

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

FELIPE SANTOS SIMÕES DE FREITAS

Investigação dos efeitos pleiotrópicos cardiovasculares e microcirculatórios da sinvastatina em um modelo de hipertensão arterial e hiperpermeabilidade microvascular

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências – Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Vera Tibiriçá

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Adriano da Rocha Lessa

RIO DE JANEIRO

2016

i

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ – RJ

F866 Freitas, Felipe Santos Simões de

Investigação dos efeitos pleiotrópicos cardiovasculares e microcirculatórios da sinvastatina em um modelo de hipertensão arterial e hiperpermeabilidade microvascular / Felipe Santos Simões de Freitas. – Rio de Janeiro, 2016.

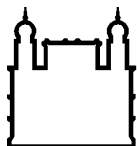
xiv, 89 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 73-89

1. Microcirculação. 2. Sinvastatina. 3. Hipertensão arterial. 4. Hiperpermeabilidade microvascular. 5. Rarefação microvascular. 6. Disfunção endotelial. Título.

CDD 547.615



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

FELIPE SANTOS SIMÕES DE FREITAS

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS PLEIOTRÓPICOS CARDIOVASCULARES E
MICROVASCULARES DA SINVASTATINA EM UM MODELO DE
HIPERTENSÃO ARTERIAL E PERMEABILIDADE MICROVASCULAR**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Vera Tibiriçá

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Adriano da Rocha Lessa

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto
Prof. Dr. Mario Fritsch Toros Neves
Prof. Dra. Patrícia Alves Reis
Prof. Dr. Dr. Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar
Prof. Dr. Vinicius de Frias Carvalho

Rio de Janeiro, de 2016

Aos meus queridos pais, Cláudio e Sônia, a minha
avó Luzia, a minha namorada Caroline.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Eduardo Tibiriçá que me proporcionou a oportunidade de ingressar no Laboratório de Investigação Cardiovascular, e em uma das maiores instituições de pesquisa do país, e ao longo desses últimos 8 anos acreditou no meu potencial de desenvolver este projeto de pesquisa, contribuindo para a minha formação acadêmica.

A todos os amigos do Laboratório de Investigação Cardiovascular que conviveram comigo neste período e contribuíram para o desenvolvimento desse projeto, além de participar e alegrar os meus dias.

A pesquisadora Vanessa Estato pela amizade e parceria que foram importantes na execução e desenvolvimento do projeto de doutorado.

Ao meu co-orientador Dr. Marcos Adriano Lessa pelo auxílio ao longo do projeto de doutorado.

Aos amigos do Laboratório de Inflamação, Dr. Vinícius de Frias e Rafael Carvalho que contribuíram de forma significativa com o projeto, com a realização dos experimentos com imunohistoquímica.

Ao laboratório de Imunofarmacologia pela significativa contribuição e colaboração ao longo do projeto, principalmente a Dra. Patrícia Reis e ao Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Aos meus amigos, que fazem parte da minha família, Rafael Chavadian, João Paulo, Márcia Rubia, Silvio Amaral, Therezinha e Joaquim Fonseca.

Aos professores das disciplinas do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, e todos os funcionários do Instituto Oswaldo Cruz e da Fiocruz. Ao Instituto Oswaldo Cruz, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro-FAPERJ, pelo apoio financeiro.

Ao meus amigos Oliver, Phoebe, Christina e Lineu e orientadores Dr. Giovanni Mann e Dr. Paul Fraser da King's College London pelo apoio e suporte ao longo do doutorado sanduíche.

Ao CNPq e ao Programa Ciências sem Fronteiras pelo apoio financeiro e científico para a realização do estágio de doutorado sanduíche na King's College London.

A toda minha família.

SUMÁRIO

Página

FOLHA DE ROSTO.....	i
FICHA CATALOGRÁFICA	ii
FOLHA DE APROVAÇÃO	iii
FOLHA DE DEDICATÓRIA.....	iv
FOLHA DE AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I	1
1. Introdução	2
1.2 Estatinas	4
1.2.1 Mecanismo de inibição da biossíntese do colesterol	6
1.2.2 Efeitos sobre as proteínas da família Rho	7
1.2.3 Efeitos no endotélio vascular	8
1.2.4 Efeitos sobre as células musculares lisas vasculares	9
1.2.5 Efeitos antioxidantes	10
1.2.6 Efeitos na hipertensão arterial	11
1.3 Microcirculação	13
1.3.1 Capilares	14
1.3.2 Rolamento e adesão de leucócitos na microcirculação	14
1.3.3 Hipertensão arterial e alterações microcirculatórias	15
1.3.4 SHR como um modelo de disfunção microvascular	15
CAPÍTULO II	18
2. Regulação da permeabilidade microvascular	19
2.1 A barreira endotelial	19
2.2 Estrutura molecular das junções intercelulares do endotélio vascular	20
2.3 Modelos ex vivo de hiperpermeabilidade microvascular	21
2.4 Efeitos vasculares da bradicinina	22

ETAPA I	24
3. Objetivos	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. Materiais e Métodos	25
4.1 Animais	25
4.2 Medidas Hemodinâmicas	25
4.3 Microscopia intravital por epi-iluminação e fluorescência	25
4.4 Avaliação do fluxo sanguíneo cerebral	27
4.5 Avaliação do estresse oxidativo e potencial antioxidante	28
4.6 Avaliação da expressão gênica da eNOS e dos receptores AT2 através de PCR.	28
4.7 Análises histológicas	29
4.7.1 Expressão proteica dos receptores AT2 cerebrais através imunohistoquímica	29
4.8 Mensuração dos níveis séricos de colesterol total	30
4.9 Análise estatística	30
5. Resultados	31
5.1 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre a pressão arterial sistólica	31
5.2 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre a densidade capilar funcional no músculo grácil	32
5.3 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre a densidade capilar funcional cerebral	33
5.4 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre o rolamento e adesão de leucócitos em vênulas cerebrais	34
5.5 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre reatividade vascular dependente de endotélio em arteríolas cerebrais	35
5.6 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre o fluxo sanguíneo microvascular cerebral basal	37
5.7 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre as alterações no fluxo sanguíneo microvascular cerebral em resposta a administração local de Acetilcolina	38
5.8 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre as alterações no fluxo sanguíneo cerebral em resposta a administração local de Ang II	39
5.9 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre o estresse oxidativo cerebral e muscular	40
5.10 Níveis de tiol cerebral e muscular de ratos hipertensos tratados com sinvastatina	41
5.11 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre a expressão gênica da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)	42
5.12 Efeitos do tratamento com sinvastatina sobre a expressão gênica dos receptores AT2 cerebral através de PCR	43

5.13 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre a expressão proteica dos receptores AT2 através de imunohistoquímica	44
5.14 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre os níveis séricos de colesterol total	45
Etapa II	46
6. Objetivos	46
6.1 Objetivos geral	46
6.2 Objetivos específicos	46
7. Materiais e Métodos	47
7.1 Animais	47
7.2 Protocolo experimental	47
7.3 Drogas e soluções	49
7.3.1 Solução cardioplégica - St. Thomas'	49
7.3.2 Solução de Krebs	49
7.4 Canulação da artéria aorta abdominal	49
7.5 Isolamento e dissecação do músculo cremáster	50
7.6 Aquisição das imagens	52
7.7 Controle do fluxo vascular	52
7.8 Aplicação das drogas	52
7.9 Análise das imagens e mensuração da permeabilidade microvascular	53
7.10 Análise estatística	56
8. Resultados	57
8.1 Efeito do pré-tratamento com sinvastatina sobre a hiperpermeabilidade microvascular induzida pela bradicinina	57
8.2 Efeito do pré-tratamento com sinvastatina sobre a hiperpermeabilidade microvascular induzida pela combinação da IL-1 β com a bradicinina	58
8.3 Papel da enzima NADPH oxidase nos efeitos da sinvastatina sobre a permeabilidade microvascular.	59
9. Discussão	60
10. Conclusões	72
11. Referências bibliográficas	73

- Figura 1: Imagens representativas da avaliação do fluxo sanguíneo cerebral mensurado através de um aparelho de fluxometria microvascular à laser com contraste de imagem (*Laser Speckle Contrast Imaging*, PeriCam PSI System, Perimed, Suécia). 27
- Figura 2: Medida da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos hipertensos tratados com sinvastatina 31
- Figura 3: Densidade capilar funcional no músculo esquelético (músculo grácil) de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). 32
- Figura 4. Densidade capilar funcional cerebral de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). 34
- Figura 5: (A) Rolamento e (B) adesão de leucócitos na parede venular de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). 34
- Figura 6: Percentual de reatividade arteriolar cerebral em resposta à administração local de acetilcolina (1µm) em ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). 36
- Figura 7: Fluxo sanguíneo microvascular cerebral basal de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). 37
- Figura 8: Alterações no fluxo sanguíneo cerebral em resposta a administração local de acetilcolina 1µm em ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). 38
- Figura 9. Alterações no fluxo sanguíneo cerebral em resposta a administração local de Ang II 1µm em ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). 39
- Figura 10. Nível de formação de malondialdeído (MDA) no (A) cérebro e músculo grácil, (B) e ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). 40
- Figura 11. Níveis de tiol no (A) cérebro e músculo grácil (B) de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). 41
- Figura 12. Expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial cerebral de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). 42
- Figura 13. Expressão gênica dos receptores AT₂ no cérebro de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). 43
- Figura 14. Fotomicrografia de imunohistoquímica e análise quantitativa para os receptores AT₂ no cérebro de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). 44

Figura 15: Esquema representativo do protocolo experimental utilizado para investigação dos efeitos do tratamento com sinvastatina (SINVA) sobre a hiperpermeabilidade microvascular induzida pela bradicinina (BK)	48
Figura 16: Esquema representativo do protocolo experimental utilizado para avaliar o papel da NADPH oxidase na potencialização da permeabilidade causada pela bradicinina induzida pela IL-1 β .	48
Figura 17: Imagens representativas das etapas de isolamento do músculo cremáster.	50
Figura 18: Representação do set experimental de microscopia intravital.	51
Figura 19: Avaliação da permeabilidade de vênulas pós-capilares no músculo cremáster.	54
Figura 20: Curva exponencial representativa utilizada para o cálculo das constantes basal e após a administração de bradicinina usadas o cálculo do coeficiente da permeabilidade microvascular no músculo cremáster.	55
Figura 21: Efeitos do pré-tratamento com sinvastatina (5 mg/kg; i.p.) sobre a permeabilidade microvascular induzida pela bradicinina.	57
Figura 22: (A). Efeitos do pré-tratamento com sinvastatina sobre a hiperpermeabilidade microvascular induzida pela combinação da IL-1 β com a bradicinina.	58
Figura 23: Papel da enzima NADPH oxidase na redução da permeabilidade microvascular mediada pela sinvastatina.	59

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

Ach - Acetilcolina
Akt - Proteína kinase Akt
Ang II - Angiotensina II
APO – Apocinina
AT1R – Receptores de angiotensina II do tipo 1
AT2R - Receptores de angiotensina II do tipo 2
AVC - Acidente vascular cerebral
BK - Bradicinina
CMLV - Células musculares lisas vasculares
DAC - Doença arterial coronariana
DCF - Densidade capilar funcional
ECA - Enzima conversora de angiotensina
eNOS - NO sintase endotelial
ET-1 - Endotelina-1
FITC – Fluoresceína isotiocianato
FPP - Farnesilpirofosfato
GGPP – Geranylgeranylpirofosfato
HMG-CoA - 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA
HO-1 - Hemeoxigenase-1
IL-1 β - Interleucina-1 β
LFA-1 - β 2-integrina function-associated antigen-1
MDA - Malondialdeído
MLC - Cadeias leves de miosina
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO - xido nítrico
NTS - Núcleo do trato solitário
O₂^{·-} - ânion superóxido
ox-LDL-C - LDL oxidado
PAS - Pressão arterial sistólica
PGI₂ – Prostaciclina
PI3K - Fosfatidilinositol-3-kinase
ROCK - Rho Kinase
ROS - Espécies reativas do oxignio

RVS - Resistência vascular sistêmica

SHR - Ratos espontaneamente hipertensos

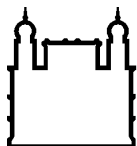
SINVA - Sinvastatina

Snpp - Tin protoporfirina

SRA - Sistema renina-angiotensina

t-PA - Ativador de plasminogênio tecidual

WKY- Wistar



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

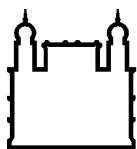
INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS PLEIOTRÓPICOS CARDIOVASCULARES E MICROCIRCULATORIOS DA SINVASTATINA EM UM MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL E HIPERPERMEABILIDADE MICROVASCULAR

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Felipe Santos Simões de Freitas

As estatinas são amplamente utilizadas no tratamento da dislipidemia, que está frequentemente associada com anormalidades cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial. A rarefação microvascular e disfunção endotelial são fatores de risco para a ocorrência de lesões em órgãos-alvo na hipertensão arterial. O objetivo do projeto de tese foi investigar os efeitos agudos da sinvastatina (SINVA) sobre a microcirculação cerebral e função endotelial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e os efeitos do tratamento com sinvastatina em um modelo de hiperpermeabilidade microvascular induzido pela bradicinina. Ratos machos normotensos (WKY) e hipertensos foram divididos em 4 grupos experimentais, e foram tratados por gavagem com salina (WKY-CTL e SHR-CTL) ou sinvastatina 30 mg/kg/dia (WKY+SINVA e SHR+SINVA) durante 3 dias consecutivos. Para investigação dos efeitos do tratamento com sinvastatina (SINVA) sobre a hiperpermeabilidade microvascular induzida pela bradicinina (BK), os ratos foram inicialmente divididos em dois grupos experimentais (n=8), o grupo BK, onde os animais foram administrados com salina e o grupo BK+SINVA, tratados com sinvastatina (5 mg/kg), por via intraperitoneal, 24 horas antes da indução da hiperpermeabilidade vascular utilizando a concentrações crescentes de bradicinina na superfície do músculo cremaster. O tratamento com sinvastatina reduziu a pressão arterial, reverteu a rarefação microvascular funcional cerebral e muscular, além de melhorar a vasodilatação arteriolar dependente de endotélio, acompanhado do aumento na expressão da enzima eNOS, e normalização do fluxo sanguíneo cerebral em ratos hipertensos. Além disso, o tratamento com sinvastatina teve um efeito anti-inflamatório vascular, reduzindo o rolamento e adesão de leucócitos em vênulas cerebrais, diminuiu o estresse oxidativo e aumentou a capacidade antioxidante no músculo e cérebro de ratos hipertensos. Os efeitos cardiovasculares benéficos observados com o tratamento de sinvastatina neste estudo foram completamente independentes dos níveis de colesterol, uma vez que os ratos hipertensos utilizados não apresentam hipercolesterolemia comparado com ratos normotensos, e o tratamento com sinvastatina durante três dias não alterou os níveis séricos de colesterol. Adicionalmente, o tratamento agudo com sinvastatina foi capaz de prevenir o aumento da permeabilidade microvascular induzido pela bradicinina. Os efeitos microcirculatorios e cardiovasculares da sinvastatina observados no presente estudo podem contribuir sobremaneira para a ampliação das indicações terapêuticas dessa classe farmacológica na hipertensão arterial, independente dos níveis de colesterol.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Felipe Santos Simões de Freitas

Statins are widely used in the treatment of dyslipidemia, which is usually associated with cardiovascular abnormalities including hypertension. Microvascular rarefaction and endothelial dysfunction are aggravating factors of hypertensive end-organ damage. Thus, this study was designed to investigate the acute effects of simvastatin (SINVA) on cerebral microcirculation and endothelial function in spontaneously hypertensive rats (SHR) and the simvastatin effects on bradykinin-induced increases in microvascular permeability. Male Wistar normotensive rats (WKY) and SHR were divided into 4 groups of 8 animals each: WKY-CTL and SHR-CTL treated with 0.9% saline solution, and WKY+SINVA e SHR+SINVA treated with SIM 30 mg/kg/day during 3 days by gavage. In order to investigate the effects of simvastatin on microvascular hyperpermeability induced by bradykinin (BK), male rats were divided in two groups, BK group, treated with saline and BK+SINVA group treated with SINVA (5 mg/kg; i.p) 24 hours prior to the induction of microvascular hyperpermeability with rising concentrations of BK on the cremaster muscle surface. Simvastatin treatment reduced blood pressure, reversed functional microvascular rarefaction in the brain and skeletal muscle of hypertensive rats, as well as, improved endothelial-dependent arteriolar vasodilation, followed by an increase on brain eNOS expression and microvascular cerebral blood flow in hypertensive rats. Moreover, simvastatin had an anti-inflammatory effect, reducing leukocyte rolling and adhesion in cerebral microvessels, and reduced oxidative stress in the skeletal muscle and brain of hypertensive rats. The cardiovascular benefits observed with simvastatin treatment in this study, were completely independent of cholesterol levels, as the hypertensive rats did not present hypercholesterolemia compared with normotensive rats, and simvastatin treatment during 3 days did not alter cholesterol levels of any experimental group. Furthermore, acute treatment with simvastatin was able to prevent the bradykinin-induced increase in microvascular permeability. The microcirculatory and cardiovascular effects could turn out to be a new therapeutic approach for improving microcirculatory function in hypertensive patients, independently of cholesterol levels.

CAPÍTULO I

1. Introdução

A hipertensão arterial é uma doença que acomete mais de um quarto da população adulta mundial e mais da metade da população idosa, sendo o principal fator de risco para doenças cerebrovasculares e o segundo fator de risco, para os acidentes vasculares cerebrais (AVC) hemorrágico e isquêmico (1). A hipertensão está, ainda, associada às demais doenças e condições crônicas, tais como doença renal crônica, diabetes, e demência, principalmente em indivíduos idosos. As doenças cardiovasculares, no Brasil, têm gerado elevado número de mortes prematuras, perda de qualidade de vida, alto grau de limitação das pessoas em suas atividades de trabalho e de lazer, além de ocasionar impactos econômicos negativos para as famílias, as comunidades e a sociedade em geral, resultando no agravamento das iniquidades sociais e da pobreza (2).

Nos últimos 50 anos, linhagens de ratos com hipertensão herdada geneticamente foram desenvolvidas. O modelo de hipertensão mais extensivamente estudado provavelmente é o de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Possui especificidade e predisposição genética uniforme (3), permitindo o estudo das causas, mecanismos e fisiopatologia da hipertensão arterial, assim como suas consequências comportamentais. O SHR também é bastante utilizado para a comparação da eficácia de intervenções terapêuticas propostas para o uso clínico de fármacos. Mecanismos neuro-hormonais centrais constituem o principal gatilho no SHR (3) e fornecem um modelo de hipertensão excelente para a investigação de novos mecanismos de ação de fármacos em diferentes estágios da hipertensão arterial, como por exemplo, os efeitos das estatinas independente da redução dos níveis de colesterol.

Desde 1964, o SHR representa um excelente modelo experimental para os estudos da doença cardiovascular hipertensiva (4, 5). Alterações cerebrovasculares relacionadas à longa duração da injúria hipertensiva também foram observadas (6). Estudos mais recentes, usando o SHR como um modelo animal de modificações cerebrais induzidas pela hipertensão, demonstraram claramente que a hipertensão, quando combinada com a idade, altera significativamente a resistência e reatividade cerebrovascular (7). Outros estudos também confirmaram que os SHR poderiam representar um modelo de alteração comportamental adequado para teste de drogas com potencial utilidade terapêutica para o tratamento de distúrbios neurovasculares induzidos pela hipertensão, como o déficit cognitivo (8). Existem evidências clínicas consistentes indicando que pacientes com hipertensão arterial primária apresentam modificações funcionais e estruturais da microcirculação associadas à disfunção endotelial que podem contribuir para o desenvolvimento da disfunção cognitiva (9-11).

Experimentalmente, os SHR apresentam modificações microvasculares semelhantes às descritas na hipertensão arterial humana (12-14).

Logo, os SHR representam um modelo extensivamente investigado para a avaliação dos danos cerebrais e as possibilidades de tratamento. A elevação tempo-dependente da pressão arterial, a ocorrência de atrofia cerebral, perda neuronal, e alterações gliais são fenômenos similares aos presentes nas alterações cerebrais em pacientes hipertensos. A restrição do fluxo sanguíneo cerebral causa alterações na microcirculação do córtex cerebral de acordo com a ordem de ramificação arteriolar (15). As alterações mais evidentes são a obstrução de microvasos e adesão leucocitária capaz de exacerbar a injúria endotelial produzindo espécies reativas de oxigênio, com consequente lesão da barreira hematoencefálica (15). Com isso, o SHR, pode ser considerado um modelo aceitável de injúria cerebral induzida pela hipertensão, que seria possivelmente revertida pelo tratamento apropriado com anti-hipertensivos.

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos de diferentes estatinas na hipertensão arterial (16-18), utilizando diferentes modelos experimentais, incluindo os SHRs (19, 20). Além disso, foi demonstrado que as estatinas são capazes de reduzir a responsividade a vasoconstritores, e a expressão de pequenas GTPases, sugerindo que estes mecanismos poderiam contribuir com as ações anti-hipertensivas das estatinas (21). No entanto, estudos que caracterizem os efeitos microvasculares das estatinas independentes dos níveis de colesterol na hipertensão ainda são escassos.

1.2 Estatinas

As estatinas, inibidores da 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) redutase, são usadas extensivamente no tratamento das dislipidemias, sendo potentes inibidores da biossíntese de colesterol. Atualmente, os efeitos farmacológicos globais observados com as estatinas parecem ser maiores do que aqueles esperados com alterações nos níveis lipídicos, sugerindo que esta classe farmacológica possui benefícios além da diminuição dos níveis de colesterol (22). Na medicina, as estatinas são amplamente utilizadas com o objetivo de reduzir ou normalizar os níveis de colesterol na prevenção primária e secundária de doenças cardiovasculares. De fato, estudos clínicos e experimentais demonstraram que as estatinas são capazes de induzir efeitos farmacológicos favoráveis sobre a função cardiovascular, independente dos efeitos sobre os níveis de colesterol, sendo denominados como efeitos pleiotrópicos (23). Atualmente, as estatinas são uma das classes farmacológicas mais importantes na prevenção do acidente vascular encefálico (AVC) e doença arterial coronariana (DAC) (24), prevenindo eventos isquêmicos através dos seus efeitos vasculares (25-27).

As estatinas, ao inibirem a enzima HMG-CoA redutase, também inibem a síntese do ácido L-mevalônico ou mevalonato, bloqueando a síntese de outros intermediários importantes da via de biossíntese do colesterol, classificados como isoprenóides, tais como o farnesilpirofosfato (FPP) e geranylgeranylpirofosfato (GGPP). Esses intermediários servem como importantes anexos lipídicos, necessários para a modificação pós-traducional de uma variedade de proteínas, e são essenciais para a modulação de diversas vias de sinalização intracelular envolvidas na angiogênese, regulação no óxido nítrico (NO) e no estresse oxidativo (28). Em particular, a inibição dessas proteínas, cuja localização correta na membrana celular e funções dependem da isoprenilação, podem possuir um papel importante na mediação dos efeitos pleiotrópicos das estatinas (29, 30).

A função endotelial representa um importante órgão autócrino e parácrino responsável pela regulação da homeostase vascular (31). Deste modo, a preservação da função endotelial está diretamente relacionada com o equilíbrio entre mediadores vasodilatadores e vasoconstritores, como o NO, prostaciclina (PGI₂) e endotelina-1 (ET-1). Estudos recentes demonstram que as estatinas atuam sobre a função endotelial, aumentando a produção de mediadores vasodilatadores e reduzindo a síntese de moléculas vasoconstritoras (32, 33). Logo, o melhor conhecimento dos efeitos pleiotrópicos atribuídos às estatinas podem contribuir de forma importante para o tratamento de diversas doenças relacionadas às alterações da função endotelial, como na hipertensão arterial.

Existem evidências clínicas consistentes indicando que pacientes com hipertensão arterial primária apresentam modificações funcionais e estruturais da microcirculação associadas à disfunção endotelial (9, 34, 35). Experimentalmente, ratos espontaneamente hipertensos, modelo experimental clássico de hipertensão arterial, apresentam modificações microvasculares semelhantes às aquelas descritas na hipertensão arterial humana (10, 13, 36). No entanto, estudos que caracterizem os efeitos microvasculares das estatinas na hipertensão ainda são escassos. A detecção qualitativa e quantitativa das alterações microcirculatórias na hipertensão é fundamental para acessar o risco cardiovascular e qualidade do tratamento anti-hipertensivo (37). É importante ressaltar que a redução da pressão arterial no paciente hipertenso nem sempre resulta em reversão das alterações microcirculatórias e redução e/ou prevenção das lesões de órgãos-alvo (9). Existem poucos estudos investigando os efeitos microcirculatórios das estatinas independentes dos níveis de colesterol na hipertensão (38). Desta forma, a investigação dos efeitos pleiotrópicos das estatinas sobre a reatividade vascular e microcirculação cerebral e muscular na hipertensão poderá contribuir sobremaneira para a ampliação dos alvos terapêuticos dessa classe farmacológica.

1.2.1 Mecanismo de inibição da biossíntese do colesterol

Colesterol é um componente essencial das membranas celulares e é o precursor imediato dos hormônios esteroides e dos ácidos biliares (39). No entanto, em níveis elevados, o colesterol se torna um importante fator de risco para doenças cardiovasculares, como demonstrado no estudo de Framingham (40, 41) e em outros ensaios clínicos (42, 43). Apesar do colesterol oriundo da dieta contribuir para alterações nos níveis séricos de colesterol, mais de dois terços do colesterol do organismo é sintetizado no fígado. Portanto, a inibição da biossíntese de colesterol é o alvo de escolha para a redução dos níveis séricos de colesterol.

A enzima limitante para a biossíntese do colesterol no fígado é a HMG-CoA redutase que catalisa a conversão de HMG-CoA em ácido mevalônico (44). Os inibidores da HMG-CoA redutase, ou estatinas, foram originalmente identificados como metabólitos secundários de fungos. A HMG-CoA redutase catalisa a etapa limitante da biossíntese de colesterol, uma desacilação redutiva de quatro elétrons da HMG-CoA em CoA e mevalonato (45).

Um dos primeiros inibidores naturais da HMG-CoA redutase foi a mevastatina (compactin, ML-236B), que foi isolada do fungo *Penicillium citrinium* em 1976 (46). Em sua forma ativa, a mevastatina possui semelhança estrutural com o precursor do colesterol, o HMG-CoA. Quando a mevastatina foi testada em ratos, foi capaz de inibir a biossíntese de colesterol com um K_i de 1.4 nM. No entanto, também causou toxicidade hepatocelular

inaceitável e logo seu desenvolvimento clínico foi descontinuado. Posteriormente, um metabólito fúngico mais ativo, a mevastatina ou lovastatina, foi isolado do *Aspergillus terreus* por Alberts e colaboradores em 1980 (45, 47). A lovastatina difere da mevastatina por possuir um grupo metil substituído. Comparada com a mevastatina, a lovastatina foi um inibidor mais potente da HMG-CoA redutase, com uma K_i de 0.6 nM, porém não causou toxicidade hepatocelular quando administrada em ratos. A lovastatina, portanto, se tornou a primeira classe de agente redutores dos níveis de colesterol aprovada para o uso clínico em humanos.

Desde então, algumas novas estatinas, naturais e modificadas quimicamente, tem se tornado comercialmente disponíveis, incluindo a pravastatina, sinvastatina, fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, e mais recentemente a pitavastatina e a rosuvastatina (48). De fato, as estatinas se consolidaram como a classe farmacológica mais efetiva na redução dos níveis séricos de colesterol. As estatinas atuam inibindo reversivelmente a HMG-CoA redutase através das cadeias laterais que se ligam ao sítio ativo da enzima e bloqueiam a transição do estado substrato-produto da enzima (44). Portanto todas as estatinas compartilham um radical similar ao HMG e inibem a HMG-CoA redutase por um mecanismo similar.

