. Med.**, v.76, p.725–746, 1998.

SUSIC, D. et al. Beneficial pleiotropic vascular effects of rosuvastatin in two hypertensive models. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 42, p.1091-1097, 2003.

TAKEMOTO, M. et al. A important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long term blockade of nitric oxide synthesis in rat. **J. Clin. Invest.**, v.99, p.278-287, 1997.

TERZOLI, L. et al. Lowering of elevated ambulatory blood pressure by HMG-CoA reductase inhibitors. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 46, p.310 –315, 2005.

THOMPSON, J. F. et al. Polymorphisms in the CETP gene and association with CETP mass and HDL levels. **Atherosclerosis**. v. 167, n. 2, p. 195-204, 2003.

TIAN, Q. et al. Inhibition of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Interleukin-6 Expression by Telmisartan Through Cross-Talk of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  With Nuclear Factor KB and CCAAT/Enhancer-Binding Protein- $\beta$  **Hypertension**., v. 53, p.798-804, 2009.

TIMMERMANS, P.B. *et al.* Angiotensin II receptors and angiotensin II receptors antagonists. **Pharmacol. Rev.**, v.45, p.205-251, 1993.

TOKUDA, K. *et al.* Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. **Hypertension**, v.43, p. 499–503, 2004.

TOLLNSM, J. P. *et al.* Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of renal hemodynamic responses. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. 655-662, 1990.

TOUYZ, R. M. Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure – implications in the pathogenesis of hypertension. **Can. J. Cardiol.**, v.16, p.1137-1146, 2000.

TRONC, F. *et al.* Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. **Arterioscler, Thromb, Vasc. Biol.**, v.16, p.1256-1262, 1996.

TU, X. *et al.* Anti-inflammatory Renoprotective Effect of Clopidogrel and Irbesartan in Chronic Renal Injury. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 19, p. 77-83, 2008.

ÜLKER, S.; McKEOWN, P. P.; BAYRAKTUTAN, U. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS And NADPH oxidase activities. **Hypertension**, v. 41, p. 534-539, 2003.



UNGER, T. The role of the renin–angiotensin system in the development of cardiovascular disease. **Am. J. Cardiol.**, v.89, p.3–9, 2002.

USHIO-FUKAI, M. et al. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II–induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v.271, p.23317–23321, 1996.

VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. **Lancet**, p.997–1000, 1989.

VAN AELST, L.; D'SOUZA-SCHOREY, C. Rho GTPases and signaling networks. **Genes. Dev.**, v.11, p.2295–2322, 1997.

VAN DER WOUDE, E.A. et al. The role of angiotensin (1-7) in renal vasculature of the rat. **J. Hypertens.**, v.24, p.1971–1978, 2006.

VAUGHAN, D. E. AT1 receptor blockade, and atherosclerosis, hopeful insights into vascular protection. **Circulation**, v. 101, p.1496–1497, 2000.

VERMA, A. et al. Effect of rosuvastatin on C-reactive protein and renal function in patients with chronic kidney disease. **Am J Cardiol**, v.96, p.1290–1292, 2005.

VERMA, S. et al. Mickle Endothelin Antagonism and Interleukin-6 Inhibition Attenuate the Proatherogenic Effects of C-Reactive Protein. **Circulation**, v.105, p.1890–1896, 2002.

VIEIRA JR., J.M et al. Statin Monotherapy Attenuates Renal Injury in a Salt-Sensitive Hypertension Model of Renal Disease. **Nephron. Physiol.**, v.101, p. 82–91, 2005.

VI DIRETRIZES Brasileiras de Hipertensão. **Rev. Bras. Hipertens.**, v.17, n.1, p.7–10, 2010.

VILLARREAL, F. J.; BAHNSON T.; KIM, N. N. Human cardiac fibroblasts and receptors for angiotensin II and bradykinin: a potential role for bradykinin in the modulation of cardiac extracellular matrix. **Basic. Res. Cardiol.**, v.93, supl. 3, p.4–7, 1998.

WALTERS, P. E; GASPARI, T. A; WIDDOP, R. E. Angiotensin (1-7) acts a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. **Hypertension**, v.45, p.960–966, 2005.