As estatinas se ligam a HMG-CoA redutase em concentrações nanomolares, levando a uma deslocação efetiva do substrato natural, HMG-CoA, que se liga a enzima em concentrações micromolares (49). Uma vez que os receptores de LDL-C são os principais responsáveis pela depuração do LDL-C da circulação, a diminuição substancial nos níveis de colesterol é acompanhada por um aumento na atividade dos receptores de LDL-C hepáticos. Logo, as estatinas reduzem efetivamente os níveis séricos de colesterol através de dois mecanismos distintos, inibindo a biossíntese endógena de colesterol via inibição da enzima HMG-CoA redutase e também aumentando a depuração do colesterol, aumentando a atividade dos receptores LDL-C.

O ranking de potência da inibição da HMG-CoA redutase dentre as estatinas de segunda geração é sinvastatina > pravastatina > lovastatina \cong mevastatina, com os valores de IC_{50} teciduais da sinvastatina e mevastatina sendo de aproximadamente 4 nM e 20 nM, respectivamente (50). Os valores de IC_{50} para estas estatinas correspondem a sua potência relativa para a redução dos níveis séricos de colesterol *in vivo* (51). As estatinas diferem na permeabilidade tecidual e metabolismo, logo possuem potências diferentes para a inibição da HMG-CoA redutase extra-hepática. Essas diferenças na permeabilidade tecidual e no metabolismo podem ser responsáveis por algumas das diferenças observadas nos efeitos periféricos das estatinas (52). As estatinas lipofílicas, como a sinvastatina, entram com maior facilidade nas células endoteliais por difusão passiva do que as estatinas hidrofílicas, como a

pravastatina e a rosuvastatina, que tem como o principal alvo o fígado (52). No entanto, estudos em animais e humanos mostraram que a lipofilicidade não prediz completamente a habilidade das estatinas em exercer efeitos extra-hepáticos, e outros fatores não identificados até o momento podem possuir um papel importante na mediação desses efeitos.

1.2.2 Efeitos sobre as proteínas da família Rho

A família Rho GTPase é formada por diferentes subfamílias como a RhoA, Rac1 e Cdc42, sendo todas estas isopreniladas pela geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP). Estas proteínas estão diretamente envolvidas em diferentes funções celulares, sendo cruciais para a motilidade, secreção e proliferação celular (53, 54). Os efeitos biológicos das proteínas RhoA são mediados principalmente pelos seus mediadores subsequentes, como a Rho Kinase (ROCK), que atua no citoesqueleto celular inibindo o sítio de ligação da fosfatase às cadeias leves de miosina (MLC). A inibição desta fosfatase aumenta a fosforilação das MLC aumentando a contratilidade da miosina, levando a instabilidade do citoesqueleto (53, 54). Atividade da ROCK está aumentada em diversos distúrbios cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial (55-57).

Assim, as estatinas através da inibição da isoprenilação da Rho reduzem a ativação da ROCK, regulando parcialmente a contração da musculatura lisa vascular (58). A via Rho/ROCK também pode estar envolvida em diferentes processos fisiopatológicos, como na angiogênese (59), hipertrofia cardíaca (60), fibrose perivascular (61) e hipertensão pulmonar (57). De fato, a utilização de inibidores específicos da ROCK induziram efeitos semelhantes aos das estatinas, sugerindo que diversos efeitos pleiotrópicos das estatinas são devidos a inibição da via Rho/ROCK (62-64).

A Rac está envolvida em duas vias de sinalização importantes: o remodelamento do citoesqueleto e a formação de espécies reativas do oxigênio (ROS). A Rac1, ao se ligar ao GTP e migrar para a membrana celular, também ativa a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase com a subsequente produção de ROS (54, 65, 66). As estatinas ao inibirem a atividade da Rac1, indiretamente inibem a ativação da NADPH oxidase, possuindo um papel antioxidante importante, diminuindo a produção de ROS induzidas pela Angiotensina II (Ang II) e inibindo a hipertrofia de cardiomiócitos (67). Logo a inibição da Rac1 também pode estar envolvida em alguns dos efeitos pleiotrópicos das estatinas.

1.2.3 Efeitos no endotélio vascular

O endotélio vascular funciona como um importante órgão endócrino e parácrino que regula o estado contrátil da parede vascular, além de outras propriedades vasculares. A hipercolesterolemia prejudica a função endotelial, e a disfunção endotelial é uma das manifestações mais precoces da aterosclerose, ocorrendo mesmo na ausência de evidências angiográficas da doença (68)

Uma importante característica da disfunção endotelial é a alteração na síntese, liberação e atividade do NO derivado do endotélio. Tem sido demonstrado que o NO endotelial inibe alguns componentes do processo aterogênico. O NO derivado do endotélio medeia o relaxamento vascular (69), inibe a agregação plaquetária (70), a proliferação do músculo liso vascular (71), e as interações endotélio-leucócito (72, 73). A inativação do NO pelo ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) limita a biodisponibilidade do NO. Foi demonstrado que a aférese aguda de LDL-C plasmático melhora a vasodilatação dependente de endotélio (74), sugerindo que as estatinas poderiam recuperar a função endotelial, em parte, pela redução dos níveis séricos de colesterol. No entanto, as estatinas foram capazes de recuperar a função endotelial antes da diminuição significativa dos níveis séricos de colesterol, sugerindo efeitos adicionais sobre a função endotelial além da redução dos níveis de colesterol (75-77).

De fato, as estatinas aumentam a produção de NO endotelial através da estimulação e supra-regulação da NO sintase endotelial (eNOS) (78, 79). Além disso, tem sido demonstrado que as estatinas recuperam a atividade da eNOS em uma condição de hipóxia (80) e LDL oxidado (ox-LDL-C) (78), condições estas que levam a disfunção endotelial. As estatinas também aumentam a expressão do ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) (81) e inibem a expressão da endotelina-1, um potente vasoconstritor (82). Logo, as estatinas exercem vários efeitos favoráveis sobre o endotélio e atenuam a disfunção endotelial na presença de fatores de risco ateroscleróticos. Apesar dos efeitos das estatinas sobre a isoprenilação da Ras e Rho serem revertidas na presença de FPP e GGPP, respectivamente, os efeitos das estatinas sobre a expressão da eNOS é somente revertido pelo GGPP e não pelo FPP ou LDL-C (83). De fato, a inibição direta da geranylgeranyltransferase ou da RhoA leva a um aumento na expressão na eNOS (84, 85). Esses achados demonstram um efeito das estatinas independente dos níveis de colesterol e sugeriram que a inibição da RhoA pelas estatinas é responsável pelo aumento na expressão de eNOS. De fato, as estatinas supra-regulam a expressão da eNOS através do prolongamento da meia vida do RNAm da eNOS, mas não aumentando a transcrição gênica da enzima (83).

Importantes efeitos adicionais das estatinas sobre a função da eNOS incluem a inibição da caveolina (86, 87). As estatinas também aumentam a atividade da eNOS via ativação pós-traducional da via fosfatidilinositol-3-kinase/proteína kinase Akt (PI3K/Akt) (79). A fosforilação da Akt é um importante evento em várias atividades celulares. De fato, a produção de NO pelo endotélio pode ser regulada pela fosforilação e ativação na eNOS pela Akt, que por sua vez é fosforilada na presença das estatinas (88). A caveolina-1 se liga a eNOS na caveola, regulando negativamente a enzima (89). Foi demonstrado em um estudo *in vitro*, que a exposição de células endoteliais a um soro hipercolesterolêmico causou uma supra-regulação da caveolina-1 e promoveu a associação da caveolina-1 e da eNOS em um complexo inibitório, causando uma redução na produção de NO (90). Tem sido demonstrado que as estatinas reduzem a quantidade de caveolina-1, reduzindo seus efeitos inibitórios sobre a atividade basal e induzida por agonista da eNOS.

Outro mecanismo em potencial pelo qual as estatinas podem melhorar a função endotelial é através das suas ações antioxidantes. As estatinas são capazes de aumentar a vasodilatação dependente de endotélio através da inibição da produção de ROS, como os radicais livres, na aorta de coelhos alimentados com colesterol (91). Apesar da redução nos níveis lipídicos por si só ser capaz de diminuir o estresse oxidativo vascular, alguns desses efeitos antioxidantes das estatinas são independentes dos níveis de colesterol (68). Uma vez que o NO é sequestrado pelas ROS, esses achados mostram que as propriedades antioxidantes das estatinas também podem contribuir para seus efeitos benéficos sobre a função endotelial (68).

1.2.4 Efeitos sobre as células musculares lisas vasculares

A proliferação das células musculares lisas vasculares (CMLV) é uma etapa crucial na fisiopatologia de diversas doenças vasculares proliferativas, incluindo a reestenose pós-angioplastia, a aterosclerose de órgãos transplantados (92). Estudos clínicos demonstraram que as estatinas são capazes de reduzir a proliferação de CMLV em artérias coronárias induzida por citocinas, diminuir a acumulação de leucócitos, promover a apoptose de células endoteliais comprometidas e ainda inibir a proliferação patológica em artérias transplantadas (93). As estatinas inibem a proliferação de CMLV através da inibição da isoprenilação das proteínas Ras e Rho, (94) assim impedindo tanto a continuação do ciclo celular destas células quanto a produção de fatores de crescimento (95). A inibição da geração de ROS pelas estatinas também podem contribuir na inibição da proliferação das CMLV (96).

1.2.5 Efeitos antioxidantes

Os sistemas redox possuem um papel chave na fisiologia cardiovascular. Alterações na homeostasia redox resultam em um desequilíbrio entre a geração de ROS e as defesas endógenas antioxidantes, e tem o potencial de criar um estado de estresse oxidativo que posteriormente desenvolve um papel importante na fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares e metabólicas (97). As estatinas, que são primariamente utilizadas para reduzir os níveis de colesterol, também tem o potencial de reduzir o estresse oxidativo através da modulação dos sistemas redox (97). Estudos *in vitro* e *in vivo* suportam que o estresse oxidativo possui um papel decisivo no desenvolvimento da aterosclerose e das doenças cardiovasculares. As estatinas reduzem o estresse oxidativo bloqueando a geração de ROS e reduzindo a relação NAD⁺/NADH. Também regulam a eNOS, peroxidação lipídica e os níveis de adiponectina. É possível que as propriedades antioxidantes das estatinas contribuam significativamente para seus efeitos cardioprotetores, independente dos efeitos sobre os níveis lipídicos (98).

As estatinas inibem a expressão dos receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT₁R), que posteriormente contribui para a redução da produção de radicais livres derivados do oxigênio e redução da pressão arterial (99-101). As estatinas também diminuem a produção de proteínas pró-inflamatórias, como quimiocinas e citocinas, que contribuem para o estresse oxidativo (102). Além disso, ao inibir a produção de radicais livres as estatinas reduzem os níveis de LDL-colesterol, aumentando a produção de NO e promovendo aumento das defesas antioxidantes (103).

A hemeoxigenase pertence à família das proteínas de choque térmico. É a enzima limitante na reação de oxidação do radical heme em biliverdina e monóxido de carbono (104). A biliverdina é posteriormente metabolizada em bilirrubina, um potente antioxidante (105). A hemeoxigenase-1 (HO-1) é uma importante enzima antioxidante, induzida sob condições de hipóxia (106), estresse oxidativo, dentre outros. A indução da HO-1 está associada com a resposta antioxidante adaptativa celular (107, 108). Um dos principais efeitos pleiotrópicos das estatinas são as propriedades antioxidantes. Diversos estudos têm demonstrado que as estatinas podem aumentar a expressão e atividade da HO-1, o que contribui para efeitos pleiotrópicos vasculares das estatinas. Gonzalez e colaboradores demonstraram, utilizando modelo de trabalho de parto prematuro em camundongos induzido por LPS, que o tratamento com sinvastatina (20 mg/animal; i.p.) 24h antes e duas horas após a administração de LPS, foi capaz de aumentar a expressão e atividade da HO-1 no miométrio e na cérvix das fêmeas, e a co-administração da estatina com um inibidor da HO-1 aboliu os efeitos protetores do

tratamento com estatinas sobre o remodelamento e contrações do miométrio após a administração de LPS, levando ao trabalho de parto prematuro (109). Em um modelo de isquemia-reperfusão de testículos de ratos, a administração de sinvastatina (5 mg/kg; i.p.) 24 horas antes da injúria isquêmica, induziu a expressão da HO-1, 24 e 48 horas após a lesão de isquemia-reperfusão. Novamente, o tratamento concomitante da sinvastatina com o inibidor da HO-1 (Tin protoporfirina; Snpp; 50 mol/kg i.p.) aboliu completamente os efeitos citoprotetores induzidos pela sinvastatina (110).

Também foi demonstrado em modelos de hipertensão pulmonar que o tratamento com sinvastatina durante três dias consecutivos foi capaz de reduzir significativamente a hipertensão pulmonar, a produção de ROS e a hipertrofia ventricular direita, acompanhado do aumento na expressão e atividade da HO-1 pulmonar (111, 112). A HO-1 teve um papel crucial na proteção pulmonar mediada pela sinvastatina, uma vez que quando administrada conjuntamente com o inibidor da HO-1, os efeitos protetores da sinvastatina foram abolidos (111, 112). Outro estudo demonstrou que o pré-tratamento com a cerivastatina reduziu a lesão renal após uma injúria isquêmica, aumentando a expressão da HO-1 nos rins 24 horas após a isquemia-reperfusão (113). Juntos estes estudos sugerem fortemente que diversos efeitos benéficos das estatinas estão diretamente relacionados com o aumento da atividade antioxidante da HO-1 induzida pelas estatinas em diferentes modelos experimentais.

1.2.6 Efeitos na hipertensão arterial

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos de diferentes estatinas na hipertensão arterial (16-18), utilizando diferentes modelos experimentais, incluindo os SHRs (19, 20). Wilson e colaboradores demonstraram que a pravastatina preveniu a hipertensão, reduziu a proteinúria e lesão no glomérulo renal associada a hipertensão (114). Utilizando o SHR, cujos níveis de colesterol não são elevados, foi demonstrado que o tratamento com lovastatina atenuou o desenvolvimento da hipertensão e dano vascular renal (21, 115). Além disso, foi demonstrado que a lovastatina é capaz de reduzir a responsividade a vasoconstritores, e a expressão de pequenas GTPases, sugerindo estes mecanismos poderiam contribuir com as ações anti-hipertensivas da lovastatina (21).

A existência de evidências clínicas da habilidade das estatinas em reduzir a pressão arterial ainda é controversa. Goode e colaboradores foram os primeiros a demonstrar que a redução dos níveis de colesterol em pacientes com hipercolesterolemia estava associada com uma redução clinicamente significativa da pressão arterial diastólica (116). Além disso, estudos clínicos mostraram que o tratamento concomitante com anti-hipertensivos e estatinas

em pacientes com hipertensão e hipercolesterolemia aumentou a eficácia da terapia anti-hipertensiva, independente das ações das estatinas sobre os níveis lipídicos (117, 118) Logo, tem sido demonstrado na hipertensão clínica e experimental que as estatinas possuem um efeito cardioprotetor independente dos níveis de colesterol, acompanhado da redução da pressão arterial. Além disso, evidências experimentais indicam que as estatinas são capazes de reduzir lesões em órgãos-alvo, como coração (119-121), rins (122) e cérebro em modelos animais de hipertensão (123).

As estatinas, assim como fármacos que atuam sobre o sistema renina-angiotensina (SRA), possuem um papel importante na prevenção primária e secundária de eventos cardiovasculares (124, 125). Os fármacos que atuam sobre o SRA têm servido como o pilar da terapia anti-hipertensiva por mais de três décadas. Como descrito anteriormente, diversos estudos têm demonstrado que as estatinas reduzem a pressão arterial (126-128) além de aumentar a eficácia de fármacos anti-hipertensivos (129)

Nesse contexto, tem sido demonstrado que as estatinas reduzem a ação hipertensiva da Ang II (130). Straznicky e colaboradores mostraram que a pravastatina diminui os efeitos pressores da infusão intravenosa de Ang II em pacientes com hipertensão moderada (131). Em um estudo com ratos normotensos Sprague-Dawley, foi demonstrado que o tratamento com sinvastatina inibiu a produção de radicais livres induzida pela Ang II (130). Além disso, foi demonstrado que a atorvastatina e a sinvastatina reduziram a responsividade do músculo liso vascular a Ang II (132).

Evidências adicionais para uma interação entre as estatinas e o SRA foram sugeridas por estudos que mostraram que as estatinas aumentaram o efeito hipotensor de um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) e antagonista dos receptores da Ang II (133). Spósito e colaboradores demonstraram que pacientes recebendo concomitantemente o tratamento com estatinas e um inibidor da ECA apresentaram uma maior queda na pressão arterial do que pacientes tratados apenas com inibidores da ECA (134). De forma similar, em um modelo animal de hipertensão, a sinvastatina administrada junto com o valsartan ou enalapril induziu um efeito sinérgico de redução da pressão arterial (133). Logo, o efeito sinérgico entre as estatinas e fármacos que atuam sobre o SRA pode contribuir para redução da pressão arterial e inibição de diferentes alterações cardiovasculares induzidas na hipertensão arterial.

1.3 Microcirculação

A microcirculação é constituída por vasos com diâmetros menores que 100-150 μm , incluindo as arteríolas, os capilares e as vênulas. Com base na fisiologia dos vasos arteriais, outra definição pode ser proposta, dependendo da resposta do vaso isolado ao aumento da pressão interna. Tal definição deveria incluir as pequenas artérias e arteríolas na microcirculação e estaria de acordo com a recente sugestão que os componentes das pequenas artérias e das arteríolas devem ser considerados em continuidade ao invés de sítios distintos do controle da resistência (11, 136)

A microcirculação é responsável pelo transporte de nutrientes para os tecidos e pela remoção das excretas celulares. As pequenas arteríolas controlam o fluxo sanguíneo para cada área de tecido, e por sua vez, as condições locais dos tecidos controlam o diâmetro das arteríolas. Em geral, cada artéria nutridora que penetra em um órgão se ramifica por seis a oito vezes, antes que se tornem suficientemente pequenas para serem classificadas como arteríolas, as quais geralmente possuem diâmetros internos menores que 20 μm . Essas arteríolas então se ramificam por duas a cinco vezes, alcançando diâmetros de 5 a 9 μm em suas extremidades, onde irão suprir aos capilares (11, 137).

Outra função importante da microcirculação é evitar grandes variações na pressão hidrostática a nível capilar, o que poderia causar distúrbios nas trocas entre capilares e tecidos. Finalmente, é ao nível das arteríolas que ocorre uma queda substancial na pressão hidrostática. Dessa forma, a microcirculação é extremamente importante na regulação da resistência periférica total (11, 136).

Esta propriedade de resistência das pequenas artérias e das arteríolas está intimamente, porém não exclusivamente, relacionada com a prevalência da estimulação simpática nestes vasos (35). O tônus miogênico é uma propriedade intrínseca do músculo liso vascular, que contrai em resposta à tensão na parede do vaso, independente de mediação neuro-humoral (138).

Todas as artérias possuem tônus miogênico e, logo, se contraem em resposta ao aumento da pressão arterial. Quanto menor o calibre do vaso, mais importante é o tônus miogênico (139) e apenas nas pequenas artérias e arteríolas (diâmetros de 15 a 300 μm , dependendo da espécie e do órgão) pode ocorrer diminuição substancial ou até fechamento da luz do vaso em resposta a elevação da pressão transmural (35). O tônus miogênico serve para proteger os capilares contra a hipertensão local deletéria (140, 141). Esta característica leva a um resultado imediato, uma vez que o aumento do tônus miogênico aumenta a resistência arteriolar ao fluxo sanguíneo, causando uma elevação da pressão arterial (35, 142, 143)

1.3.1 Capilares

Os capilares são definidos como vasos que variam de 4 a 12 μm de diâmetro, os quais possuem paredes compostas exclusivamente de células endoteliais mais ou menos fenestradas de acordo com o órgão e a membrana basal. Normalmente, cada célula endotelial, arranjadas na forma de um tubo, compõe um segmento do capilar (144). Os capilares asseguram as trocas de fluidos e metabólitos entre o plasma e os tecidos, uma função que necessita de alta permeabilidade das paredes, com conseqüente alta fragilidade das mesmas. Com exceção de leitos vasculares especializados, tais como o glomérulo renal, a pressão capilar sistêmica normal é relativamente baixa (10 a 30 mmHg) (145). A elevação da pressão capilar sistêmica acima destes níveis pode ocasionar vários efeitos potencialmente deletérios, incluindo edema intersticial, destruição da estrutura da parede capilar e ativação do endotélio microvascular (146).

1.3.2 Rolamento e adesão de leucócitos na microcirculação

As citocinas produzidas localmente como a interleucina-1 β (IL-1 β), causam a ativação de células inflamatórias e também as células endoteliais, induzindo a expressão de moléculas de adesão na superfície celular, responsáveis pela migração celular ao longo da parede endotelial. A primeira etapa do processo de transmigração de leucócitos é o rolamento e ocorre quando leucócitos ativados rolam ao longo da superfície endotelial (147). As selectinas constituem um grupo de glicoproteínas expressas em células endoteliais ativadas (E- e P-selectina), em plaquetas (P-selectina), e nos leucócitos (L-selectina e PSGL-1). As selectinas possuem um importante papel na mediação do rolamento de leucócitos *in vivo* e *in vitro* permitindo as interações reversíveis leucócito-endotélio ou leucócito-leucócito (148). A velocidade do rolamento dos leucócitos é uma etapa crucial para a adesão de leucócitos, sendo que a velocidade de rolamento leucocitário reduz drasticamente antecedendo a adesão (149, 150). Esse processo é dependente da expressão das E-selectinas nas células endoteliais (151) e a expressão das integrinas- β 2 nos leucócitos rolando (149). Quando os leucócitos chegam ao local de inflamação, a firme adesão é mediada pela ativação das integrinas- β 2 (CD11/CD18) que se ligam as respectivas moléculas de adesão intercelular nas células endoteliais (ICAMs) (152). A etapa final, conhecida como transmigração ou diapedese, normalmente ocorre através das junções intercelulares de vênulas pós-capilares.

1.3.3 Hipertensão arterial e alterações microcirculatórias

A hipertensão arterial já foi atribuída a alterações em praticamente todos os parâmetros hemodinâmicos primários envolvidos no controle da pressão arterial (153). No entanto, considera-se atualmente que a elevação crônica da resistência vascular sistêmica (RVS) pode ser considerada como a principal alteração hemodinâmica na hipertensão arterial primária estabelecida (154). Neste contexto, é importante ressaltar que o aumento da resistência vascular na hipertensão arterial é determinado essencialmente na microcirculação (136), resultando tanto de alterações funcionais (modificações da reatividade vascular) quanto estruturais (aumento da secção transversal da parede do vaso) (155-158).

Além disso, estudos de micropunção mostraram que a rede microvascular de hipertensos apresenta uma pressão capilar elevada (159, 160), sendo a pressão venosa normal (161), sugerindo que a resistência vascular capilar ou pós-capilar encontra-se aumentada. Diversos estudos clínicos e experimentais também sugerem que a redução da densidade arteriolar e capilar por volume de tecido (rarefação) contribui de maneira significativa para a elevação da resistência vascular e em consequência da pressão arterial na doença hipertensiva (11, 137, 146). Alterações morfológicas microcirculatórias de pacientes hipertensos também foram demonstradas em território de músculo esquelético (162). Além disso, essas alterações microcirculatórias parecem ser a causa e não a consequência da elevação da pressão arterial (163, 164).

As alterações vasculares determinadas pela hipertensão arterial ocorrem em todos os níveis da circulação, desde as artérias de grosso calibre até a microcirculação. A detecção qualitativa e quantitativa destas mudanças pode oferecer informação preditiva de fundamental importância no acesso do risco cardiovascular e na avaliação da necessidade e da qualidade do tratamento (37). É importante ressaltar que a redução da pressão arterial no paciente hipertenso nem sempre resulta em redução e/ou prevenção das lesões de órgãos-alvo (9, 136, 165) uma vez que nem todos os anti-hipertensivos são capazes de promover a reversão da rarefação microvascular presente nesses pacientes.

Apesar de a rarefação microvascular estar associada principalmente com a hipertensão arterial primária, alguns estudos tem demonstrado ocorrência de rarefação microvascular em modelos animais de hipertensão arterial secundária (166) (167).

1.3.4 SHR como um modelo de disfunção microvascular

A redução na densidade tecidual de microvasos é definida como rarefação

microvascular, e essa condição geralmente ocorre na hipertensão arterial clínica e experimental (11, 136). Sobre condições de repouso homeostático, uma parte considerável dos leitos microcirculatórios dos órgãos e tecidos está fechada, estabelecendo um importante fluxo de reserva fisiológico para adaptações diante de elevações nas necessidades metabólicas.

Essencialmente, a rarefação microvascular pode ser definida como funcional, estrutural, ou ambas (11). A rarefação microvascular funcional é caracterizada por uma redução na perfusão da rede microvascular, apesar de uma densidade tecidual regular de microvasos. A rarefação microvascular estrutural é descrita como uma redução anatômica no número de vasos existentes no leito microvascular e podem ser mensuradas através de quantificação histológica ou *in vivo*, através de um desafio funcional de vasodilatação máxima (13). Os SHR, já apresentam rarefação microvascular com quatro semanas de idade, sendo um modelo importante para investigação da disfunção microcirculatória presente na hipertensão (9, 11, 14, 36, 136, 168-173).

Baseado em estudos clínicos e experimentais, tem sido proposto que a rarefação microvascular sistêmica seria uma disfunção primária na hipertensão primária. A disfunção microcirculatória também pode ser causada como um efeito secundário da elevação da pressão arterial, como evidenciado em modelos de hipertensão arterial secundária, como hipertireoidismo, por exemplo (14, 166, 169, 174, 175). Recentemente, foi demonstrado em nosso laboratório que a rarefação microvascular pode estar envolvida na fisiopatologia das alterações cardíacas induzidas no hipertireoidismo (176, 177).

A íntima relação entre causa e efeito da rarefação microvascular e hipertensão ainda é um tópico controverso. Ainda está em debate se alterações nas forças mecânicas e a elevação na pressão arterial podem sozinhos constituir as causas da rarefação microcirculatória. Interessantemente, em um modelo secundário de hipertensão arterial a rarefação microvascular esteve presente em leitos vasculares de músculos do membro que não foi exposto à pressão arterial elevada, mostrando que a indução da rarefação estrutural foi independente da elevação da pressão arterial (170). No entanto, tem sido demonstrado que é possível prevenir a rarefação microvascular se a pressão arterial é mantida normal, utilizando anti-hipertensivos (178).

A redução na densidade microcirculatória pode ocorrer devido a dois fatores, que podem ser a perda substancial de microvasos ou um déficit de angiogênese. O desenvolvimento da rarefação microvascular nos SHR em diferentes estágios da doença mostram que um fator não-neural, como o tônus miogênico, é o principal responsável pela rarefação funcional em estágios precoces da hipertensão, que é o fechamento temporário dos

microvasos, posteriormente acompanhada da perda anatômica desses microvasos (rarefação estrutural) (13). Além do tônus miogênico, o estresse oxidativo e ativação da NADPH oxidase pela Ang II podem causar o desaparecimento anatômico de microvasos, através de apoptose de células endoteliais no SHR (10). Logo, experimentalmente, os SHR, modelo experimental clássico de hipertensão arterial, apresentam modificações microvasculares análogas às descritas na hipertensão arterial humana.

CAPÍTULO II

2. Regulação da permeabilidade microvascular

O aumento na permeabilidade microvascular e interações leucócito-endotélio são dois parâmetros fundamentais no processo inflamatório, ocorrendo alterações nas barreiras do endotélio vascular assim como a migração de leucócitos circulantes nos tecidos inflamados (179). Respostas inflamatórias envolvem a coordenação da resposta de vasos sanguíneos, leucócitos e componentes plasmáticos, que são ativados por fatores que são produzidos e liberados mediante a um determinado estímulo. A observação de alterações adaptativas na microcirculação leva a caracterização dos sinais cardinais da inflamação como: calor, rubor, edema, dor e perda de função tecidual (180). O aumento da permeabilidade vascular associada ao dano do endotélio é responsável pela ocorrência de edema tecidual, que pode ser dramático em determinados órgãos como o cérebro. Estímulos inflamatórios de curta duração estão associados com o recrutamento e ativação de leucócitos. Além disso, o endotélio pode ser ativado por autacóides locais, como a bradicinina, que medeiam a quebra da barreira célula-célula, aumentando a permeabilidade (181).

2.1 A barreira endotelial

O sangue e os componentes extravasculares estão separados por uma camada plana de células conhecidas como células endoteliais que revestem todo o sistema cardiovascular (182). Devido à estreita ligação entre células endoteliais vizinhas, a membrana basal e a presença de uma camada altamente dinâmica de glicoproteínas luminiais conhecidas como glicocálice, a função primária do endotélio é agir como uma barreira restritiva para macromoléculas no sangue e regular a troca de fluidos entre os compartimentos vascular e extravascular (183). O glicocálice consiste em um agregado carregado negativamente de proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e proteínas plasmáticas que limitam a passagem de macromoléculas ao longo da barreira endotelial (184). A presença do glicocálice na interface entre o sangue e o endotélio, também protege a parede vascular do contato direto com as células sanguíneas e o estresse de cisalhamento (*shear stress*). O glicocálice tem sido implicado na manutenção da integridade endotelial, uma vez que a sua degradação está associada com o dano vascular em diferentes doenças (185, 186).

A membrana basal também contribui para a função da barreira endotelial aumentando a adesão célula-célula através das suas interações com integrinas nas células endoteliais (187). Apesar da contribuição do glicocálice e da membrana basal para a manutenção da barreira

para macromoléculas, as células endoteliais possuem o principal papel no processo de regulação da permeabilidade vascular, podendo contrair reversivelmente durante um estímulo inflamatório, levando a formação de espaços paracelulares, que permitem a passagem de macromoléculas do lúmen para o compartimento extravascular (188).

2.2 Estrutura molecular das junções intercelulares do endotélio vascular

As células endoteliais permitem a passagem seletiva de proteínas plasmáticas, solutos e fluidos dos vasos sanguíneos para o interstício através de vias transcelulares e paracelulares. (189). O conhecimento sobre a composição das vias paracelulares ou junções intercelulares se originaram de estudos em células epiteliais através de microscopia eletrônica (190). Foi demonstrado que as junções intercelulares continham três grupos distintos de proteínas especializadas: junções oclusivas (*tight junctions*), junções aderentes (*adherens junctions*) e os desmossomos. Ao contrário, as células endoteliais não possuem os desmossomos em termos da estrutura das junções intercelulares, sendo menos definidas devido ao entrelaçamento das junções oclusivas com as junções aderentes (191)

Apesar de inicialmente ser especulado que essas junções eram impermeáveis a solutos, posteriormente foi revelado que as junções oclusivas regulam a permeabilidade restringindo a passagem de solutos de acordo com o tamanho e a carga. Em condições normais, cada grupo de proteínas das junções intercelulares interage com as células vizinhas para manter a integridade para barreira endotelial. No entanto, durante processos inflamatórios ocorre a instabilidade das junções intercelulares causando um aumento na permeabilidade vascular. As vênulas pós-capilares apresentam uma permeabilidade particularmente alta durante processos inflamatórios, devido a uma menor organização de suas junções intercelulares (192). Outros estudos demonstram que a integridade da barreira também pode ser regulada por uma via transcelular alternativa (transcitose), para moléculas maiores, como a albumina (193). Tem sido sugerido que a regulação da barreira endotelial e conseqüentemente da permeabilidade vascular ocorre através de uma interação entre essas vias descritas anteriormente (194). Os membros da família da RhoGTPase, Rac-1, Cdc42 e RhoA possuem um papel importante na regulação da permeabilidade vascular (195). A ativação da atividade da proteína *RhoA* leva a um aumento da reorganização do citoesqueleto de actina, resultando na desestabilização das junções aderentes, podendo contribuir para o aumento da permeabilidade microvascular.

2.3 Modelos *ex vivo* de hiperpermeabilidade microvascular

Diversas abordagens experimentais têm sido desenvolvidas para avaliar variações na permeabilidade endotelial em modelos de inflamação e diferentes doenças. Grandes avanços na área foram obtidos com ensaios *in vitro* de monocamadas de células endoteliais, modelos *ex vivo* de vasos isolados (*single vessels*) e microscopia *in vivo* em diferentes leitos vasculares (198-200). Modelos de permeabilidade utilizando células endoteliais oferecem diversas vantagens experimentais, incluindo o acesso direto das células aos fármacos, maior controle do meio, e concentrações das drogas, fornecendo informações valiosas acerca das respostas do endotélio a estímulos inflamatórios e suas interações com macromoléculas (201, 202). No entanto, resultados obtidos a partir desses modelos *in vitro* não são representações acuradas da microcirculação *in vivo*. Por exemplo, células endoteliais aórticas de fetos bovinos possuem uma permeabilidade basal para macromoléculas de 10-100 vezes maior do que vasos intactos (202). Em cultura de células, podem ser observadas regiões de descontinuidade entre as células, o que não acontece em vasos intactos da microvasculatura.

Grande parte dos experimentos de avaliação da permeabilidade vascular *in vivo* é realizada em diferentes espécies. Apesar da variabilidade dos resultados obtidos de espécie para espécie, esses modelos, sem dúvida, forneceram uma importante parte dos eventos que ocorrem em diferentes regiões da microcirculação de diferentes animais. A heterogeneidade de fatores físicos e fisiológicos, como as pressões oncótica e hidrostática, fluxo sanguíneo, e células inflamatórias, podem aumentar a variabilidade da permeabilidade em diferentes partes do sistema circulatório e entre diferentes animais do mesmo grupo experimental. Esses fatores tornam difícil a obtenção do coeficiente exato de permeabilidade em leitos vasculares específicos.

Essas limitações têm sido sobrepujadas em alguns estudos através do estabelecimento de modelos experimentais *ex vivo*, permitindo a mensuração quantitativa do coeficiente de permeabilidade sobre condições controladas de fluxo e pressão, que mimetizam a condição *in vivo* através da perfusão contínua de soluções fisiológicas (203, 204,205).

Smaje e colaboradores demonstraram que os coeficientes de filtração em vênulas mesentéricas eram maiores do que em capilares (206), assumindo que não havia fluxo de proteínas ao longo da parede endotelial durante os experimentos. Michel e colaboradores, a partir do trabalho de Landis, realizaram a canulação de vasos isolados no mesentério de sapos e manipulando a pressão hidrostática durante a oclusão, calcularam a condutância hidráulica (coeficiente de filtração) e o coeficiente de reflexão (207). Eles demonstraram que o coeficiente de reflexão com a albumina e pequenas proteínas, como a mioglobina foram

constantes mesmo com variações de até 10 vezes no coeficiente de filtração quando comparados vasos diferentes. Experimentos com a oclusão única de microvasos foram importantes na caracterização de importantes via de sinalização de diferentes mediadores inflamatórios envolvidos na alteração da permeabilidade vascular, incluindo a resposta mediada pela bradicinina dependente da geração de ROS e ativação da guanilato ciclase (208).

O músculo cremáster é comumente utilizado em estudos de microscopia intravital e de permeabilidade vascular, sendo um excelente leito microvascular para estudos de dose-resposta. Em ratos, a microcirculação é bem desenvolvida, facilitando a transiluminação e avaliação da permeabilidade vascular, além de ser acessada de uma forma relativamente prática. Além disso, ao contrário de outros leitos vasculares, a microcirculação do músculo cremáster é desprovida de gordura tecidual, facilitando a visualização e administração local de drogas (221). Outro ponto importante, é que o músculo cremáster apresenta uma boa representação dos efeitos que podem ser observados em outros músculos esqueléticos.

2.4 Efeitos vasculares da bradicinina

A bradicinina é uma potente substância vasoativa não-peptídica, sintetizada endogenamente através da clivagem proteolítica do cininogênio pela calicreína em locais de dano tecidual e inflamação (209, 210). A bradicinina em condições inflamatórias contribui para a vasodilatação local (211), aumento na permeabilidade (212), dor (213) e contrações do músculo liso (214). O aumento na permeabilidade induzido pela bradicinina ocorre principalmente através da ativação dos receptores B2 nas células endoteliais, ativando a via clássica dos receptores acoplados a proteína-G. Uma vez ativados os receptores de bradicinina ativam a fosfolipase C via $G\alpha_q$ aumentando a concentração intracelular de Ca^{2+} (215).

Diversos estudos em roedores demonstraram que a bradicinina é capaz de induzir um aumento dose-dependente na permeabilidade vascular em diferentes órgãos, como cérebro (216), retina (205), músculo cremáster (217) e mesentério (218). Em um estudo *in vitro* foi demonstrado que o aumento na permeabilidade vascular induzido pela bradicinina é dependente da produção de ROS (219). Estudos *in vivo*, utilizando inibidores de ROS confirmaram esses achados e demonstraram que a geração de superóxido contribuiu para a vasodilatação (220) e aumento da permeabilidade microvascular (216) após a aplicação de bradicinina. Logo, o aumento na permeabilidade microvascular induzido pela bradicinina está

diretamente relacionado com a produção de radicais livres após a ativação dos receptores de bradicinina.

Os efeitos da bradicinina sobre a permeabilidade microvascular no músculo cremáster foram descritos por Boric e colaboradores (217). Foi observado que a aplicação tópica de bradicinina induziu um aumento dose-dependente na permeabilidade vascular. Nesse contexto, o modelo de hiperpermeabilidade induzido pela bradicinina é excelente para mimetizar processos inflamatórios, onde a bradicinina pode ter um papel importante, como o angioedema hereditário, artrite reumatoide e asma.

Etapa I

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Investigar os efeitos da sinvastatina sobre a disfunção endotelial microvascular em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), e os possíveis mecanismos moleculares envolvidos nas ações pleiotrópicas microvasculares das estatinas.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos do tratamento de SHR com sinvastatina sobre:
 1. Pressão arterial
 2. Densidade capilar funcional no músculo grácil e cérebro.
 3. Rolamento e adesão de leucócitos em vênulas cerebrais.
 4. Reatividade vascular dependente de endotélio em arteríolas cerebrais.
 5. Fluxo sanguíneo cerebral basal.
 6. Alterações no fluxo sanguíneo cerebral em resposta a administração local de Acetilcolina.
 7. Alterações no fluxo sanguíneo cerebral em resposta a administração local de Ang II.
 8. Estresse oxidativo e potencial antioxidante cerebral e muscular.
 9. Expressão gênica da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) cerebral.
 10. Expressão receptores AT₂ da Ang II no cérebro.

4. Materiais e Métodos

4.1 Animais

Todos os procedimentos previstos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (LW-48/12). Ratos Wistar (WKY) e ratos hipertensos SHR machos pesando de 200 a 250 g foram divididos em grupos de oito animais cada, os ratos WKY (WKY-CTL) e SHR (SHR-CTL) do grupo controle receberam água destilada. Os ratos SHR receberam sinvastatina 30 mg/kg/dia (SHR+SINVA). Os ratos WKY também foram tratados com sinvastatina 30 mg/kg/dia (WKY + SINVA). Todos os animais foram tratados por gavagem durante três dias consecutivos.

4.2 Medidas Hemodinâmicas

As medidas de pressão arterial sistólica (PAS) foram realizadas com os animais conscientes através de um sistema computadorizado de pletismografia caudal (BP-2000, Visitech blood pressure analysis system, USA), considerado um método de aferição indireta. Os animais foram adaptados por três dias consecutivos ao aparelho na semana anterior ao início do protocolo experimental. Após o início do protocolo experimental, a PAS foi aferida diariamente, onde foram feitas 10 aquisições individuais por animal, e posteriormente calculadas a média destas medidas.

4.3 Microscopia intravital por epi-iluminação e fluorescência

Para a realização dos procedimentos de microscopia intravital, os animais foram anestesiados com mistura de quetamina (100mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Para avaliação da microcirculação do músculo esquelético, foi realizada uma incisão medial na pele da pata esquerda, assim como na fáscia ventral da coxa, permitindo a visualização do músculo grácil. O animal foi então posicionado de uma forma que o músculo ficasse sob o microscópio e permanecesse sob o feixe de luz. Posteriormente os animais foram submetidos a uma incisão, com auxílio de um bisturi, na pele da cabeça para exposição da calota craniana e exposição da microcirculação cerebral.

Foram avaliados a da densidade capilar funcional (DCF) cerebral e muscular, reatividade vascular dependente de endotélio em resposta à acetilcolina administrada na janela craniana (Ach) e o rolamento e adesão de leucócitos em vênulas cerebrais através de

videomicroscopia intravital por epi-iluminação e fluorescência. Utilizou-se um microscópio intravital de base fixa (Olympus BX51/WI, USA) acoplado a um sistema de câmera de vídeo digital (Optronics, Goleta, CA, USA). Foi utilizada a objetiva Olympus 10x nos experimentos produzindo um aumento final de 100x no monitor. Após a injeção i.v. de 0,15 ml de fluoresceína-isotiocianato (FITC) – dextran a 5% (peso molecular 150.000), as imagens da microcirculação foram obtidas sucessivamente para contagem em tempo real dos capilares, através do *software* Saisam 5.1.3 (Microvision, France).

Foram selecionadas imagens com oculares de 10 x e objetivas de 10 x, com duração de 1 min para cada campo e calculadas por número de capilares por mm². Somente foram mensurados os capilares perfundidos continuamente, para avaliação da densidade capilar funcional. Após obter-se aleatoriamente um campo microscópico, foi delimitado um campo equivalente a 1 mm² e, nesta área, foram contados todos os capilares espontaneamente perfundidos durante 4 minutos. Foram considerados capilares perfundidos somente os vasos que permitiram o fluxo contínuo e unitário de hemácias pelo vaso. Além disso, toda vez que ocorresse a ramificação de um capilar, os vasos oriundos dessa ramificação foram considerados como novos capilares. O valor total de capilares contados foi considerado como sendo a densidade capilar funcional.

Durante o procedimento de microscopia intravital também foi realizada a avaliação *in vivo* da reatividade vascular dependente de endotélio em resposta à acetilcolina 1μM, a resposta vasodilatadora será avaliada em arteríolas cerebrais após a mensuração da DCF e da interação leucócito-endotélio. A janela craniana foi superfundida com Ach durante 5 min e os diâmetros arteriolares foram medidos antes e após a superfusão com o auxílio do software Cell Sens Standart 1.9. (Olympus, Nova Iorque, USA). As respostas vasculares foram expressas em porcentagem de variação (%) a partir das medidas basais.

A marcação dos leucócitos circulantes, foi realizada através da administração intravenosa de 0,3 mg/kg de rodamina 6G e os leucócitos com a fluorescência associada foram visualizados. A interação leucócito-endotélio foi avaliada determinando o número de leucócitos aderidos à parede venular por um período de 30 segundos. O rolamento de leucócitos foi definido quando células brancas se moverem dentro do vaso em velocidade inferior aos eritrócitos circulantes. Foram analisados vasos da membrana pia mater com diâmetros variando de 50 a 120 μm e a adesão leucocitária foi expressa em número de células/min.

4.4 Avaliação do fluxo sanguíneo cerebral

O fluxo sanguíneo cerebral foi mensurado através de um aparelho de fluxometria microvascular à laser com contraste de imagem (*Laser Speckle Contrast Imaging*, PeriCam PSI System, Perimed, Suécia) que constitui uma técnica óptica para o monitoramento do fluxo sanguíneo microvascular, em tempo real (Figura 1). Para esta análise foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico descrito no procedimento anterior, para a microscopia intravital. Em seguida os animais foram mantidos em uma superfície estável, em uma sala com temperatura estável a 25°C e colocados sob um sistema de luz laser com contraste de imagem com comprimento de onda de 785 nm para medida contínua da perfusão sanguínea tecidual em tempo real. Foram realizadas 16 imagens/seg. As imagens foram analisadas utilizando o software do fabricante (PeriCam PSI System, Perimed, Suécia) e expressas em unidades arbitrárias.

Para investigação do papel dos receptores AT₂ nas alterações no fluxo sanguíneo cerebral induzidas após a administração local de Ang II na janela craniana, foram realizadas a aferição do fluxo sanguíneo cerebral basal (5 minutos) nos diferentes grupos experimentais, com posterior superfusão da Ang II (1µM) na janela craniana por 5 minutos, e aferição do fluxo após a administração local de Ang II.

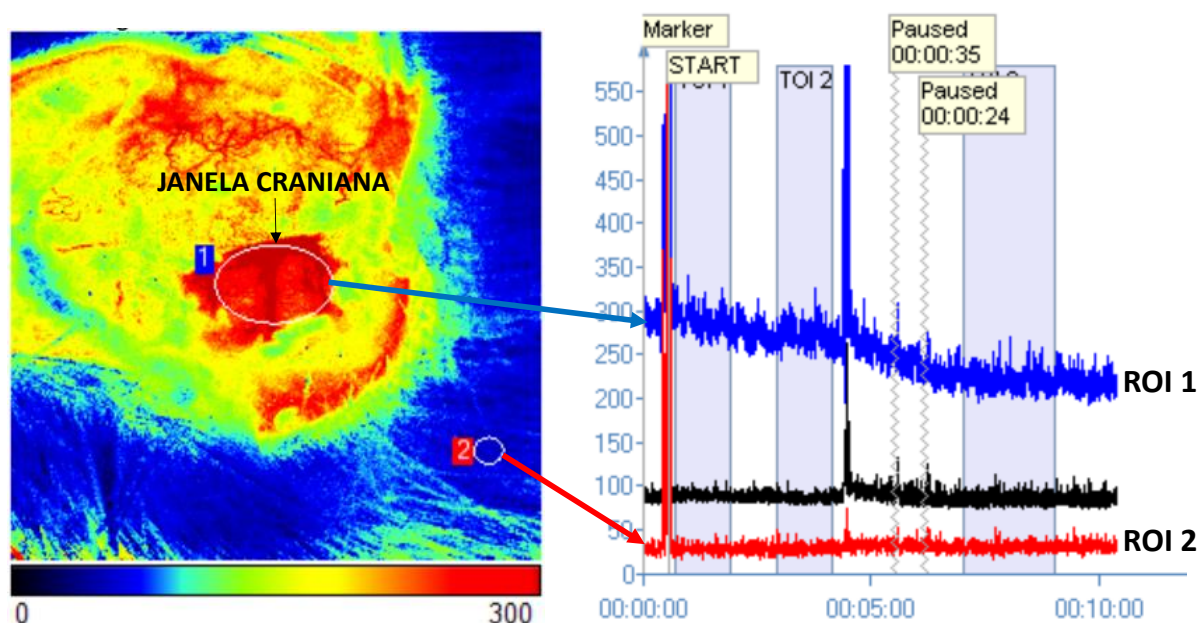


Figura 1: Imagens representativas da avaliação do fluxo sanguíneo cerebral mensurado através de um aparelho de fluxometria microvascular à laser com contraste de imagem (*Laser Speckle Contrast Imaging*, PeriCam PSI System, Perimed, Suécia). A seta azul indica a área de interesse avaliada durante o experimento (ROI 1 córtex cerebral). A seta vermelha indica a região sem fluxo sanguíneo utilizada para avaliação e controle de movimentos ao longo do

experimento (ROI 2).

4.5 Avaliação do estresse oxidativo e potencial antioxidante

A avaliação do estresse oxidativo foi realizada de forma indireta através da mensuração dos níveis de peroxidação lipídica pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As análises foram feitas no cérebro e músculo esquelético dos grupos experimentais. Os tecidos foram homogeneizados em PBS e BHT 0,2% (2,6-di-tert-butyl-4 methylphenol). Posteriormente 0,5 ml das amostras homogeneizadas foram misturados com 0,5 ml do ácido tiobarbitúrico 0,67% (Sigma Chemical, USA) e aquecidas a 96°C durante 30 minutos. Este método se baseia na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malondialdeído (MDA), produzindo um complexo de coloração rósea que foi quantificado em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 535nm.

As ações antioxidantes da sinvastatina foram avaliadas através dos níveis de tiol cerebral e muscular. Para avaliação dos níveis de tióis, as amostras foram precipitadas com TCA 10%, centrifugadas e posteriormente o sobrenadante foi misturado com DTNB (5,5 99-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid - 1,7 M) e tampão Tris-HCl contendo EDTA 3mM, pH 8,9. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

4.6 Avaliação da expressão gênica da eNOS e dos receptores AT₂ através de PCR.

Para extração de RNA das amostras o Kit Trizol Reagent (Life Technologies) foi utilizado. O RNA total, 1 mg de RNA total e oligo dT, foi convertido a cDNA utilizando a transcriptase reversa do Kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). As sequências dos primers foram escolhidas utilizando o banco de dados NCBI/Nucleotide bank. A reação foi realizada em um termociclador utilizando 35 ciclos utilizando o kit Platinum PCR SuperMix (Life Technologies). Após a etapa de desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos cada ciclo foi iniciado, sendo a etapa de desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, e alongamento 72 °C por 30 segundos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida 6% e coração com corante de prata. A quantidade relativa dos alvos será normalizada utilizando a GAPDH como controle interno. As imagens foram capturadas e analisadas pelo software Image J (National Institute of Health).

4.7 Análises histológicas

Inicialmente, foi realizada a hidratação dos tecidos. Para tal as lâminas foram colocadas em um suporte e deixadas em estufa a 60° C por 1 hora ou até que a parafina derretesse. As lâminas foram retiradas da estufa e mergulhadas na solução de Xilol 1 por 5 minutos, e depois no Xilol 2 por 5 minutos. Posteriormente foram colocadas em concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70 %) por 3 minutos, respectivamente. As lâminas foram colocadas em água corrente durante 10 minutos e depois foram secas com uma gaze

4.7.1 Expressão proteica dos receptores AT₂ cerebrais através imunohistoquímica

As amostras do córtex cerebral dos ratos foram processadas como descrito anteriormente e posteriormente foram colocadas em uréia 3M, (em temperatura ambiente) na superfície a ser analisada. A uréia foi desprezada e recolocada no material por 15 minutos. As lâminas foram lavadas com TBS pH 7,6 por 3 vezes, sendo a última lavagem por 10 minutos. Posteriormente foram colocadas em H₂O₂ a 3% em metanol por 10 minutos, com o objetivo de consumir peroxidases endógenas e depois foram lavadas novamente 2 vezes com TBS por 5 minutos. Um bloqueio foi realizado por 3 horas com solução de leite 1%, BSA 2,5% e soro fetal bovino 8% em PBS, para inibir a ligação do anticorpo primário com antígenos inespecíficos.

Após as 3 horas, a solução de bloqueio foi descartada e as lâminas foram incubadas overnight com anticorpo primário anti-receptor AT₂ feito em coelhos (Santa Cruz Biotechnology, Inc), (diluído em Tris-HCl 0,05M pH 7,6 com BSA 1% overnight a 4°C). Em seguida, as lâminas foram lavadas 2 vezes com TBS por 10 minutos e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit também diluído em Tris-HCl 0,05M pH 7,6 por 2,5 horas. Posteriormente, foram lavadas com TBS por 10 minutos e incubadas com solução de AEC por 15 a 25 minutos para a revelação. Após a incubação com AEC, as lâminas foram lavadas abundantemente com água corrente por 5 minutos e depois contra-coradas com hematoxilina de Mayer por 10 segundos.

Posteriormente as lamínas foram lavadas em água corrente e as lamínulas foram colocadas para visualização das lâminas em microscópio óptico Olympus BX-50 e as imagens foram capturadas com um aumento de 400X, com a câmera digital Olympus UC30, e o software Image Pro-Plus® versão 6.3. A quantificação de pixels presentes em cada imagem foi realizada, afim de calcular de forma indireta a expressão dos receptores AT₂ nas amostras.

4.8 Mensuração dos níveis séricos de colesterol total

A determinação dos níveis séricos de colesterol total dos grupos experimentais foi realizada por meio do método da colesterol-oxidase e analisada por fotometria, através do sistema Accutrend Colesterol® (Roche Diagnostics).

4.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como sendo a média \pm erro padrão da média (EPM) para cada grupo e comparações entre grupos diferentes foram feitas através da análise de variância (One way-ANOVA). Em seguida, foi realizado o teste de comparação múltipla de Bonferroni. Em todos os testes, o grau mínimo de significância considerado foi de 95% ($P < 0,05$). Todos os cálculos foram realizados por análises informatizadas através do programa estatístico comercialmente disponível (Graphpad Prism, versão 5.0, San Diego, CA, USA).

5. Resultados

5.1 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre a pressão arterial sistólica

A administração de sinvastatina durante 3 dias consecutivos foi capaz de diminuir a PAS de ratos hipertensos (SHR+SINVA 170 ± 4 mmHg, $p < 0.001$) comparado com ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL 202 ± 3 mmHg), no entanto não alterou a PAS de ratos normotensos quando comparado com ratos normotensos não tratados (WKY-CTL 123 ± 3 vs. WKY+SINVA 119 ± 4 mmHg; Figura 2).

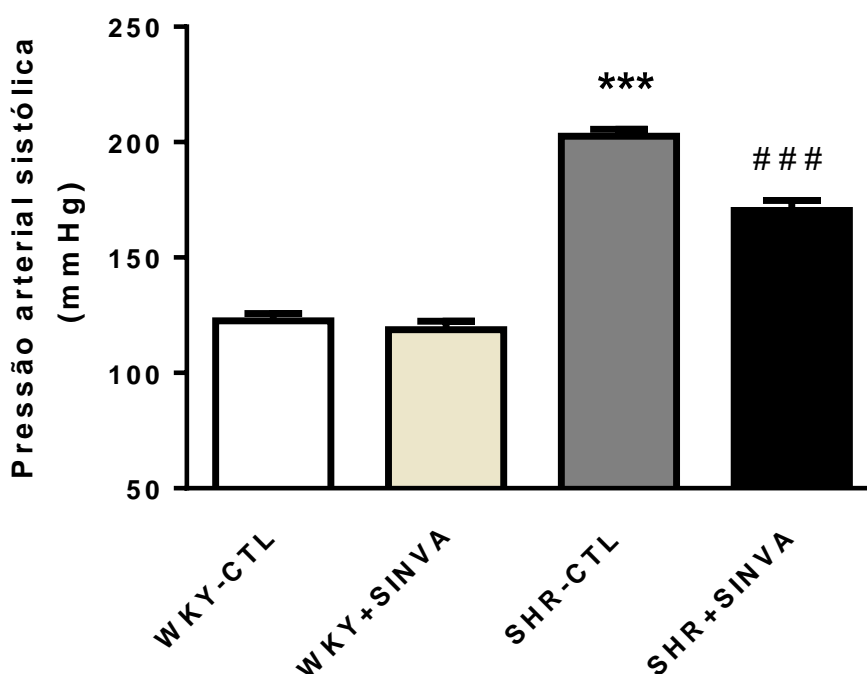


Figura 2: Medida da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). Os valores representam a média \pm erro padrão da média; $n=8$. *** $p < 0,001$ vs. WKY-CTL e WKY+SINVA; ### $p < 0,001$ vs. SHR-CTL.

5.2 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre a densidade capilar funcional no músculo grácil

Ratos hipertensos apresentaram uma diminuição significativa na DCF no músculo grácil quando comparados com ratos normotensos (SHR-CTL 210 ± 17 vs. WKY-CTL 338 ± 16 capilares/mm², $p < 0,01$). O tratamento com sinvastatina (SHR+SINVA 447 ± 20 capilares/mm², $p < 0,001$) foi capaz de aumentar significativamente a DCF no músculo esquelético comparado com ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL 210 ± 17 capilares/mm²). Em contraste, o tratamento com sinvastatina não modificou a DCF em ratos normotensos (WKY+SINV 315 ± 16 capilares/mm²; Figura 3).