WANG, B. et al. Effect of traditional Chinese medicine Qin-Dan-Jiang-Ya-Tang on remodeled vascular phenotype and osteopontin in spontaneous hypertensive rats. **J. Ethnopharmacol**, v.110, p.176–182, 2007.

WANG, C. Y.; LIU, P. Y.; LIAO, J. K. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. **Trends Mol. Med.**, v. 14, p.37–44, 2008.

WASSMANN, S. et al. Angiotensin II Type 1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction, **Arterioscler Thromb Vasc. Biol.**, v. 22, p. 1208–1212, 2002.

\_\_\_\_\_. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 22, p. 300–305, 2002.

\_\_\_\_\_. Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac 1 GTPase. **Mol. Pharmacol.**, v.59, p.646-654, 2001.

\_\_\_\_\_. ; WAASMAN, K.; NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**, v. 44, p. 381-386, 2004.

WATANABE, S. et al. Role of JAK/STAT pathway in IL-6-induced activation of vascular smooth muscle cells. **Am. J. Nephrol.**, v. 24, p. 387–392, 2004.

WATANABE, T. et al. Influence of sex and age on serum nitrite/nitrate concentrations in healthy subjects. **Clin. Chim. Acta**, vol. 301, n.1–2, p.169–179, 2000.

WHEAL, A. J. et al. Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition on the cardiovascular responses to cannabinoids *in vivo* and *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 150, n.5, p.662–671, 2007.

WHITE, C. M. A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of rosuvastatin. **J. Clin. Pharmacol.**, v.42, n.9, p. 963-970, 2002.

WILCOX, C. S. Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. **Curr. Hypertens. Rep.**, v.4, p.160-166, 2002.

WILLICH, S. N. *et al.* Economic evaluation of a compliance-enhancing intervention in patients with hypercholesterolaemia: design and baseline results of the open label primary care study: rosuvastatin bases compliance initiatives to achievements of LDL goals (ORBITAL) study. **Am. Heart. J.**, v.148, p.1060-1067, 2004.

WOLFRUM, S.; JENSEN, K. S.; LIAO, J. K. Endothelium-Dependent Effects of Statins. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.23, p.729-736, 2003.

WOLLERT, K. C.; DREXLER, H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. **Cardiovasc. Res.**, v. 43, p. 838–849, 1999.

XU, H. L. et al. Effects of CS-866, an angiotensin II receptor antagonist, in 5/6 nephrectomized spontaneously hypertensive rats. **Nippon Jinzo\_Gakkai Shi**, v.43, p.580-588, 2001.

XU, P. et al. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in mas gene-deleted mice. **Hypertension**, v. 51, p. 574-580, 2008.

XU, Z. et al. Pravastatin Attenuates Left Ventricular Remodeling and Diastolic Dysfunction in Angiotensin II-Induced Hypertensive Mice. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 51, p.62-70, 2008.

YAGI, S. et al. Endothelial nitric oxide synthase-independent protective action of statin against angiotensin II-induced atrial remodeling via reduced oxidant injury. **Hypertension**, v. 55, p.918-923, 2010.

YAMAMOTO, E. et al. Pravastatin enhances beneficial effects of olmesartan on vascular injury of salt-sensitive hypertensive rats, via pleiotropic effects. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.**, v.27, p. 556-563, 2007.

YAMAZAKI, T.; KOMURO, I.; KUDOH, S. et al. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 3221-3228, 1996.

YANAGISAWA, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v.332, p.411-415, 1988.

YOSHIDA, J. et al. AT1 Receptor Blocker Added to ACE Inhibitor Provides Benefits at Advanced Stage of Hypertensive Diastolic Heart Failure. **Hypertension**, v.43, p.686-691, 2004.

YUDKIN, J.S. et al. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? **Atherosclerosis**, v. 148, p. 209–214, 2000.

ZATS, R.; BAYLIS, C. Chronic nitric oxide inhibition model: six years on. **Hypertension**, v.32, p.958-964, 1998.

ZATZ, R.; NUCCI, G. Effects of acute nitric oxide inhibition of rat glomerular microcirculation. **Am. J. Physiol.**, v. 30, p.360–363, 1991.