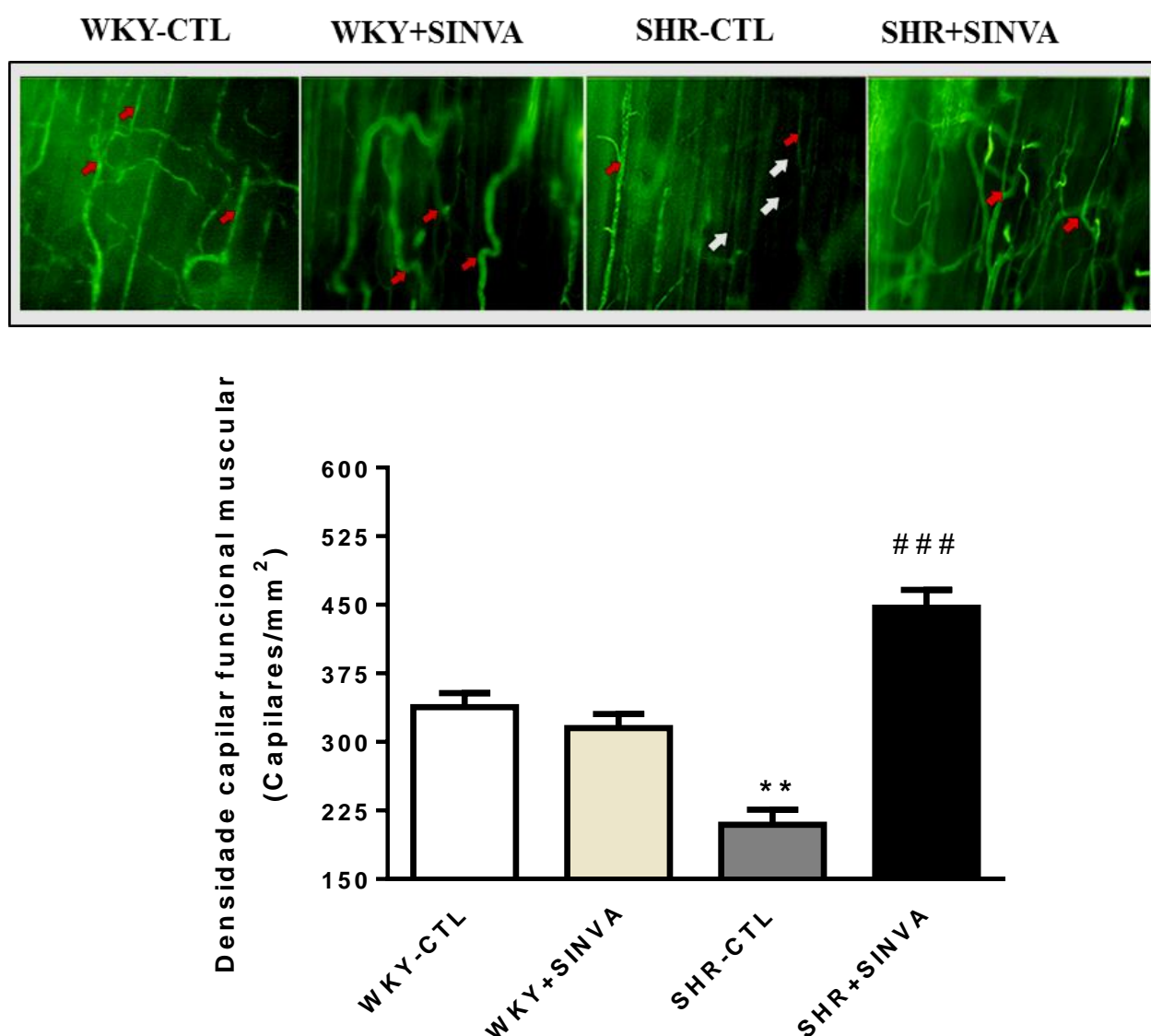


Figura 3: Densidade capilar funcional no músculo esquelético (músculo grácil) de ratos de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina

(WKY+SINVA). As setas vermelhas indicam os capilares perfundidos e as setas brancas as regiões não-perfundidas no momento da captura das fotomicrografias representativas durante a videomicroscopia intravital de fluorescência. Os valores representam a média \pm erro padrão da média; $n=8$. ** $p < 0,01$ vs. WKY-CTL e WKY+SINVA; ### $p < 0,001$ vs. SHR-CTL.

5.3 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre a densidade capilar funcional cerebral

O tratamento de ratos hipertensos com sinvastatina (SHR+SINVA 549 ± 26 capilares/ mm^2 , $p < 0.01$) durante três dias foi capaz de aumentar a DCF cerebral quando comparado com ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL 337 ± 61 capilares/ mm^2). A administração de sinvastatina não alterou a DCF em ratos normotensos (WKY-CTL 421 ± 35 vs. WKY+SINVA 383 ± 16 capilares/ mm^2 ; Figura 4).

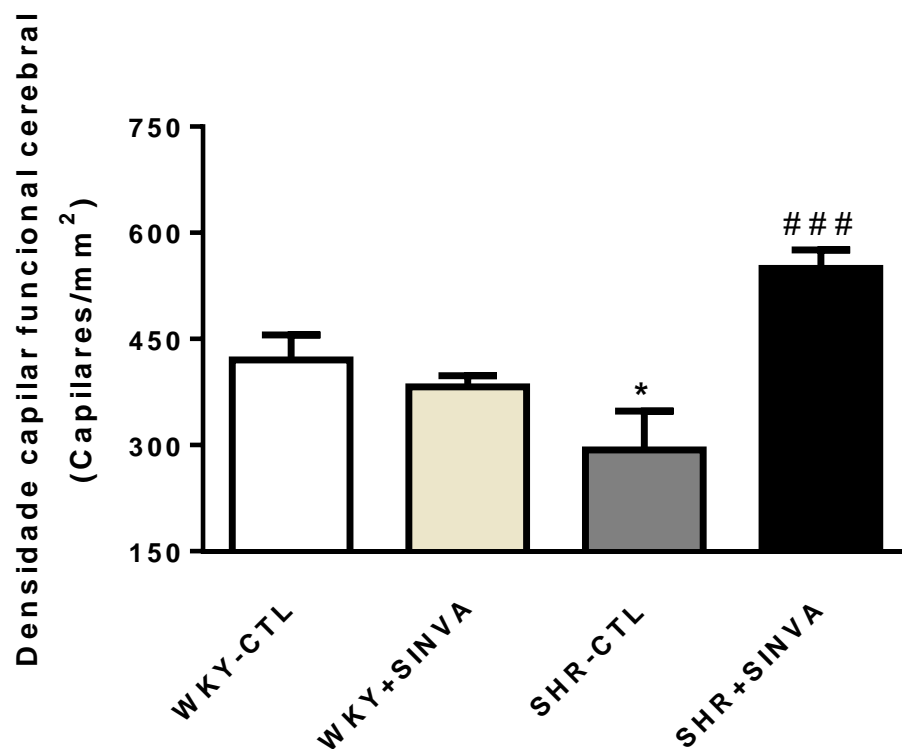
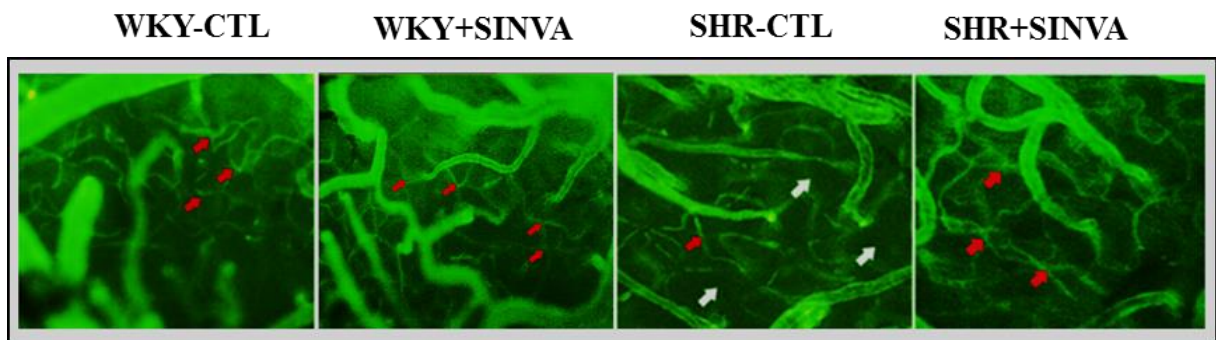


Figura 4. Densidade capilar funcional cerebral de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). As setas vermelhas indicam os capilares perfundidos e as setas brancas as regiões não-perfundidas no momento da captura das fotomicrografias representativas durante a videomicroscopia intravital de fluorescência. Os valores representam a média \pm erro padrão da média; n=8. * $p < 0.05$ vs. WKY-CTL; ### $p < 0.001$ vs. SHR-CTL. Indicar o que significam as setas vermelhas e brancas

5.4 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre o rolamento e adesão de leucócitos em vênulas cerebrais

Como observado na figura 5A, o rolamento de leucócitos foi significativamente maior em ratos hipertensos quando comparados com ratos normotensos (SHR-CTL 6.2 ± 0.7 vs. WKY 2.7 ± 0.6 leucócitos/min; $p < 0.05$), e o tratamento de três dias com sinvastatina (SHR+SINVA 2.8 ± 0.6 leucócitos/min; $p < 0.01$) reduziu o rolamento de leucócitos quando comparado com ratos hipertensos não tratados. A administração de sinvastatina reduziu o rolamento de leucócitos em ratos normotensos (WKY+SINVA 0.5 ± 0.3 leucócitos/min; $p < 0.05$) comparado com ratos normotensos não tratados. Além disso, o tratamento com sinvastatina também diminuiu a adesão de leucócitos à parede venular comparados com ratos hipertensos não tratados (Figura 5B; $p < 0.05$). A administração de sinvastatina não alterou a adesão de leucócitos quando comparados com ratos normotensos não tratados ($p > 0.05$).

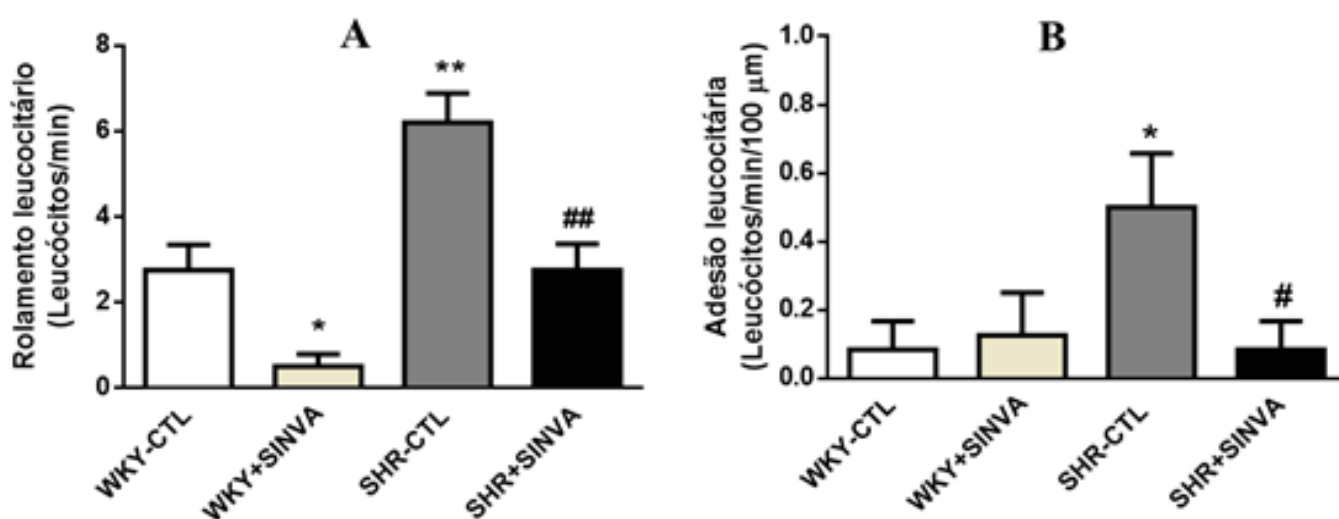
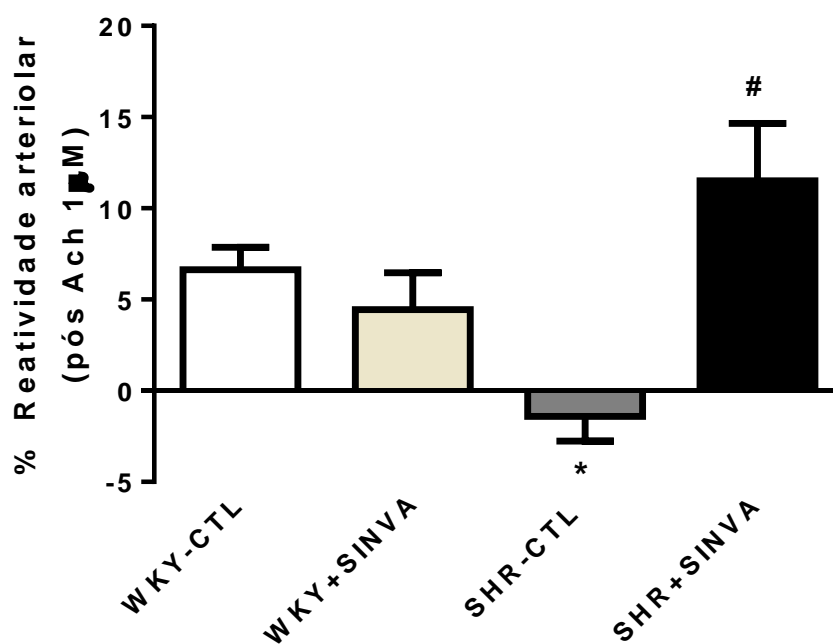


Figura 5: (A) Rolamento e (B) adesão de leucócitos na parede venular de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos

normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINV). Os valores representam a média \pm erro padrão da média; n=8. * $p < 0.05$ vs. WKY-CTL; ** $p < 0.01$ vs. WKY-CTL e WKY+SINVA; ## $p < 0.01$ vs. SHR-CTL; # $p < 0.05$ vs. SHR-CTL.

5.5 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre reatividade vascular dependente de endotélio em arteríolas cerebrais

Na avaliação *in vivo* da reatividade vascular dependente de endotélio, ratos hipertensos apresentaram uma diminuição no percentual de dilatação arteriolar cerebral em resposta à administração local de acetilcolina comparada com ratos normotensos (SHR-CTL - 1.4 ± 1.3 vs. WKY-CTL $+6.6 \pm 1.2$ %, $p < 0.05$). O tratamento agudo com sinvastatina (SHR+SINV $+11.5 \pm 3.1$ %; $p < 0.05$) aumentou o percentual de dilatação arteriolar em resposta à acetilcolina quando comparados com ratos hipertensos não tratados. A administração de sinvastatina não alterou o percentual de dilatação arteriolar quando comparados com ratos normotensos não tratados ($p > 0.05$; Figura 6).



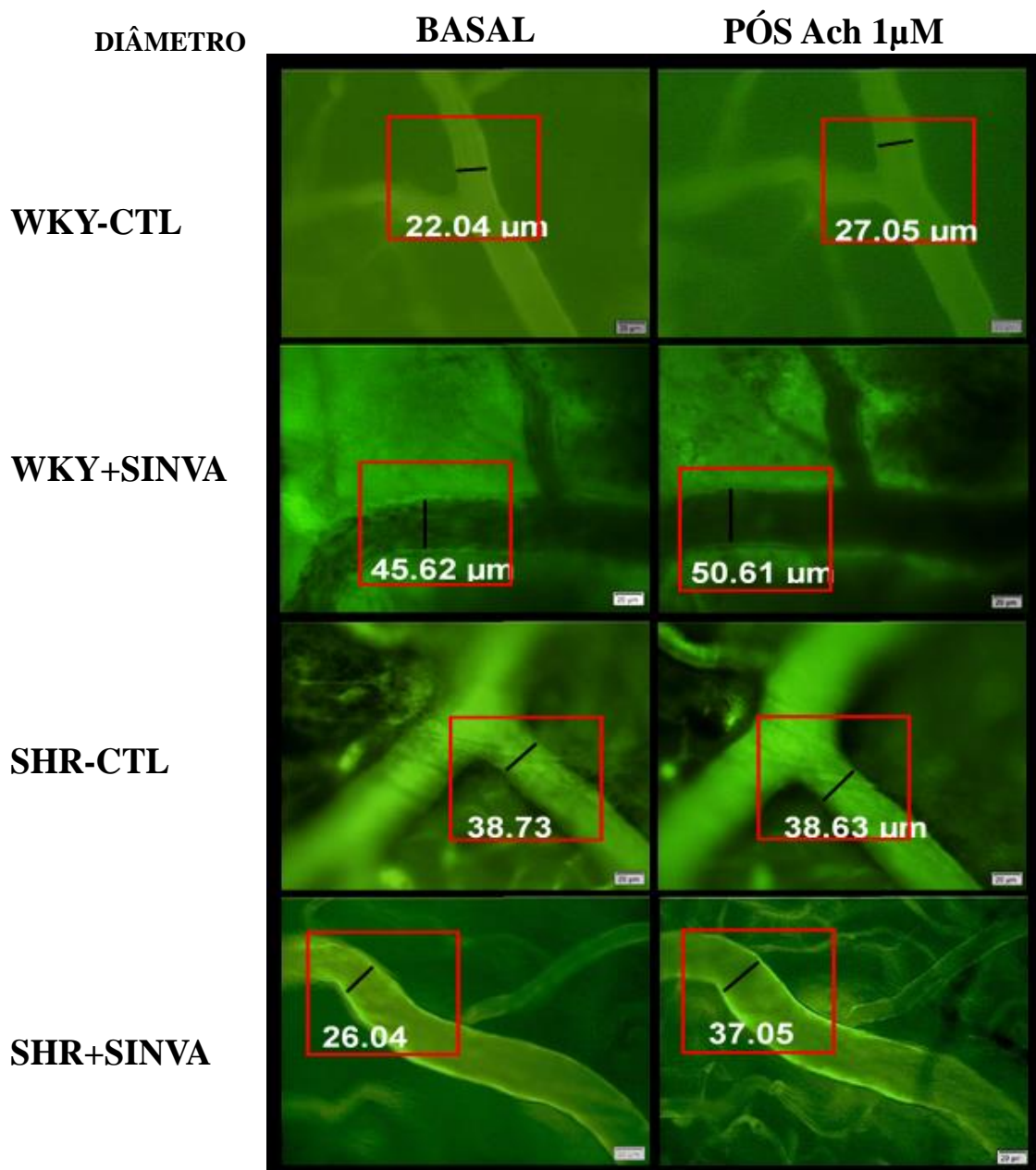


Figura 6: Percentual de reatividade arteriolar cerebral em resposta à administração local de acetilcolina (1 μ m) em ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). Os valores representam a média \pm erro padrão da média; n=8. * $p < 0.05$ vs. WKY-CTL e WKY+SINVA; # $p < 0.05$ vs. SHR-CTL.

5.6 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre o fluxo sanguíneo microvascular cerebral basal

Ratos hipertensos apresentaram uma diminuição significativa do fluxo sanguíneo microvascular cerebral quando comparado com ratos normotensos (Figura 7; $p < 0.05$). O tratamento de ratos hipertensos com sinvastatina durante três dias foi capaz de normalizar o fluxo sanguíneo microvascular cerebral quando comparado com ratos hipertensos não tratados (Figura 7; $p < 0.05$). A administração de sinvastatina não alterou o fluxo sanguíneo microvascular cerebral em ratos normotensos.

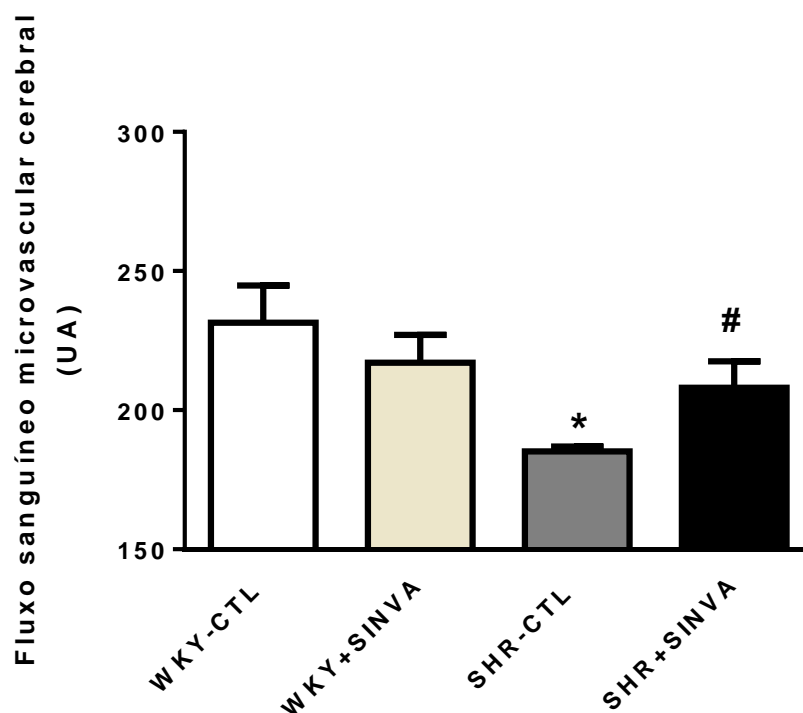


Figura 7: Fluxo sanguíneo microvascular cerebral basal de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). Os valores representam a média \pm erro padrão da média; $n=8$. * $p < 0.05$ vs. WKY-CTL; # $p < 0.05$ vs. SHR-CTL.

5.7 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre as alterações no fluxo sanguíneo microvascular cerebral em resposta a administração local de Acetilcolina

Ratos hipertensos apresentaram uma redução significativa do fluxo sanguíneo microvascular cerebral em resposta à administração local de acetilcolina quando comparados com ratos normotensos (figura 8, $p < 0.05$). Após o tratamento com sinvastatina, o fluxo sanguíneo microvascular cerebral de ratos hipertensos aumentou significativamente em resposta a Ach quando comparados com ratos hipertensos não tratados ($p < 0.05$). A administração de sinvastatina em ratos normotensos não alterou o fluxo sanguíneo microvascular cerebral após a administração local de Ach quando comparado com ratos normotensos não tratados.

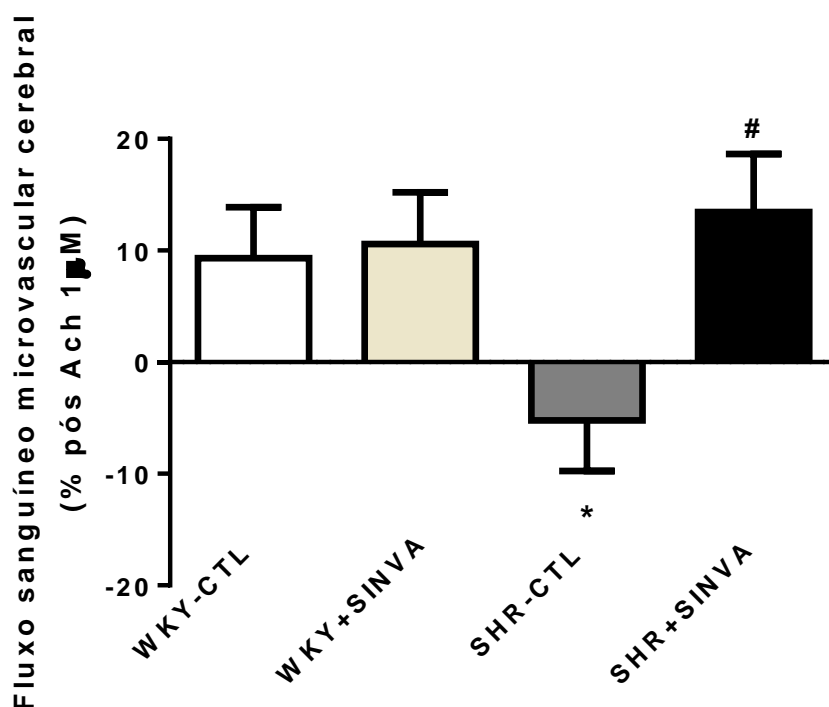


Figura 8: Alterações no fluxo sanguíneo cerebral em resposta a administração local de acetilcolina 1 μM em ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). Os valores representam a média ± erro padrão da média; n=8. * $p < 0.05$ vs. WKY-CTL e WKY+SINVA; # $p < 0.05$ vs. SHR-CTL.

5.8 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre as alterações no fluxo sanguíneo cerebral em resposta a administração local de Ang II

Ratos hipertensos apresentaram uma diminuição significativa do fluxo sanguíneo cerebral após a administração local de Ang II, em contraste o fluxo sanguíneo cerebral de ratos normotensos aumentou em resposta a aplicação tópica de Ang II na janela craniana ($p < 0.0001$). O tratamento de ratos hipertensos com sinvastatina foi capaz de atenuar a redução do fluxo sanguíneo cerebral induzida pela Ang II, quando comparado com ratos hipertensos não tratados ($p < 0.01$; Figura 9).

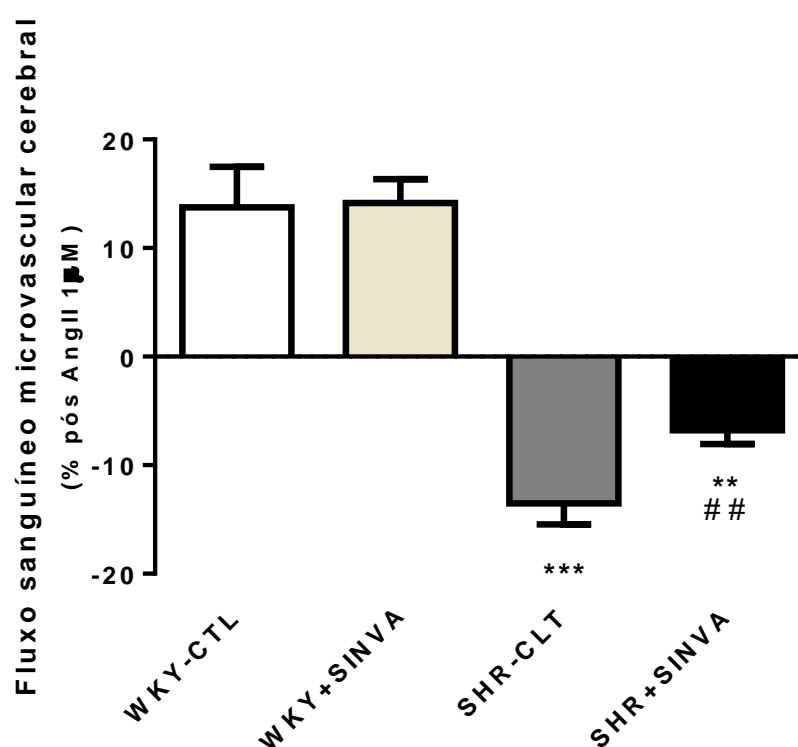


Figura 9. Alterações no fluxo sanguíneo cerebral em resposta a administração local de Ang II 1µm em ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). Os valores representam a média \pm erro padrão da média; $n=5-6$. *** $p < 0.0001$ vs. WKY-CTL e WKY+SINVA; ** $p < 0.001$ vs. WKY-CTL e WKY+SINVA ## $p < 0.01$ vs. SHR-CTL.

5.9 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre o estresse oxidativo cerebral e muscular

Na análise do estresse oxidativo foram observados aumentos significativos nos níveis de MDA no cérebro e músculo grácil de ratos hipertensos quando comparado com ratos normotensos ($p < 0.05$; Figura 10). O tratamento de ratos hipertensos durante três dias com sinvastatina foi capaz de reduzir os níveis de MDA no cérebro e músculo grácil quando comparados com ratos hipertensos não tratados ($p < 0.05$). A administração de sinvastatina não alterou os níveis de MDA em ratos normotensos.

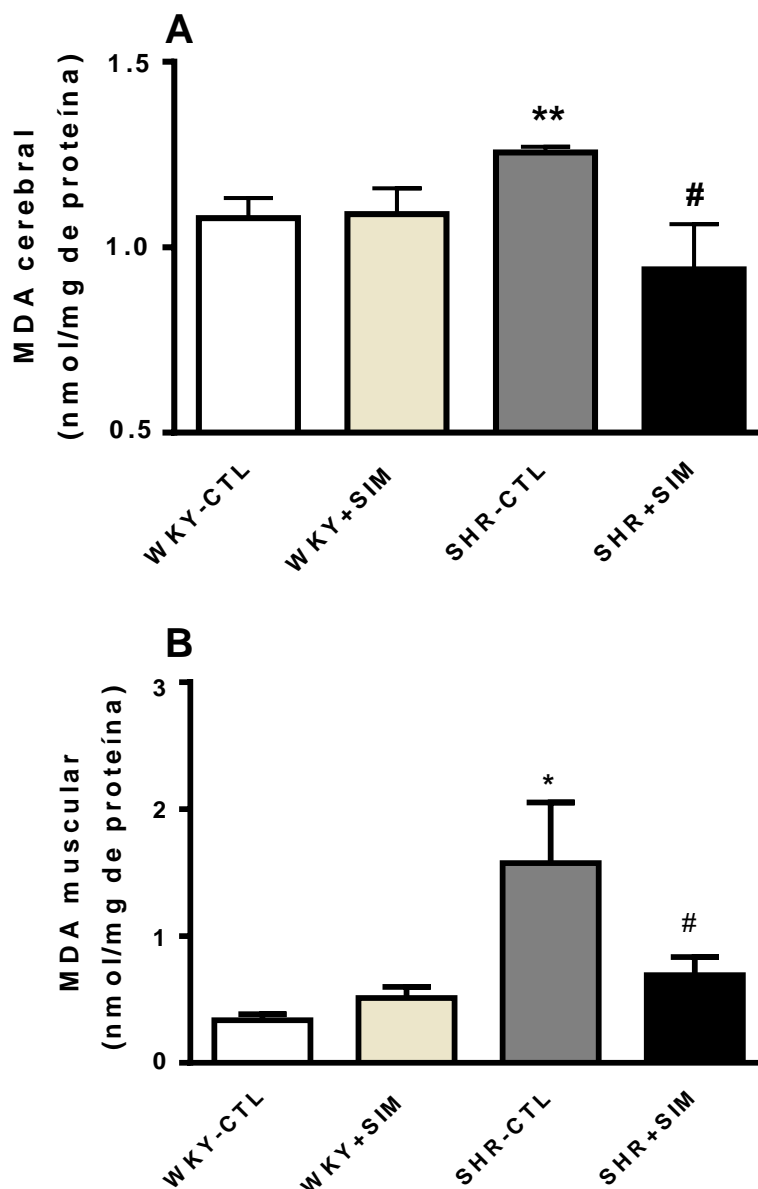


Figura 10. Nível de formação de malondialdeído (MDA) no (A) cérebro e músculo grácil, (B) e ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINV). Os valores representam a média \pm erro padrão da média; $n=5$. * $p < 0.05$ vs.

WKY-CTL e WKY+SINV; ** $p < 0.01$ vs. WKY-CTL e WKY+SINV # $p < 0.05$ vs. SHR-CTL.

5.10 Níveis de tiol cerebral e muscular de ratos hipertensos tratados com sinvastatina

As ações antioxidantes da sinvastatina foram avaliadas através dos níveis de tiol cerebral e muscular. Foi observada uma diminuição significativa dos níveis de tiol no cérebro e músculo grácil de ratos hipertensos quando comparado com ratos normotensos ($p < 0.01$; Figura 11). O tratamento de ratos hipertensos durante três dias com sinvastatina foi capaz de restaurar os níveis normais de tiol no cérebro e músculo grácil quando comparados com ratos hipertensos não tratados ($p < 0.05$). A administração de sinvastatina não alterou os níveis de tiol em ratos normotensos.

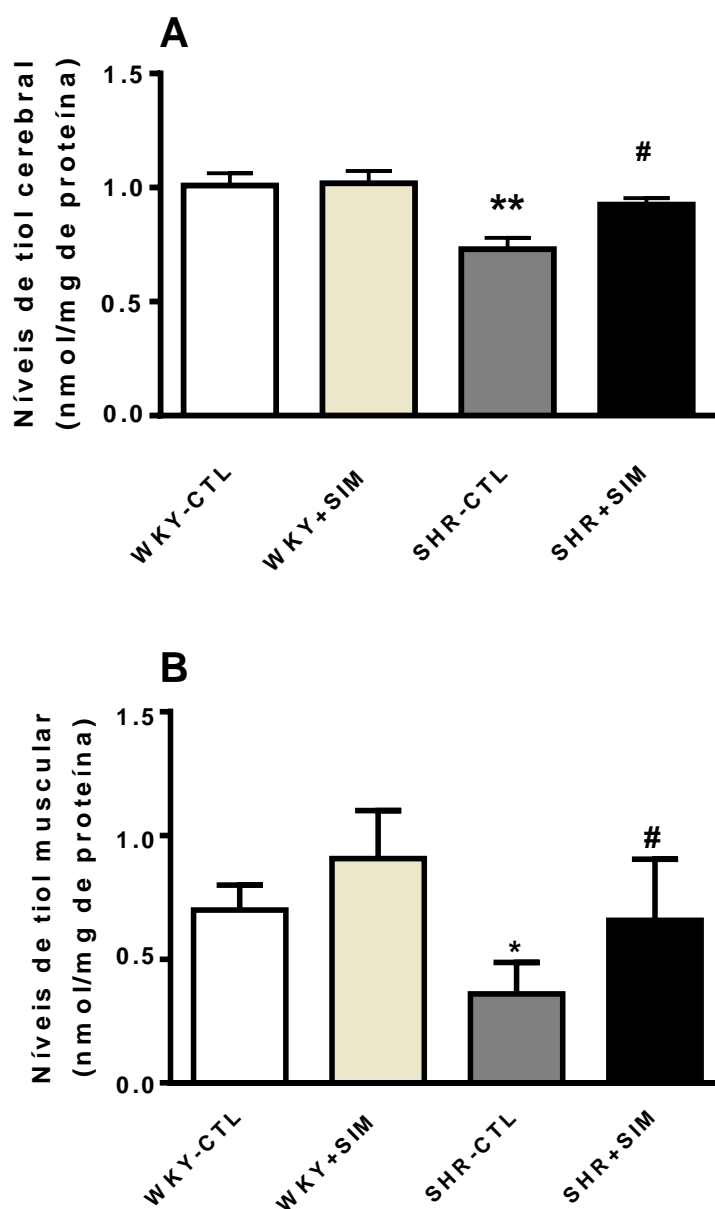


Figura 11. Níveis de tiol no (A) cérebro e músculo grácil (B) de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). Os valores representam a média \pm erro padrão da média; n=5. * $p < 0.05$ vs. WKY-CTL e WKY+SINVA; ** $p < 0.01$ vs. WKY-CTL e WKY+SINVA # $p < 0.05$ vs. SHR-CTL.

5.11 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre a expressão gênica da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)

Ratos hipertensos não tratados apresentaram uma diminuição na expressão da eNOS cerebral comparada com ratos normotensos não tratados (SHR-CTL vs. WKY-CTL $p < 0.05$; Figura 12). O tratamento de ratos hipertensos com sinvastatina aumentou significativamente a expressão da eNOS cerebral (SHR+SINVA; $p < 0.05$) quando comparados com ratos hipertensos não tratados. A administração de sinvastatina em ratos normotensos (WKY+SINVA) não alterou a expressão da eNOS cerebral quando comprados com ratos normotensos não tratados (Figura 12).

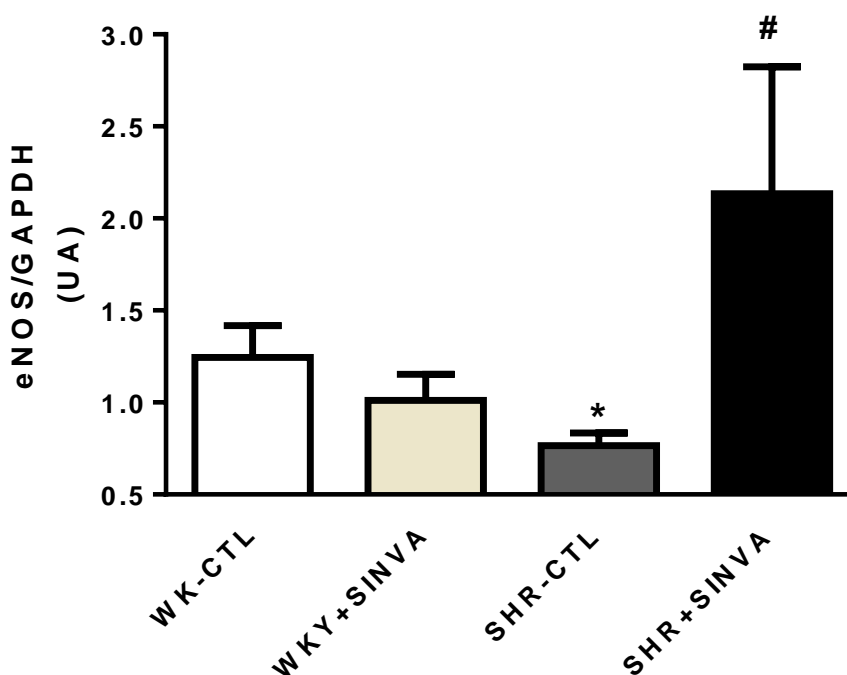


Figura 12 . Expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial cerebral de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). Os valores representam a média \pm erro padrão da média; n=5. * $p < 0.05$ vs. WKY-CTL e WKY+SINVA; # $p < 0.05$ vs. SHR-CTL.

5.12 Efeitos do tratamento com sinvastatina sobre a expressão gênica dos receptores AT₂ cerebral através de PCR

Ratos hipertensos não tratados apresentaram uma diminuição na expressão gênica dos receptores AT₂ cerebrais comparada com ratos normotensos não tratados (SHR-CTL vs. WKY-CTL; $p < 0.05$). O tratamento agudo de ratos hipertensos com sinvastatina aumentou significativamente a expressão gênica dos receptores AT₂ no sistema nervoso central (SHR+SINVA; $p < 0.05$) quando comparados com ratos hipertensos não tratados. A administração de sinvastatina em ratos normotensos (WKY+SINVA) não alterou a expressão gênica dos receptores AT₂ cerebrais quando comprados com ratos normotensos não tratados (Figura 13).

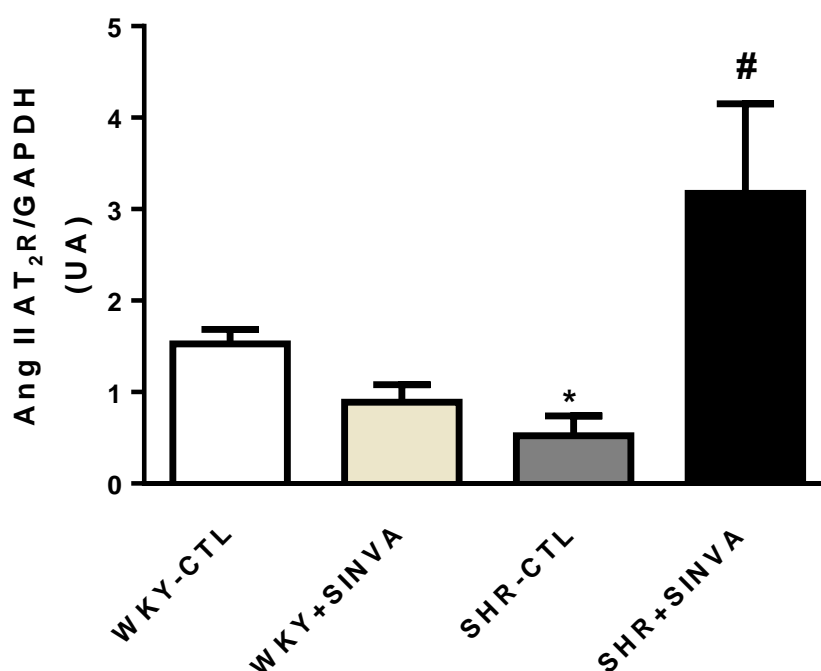


Figura 13. Expressão gênica dos receptores AT₂ no cérebro de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). Os valores representam a média \pm erro padrão da média; $n=5$. * $p < 0.05$ vs. WKY-CTL e WKY+SINVA; # $p < 0.05$ vs. SHR-CTL.

5.13 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre a expressão proteica dos receptores AT₂ através de imunohistoquímica

De forma similar à análise da expressão gênica, ratos hipertensos não tratados apresentaram menor expressão dos receptores AT₂ no córtex cerebral comparada com ratos normotensos não tratados (SHR-CTL vs. WKY-CTL; $p < 0.01$). O tratamento de ratos hipertensos com sinvastatina aumentou significativamente a expressão dos receptores AT₂ no córtex cerebral (SHR+SINVA; $p < 0.05$) quando comparado com ratos hipertensos não tratados. A administração de sinvastatina em ratos normotensos (WKY+SINVA) não alterou a expressão dos receptores AT₂ cerebral quando comparados com ratos normotensos não tratados (Figura 14).

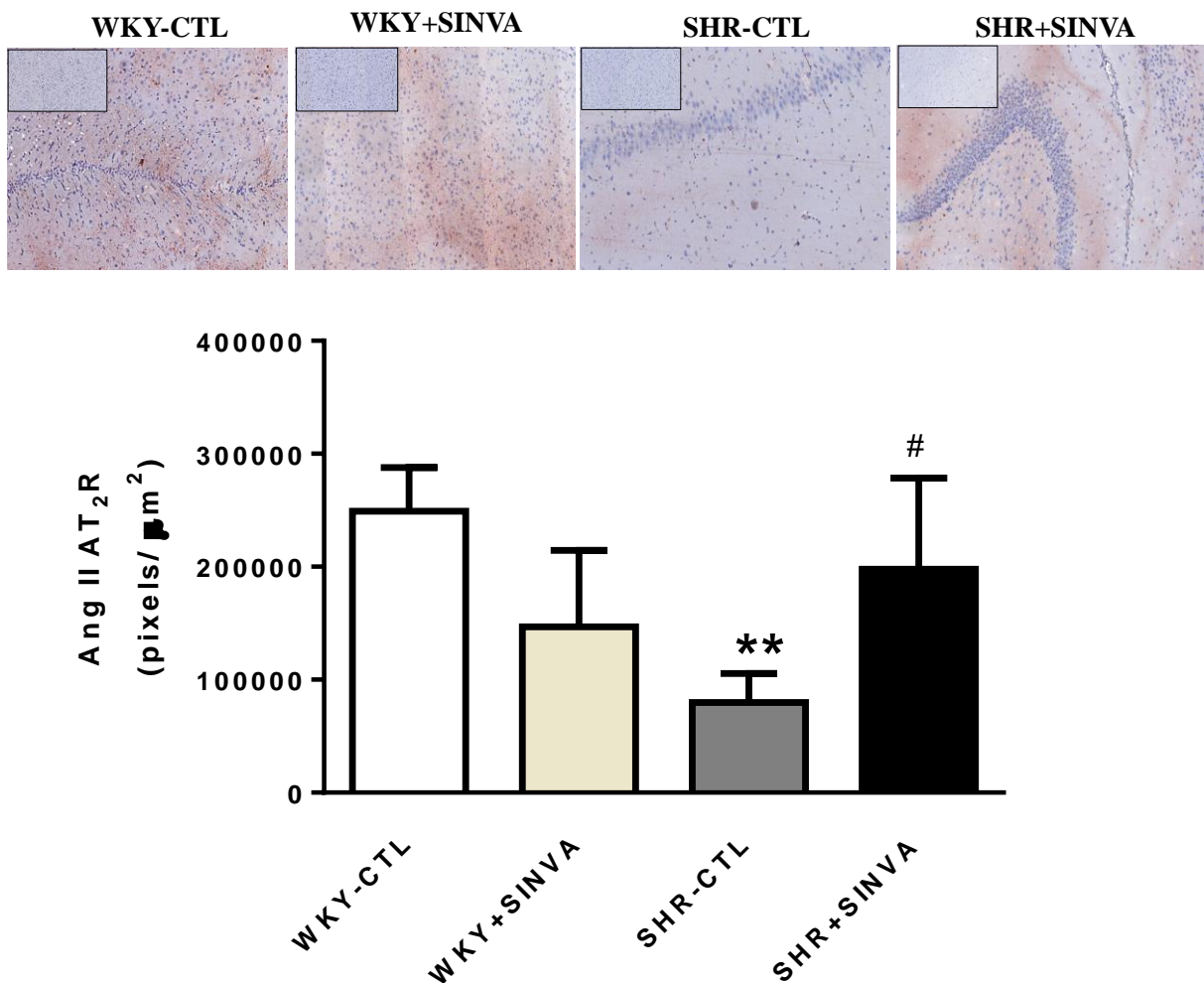


Figura 14. Fotomicrografia de imunohistoquímica e análise quantitativa para os receptores AT₂ no cérebro de ratos hipertensos tratados com sinvastatina (SHR+SINVA), ratos hipertensos não tratados (SHR-CTL), ratos normotensos não tratados (WKY-CTL) e tratados com sinvastatina (WKY+SINVA). Os valores representam a média \pm erro padrão da média; $n=5$. ** $p < 0.01$ vs. WKY-CTL e WKY+SINVA; # $p < 0.05$ vs. SHR-CTL.

5.14 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre os níveis séricos de colesterol total

Não houve diferença estatística nos níveis de colesterol total entre os ratos normotensos e hipertensos (WKY-CTL $88 \pm 2,9$ mg/dL vs. SHR-CTL $86 \pm 3,3$ mg/dL). O tratamento com sinvastatina durante três dias não modificou os níveis séricos de colesterol em ratos hipertensos (SHR+SINVA $89 \pm 3,4$ mg/dL) e normotensos (WKY+SINVA $85 \pm 4,1$ mg/dL), comparado com os grupos não tratados. Os valores representam a média \pm erro padrão da média; n=5.

Etapa II

6. Objetivos

6.1 Objetivos geral

- Investigar os efeitos do tratamento com sinvastatina em um modelo de hiperpermeabilidade microvascular.

6.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos do pré-tratamento com sinvastatina sobre:
 1. Hiperpermeabilidade microvascular induzida pela bradicinina.
 2. Hiperpermeabilidade microvascular induzida pela combinação da IL-1 β com a bradicinina.
- Investigar o papel da enzima NADPH oxidase nos efeitos da sinvastatina sobre a permeabilidade microvascular.

7. Materiais e Métodos

7.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos 80-100 g que ficaram em sala climatizada (20-24°C) com controle de claro-escuro (12 horas por período) em caixas contendo no máximo quatro animais com água e ração padrão para ratos *ad libitum*. A eutanásia dos animais foi realizada em câmara de CO₂ através da exposição a concentrações crescentes de CO₂ até que a parada cardiorrespiratória ocorresse, seguida do deslocamento cervical. Todos os procedimentos realizados estão de acordo com as diretrizes de procedimentos e utilização de animais de experimentação do Reino Unido (*Scientific Procedures, Act 1986 UK Home Office Schedule One procedure*).

7.2 Protocolo experimental

Para investigação dos efeitos do tratamento com sinvastatina (SINVA) sobre a hiperpermeabilidade microvascular induzida pela bradicinina (BK), os ratos foram inicialmente divididos em dois grupos experimentais (n=8), o grupo BK, onde os animais foram administrados com salina e o grupo BK+SINVA, tratados com sinvastatina (5 mg/kg), por via intraperitoneal, 24 horas antes da indução da hiperpermeabilidade vascular utilizando a concentrações crescentes de bradicinina na superfície do músculo cremaster (10⁻⁹, 10⁻⁸ e 10⁻⁷ M ou 1nM – 0.1µM).

Realizando experimentos pareados, após a primeira curva dose-resposta com a bradicinina, o músculo cremáster foi lavado rapidamente, e posteriormente uma segunda etapa foi realizada, a aplicação de IL-1β (30pM) na superfície abluminal da microcirculação do músculo cremáster de ambos os grupos, por 10 minutos. Posteriormente, o músculo foi lavado com solução fisiológica de Krebs, e uma nova dose-resposta foi realizada. Afim de facilitar a compreensão e análise dos resultados, após a aplicação de IL-1β os grupos experimentais (BK e BK+SINVA) foram renomeados para: grupo BK+IL-1β e BK+SINVA+IL-1β, como demonstrado na figura 15.

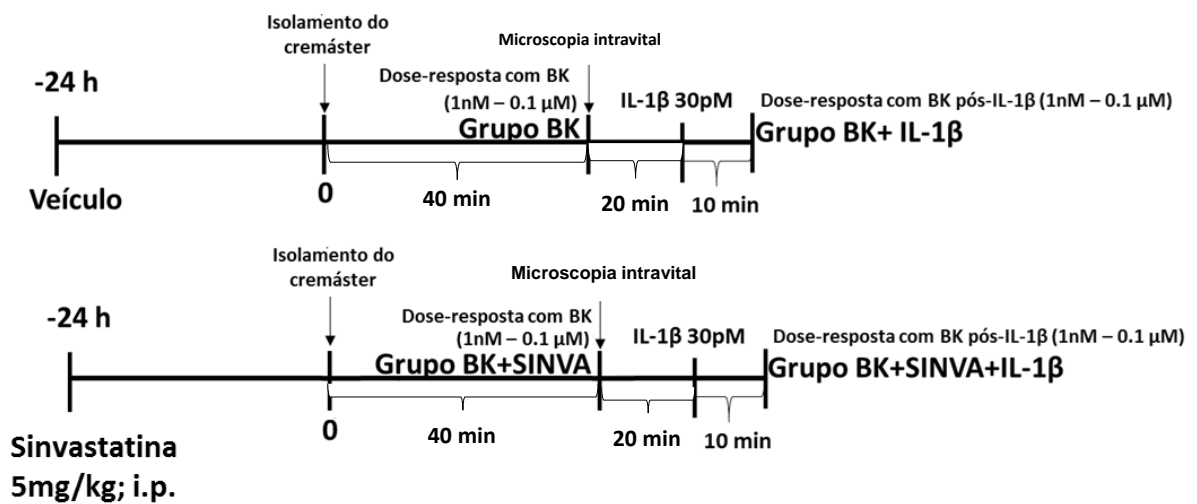


Figura 15: Esquema representativo do protocolo experimental utilizado para investigação dos efeitos do tratamento com sinvastatina (SINVA) sobre a hiperpermeabilidade microvascular induzida pela bradicinina (BK)

Uma segunda etapa foi realizada para avaliar o papel da NADPH oxidase na potencialização da permeabilidade causada pela bradicinina induzida pela IL-1 β . Para tal finalidade novos experimentos foram realizados com o mesmo protocolo descrito nos grupos BK+IL-1 β e BK+SINVA+IL-1 β , sendo que a única diferença foi a co-administração de um inibidor seletivo da NADPH oxidase, a apocinina (APO; 1 μ M) com a IL-1 β , também na superfície abluminal da microcirculação durante 10 minutos, gerando os seguintes grupos experimentais: BK+IL-1 β +APO e BK+SINVA+IL-1 β +APO (n=8), como demonstrado na figura 16.

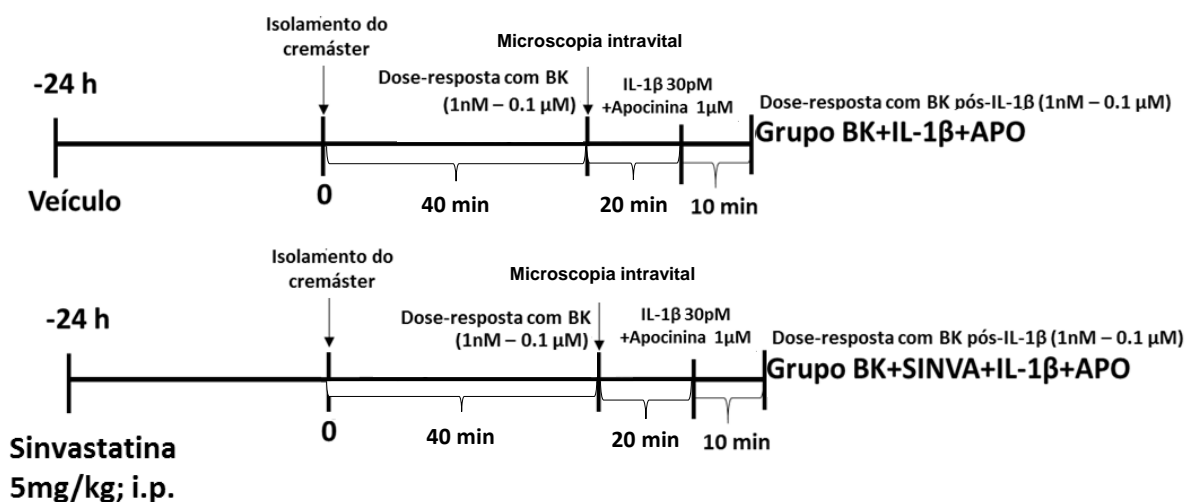


Figura 16: Esquema representativo do protocolo experimental utilizado para avaliar o papel da NADPH oxidase na potencialização da permeabilidade causada pela bradicinina induzida pela IL-1 β .

7.3 Drogas e soluções

7.3.1 Solução cardioplégica - St. Thomas'

A solução cardioplégica foi utilizada para estabilização do músculo cremáster. A composição da solução é a seguinte: NaCl (110 mM), MgCl₂ (16 mM), KCl (16 mM), CaCl₂ (1.2 mM), NaHCO₃ (10 mM), preparada com 80 ml de água destilada. O pH foi ajustado para 7.0 ± 0.05 . Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Dorset, UK).

7.3.2 Solução de Krebs

Após a dissecação, o músculo foi mantido viável durante o experimento através da superfusão contínua com a solução fisiológica de Krebs contendo: NaCl (118 mM); KCl (4,7 mM); CaCl₂ (2,52 mM); MgSO₄.7H₂O (1,18 mM); KH₂PO₄ (1,18mM), NaHCO₃ (25 mM), glicose (9 mM) preparada com 1,8 L de água destilada, e o pH foi ajustado para $7,4 \pm 0,05$. Albumina sérica bovina (10 mg.ml⁻¹) foi adicionada a uma alíquota da solução de Krebs para perfusão intravascular com o objetivo de manter as propriedades do glicocálix. Todas os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Dorset, UK).

7.4 Canulação da artéria aorta abdominal

Após a eutanásia, o rato foi posicionado estabilizado em decúbito dorsal ou supina em uma pequena plataforma plástica. Foi realizada a tricotomia da região abdominal e região escrotal, posteriormente foi realizada uma incisão na linha média expondo a cavidade abdominal. O omento maior e tecidos conectivos adjacentes foram cuidadosamente removidos para a visualização clara da artéria aorta abdominal e a veia cava. A artéria aorta foi canulada com uma cânula de polietileno (DI: 0,28 mm, DE: 0,61mm), posteriormente foi realizada a perfusão com a solução cardioplégica contendo heparina (100U.ml⁻¹), para evitar a formação de coágulos intravasculares. Posteriormente a veia cava foi seccionada para realização da perfusão e remoção completa do sangue do compartimento intravascular.

7.5 Isolamento e disseção do músculo cremáster

Como demonstrado na figuras 17 e 18, uma incisão longitudinal foi realizada na região ventral do escroto e a fáscia superficial e tecidos conectivos e adiposo foram cuidadosamente removidos. O músculo cremáster foi gentilmente tracionado para fora do testículo com o auxílio de uma pinça de dissecação e a extremidade distal do músculo foi fixada utilizando pinos histológicos (Watkins & Doncaster, Kent: England) em um bloco de silicone transparente (SylGard®). Durante a dissecação e isolamento, o músculo foi constantemente irrigado com a solução de Krebs a 37°C. Utilizando a cânula aórtica, o músculo foi continuamente perfundido com a solução de Krebs contendo albumina (10 mg.ml⁻¹), sendo mantida até o momento em que a preparação foi transferida para o set de microscopia intravital (ACM, Zeiss, Oberkochen, Germany). Uma vez posicionado no microscópio intravital, o músculo cremáster foi constantemente superfundido, com a solução de Krebs (2ml.min⁻¹), através de uma bomba peristáltica (MiniPuls3, Gilson, UK). A temperatura da solução de Krebs foi mantida a 37°C por um controlador de temperatura (Cal 9900 autotune PID, CAL Controls Ltd. UK). O pH da solução de Krebs foi mantido a $7,4 \pm 0,05$ com uma mistura gasosa de CO₂ a 5%.