ZHAI, Y. et al. Fluvastatin decreases cardiac fibrosis possibly through regulation of TGF-beta(1)/Smad 7 expression in the spontaneously hypertensive rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 587, p.196-203, 2008.

ZHAI, Y.; GAO, X.; WU, Q. Fluvastatin decreases cardiac fibrosis possibly through regulation of TGF-beta(1)/Smad 7 expression in the spontaneously hypertensive rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 587, p.196-203, 2008.

ZHANG, C. et al. Divergent roles of angiotensin II AT1 and AT2 receptors in modulating coronary microvascular function. **Circ. Res.**, v. 92, p.322–329, 2003.

ZHOU, M. S.; JAIMES, E. A.; RAIJ, L. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress. **Hypertension**, v. 44, p.186-190, 2004.

ZOU, Y. et al. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. **Nat. Cell Biol.**, v.6, p. 499–506, 2004.

ZUNIC, G. et al. Pulmonary blast injury increases nitric oxide production, disturbs arginine metabolism, and alters the plasma free amino acid pool in rabbits during the early posttraumatic period. **Nitric Oxide**, vol. 4, n.2, p.123–128, 2000.

ZUNIC, G. et al. Very early increase in nitric oxide formation and oxidative cell damages associated with the reduction of tissue oxygenation is a trait of blast casualties. **Vojnosanit. Pregl.**, v.62, n.4, p.273-280, 2005.

## ANEXOS

### ANEXO A – Tabela 1

**TABELA 1** Pressão arterial sistólica (mmHg) dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais ao longo do tempo.

	Inicial	Semana 1	Semana2	Semana 3	Semana 4
G1	96,6±1,4	96,6±1,9*	98,6±2,3	96,2±2,4	98,4±2,2
G2	93,8±1,6	111,2±1,9	125,3±2,7	135,2±2,3	140,3±3,1
G3	93,7±1,6	105,1±1,7	102,3±2,3*	104,8±2,4*	108,8±2,0*
G4	96,9±1,9	115,1±1,8	117,4±2,4	127,7±1,9	132,2±2,3
G5	94,3±1,8	107,6±1,8	107,7±1,6*	104,4±1,6*	106,5±1,2*
G6	92,1±2,2	113,1±1,4	119,8±1,3	129,0±1,8	132,5±1,7
G7	92,0±1,6	105,6±1,6	104,3±1,8*	106,2±1,1*	102,4±1,7*
G8	91,4±2,1	104,5±1,5	102,9±1,4*	103,8±1,3*	101,4±1,2*

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (n=10 animais/grupo) e analisados estatisticamente através de ANOVA seguida de *Tukey* (\*p < 0,0001). G1=grupo controle; G2=grupo L-NAME; G3=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia; G4=grupo rosuvastatina 20 mg/kg/dia; G5=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia; G6=grupo rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G7=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia+rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G8=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia+rosuvastatina 20 mg/kg/dia. Análises estatísticas realizadas entre G2 e os diferentes grupos experimentais.

## ANEXO B – Tabela 2

**TABELA 2** Frequência cardíaca (bpm) dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais ao longo do tempo.

	Inicial	Semana 1	Semana2	Semana 3	Semana 4
G1	420,8±5,5	421,1±6,3	420,3±5,2	417,3±6,6	419,8±5,7
G2	428,7±4,5	422,1±5,4	426,3±5,2	418,5±4,8	429,7±3,9
G3	425,9±4,4	428,8±4,1*	429,1±5,8*	426,4±3,9*	429,1±4,7
G4	419,8±5,8	416,8±5,1	417,7±3,9	419,0±4,3	418,5±4,2
G5	412,9±4,7	411,0±6,0	409,1±4,9	412,5±4,6	411,2±5,3
G6	406,1±6,1	406,1±4,1*	405,8±4,6*	405,6±5,3*	409,0±4,6
G7	415,1±4,8	408,4±4,1	406,5±4,4*	410,7±4,1	405,7±4,7*
G8	410,1±5,9	408,2±5,2	408,3±5,1*	409,0±5,1	410,0±5,3

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (n=10 animais/grupo) e analisados estatisticamente através de ANOVA seguida de *Tukey* (\*p < 0,05). G1=grupo controle; G2=grupo L-NAME; G3=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia; G4=grupo rosuvastatina 20 mg/kg/dia; G5=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia; G6=grupo rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G7=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia+rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G8=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia+rosuvastatina 20 mg/kg/dia; bpm=batimentos por minuto. Análises estatísticas realizadas entre G2 e os diferentes grupos experimentais.