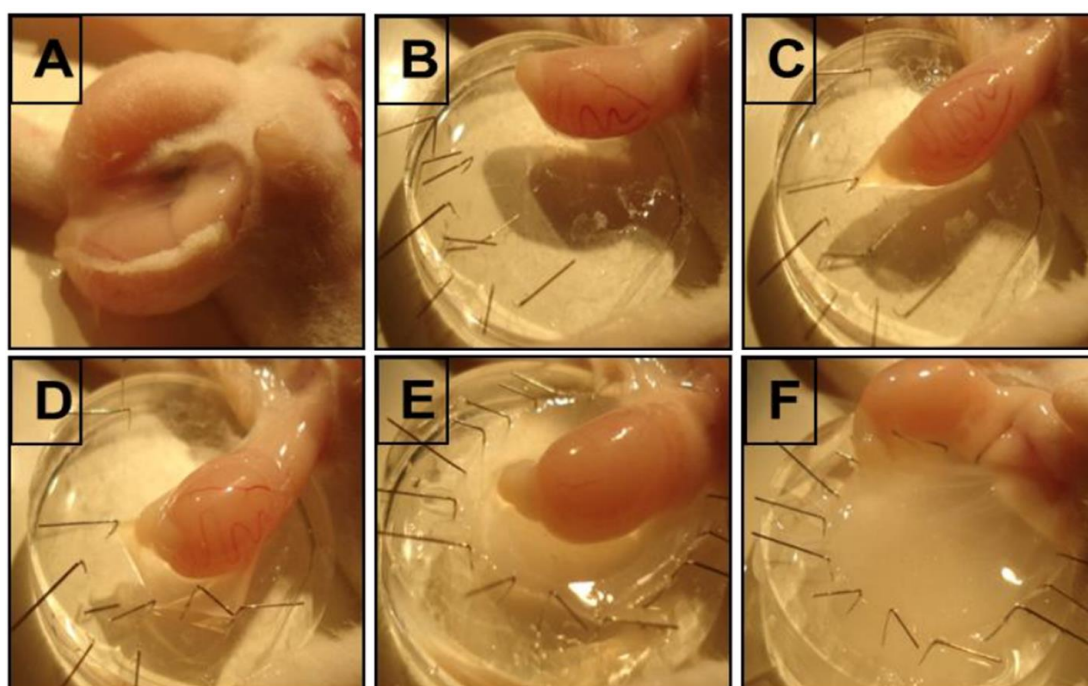


Figura 17: Imagens representativas das etapas de isolamento do músculo cremáster (A-F). Uma incisão longitudinal foi realizada na pele e tecido conectivo sobre o testículo selecionado (A). O tecido conectivo foi cuidadosamente removido e o músculo cremáster juntamente com o testículo foram fixados com pinos histológicos em um bloco de silicone (B e C). Foi realizada uma incisão longitudinal sobre o músculo cremáster, e o músculo foi aberto sobre o

bloco de silicone (D). Após a abertura, o músculo cremáster foi inteiramente fixado com os pinos histológicos (E), e o testículo foi posicionado lateralmente ao músculo cremáster (F).

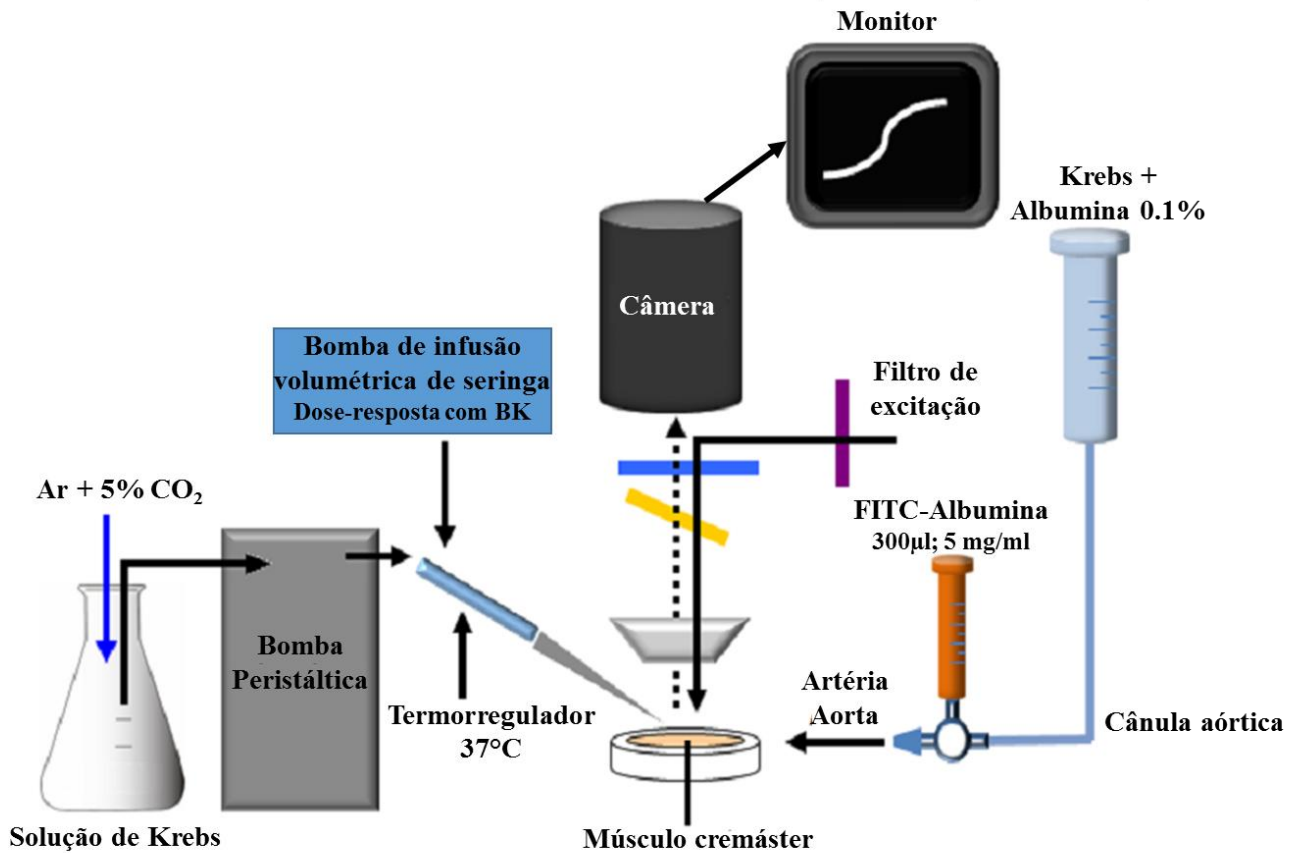


Figura 18: Representação do set experimental de microscopia intravital. Após a perfusão da microcirculação com a solução de Krebs e albumina 0,1%, foi administrado FITC-albumina através da cânula aórtica. Posteriormente, o músculo cremáster foi constantemente superfundido, com a solução de Krebs ($2\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$), através de uma bomba peristáltica (MiniPuls3, Gilson, UK). A temperatura da solução de Krebs foi mantida a 37°C por um controlador de temperatura (Cal 9900 autotune PID, CAL Controls Ltd. UK). O pH da solução de Krebs foi mantido a $7,4 \pm 0,05$ com uma mistura gasosa de CO_2 a 5%. As drogas foram aplicadas na superfície abluminal através de uma bomba de infusão volumétrica de seringa diretamente no circuito de perfusão ligado a bomba peristáltica que realiza a superfusão do músculo cremáster, permitindo a administração direta da bradicinina no superfusato?? sem interferir com o sistema de controle de temperatura e a irrigação continua com do músculo com a solução de Krebs.

7.6 Aquisição das imagens

O músculo cremáster foi transiluminado e examinado com uma objetiva de imersão em água de 10x (Cooke, N.A. 0,5) e imagens em tempo real foram capturadas por uma câmera de baixa-luz (DarkStar, Photonic Sciences, UK) e um software para análise de imagens, Image Hopper (Samsara Research, Reading, Surrey). Um período de estabilização de 30 minutos foi utilizado para observação da microcirculação e escolha de um campo microscópico de qualidade. Uma injeção em bolus de FITC-albumina (300 μ l; 5 mg/ml) foi realizada através da cânula aórtica. O marcador fluorescente foi excitado a (525 – 535 nm) permitindo a visualização dos vasos da microcirculação. Vênulas pós-capilares foram selecionadas para a realização da mensuração das variações da permeabilidade durante o presente estudo. Antes da realização da aquisição de imagens, a administração de soluções através da artéria aorta foi interrompida, com o objetivo de evitar o fluxo e permitir a estabilização da FITC-albumina no interior dos vasos. Após o isolamento, o músculo cremáster foi posicionado no microscópio intravital, para avaliação da permeabilidade microvascular. O músculo foi continuamente superfundido com a solução fisiológica de Krebs a 37°C (pH 7,4). A luz emitida após a excitação do FITC-albumina presente na microcirculação do cremáster, ??para através de um filtro de emissão para uma câmera de baixa-iluminação. Uma vênula pós-capilar foi escolhida para avaliação da permeabilidade vascular. As imagens foram capturadas e salvas para subsequente análise através do software Image Hopper.

7.7 Controle do fluxo vascular

Todos os experimentos foram realizados sobre condições de “fluxo zero”. Essa condição é necessária para evitar a possibilidade de fluxo ao longo do vaso de interesse durante o experimento e a análise subsequente dos dados. No presente estudo, essa condição foi obtida parando a perfusão através da artéria aorta e aguardando 2 minutos para estabilização.

7.8 Aplicação das drogas

As drogas foram aplicadas na superfície abluminal através de uma bomba de infusão volumétrica de seringa diretamente no circuito de perfusão ligado a bomba peristáltica que realiza a superfusão do músculo cremáster, permitindo a administração direta da bradicinina

no superfusato sem interferir com o sistema de controle de temperatura e a irrigação contínua do músculo com a solução de Krebs.

Devido ao desenho do setup experimental, as drogas sempre foram misturadas com a solução de Krebs, e sua concentração final foi calculada para terem um fator de diluição de 1:4 a partir das concentrações iniciais. Foram realizadas gravações das imagens antes e após a aplicação das drogas para o cálculo do coeficiente de permeabilidade. As drogas foram lavadas durante 5 minutos, antes da administração seguinte, para possibilitar o retorno à linha de base. Se necessário, uma nova injeção de FITC-albumina era realizada, antes da realização de nova administração da bradicinina. Para minimizar a variabilidade entre as aplicações de bradicinina, a mesma região do cremáster foi observada ao longo do experimento.

7.9 Análise das imagens e mensuração da permeabilidade microvascular

No final de cada experimento, o conjunto de imagens era observado para a visualização das alterações na fluorescência e cálculo do coeficiente de permeabilidade. A permeabilidade ao longo do período de gravação foi calculada como a diferença dos valores obtidos da região intravascular e aqueles obtidos a partir do interstício, e plotados como observado na figura 19. Como observado na figura 20, os gráficos gerados no software Image Hopper foram exportados para o Microsoft Excel na forma de valores numéricos em (Concentração de FITC-albumina) pixels vs. Tempo (s). Utilizando o software Microsoft Excel, foram calculadas as curvas exponenciais de cada ensaio, podendo-se obter as constantes de queda na concentração do marcador fluorescente (***k***) para a região basal da curva e pós-bradicinina. Para o cálculo do coeficiente de permeabilidade, posteriormente foi determinado o diâmetro (***d***) (µm) do vaso utilizado para a análise, e a permeabilidade (***P***) foi calculada de acordo com a equação : ***P=k.d/4***.

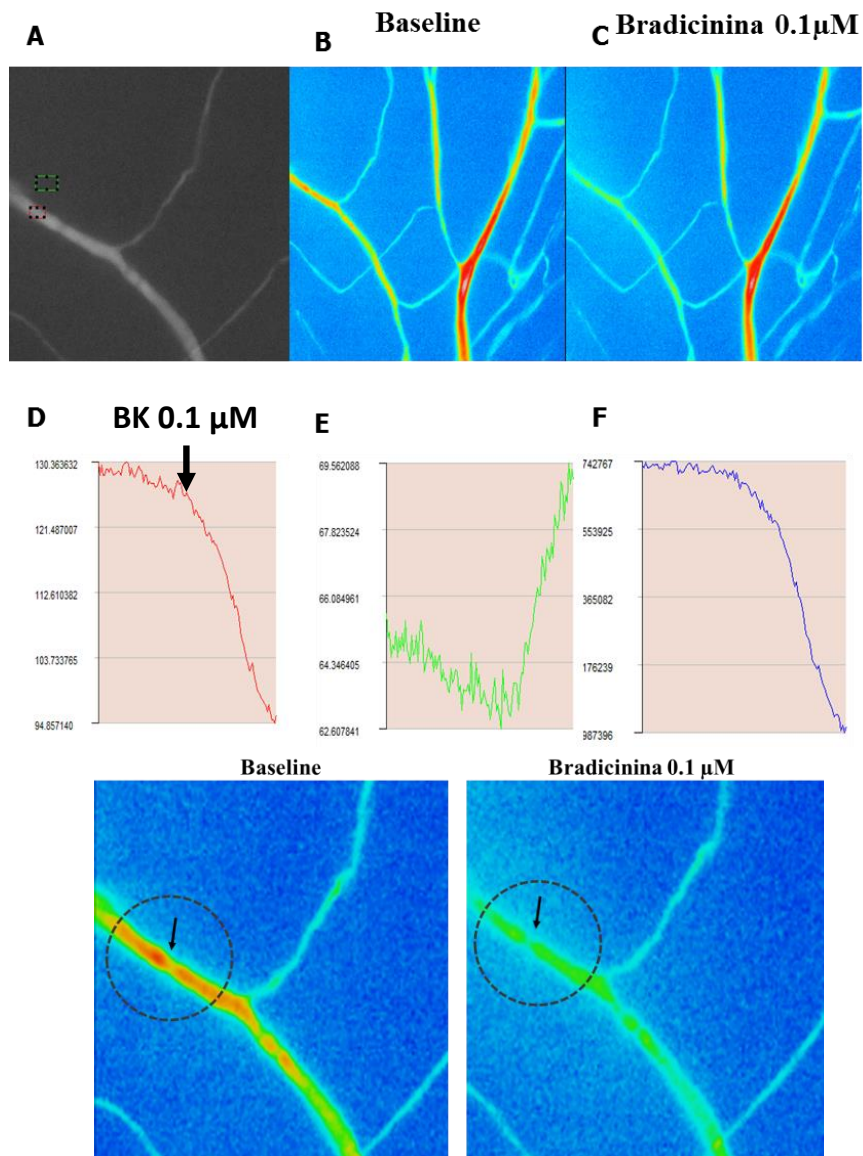


Figura 19: Avaliação da permeabilidade de vênulas pós-capilares no músculo cremáster. Imagens representativas da microscopia intravital da região de interesse de mostrando uma vênula antes (B) e após a administração de bradicinina (BK) na concentração de 0,1 μM (C). As alterações na fluorescência das regiões de interesse dentro do vaso escolhido (quadrado vermelho) e no interstício (quadrado verde) estão dispostas nos gráficos obtidos com o software Image Hopper e foram posteriormente utilizados para o cálculo do coeficiente de permeabilidade (A; D-F).

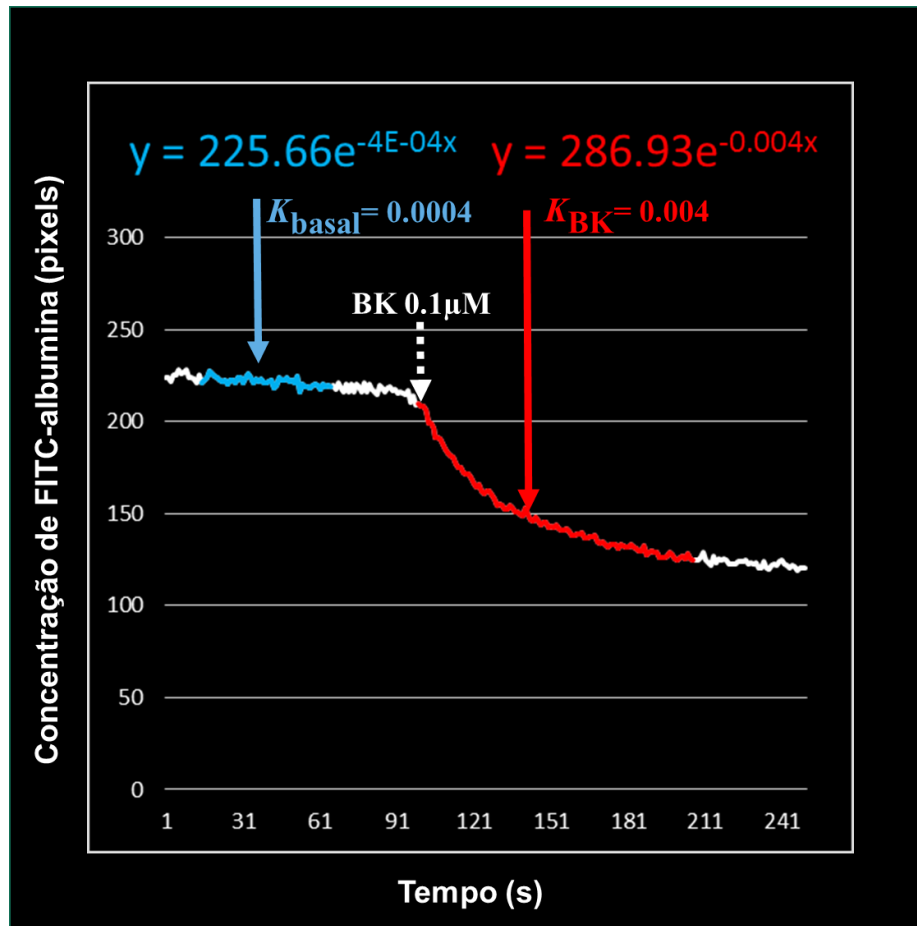


Figura 20: Curva exponencial representativa utilizada para o cálculo das constantes basal e após a administração de bradicinina usadas o cálculo do coeficiente de permeabilidade microvascular no músculo cremáster. Queda exponencial na concentração de FITC-albumina, induzido pela aplicação local de bradicinina ($0,1 \mu\text{M}$) na superfície abluminal da microcirculação do cremáster, aumentando a permeabilidade microvascular. Por exemplo, para o cálculo do coeficiente de permeabilidade microvascular ($P=k.d/4$) para uma vênula pós-capilar com um diâmetro (d) = $20\mu\text{m}$, e constantes de queda na concentração do marcador fluorescente basal, $k_{basal}=0,0004$ e pós-bradicinina $k_{BK}=0,004$, calcula-se a permeabilidade basal, $P_{basal}= 0,002$ e permeabilidade pós-bradicinina $P_{BK}= 0,02$, um aumento de 10 vezes na permeabilidade microvascular induzido pela bradicinina; logo o coeficiente de aumento da permeabilidade vascular é calculado como: $P_{BK} - P_{basal} = 0,018$ ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot 10^{-6}$).

7.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como sendo a média \pm erro padrão da média (EPM) para cada grupo e comparações entre grupos diferentes foram feitas o teste student-t pareado e não pareado. Em todos os testes, o grau mínimo de significância considerado foi de 95% ($P < 0,05$). Todos os cálculos foram realizados por análises informatizadas através do programa estatístico comercialmente disponível (Graphpad Prism, versão 5.0, San Diego, CA, USA).

8. Resultados

8.1 Efeito do pré-tratamento com sinvastatina sobre a hiperpermeabilidade microvascular induzida pela bradicinina

A aplicação local de bradicinina na superfície abluminal do músculo cremáster induziu um aumento concentração-dependente na permeabilidade microvascular BK 10^{-9} M ($0,11\pm 0,02$); BK 10^{-8} M ($0,37\pm 0,09$); BK 10^{-7} M ($0,73\pm 0,20$ cm.s $^{-1}\cdot 10^{-6}$, figura 21A) e a permeabilidade máxima foi observada com a maior concentração de bradicinina (10^{-7} M). O pré-tratamento com sinvastatina foi capaz de reduzir significativamente a permeabilidade microvascular induzida pela bradicinina, praticamente abolindo, neste modelo, a ação microvascular mediada pela bradicinina BK+SINVA 10^{-9} M ($0,04\pm 0,03$); BK+SINVA 10^{-8} M ($0,05\pm 0,02$); BK+SINVA 10^{-7} M ($0,14\pm 0,04$ cm.s $^{-1}\cdot 10^{-6}$, figura 21B;), como evidenciado pelo cálculo da área sob a curva (ASC) (BK $0,65 \pm 0,09$ vs. BK+SINVA $0,15 \pm 0,05$; $p < 0,01$, figura 21B)

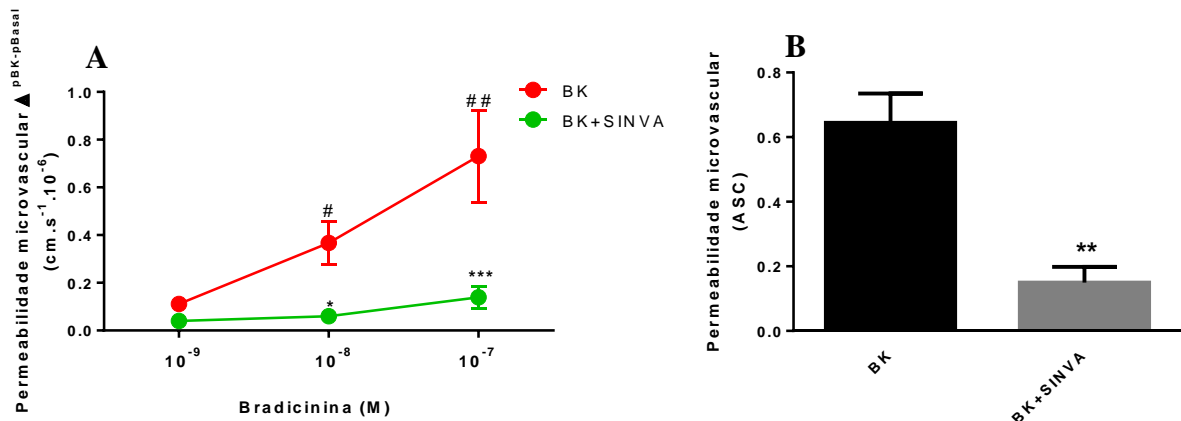


Figura 21: Efeitos do pré-tratamento com sinvastatina (5 mg/kg; i.p.) sobre a permeabilidade microvascular induzida pela bradicinina. (A). Curva dose-resposta mostrando a variação na permeabilidade vascular a partir da permeabilidade basal (p^{Basal}) após a aplicação de bradicinina (p^{BK} ; 1nM – 0.1 μM). * $p < 0,05$ vs. 10^{-8} M BK, *** $p < 0,001$ vs. 10^{-7} M BK.; # $p < 0,05$ vs. 10^{-9} M BK, ## $p < 0,01$ vs. 10^{-8} M BK (B) Cálculo da área sob curva (ASC) dos grupos BK e BK+SINVA; ** $p < 0,01$ vs. BK. Os valores representam a média \pm erro padrão da média; n=8.

8.2 Efeito do pré-tratamento com sinvastatina sobre a hiperpermeabilidade microvascular induzida pela combinação da IL-1 β com a bradicinina

A aplicação local prévia de IL-1 β (30 pM) durante 10 minutos na superfície abluminal da microcirculação do músculo cremáster potencializou o efeito da bradicinina, aumentando a permeabilidade microvascular nas concentrações de 10⁻⁸M (BK pré-IL-1 β 0,37 \pm 0,09 vs. BK pós- IL-1 β 0,57 \pm 0,11 cm.s⁻¹.10⁻⁶; p<0.05) e 10⁻⁷M (BK pré-IL-1 β 0,73 \pm 0,19 vs. BK pós- IL-1 β 1,11 \pm 0,22 cm.s⁻¹.10⁻⁶; p<0.05) quando comparados com a administração da bradicinina sozinha (Figura 22). Na menor concentração de BK, 10⁻⁹M, a pré-aplicação de IL-1 β foi capaz de aumentar a permeabilidade induzida pela bradicinina, no entanto não houve diferença estatística entre os grupos experimentais (BK pré-IL-1 β 0,11 \pm 0,02 vs. BK pós-IL-1 β 0,29 \pm 0,16 cm.s⁻¹.10⁻⁶; p=0.09).

O pré-tratamento com sinvastatina foi capaz de prevenir ou abolir completamente a ação da IL-1 β sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida pela a bradicinina, reduzindo significativamente a hiperpermeabilidade microvascular induzida pelas diferentes concentrações de BK, BK+SINVA+IL-1 β 10⁻⁹M (0,06 \pm 0,04); BK+SINVA+IL-1 β 10⁻⁸ M (0,21 \pm 0,08); BK+SINVA+IL-1 β 10⁻⁷ M (0,44 \pm 0,23 cm.s⁻¹.10⁻⁶, figura 22).

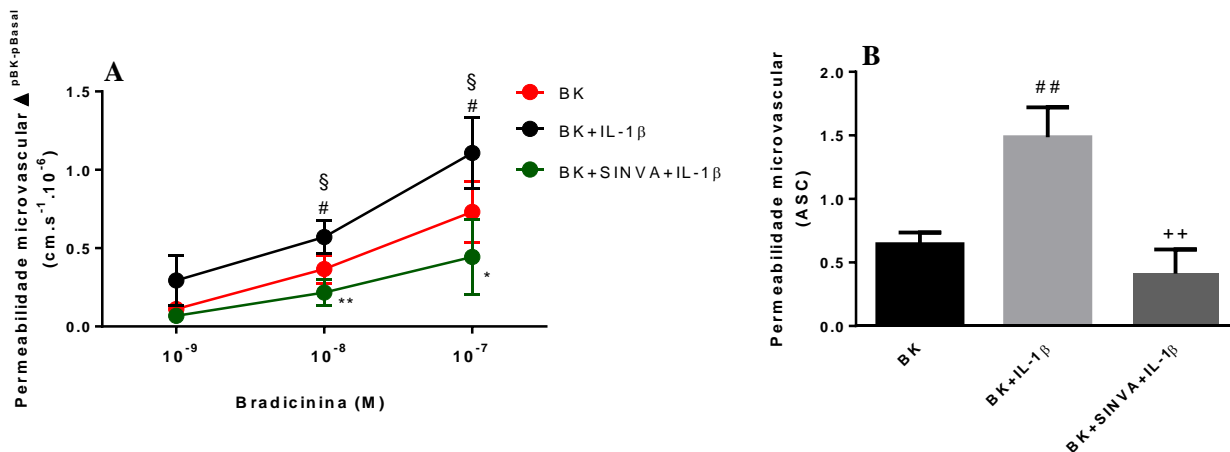


Figura 22: (A). Efeitos do pré-tratamento com sinvastatina sobre a hiperpermeabilidade microvascular induzida pela combinação da IL-1 β com a bradicinina. (A) Curva dose-resposta mostrando a variação na permeabilidade vascular. * $p < 0.05$ vs. 10⁻⁸M BK+IL-1 β , ** $p < 0.01$ vs. 10⁻⁷M BK+IL-1 β . # $p < 0.05$ vs. 10⁻⁹M BK+IL-1 β , 10⁻⁸M BK+IL-1 β ; § $p < 0.05$ vs.10⁻⁸M BK; § $p < 0.05$ vs. 10⁻⁷M BK. (B) Cálculo da área sob curva (ASC) dos grupos BK, BK+IL-1 β e BK+SINVA+IL-1 β . ## $p < 0.01$ vs. BK; ++ $p < 0.01$ vs. BK+IL-1 β . Os valores representam a média \pm erro padrão da média; n=8.

8.3 Papel da enzima NADPH oxidase nos efeitos da sinvastatina sobre a permeabilidade microvascular.

A aplicação concomitante de apocinina (APO), um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, diminuiu o aumento da permeabilidade induzido pela combinação da IL-1 β e da bradicinina, no entanto não houve diferença significativa entre os grupos (BK+IL-1 β +APO 10⁻⁹M (0,15 \pm 0,02); 10⁻⁸M (0,4 \pm 0,09); 10⁻⁷M (0,85 \pm 0,10) vs. BK+IL-1 β 10⁻⁹M (0,29 \pm 0,16) 10⁻⁸M (0,57 \pm 0,11) 10⁻⁷M (1,11 \pm 0,22). A combinação de sinvastatina e apocinina inibiu completamente o aumento na permeabilidade vascular induzido pela combinação de IL-1 β e bradicinina (BK+SINVA+IL-1 β +APO) (0,03 \pm 0,01); 10⁻⁸M (0,04 \pm 0,03); 10⁻⁷M (0,03 \pm 0,02; figura 23) quando comparado com o grupo BK+IL-1 β +APO (p<0,001). Não houve diferença estatística entre os grupos BK+SINVA+IL-1 β e BK+SINVA+IL-1 β +APO.

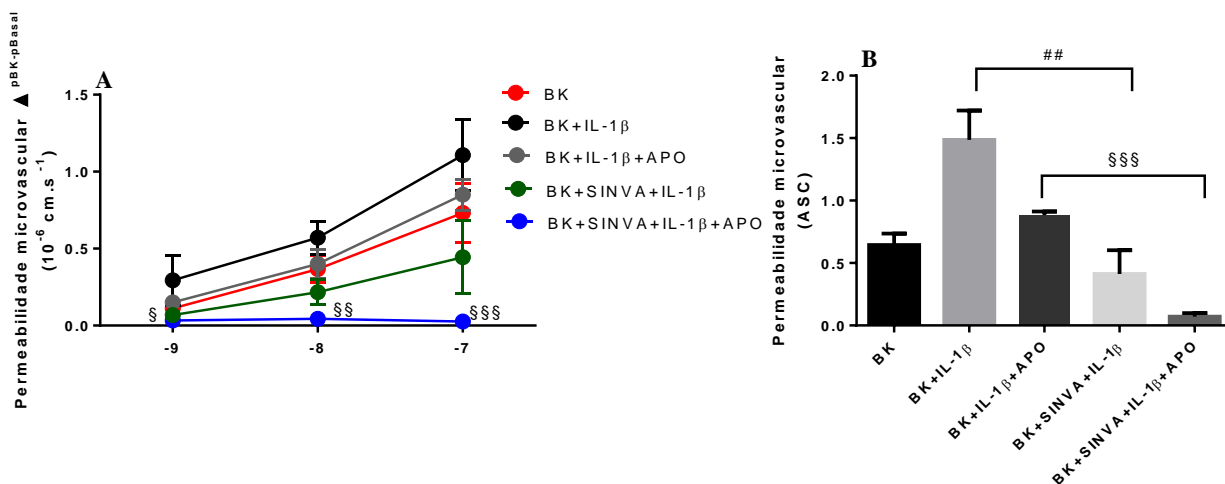


Figura 23: Papel da enzima NADPH oxidase na redução da permeabilidade microvascular mediada pela sinvastatina. (A) Curva dose-resposta mostrando a variação na permeabilidade vascular. § $p < 0.01$ vs. 10⁻⁹M BK+IL-1 β +APO; §§ $p < 0.01$ vs. 10⁻⁸M BK+IL-1 β +APO; §§§ $p < 0.01$ vs. 10⁻⁷M BK+IL-1 β +APO. (B) Cálculo da área sob curva (ASC) dos grupos BK, BK+IL-1 β e BK+SINVA+IL-1 β ; e BK+IL-1 β +APO BK+SINVA+IL-1 β +APO. §§§ $p < 0.01$ vs. BK+IL-1 β +APO, ### vs. BK+IL-1 β . Os valores representam a média \pm erro padrão da média; n=8.

9. *Discussão*

O tratamento com sinvastatina reduziu a pressão arterial, reverteu a rarefação microvascular funcional cerebral e muscular, além de melhorar a vasodilatação arteriolar dependente de endotélio, acompanhado do aumento na expressão da enzima eNOS, e normalização do fluxo sanguíneo cerebral em ratos hipertensos. Além disso, o tratamento com sinvastatina teve um efeito anti-inflamatório vascular, reduzindo o rolamento e adesão de leucócitos em vênulas cerebrais, diminuiu o estresse oxidativo e aumentou a capacidade antioxidante no músculo e cérebro de ratos hipertensos. Os efeitos cardiovasculares benéficos observados com o tratamento de sinvastatina neste estudo foram completamente independentes dos níveis de colesterol, uma vez que os ratos hipertensos utilizados não apresentam hipercolesterolemia comparado com ratos normotensos, e o tratamento com sinvastatina durante três dias não alterou os níveis séricos de colesterol. Adicionalmente, o tratamento agudo com sinvastatina foi capaz de prevenir o aumento da permeabilidade microvascular induzido pela bradicinina.

Devido as suas propriedades farmacocinéticas, a sinvastatina possui baixa biodisponibilidade após administração por via oral quando comparado com outras vias, como intraperitoneal e inalatória. Em estudos de farmacocinética foi demonstrado que após a administração oral de sinvastatina na dose de 40 mg/kg, a biodisponibilidade calculada foi de 5% (222). É importante notar que a via clássica de administração da sinvastatina na prática clínica é a via oral, no entanto alguns estudos experimentais mostraram que a administração de sinvastatina via intraperitoneal produziu um efeito anti-inflamatório maior do que quando administrada na mesma dose por via oral (223). Alguns fatores podem contribuir para a diminuição da biodisponibilidade oral da sinvastatina, como o efeito de primeira passagem hepática após absorção pelo trato gastrointestinal (224). A dose de sinvastatina usada neste estudo por via oral é maior do que normalmente a dose utilizada por humanos. É importante notar que normalmente as doses de estatinas empregadas em estudos experimentais com ratos e camundongos são maiores do que as usadas em humanos, devido a rápida supra-regulação da HMG-CoA que ocorre em roedores após o tratamento com estatinas (225). Esses fatores farmacocinéticos e metabólicos inerentes aos roedores poderiam explicar o motivo pelo qual a dose de sinvastatina é normalmente mais alta quando escolhida a via oral de administração.

Por outro lado, um estudo toxicológico demonstrou que a sinvastatina administrada na dose de 40 mg/kg/dia por via intraperitoneal induziu severa toxicidade, e alguns animais morreram 3 dias após a administração por via intraperitoneal (226). Por outro lado, a

administração via oral da sinvastatina na mesma dose de 40 mg/kg/dia, maior que a dose de 30 mg/kg/dia utilizada no presente estudo, foi bem tolerada, não induziu efeitos adversos, nem óbitos ao longo de 14 dias de tratamento, quando comparado com animais do grupo controle (226). Logo, a dose de 30 mg/kg/dia utilizada no presente estudo é segura do ponto de vista toxicológico e experimental.

Os efeitos das estatinas sobre a pressão arterial têm sido estudados em alguns ensaios clínicos. Alguns estudos mostraram um efeito hipotensor das estatinas, enquanto outros estudos não observaram diminuição da pressão arterial em pacientes tratados com estatinas (227). Alguns fatores controversos têm sido publicados acerca dos efeitos das estatinas sobre a pressão arterial, diferentes aspectos populacionais (hipercolesterolemia, idade), o tratamento concomitante com anti-hipertensivos, dentre outros (228). Estudos recentes mostraram que pacientes com hipertensão controlada que também são hipercolesterolêmicos não apresentaram alterações nos níveis de pressão arterial com o tratamento adicional com estatina (229, 230), enquanto outros estudos demonstraram que a terapia adicional com estatinas levou a uma grande redução da pressão arterial em pacientes com hipertensão não controlada (129, 134). Tseng e colaboradores demonstraram que a sinvastatina foi capaz de promover o controle central da pressão arterial no núcleo do trato solitário (NTS) de SHR através da supra-regulação da atividade da eNOS (123).

Dados na literatura sobre o efeito das estatinas em pacientes hipertensos são altamente controversos. No presente estudo, o tratamento com sinvastatina teve um efeito anti-hipertensivo importante considerando apenas três dias de tratamento de ratos hipertensos. Do ponto de vista experimental, a redução da pressão arterial no presente modelo de hipertensão é importante uma vez que ratos SHR não desenvolvem hipercolesterolemia, sendo possível dissociar o efeito sobre a pressão arterial dos efeitos dependentes dos níveis de colesterol. Esse resultado reforça a possibilidade que as estatinas podem diminuir diretamente a pressão arterial, independente de reduzir os níveis de colesterol. De fato, tem sido demonstrado que as estatinas reduzem significativamente a pressão sistólica e diastólica (16, 22). Bautista demonstrou que as estatinas reduziram a pressão arterial de uma forma similar em pacientes tratados e não tratados com medicamentos anti-hipertensivos. Além disso, os efeitos anti-hipertensivos das estatinas foram maiores em pacientes com altos níveis de pressão arterial diastólica (16).

Também foi demonstrado que pacientes com hipertensão controlada e hipercolesterolêmicos não apresentaram alterações significativas nos níveis de pressão arterial

com o tratamento adicional com estatinas (229, 230), enquanto outros estudos demonstraram que a terapia adicional com as estatinas levaram a uma maior redução da pressão arterial em pacientes com a hipertensão não controlada (129, 134).

Logo, a associação de resultados clínicos e experimentais, como observados no presente estudo, sugerem fortemente que as estatinas podem ser usadas para a prevenção e tratamento da hipertensão arterial, contribuindo sobremaneira para otimizar o controle da pressão arterial em pacientes hipertensos. Portanto, ao longo dos últimos anos as estatinas, que são fármacos seguros e bem tolerados pelos pacientes em geral, se apresentam como uma classe farmacológica com o potencial para a prevenção e controle da hipertensão arterial em associação ou não com anti-hipertensivos clássicos.

O NO produzido pelas células endoteliais tem um papel essencial no processo de vasodilatação. Em condições homeostáticas, o relaxamento vascular ocorre pela ativação de mecanorreceptores da membrana das células endoteliais ou quando há um aumento do estresse de cisalhamento (*shear stress*) exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial, levando à ativação da eNOS e à subsequente produção de NO (231). Pacientes com hipertensão arterial primária são caracterizados por disfunção endotelial (231) mediada por uma diminuição na biodisponibilidade de NO secundário ao aumento do estresse oxidativo (232, 233).

A disfunção endotelial é um marcador precoce do desenvolvimento de alterações ateroscleróticas, além de contribuir para eventos cardiovasculares importantes na hipertensão arterial (231). A disfunção endotelial no leito microvascular de pacientes hipertensos está associada com a lesão de órgãos alvo e é um fator preditivo de eventos cardiovasculares (231). Testes que avaliam a reatividade vascular representam os métodos mais utilizados na avaliação clínica da disfunção endotelial. Foi observado no presente estudo que ratos hipertensos apresentaram uma diminuição na expressão da enzima eNOS cerebral, redução na reatividade vascular dependente de endotélio em resposta à acetilcolina, além de redução no número de capilares espontaneamente perfundidos (rarefação capilar funcional) quando comparados com ratos normotensos. O tratamento com sinvastatina durante três dias foi capaz de aumentar a expressão da eNOS cerebral, melhorar a reatividade vascular dependente de endotélio e reverter a rarefação capilar no cérebro de ratos hipertensos quando comparado com ratos hipertensos não tratados. Logo, a reversão da rarefação microvascular funcional observada em ratos hipertensos tratados com a sinvastatina evidenciada pelo aumento no número de capilares espontaneamente perfundidos, pode estar diretamente relacionada com a

recuperação da função endotelial e redução da pressão arterial. De fato, alguns estudos já demonstraram que a preservação da função endotelial promovida pelas estatinas envolve tanto o aumento de substâncias vasodilatadoras quanto a redução de substâncias vasoconstritoras, aumentando a biodisponibilidade de NO e reduzindo o peptídeo endotelina-1 (ET-1) (234).

A rarefação microvascular está diretamente relacionada à elevação da pressão arterial nos SHR (9, 11, 14, 36, 136, 168-173). Diversos estudos têm demonstrado que a regulação da pressão arterial utilizando fármacos anti-hipertensivos possibilita a reversão da disfunção microcirculatória nos SHR. A disfunção microvascular e rarefação capilar estão intimamente envolvidas na fisiopatologia da hipertensão arterial, e a elevação da pressão arterial pode levar a alterações microcirculatórias. De fato, alguns anti-hipertensivos são capazes de restaurar a densidade capilar a um nível próximo dos valores normais. No entanto, nem todos anti-hipertensivos, como os β -bloqueadores, são capazes de reverter a disfunção microvascular, apesar de reduzirem a pressão arterial de maneira bem-sucedida (12, 35). De fato, estudos clínicos têm demonstrado que pacientes hipertensos tratados com anti-hipertensivos apresentaram uma maior densidade capilar do que indivíduos não tratados (34), outro estudo similar também demonstrou um aumento na densidade capilar em pacientes tratados com perindopril e indapamida, porém o mesmo efeito não foi observado em pacientes tratados com outros anti-hipertensivos (235). A redução da pressão arterial pode contribuir para uma diminuição no estresse oxidativo e biomecânico (236), favorecendo a função endotelial e perfusão capilar (237). Também foi demonstrado que anti-hipertensivos de ação central foram capazes de reverter a rarefação capilar em ratos hipertensos em leitos microvasculares, como a pele e músculo esquelético, o que seria um resultado primário redução da pressão arterial promovido pela inibição simpática central (238).

Apesar de algumas classes de anti-hipertensivos não serem capazes de reverter a rarefação microvascular, estudos clínicos e experimentais suportam a hipótese que a redução da pressão arterial possui um papel central na reversão das alterações microcirculatórias presentes na hipertensão arterial (9, 11, 12, 34, 235, 239). Logo, o potencial anti-hipertensivo da sinvastatina, evidenciado pela diminuição na pressão arterial, de maneira independente dos seus efeitos sobre os níveis séricos de colesterol, pode estar diretamente associado com a reversão das alterações microcirculatórias observadas no presente estudo. Nos SHR, o endotélio microvascular está exposto ao aumento no estresse oxidativo (240-242), como também observado no presente estudo. As ROS modulam diversas funções e exercem efeitos secundários sobre a microvasculatura, como por exemplo, uma inibição da vasodilatação dependente de endotélio, e aumento no rolamento e adesão de leucócitos. Logo, o aumento do

estresse oxidativo observado no presente estudo pode ter contribuído de maneira importante para o déficit na vasodilatação dependente de endotélio, assim como um aumento nas interações leucócito-endotélio nos animais hipertensos.

O estresse oxidativo também possui um papel relevante na disfunção microvascular presente nos SHR, induzindo a apoptose de células endoteliais, e o desaparecimento de microvasos contribui para rarefação capilar presente nesses animais (10). Além disso, o tratamento de SHR com antioxidantes induziu um efeito anti-apoptótico sobre células endoteliais da microcirculação, e preveniu a rarefação em SHR jovens (10). Nós observamos que o tratamento com sinvastatina foi eficaz em reduzir o estresse oxidativo nos SHR, caracterizado pela diminuição da peroxidação lipídica e aumento das defesas antioxidantes, o que pode ter contribuído de forma significativa para a reversão da disfunção microcirculatória presente neste modelo de hipertensão.

Além disso, tem sido descrito que as estatinas são capazes de aumentar o número de células progenitoras endoteliais circulantes (EPCs) (243). As EPCs aumentam em resposta a neovascularização induzida por isquemia (244), aceleram a formação do endotélio vascular na carótida após lesão (245) e melhoram a função cardíaca pós-isquêmica (246). Foi demonstrado que as estatinas induzem angiogênese através da promoção de proliferação, migração e sobrevivência das EPCs circulantes (247). Em pacientes com doença coronariana estável, a administração de estatinas durante quatro semanas aumentou o número de EPCs circulantes e aumentou a capacidade funcional desses pacientes (248). Estudos anteriores mostraram que as estatinas mobilizam rapidamente as EPCs da medula óssea e aceleram a formação da estrutura vascular através da ativação da PI3 kinase/Akt e eNOS (249). Esses efeitos foram observados com baixas concentrações de estatinas e foram independentes dos níveis de colesterol.

Alterações nas interações leucócito-endotélio possuem um papel importante no desenvolvimento das lesões em órgãos-alvo associada com a hipertensão arterial. A leucocitose e aumento na ativação leucocitária são importantes fatores de risco na hipertensão arterial (250). A ativação de leucócitos contribui para a liberação de fatores pró-inflamatórios e ROS, que possuem efeitos deletérios sobre o tônus vascular e endotélio (251). Na hipertensão, os leucócitos ativados contribuem para o aumento no estresse oxidativo pelo aumento da atividade da NADPH-oxidase e peroxidação lipídica e reduzindo as concentrações da superóxido dismutase. Além disso, o aumento na expressão de moléculas de adesão, como a integrina β_2 , também contribui para um aumento no rolamento e adesão de leucócitos. Esses eventos combinados contribuem significativamente para o dano vascular induzido na hipertensão arterial.

Nesse sentido, o tratamento agudo com sinvastatina também reduziu o perfil inflamatório na microcirculação cerebral de ratos hipertensos. Dentre os diversos mecanismos anti-inflamatórios atribuídos às estatinas, a possível ação anti-inflamatória diminuindo a ativação endotelial parece ser a mais relevante. A interação leucócito-endotélio vascular representa uma etapa crucial para o processo aterogênico (252). O aumento da adesão de leucócitos ao endotélio vascular ocorre inicialmente em detrimento do aumento da expressão de moléculas de adesão como P-selectina, E-selectina e ICAM-1 na superfície das células endoteliais (253). A família das proteínas Rho GTPases é essencial na sinalização intracelular, responsável por regular uma série de respostas celulares como a adesão e a migração celular (253). As proteínas Rho GTPases afetam a expressão de algumas moléculas de adesão nas células endoteliais, como ICAM-1 e E-selectina, induzidas por mediadores pró-inflamatórios, hipóxia e estresse traumático (253). Assim, a redução na concentração intracelular dos isoprenóides responsáveis pela ativação das proteínas Rho poderia estar envolvida na redução do rolamento e adesão de leucócitos cerebrais observado em ratos hipertensos tratados com as estatinas. A instalação do processo inflamatório está diretamente relacionada com a disfunção endotelial, e com a evolução das alterações microcirculatórias da hipertensão.

Na hipertensão, o aumento na expressão de moléculas de adesão, como a β 2-integrina, contribui para o rolamento e adesão de leucócitos no endotélio vascular. Esses eventos associados à disfunção microvascular contribuem para o dano vascular que acompanha a hipertensão arterial (251). Independente do mecanismo tradicional de inibição da HMG-CoA, as estatinas podem se ligar a um novo sítio alostérico dentro de uma integrina (*β 2-integrina function-associated antigen-1 -LFA-1*), independentemente da produção do mevalonato (254). A LFA-1 pertence a uma família de integrinas e possui um papel importante no tráfego leucocitário e na ativação de linfócitos T. Logo, as estatinas também poderiam inibir as interações leucócito-endotélio, inibindo a interação da LFA-1 e da molécula de adesão intercelular (ICAM-1).

Os leucócitos apresentam maiores níveis de ativação em SHR do que em ratos normotensos (255). A liberação de ROS por leucócitos ativados podem inativar o NO, e contribuir para a disfunção endotelial, além de contribuir para inflamação (256) e a ativação de neutrófilos pode favorecer a adesão leucocitária ao endotélio vascular promovendo um aumento na inativação do NO pelo superóxido. O NO, em contrapartida, é um inibidor endógeno da adesão leucocitária em vênulas pós-capilares (255). Logo, o aumento da biodisponibilidade de NO associado à diminuição da ativação endotelial parece ser uma das

propriedades pleiotrópicas das estatinas de considerável importância e com alto potencial na terapia e prevenção das lesões cerebrais induzidas na hipertensão.

A hipertensão arterial induz importantes alterações na morfologia vascular cerebral, fluxo sanguíneo cerebral e reatividade vascular, que podem levar a hipoperfusão cerebral e redução da reserva cerebrovascular, aumentando a susceptibilidade a desordens no cérebro, como o AVC isquêmico (257) e declínio nas funções cognitivas (258). As avaliações das alterações cerebrovasculares funcionais e estruturais na hipertensão são importantes para aprimorar a caracterização dos efeitos deletérios da hipertensão sobre o sistema nervoso central, assim como avaliar novas estratégias terapêuticas.

O SHR, como descrito anteriormente, é um modelo de hipertensão bem estabelecido. Diversos estudos têm investigado alterações no diâmetro de artérias cerebrais, fluxo sanguíneo basal e reatividade vascular, utilizando diversas técnicas *in vivo* e *ex vivo*. O fluxo sanguíneo cerebral basal tem sido reportado como similar (259, 260), menor (261, 262) ou maior (263) do que animais normotensos. As respostas do fluxo sanguíneo cerebral a uma condição de hipercapnia têm sido reportadas em diferentes estudos, podendo o fluxo sanguíneo cerebral aumentar (264), diminuir (7) ou permanecer inalterado (265) em estágios similares da hipertensão. OS efeitos da hipertensão sobre o lúmen vascular também variam significativamente em diferentes estudos. Essas inconsistências podem surgir de diferenças no estágio hipertensivo, das técnicas utilizadas nos experimentos, região do cérebro analisadas, uso de anestésicos, dentre outros fatores.

No presente estudo, ratos hipertensos apresentaram uma redução importante no fluxo sanguíneo cerebral basal, quando comparados com ratos normotensos. Além disso, o tratamento de ratos hipertensos com sinvastatina durante três dias foi capaz de normalizar o fluxo sanguíneo cerebral quando comparado com ratos hipertensos não tratados. Foi demonstrado que a atorvastatina é capaz de aumentar o fluxo sanguíneo cerebral, em ratos hipertensos com tendência a desenvolver acidente vascular cerebral (*stroke-prone-SHR*), conferindo proteção contra o AVC induzido neste modelo de hipertensão (266). Assim como observado no presente estudo, a neuroproteção induzida pelas estatinas foi em parte devida à melhora na função endotelial cerebral.

No presente estudo, a sinvastatina reverteu de forma significativa a disfunção microcirculatória cerebral, evidenciado pela associação do aumento no número de capilares espontaneamente perfundidos, aumento da reatividade vascular dependente do endotélio, aumento na expressão da eNOS cerebral e redução do estresse oxidativo, que podem

conjuntamente terem contribuído para a normalização do fluxo sanguíneo cerebral dos ratos hipertensos tratados com a sinvastatina.

O sistema renina angiotensina possui um papel central na regulação da pressão arterial e regulação do fluxo sanguíneo cerebral (267). O SHR apresenta alterações cerebrovasculares, incluindo modificações na expressão da eNOS e inflamação de microvasos cerebrais, e o bloqueio do SRA é capaz de reverter essas alterações (268-271). A Ang II circulante e gerada localmente controla o fluxo sanguíneo cerebral através da estimulação dos receptores AT₁ em vasos cerebrais e da estimulação simpática (272-274). Os sistemas renina angiotensina e simpático estão superativados em SHR (275), aumentando o tônus vasoconstritor, e reduzindo a capacidade de vasos cerebrais dilatarem durante situações de hipoperfusão (276).

Tem sido descrito que as estatinas podem reduzir a pressão arterial através de uma regulação direta do SRA, inibindo a síntese e via de sinalização da Ang II e reduzindo o estresse oxidativo e inflamação mediado pelo SRA.

No presente estudo, foi observado que ratos hipertensos apresentaram uma diminuição significativa do fluxo sanguíneo cerebral após a administração local de Ang II, ao passo que o fluxo sanguíneo cerebral de ratos normotensos aumentou em resposta a aplicação tópica de Ang II na janela craniana. De acordo com estudos anteriores, também foi observado que os ratos hipertensos apresentaram uma menor expressão dos receptores AT₂ cerebral quando comparados com ratos normotensos.

Foi demonstrado que a Ang II, na mesma concentração utilizada no nosso estudo, induz vasodilatação dependente do endotélio em arteríolas cerebrais de ratos Wistar (277), através da ativação dos receptores AT₂. Os receptores AT₂ quando estimulados agudamente sinalizam para a produção de NO aumentando a vasodilatação dependente do endotélio (278). Zhou e colaboradores descreveram um SRA local ativo em microvasos cerebrais de SHR, que apresentam uma maior expressão dos receptores AT₁ e uma expressão reduzida dos receptores AT₂, comparado com ratos normotensos (279). Esse padrão na expressão dos receptores da Ang II contribui para um aumento do padrão vasoconstritor e perfil inflamatório na hipertensão. A hiperativação do SRA no SHR, caracterizada por um aumento da ativação do receptor AT₁ da Ang II leva a um aumento na vasoconstricção de microvasos cerebrais e redução da perfusão cerebral. O bloqueio dos receptores AT₁ restaura a complacência cerebrovascular, sugerindo um papel importante do receptor AT₂ na regulação do fluxo sanguíneo cerebral (279).

As estatinas são capazes de reduzir a expressão dos receptores AT₁, através de mecanismos dependentes (280) ou não dos níveis de colesterol (281, 282). No entanto, não

existem estudos investigando a interação das estatinas com os receptores AT₂ na hipertensão arterial independente dos níveis de colesterol. No presente estudo, o tratamento de ratos hipertensos com sinvastatina foi capaz de aumentar a expressão dos receptores AT₂ no cérebro e atenuar a diminuição no fluxo sanguíneo cerebral induzida pela Ang II, quando comparado com ratos hipertensos não tratados

Nos últimos anos tem sido firmemente estabelecido que diferentemente do SRA clássico, incluindo a Ang II, a enzima conversora de angiotensina e o receptor AT₁ da Ang II, também existe um eixo contra regulatório benéfico do SRA que incluem o receptor AT₂, a Ang-(1-7), dentre outros (283, 284). Estudos recentes têm demonstrado que a estimulação do receptor AT₂ é capaz de aumentar o fluxo sanguíneo cerebral em modelos de isquemia cerebral (284), além de modular os efeitos deletérios do receptor AT₁ (283).

Logo, as estatinas podem interagir com o SRA através de diferentes mecanismos, reduzindo a expressão dos receptores AT₁ (280-282), a sinalização intracelular dependente da Ang II (285-287), o estresse oxidativo (99, 100) e inflamação (285), assim como diminuindo a síntese de Ang II e aldosterona (288, 289). Até o momento, o presente estudo foi o primeiro a demonstrar que a sinvastatina é capaz de aumentar a expressão dos receptores AT₂ no cérebro, de maneira independente de alterações dos níveis plasmáticos de colesterol, na hipertensão arterial.

Logo, o aumento na expressão dos receptores AT₂ no cérebro de ratos hipertensos tratados com sinvastatina pode ter contribuído com os efeitos pleiotrópicos benéficos das estatinas sobre o fluxo sanguíneo cerebral e atenuação dos efeitos deletérios da Ang II sobre a microcirculação cerebral. No entanto, mais estudos são necessários para uma melhor investigação da influência da sinalização via receptor AT₂ nos efeitos vasculares cerebrais das estatinas. A combinação do potencial anti-hipertensivo e modulador do SRA podem contribuir de forma importante para a neuroproteção mediada pelas estatinas na hipertensão arterial.

Tem sido demonstrado que as estatinas são capazes de reduzir a disfunção endotelial e diminuir a permeabilidade e formação de edema em diferentes modelos experimentais e clínicos. Em pacientes hipercolesterolêmicos, o tratamento com sinvastatina durante um mês, foi capaz de normalizar a taxa de escape transcápicular de albumina, de uma forma independente dos níveis lipídicos (290).

O tratamento com sinvastatina em coelhos com hiperlipidemia reduziu o extravasamento vascular na região torácica e abdominal, evidenciado indiretamente com o

corante Azul de Evans (291). Mooradian e colaboradores demonstraram em modelo de diabetes em ratos induzido por estreptozotocina que o tratamento com sinvastatina durante cinco semanas foi capaz de melhorar a função da barreira endotelial no cérebro, retina e miocárdio (292). Além disso, em um modelo de lesão pulmonar aguda induzida pela injeção intratraqueal de LPS, a administração de sinvastatina 24 horas antes e juntamente com a administração de LPS foi capaz de diminuir os níveis de albumina no lavado broncoalveolar em aproximadamente 50% e o extravasamento do corante Azul de Evans conjugado a albumina para o parênquima pulmonar (293).

Beziaud e colaboradores demonstraram que a administração aguda de sinvastatina reduziu a formação de edema cerebral, e a permeabilidade da barreira-hematoencefálica após a indução de trauma cerebral em ratos (294). Também foi demonstrado, em um modelo experimental de hemorragia intracerebral em ratos, que o tratamento com sinvastatina aumentou o fluxo sanguíneo cerebral na região lesada, e reduziu a permeabilidade da barreira hematoencefálica e edema cerebral (295).