## ANEXO C – Tabela 5

**TABELA 5** Relação albumina/creatinina urinária dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

Grupos	RACU
G1	0,02±0,004#
G2	0,08±0,03
G3	0,03±0,008*
G4	0,02±0,005#
G5	0,04±0,003
G6	0,04±0,007
G7	0,03±0,003*
G8	0,03±0,002*

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (n=10 animais/grupo) e analisados estatisticamente através de ANOVA seguida de *Tukey* (\*p < 0,05; #p < 0,01). G1=grupo controle; G2=grupo L-NAME; G3=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia; G4=grupo rosuvastatina 20 mg/kg/dia; G5=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia; G6=grupo rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G7=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia+rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G8=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia+rosuvastatina 20 mg/kg/dia. RACU = relação albumina/creatinina urinária. Análises estatísticas realizadas entre G2 e os diferentes grupos experimentais.

## ANEXO D – Tabela 6

**TABELA 6** Nitrito/nitrato plasmático dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais	NOx (µM)
G1	2,1±0,5#
G2	0,5±0,1
G3	0,4±0,1
G4	0,8±0,1
G5	1,7±0,4
G6	2,3±0,6*
G7	2,2±0,5*
G8	2,1±0,4*

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (n=10 animais/grupo) e analisados estatisticamente através de *Kruskal-Wallis* seguida de *Tamhane* (\*p<0,05; #p<0,01). G1=grupo controle; G2=grupo L-NAME; G3=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia; G4=grupo rosuvastatina 20 mg/kg/dia; G5=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia; G6=grupo rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G7=grupo olmesartana 0,5 mg/kg/dia+rosuvastatina 2 mg/kg/dia; G8=grupo olmesartana 5 mg/kg/dia+rosuvastatina 20 mg/kg/dia. Análises estatísticas realizadas entre G2 e os diferentes grupos experimentais.



## **ANEXO E – Dieta**

A ração comercial oferecida aos animais foi a ração RC Focus 1722 (Agrocere®s®, Brasil), com as seguintes características:

Composição básica do produto: carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e de aminoácidos, aditivo antioxidante.

Níveis de garantia do produto: umidade (máxima 12,5%); proteína bruta (mínimo 22%); extrato etéreo (mínimo 4%); material mineral (máximo 10%); matéria fibrosa (máximo 8%); cálcio (máximo 1,4%); fósforo (mínimo 0,8%).

Vitaminas: vitamina A 12.000 UI; vitamina D3 1.800 UI; vitamina E 30 mg; vitamina K3 3 mg; vitamina B1 5 mg; vitamina B2 6 mg; vitamina B6 7 mg; vitamina B12 20 mcg; niacina 60 mg; ácido pantotênico 20 mg; ácido fólico 1 mg; biotina 0,05 mg; colina 600 mg.

Microelementos minerais: ferro 50 mg; zinco 60 mg; cobre 10 mg; iodo 2 mg; manganês 60 mg; selênio 0,05 mg; cobalto 1,5 mg.

Aminoácidos: DL-metionina 300 mg; lisina 100 mg

Aditivos: antioxidante 100 mg.

**ANEXO F – Certificado**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PRO-REITORIA DE PESQUISA  
Comissão de Ética na Experimentação Animal**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 016/2007-CCEA sobre “Hipertensão arterial por deficiência de óxido nítrico em ratos Wistar tratados com estatina e bloqueador do receptor AT1 da angiotensina II”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de José Marcos Girardi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 06/02/2007.

**C E R T I F I C A T E**

We certify that the protocol nº 016/2007- CCEA about “Hipertensão arterial por deficiência de óxido nítrico em ratos Wistar tratados com estatina e bloqueador do receptor AT1 da angiotensina II - José Marcos Girardi - in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF - ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 06/02/2007.

**Presidente/CEEA**

**Secretário/CEEA**