A sinvastatina também reduziu a permeabilidade da barreira hematoencefálica quando administrada 30 minutos após a isquemia cerebral induzida pela oclusão da artéria cerebral média (296). Logo, a sinvastatina possui um grande potencial para proteger a barreira endotelial e reduzir a permeabilidade vascular, no entanto mais estudos são necessários para melhor caracterização dos mecanismos envolvidos nesse processo, uma vez que grande parte dos estudos avaliou as alterações na permeabilidade de uma forma indireta, através do edema intersticial e extravasamento do Azul de Evans.

Tem sido demonstrado que a bradicinina participa ativamente no processo de desregulação da barreira hematoencefálica e formação de edema em diferentes processos fisiopatológicos, incluindo o AVC (297, 298). O tratamento com um antagonista dos receptores de bradicinina após isquemia cerebral reduziu a formação de edema e área de infarto (299). A bradicinina e a IL-1 β participam na formação de edema cerebral após a ocorrência de AVC e na isquemia cerebral experimental, e ambos tem sido sugerido como alvos terapêuticos para o tratamento do AVC (300, 301). A IL-1 β é rapidamente liberada no parênquima cerebral após um evento isquêmico levando à ativação da NADPH, aumentando a permeabilidade à bradicinina. Além disso, a liberação de bradicinina e IL-1 β contribui para a geração de ROS no estágio precoce da isquemia-reperfusão cerebral. A aplicação de IL-1 β sozinha é capaz de aumentar a formação de superóxido em células endoteliais (302) e células epiteliais da retina, através da ativação da NADPH oxidase (303).

De acordo com estudos anteriores (205, 216), nós observamos que após a aplicação de apocinina, um inibidor específico da NADPH oxidase, durante a aplicação da IL-1 β , diminuiu

a resposta a aplicação a bradicinina, no entanto não houve diferença estatística entre os grupos. A rápida inibição da NADPH oxidase pela apocinina ocorre pelo bloqueio da migração da subunidade citosólica p47phox para a membrana celular, inibindo a ativação do complexo enzimático da NADPH oxidase (304).

O pré-tratamento com sinvastatina comparado com a aplicação de apocinina, inibiu de forma mais eficaz a ação da IL-1 β sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida pela a bradicinina, sugerindo que parte dos efeitos protetores mediados pela sinvastatina sobre a permeabilidade microvascular ocorra através da inibição da NADPH oxidase.

As estatinas podem inibir a atividade da NADPH oxidase através da inibição da isoprenilação da proteína Rac1 (305). A Rac1 é crucial para a atividade da NADPH oxidase, uma vez que três dos cinco componentes da enzima, p40phox, p47phox, and p67phox, se encontram no citosol formando um complexo inativo, e para ativação da NADPH oxidase é necessário que a Rac1 se ligue ao GTP e, em seguida, migre juntamente com o complexo citoplasmático para a membrana celular (306). As estatinas, ao inibirem a modificação pós-traducional da Rac1, através da inibição da conjugação ao geranylgeranilpirofosfato (GGPP), inibem a migração do núcleo citosólico da NADPH oxidase para a membrana plasmática, consequentemente inibindo a atividade enzimática e reduzindo a produção de ROS (305). De fato, um ensaio clínico demonstrou que o tratamento oral com estatinas em pacientes com insuficiência cardíaca foi capaz de diminuir a função da Rac1, a atividade da NADPH oxidase, reduzindo os níveis de ROS (30).

Foi demonstrado que a hiperpermeabilidade induzida pela bradicinina em microvasos cerebrais é dependente da liberação de radicais livres (205, 216). No presente estudo foi observado que a sinvastatina foi capaz de reduzir a permeabilidade induzida pela bradicinina. ROS regulam negativamente a adesão célula-célula controlada por moléculas intercelulares de adesão, como a VE-caderina endotelial, β -catenina que estão ligadas a moléculas transmembrana e ao citoesqueleto de actina. Além da produção de ROS, a ativação da RhoA é importante para a permeabilidade induzida pela bradicinina (307), a ativação da RhoA-GTP induz a contração do citoesqueleto de actina resultando na quebra da barreira endotelial.

As estatinas são capazes de reduzir o estresse oxidativo bloqueando a geração de ROS assim como inibir a isoprenilação e ativação da RhoA (58) Logo, a proteção da barreira endotelial induzido pelo tratamento com sinvastatina, prevenindo o aumento na permeabilidade vascular induzido pela bradicinina, provavelmente é devido a uma dupla ação inibitória da sinvastatina sobre os efeitos da RhoA, Rac1, assim como a geração de ROS via NADPH oxidase nas células endoteliais. De fato, tem sido demonstrado que as estatinas

podem proteger a barreira endotelial através da regulação de GTPases, como a RhoA e Rac1, e inibição da NADPH oxidase, como descrito anteriormente (291, 308).

Experimentalmente, uma característica importante do modelo *ex vivo* de hiperpermeabilidade induzida pela bradicinina no músculo cremáster foi o controle fino das condições experimentais e a realização de experimentos pareados avaliando as variações na permeabilidade no mesmo vaso, ao longo do ensaio, antes e após a aplicação de bradicinina.

Devido à falta de fluxo ao longo do experimento, a permeabilidade a albumina (FITC-albumina) após a aplicação de bradicinina ao leito microvascular foi quantificada de forma precisa sem a influência de variações na pressão hidrostática. A remoção do sangue através da perfusão aórtica também garantiu que as alterações na permeabilidade microvascular fossem somente atribuídas aos efeitos diretos da bradicinina sobre as células endoteliais, e não efeitos indiretos das células sanguíneas ativadas, por exemplo.

A viabilidade do músculo após os procedimentos descritos na metodologia foi de aproximadamente 3 horas. No entanto, foram investigados os efeitos agudos da bradicinina sobre a permeabilidade vascular, sendo que cada experimento com um animal durou cerca de 60 minutos. Logo, a utilização do modelo *ex vivo* manteve a estrutura e integridade funcional da vasculatura em termos de junções intercelulares endoteliais e matriz extracelular, conservando importantes fatores presentes no tecido *in vivo*. Um fator importante do modelo *ex vivo* é um melhor controle das condições experimentais, e manutenção da pressão hidrostática constante ao longo do experimento. Além de excluir a necessidade de manutenção dos parâmetros fisiológicos e anestesia durante o experimento.

10.. Conclusões

A microcirculação representa um importante alvo das ações pleiotrópicas da sinvastatina na hipertensão, evidenciado pela reversão da rarefação microvascular, melhora da função endotelial microvascular e fluxo sanguíneo cerebral, prevenção das interações leucócitos-endotélio e redução no estresse oxidativo. Além disso, as ações das estatinas sobre o aumento da permeabilidade vascular podem contribuir significativamente para o tratamento e prevenção de pacientes com predisposição a elevada permeabilidade capilar, e formação de edema. Desta forma, os efeitos microvasculares e cardiovasculares independentes dos níveis de colesterol das estatinas observados no presente estudo podem contribuir sobremaneira para a ampliação das indicações terapêuticas dessa classe farmacológica na hipertensão arterial.

11. Referências bibliográficas

1. Li Y, Shen Q, Huang S, Li W, Muir ER, Long JA, et al. Cerebral angiography, blood flow and vascular reactivity in progressive hypertension. *NeuroImage*. 2015;111:329-37.
2. Ferreira RA, Barreto SM, Giatti L. [Self-reported hypertension and non-adherence to continuous-use medication in Brazil: a population-based study]. *Cadernos de saude publica*. 2014;30(4):815-26.
3. Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiological reviews*. 1982;62(2):347-504.
4. Okamoto K, Tabei R, Fukushima M, Nosaka S, Yamori Y. Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese circulation journal*. 1966;30(6):703-16.
5. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese circulation journal*. 1963;27:282-93.
6. Sabbatini M, Strocchi P, Vitaioli L, Amenta F. Microanatomical changes of intracerebral arteries in spontaneously hypertensive rats: a model of cerebrovascular disease of the elderly. *Mechanisms of ageing and development*. 2001;122(12):1257-68.
7. Leoni RF, Paiva FF, Henning EC, Nascimento GC, Tannus A, de Araujo DB, et al. Magnetic resonance imaging quantification of regional cerebral blood flow and cerebrovascular reactivity to carbon dioxide in normotensive and hypertensive rats. *NeuroImage*. 2011;58(1):75-81.
8. Meneses A, Hong E. Spontaneously hypertensive rats: a potential model to identify drugs for treatment of learning disorders. *Hypertension*. 1998;31(4):968-72.
9. Safar ME, Struijker-Boudier HA. Cross-talk between macro- and microcirculation. *Acta physiologica*. 2010;198(4):417-30.
10. Kobayashi N, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Oxidative stress promotes endothelial cell apoptosis and loss of microvessels in the spontaneously hypertensive rats. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(10):2114-21.
11. Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HA. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation*. 2001;104(6):735-40.
12. Sabino B, Lessa MA, Nascimento AR, Rodrigues CA, Henriques M, Garzoni LR, et al. Effects of antihypertensive drugs on capillary rarefaction in spontaneously hypertensive rats: intravital microscopy and histologic analysis. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2008;51(4):402-9.
13. Prewitt RL, Chen, II, Dowell R. Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat. *The American journal of physiology*. 1982;243(2):H243-51.
14. Haack DW, Schaffer JJ, Simpson JG. Comparisons of cutaneous microvessels from spontaneously hypertensive, normotensive Wistar-Kyoto, and normal Wistar rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1980;164(4):453-8.
15. Lapi D, Marchiafava PL, Colantuoni A. Geometric characteristics of arterial network of rat pial microcirculation. *Journal of vascular research*. 2008;45(1):69-77.
16. Bautista LE. Blood pressure-lowering effects of statins: who benefits? *Journal of hypertension*. 2009;27(7):1478-84.
17. Safar ME, Protogerou AD, Blacher J. Statins, central blood pressure, and blood pressure amplification. *Circulation*. 2009;119(1):9-12.
18. Trompet S, Jukema JW, Ford I, Shepherd J, Gussekloo J, Buckley BM, et al. Statins and blood pressure. *Archives of internal medicine*. 2008;168(21):2383.
19. Kassan M, Montero MJ, Sevilla MA. Chronic treatment with pravastatin prevents early cardiovascular changes in spontaneously hypertensive rats. *British journal of pharmacology*. 2009;158(2):541-7.

20. Sicard P, Delemasure S, Korandji C, Segueira-Le Grand A, Lauzier B, Guillard JC, et al. Anti-hypertensive effects of Rosuvastatin are associated with decreased inflammation and oxidative stress markers in hypertensive rats. *Free radical research*. 2008;42(3):226-36.
21. Jiang J, Sun CW, Alonso-Galicia M, Roman RJ. Lovastatin reduces renal vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension*. 1998;11(10):1222-31.
22. Kamberi LS, Bedri Bakalli A, Muhamet Budima N, Rashit Gorani D, Karabulut AM, Talat Pallaska K. Pleiotropic and Lipid-lowering Effects of Statins in Hypertension. *Materia socio-medica*. 2012;24(2):84-6.
23. Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2010;74(5):818-26.
24. Dohi T. Do statins have a specific drug effect beyond low-density lipoprotein-cholesterol-lowering in the secondary prevention of coronary artery disease? *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2015;79(1):49-50.
25. Pisciotta L, Bertolini S, Pende A. Lipoproteins, stroke and statins. *Current vascular pharmacology*. 2015;13(2):202-8.
26. Nassief A, Marsh JD. Statin therapy for stroke prevention. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2008;39(3):1042-8.
27. Nakagami H, Liao JK. Statins and myocardial hypertrophy. *Coronary artery disease*. 2004;15(5):247-50.
28. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:89-118.
29. Xiao H, Qin X, Ping D, Zuo K. Inhibition of Rho and Rac geranylgeranylation by atorvastatin is critical for preservation of endothelial junction integrity. *PLoS One*. 2013;8(3):e59233.
30. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schafers HJ, Nickenig G, Bohm M, et al. Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation*. 2003;108(13):1567-74.
31. Liao JK. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin Invest*. 2013;123(2):540-1.
32. Rikitake Y, Liao JK. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circulation research*. 2005;97(12):1232-5.
33. Katsumoto M, Shingu T, Kuwashima R, Nakata A, Nomura S, Chayama K. Biphasic effect of HMG-CoA reductase inhibitor, pitavastatin, on vascular endothelial cells and angiogenesis. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2005;69(12):1547-55.
34. Debbabi H, Uzan L, Mourad JJ, Safar M, Levy BI, Tibirica E. Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients. *American journal of hypertension*. 2006;19(5):477-83.
35. Feihl F, Liaudet L, Waeber B, Levy BI. Hypertension: a disease of the microcirculation? *Hypertension*. 2006;48(6):1012-7.
36. Chen, II, Prewitt RL, Dowell RF. Microvascular rarefaction in spontaneously hypertensive rat cremaster muscle. *The American journal of physiology*. 1981;241(3):H306-10.
37. Thom S. Arterial structural modifications in hypertension. Effects of treatment. *Eur Heart J*. 1997;18 Suppl E:E2-4.
38. Regrigny O, Atkinson J, Capdeville-Atkinson C, Liminana P, Chillon JM. Effect of lovastatin on cerebral circulation in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2000;35(5):1105-10.

39. Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & metabolism*. 2010;7:47.
40. Gordon T, Kannel WB. Premature mortality from coronary heart disease. The Framingham study. *Jama*. 1971;215(10):1617-25.
41. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Annals of internal medicine*. 1971;74(1):1-12.
42. Adhyaru BB, Jacobson TA. New cholesterol guidelines for the management of atherosclerotic cardiovascular disease risk: a comparison of the 2013 American College of Cardiology/American Heart Association cholesterol guidelines with the 2014 National Lipid Association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia. *Cardiology clinics*. 2015;33(2):181-96.
43. Muller-Wieland D, Assmann G, Carmena R, Davignon J, von Eckardstein A, Farinero E, et al. Treat-to-target versus dose-adapted statin treatment of cholesterol to reduce cardiovascular risk. *European journal of preventive cardiology*. 2016;23(3):275-81.
44. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*. 2001;292(5519):1160-4.
45. Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(7):3957-61.
46. Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS letters*. 1976;72(2):323-6.
47. Alberts AW. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *The American journal of cardiology*. 1988;62(15):10J-5J.
48. Illingworth DR, Tobert JA. HMG-CoA reductase inhibitors. *Advances in protein chemistry*. 2001;56:77-114.
49. Moghadasian MH. Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life sciences*. 1999;65(13):1329-37.
50. Blum CB. Comparison of properties of four inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *The American journal of cardiology*. 1994;73(14):3D-11D.
51. Dansette PM, Jaoen M, Pons C. HMG-CoA reductase activity in human liver microsomes: comparative inhibition by statins. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2000;52(2):145-8.
52. GERMERSHAUSEN JI, HUNT VM, BOSTEDOR RG, BAILEY PJ, KARKAS JD, ALBERTS AW. Tissue selectivity of the cholesterol-lowering agents lovastatin, simvastatin and pravastatin in rats in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;158(3):667-75.
53. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes & development*. 1997;11(18):2295-322.
54. Sit ST, Manser E. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *Journal of cell science*. 2011;124(Pt 5):679-83.
55. Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;106(1):57-62.
56. Loirand G, Pacaud P. Involvement of Rho GTPases and their regulators in the pathogenesis of hypertension. *Small GTPases*. 2014;5(4):1-10.
57. Shaw D, Hollingworth G, Soldermann N, Sprague E, Schuler W, Vangrevelinghe E, et al. Novel ROCK inhibitors for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2014;24(20):4812-7.

58. Nishimura J, Bi D, Kanaide H. Dependence of proliferating dedifferentiated vascular smooth muscle contraction on Rho-Rho kinase system. *Trends in cardiovascular medicine*. 2006;16(4):124-8.
59. Merajver SD, Usmani SZ. Multifaceted role of Rho proteins in angiogenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2005;10(4):291-8.
60. Pan M, Jing HM, Zhu JH, Liu ZH, Jiang WP, Yang XJ. Rho-kinase inhibitor may exert a role in preventing cardiac hypertrophy, independent of antihypertensive effects. *Medical hypotheses*. 2007;68(1):234.
61. Gao HC, Zhao H, Zhang WQ, Li YQ, Ren LQ. The role of the Rho/Rock signaling pathway in the pathogenesis of acute ischemic myocardial fibrosis in rat models. *Experimental and therapeutic medicine*. 2013;5(4):1123-8.
62. Ahmed LA, Darwish HA, Abdelsalam RM, Amin HA. Role of Rho Kinase Inhibition in the Protective Effect of Fasudil and Simvastatin Against 3-Nitropropionic Acid-Induced Striatal Neurodegeneration and Mitochondrial Dysfunction in Rats. *Molecular neurobiology*. 2015.
63. Odagiri K, Watanabe H. Effects of the Rho-kinase inhibitor, fasudil, on pulmonary hypertension. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2015;79(6):1213-4.
64. Xiao JW, Zhu XY, Wang QG, Zhang DZ, Cui CS, Zhang P, et al. Acute effects of Rho-kinase inhibitor fasudil on pulmonary arterial hypertension in patients with congenital heart defects. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2015;79(6):1342-8.
65. Gorzalczany Y, Sigal N, Itan M, Lotan O, Pick E. Targeting of Rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(51):40073-81.
66. Takemura Y, Goodson P, Bao HF, Jain L, Helms MN. Rac1-mediated NADPH oxidase release of O₂⁻ regulates epithelial sodium channel activity in the alveolar epithelium. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2010;298(4):L509-20.
67. Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, et al. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(10):1429-37.
68. Hermida N, Balligand JL. Low-density lipoprotein-cholesterol-induced endothelial dysfunction and oxidative stress: the role of statins. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(8):1216-37.
69. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(24):9265-9.
70. Radomski MW, Rees DD, Dutra A, Moncada S. S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *British journal of pharmacology*. 1992;107(3):745-9.
71. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *The Journal of clinical investigation*. 1989;83(5):1774-7.
72. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(11):4651-5.
73. Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefler AM. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995;15(10):1652-9.
74. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation*. 1997;95(1):76-82.

75. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *The New England journal of medicine*. 1995;332(8):488-93.
76. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, et al. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *The New England journal of medicine*. 1995;332(8):481-7.
77. O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation*. 1997;95(5):1126-31.
78. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 1998;97(12):1129-35.
79. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nature medicine*. 2000;6(9):1004-10.
80. Laufs U, Fata VL, Liao JK. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(50):31725-9.
81. Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B, Sraer JD, Friedlander G. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and Rho proteins. *Circulation research*. 1998;83(7):683-90.
82. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, et al. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(12):2711-9.
83. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(37):24266-71.
84. Laufs U, Endres M, Custodis F, Gertz K, Nickenig G, Liao JK, et al. Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation*. 2000;102(25):3104-10.
85. Laufs U, Endres M, Stagliano N, Amin-Hanjani S, Chui DS, Yang SX, et al. Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(1):15-24.
86. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Moniotte S, Balligand JL, Feron O. Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circulation research*. 2001;89(10):866-73.
87. Plenz GA, Hofnagel O, Robenek H. Differential modulation of caveolin-1 expression in cells of the vasculature by statins. *Circulation*. 2004;109(2):e7-8; author reply e7-8.
88. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399(6736):601-5.
89. Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nature medicine*. 2000;6(12):1362-7.
90. Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(6):897-905.
91. Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, et al. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*. 2001;154(1):87-96.

92. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Dzau VJ. Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation*. 1998;98(1):82-9.
93. Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H, Johnson JA, Yeatman L, Wang XM, et al. Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *The New England journal of medicine*. 1995;333(10):621-7.
94. Loirand G, Pacaud P. Involvement of Rho GTPases and their regulators in the pathogenesis of hypertension. *Small GTPases*. 2014;5.
95. Kang S, Woo HH, Kim K, Lim KM, Noh JY, Lee MY, et al. Dysfunction of vascular smooth muscle and vascular remodeling by simvastatin. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2014;138(2):446-556.
96. Makabe S, Takahashi Y, Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Ito H. Fluvastatin protects vascular smooth muscle cells against oxidative stress through the Nrf2-dependent antioxidant pathway. *Atherosclerosis*. 2010;213(2):377-84.
97. Lim S, Barter P. Antioxidant effects of statins in the management of cardiometabolic disorders. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2014;21(10):997-1010.
98. Stoll LL, McCormick ML, Denning GM, Weintraub NL. Antioxidant effects of statins. *Timely topics in medicine Cardiovascular diseases*. 2005;9:E1.
99. Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, et al. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(2):300-5.
100. Alvarez E, Rodino-Janeiro BK, Uceda-Somoza R, Gonzalez-Juanatey JR. Pravastatin counteracts angiotensin II-induced upregulation and activation of NADPH oxidase at plasma membrane of human endothelial cells. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2010;55(2):203-12.
101. Drapala A, Sikora M, Ufnal M. Statins, the renin-angiotensin-aldosterone system and hypertension - a tale of another beneficial effect of statins. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2014;15(3):250-8.
102. Hassan HM, Al-Gayyar MM, El-Gayar AM, Ibrahim TM. Effect of simvastatin on inflammatory cytokines balance in air pouch granuloma model. *Inflammation & allergy drug targets*. 2014;13(1):74-9.
103. Drinitsina SV, Zateishchikov DA. [Antioxidant properties of statins]. *Kardiologiya*. 2005;45(4):65-72.
104. Abdel Aziz MT, El-Asmar MF, Mostafa T, Atta H, Fouad HH, Roshdy NK, et al. Effect of hemin and carbon monoxide releasing molecule (CORM-3) on cGMP in rat penile tissue. *The journal of sexual medicine*. 2008;5(2):336-43.
105. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987;235(4792):1043-6.
106. Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(9):5375-81.
107. Nath KA, Haggard JJ, Croatt AJ, Grande JP, Poss KD, Alam J. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *The American journal of pathology*. 2000;156(5):1527-35.
108. Dennery PA, Spitz DR, Yang G, Tatarov A, Lee CS, Shegog ML, et al. Oxygen toxicity and iron accumulation in the lungs of mice lacking heme oxygenase-2. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(5):1001-11.
109. Gonzalez JM, Pedroni SM, Girardi G. Statins prevent cervical remodeling, myometrial contractions and preterm labor through a mechanism that involves hemoxygenase-1 and complement inhibition. *Molecular human reproduction*. 2014;20(6):579-89.
110. Tu YP, Chuang SJ, Chen SC, Liu YH, Chen CF, Hour TC. Simvastatin induces the expression of hemoxygenase-1 against ischemia-reperfusion injury on the testes in rats. *Toxicology letters*. 2011;207(3):242-50.

111. Hsu HH, Ko WJ, Hsu JY, Chen JS, Lee YC, Lai IR, et al. Simvastatin ameliorates established pulmonary hypertension through a heme oxygenase-1 dependent pathway in rats. *Respiratory research*. 2009;10:32.
112. Hsu HH, Ruan T, Ko WJ, Hsu JY, Chen JS, Lee YC, et al. Effects of simvastatin on pulmonary C-fiber sensitivity in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2011;30(3):332-40.
113. Gueler F, Park JK, Rong S, Kirsch T, Lindschau C, Zheng W, et al. Statins attenuate ischemia-reperfusion injury by inducing heme oxygenase-1 in infiltrating macrophages. *The American journal of pathology*. 2007;170(4):1192-9.
114. Deedwania PC, Stone PH, Fayyad RS, Laskey RE, Wilson DJ. Improvement in Renal Function and Reduction in Serum Uric Acid with Intensive Statin Therapy in Older Patients: A Post Hoc Analysis of the SAGE Trial. *Drugs & aging*. 2015;32(12):1055-65.
115. Jiang J, Roman RJ. Lovastatin prevents development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30(4):968-74.
116. Goode GK, Heagerty AM. In vitro responses of human peripheral small arteries in hypercholesterolemia and effects of therapy. *Circulation*. 1995;91(12):2898-903.
117. Abdel-Zaher AO, Elkoussi AE, Abudahab LH, Elbakry MH, Elsayed EA. Effect of simvastatin on the antihypertensive activity of losartan in hypertensive hypercholesterolemic animals and patients: role of nitric oxide, oxidative stress, and high-sensitivity C-reactive protein. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2014;28(3):237-48.
118. Delgado-Montero A, Zamorano JL. Atorvastatin calcium plus amlodipine for the treatment of hypertension. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2012;13(18):2673-85.
119. Zhou MS, Jaimes EA, Raj L. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress. *Hypertension*. 2004;44(2):186-90.
120. Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Muller DN, Theuer J, Mervaala E, et al. Amelioration of angiotensin II-induced cardiac injury by a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor. *Circulation*. 2001;104(5):576-81.
121. Park JK, Muller DN, Mervaala EM, Dechend R, Fiebeler A, Schmidt F, et al. Cerivastatin prevents angiotensin II-induced renal injury independent of blood pressure- and cholesterol-lowering effects. *Kidney international*. 2000;58(4):1420-30.
122. Lee TM, Lin MS, Tsai CH, Chang NC. Effect of pravastatin on left ventricular mass in the two-kidney, one-clip hypertensive rats. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006;291(6):H2705-13.
123. Cheng WH, Ho WY, Chang CF, Lu PJ, Cheng PW, Yeh TC, et al. Simvastatin induces a central hypotensive effect via Ras-mediated signalling to cause eNOS up-regulation. *British journal of pharmacology*. 2013;170(4):847-58.
124. Flather MD, Yusuf S, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, et al. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet*. 2000;355(9215):1575-81.
125. Kjekshus J, Swedberg K, Snapinn S. Effects of enalapril on long-term mortality in severe congestive heart failure. CONSENSUS Trial Group. *The American journal of cardiology*. 1992;69(1):103-7.
126. Hashimoto S, Urushihara H, Hinotsu S, Kosugi S, Kawakami K. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on blood pressure in hypertensive patients treated with blood pressure-lowering agents: retrospective study using an anti-hypertensive drug database. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2012;16(2):235-41.
127. Ferrier KE, Muhlmann MH, Baguet JP, Cameron JD, Jennings GL, Dart AM, et al. Intensive cholesterol reduction lowers blood pressure and large artery stiffness in isolated systolic hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;39(6):1020-5.

128. Glorioso N, Troffa C, Filigheddu F, Dettori F, Soro A, Parpaglia PP, et al. Effect of the HMG-CoA reductase inhibitors on blood pressure in patients with essential hypertension and primary hypercholesterolemia. *Hypertension*. 1999;34(6):1281-6.
129. Borghi C, Prandin MG, Costa FV, Bacchelli S, Degli Esposti D, Ambrosioni E. Use of statins and blood pressure control in treated hypertensive patients with hypercholesterolemia. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2000;35(4):549-55.
130. Delbosc S, Cristol JP, Descomps B, Mimran A, Jover B. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension*. 2002;40(2):142-7.
131. Straznicky NE, Howes LG, Lam W, Louis WJ. Effects of pravastatin on cardiovascular reactivity to norepinephrine and angiotensin II in patients with hypercholesterolemia and systemic hypertension. *The American journal of cardiology*. 1995;75(8):582-6.
132. Tesfamariam B, Frohlich BH, Gregg RE. Differential effects of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin on Ca²⁺ release and vascular reactivity. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1999;34(1):95-101.
133. Ledingham JM, Lavery R. Effect of simvastatin given alone and in combination with valsartan or enalapril on blood pressure and the structure of mesenteric resistance arteries and the basilar artery in the genetically hypertensive rat model. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2005;32(1-2):76-85.
134. Sposito AC, Mansur AP, Coelho OR, Nicolau JC, Ramires JA. Additional reduction in blood pressure after cholesterol-lowering treatment by statins (lovastatin or pravastatin) in hypercholesterolemic patients using angiotensin-converting enzyme inhibitors (enalapril or lisinopril). *The American journal of cardiology*. 1999;83(10):1497-9, A8.
135. Tayebati SK, Tomassoni D, Amenta F. Spontaneously hypertensive rat as a model of vascular brain disorder: microanatomy, neurochemistry and behavior. *Journal of the neurological sciences*. 2012;322(1-2):241-9.
136. Struijker Boudier HA, le Noble JL, Messing MW, Huijberts MS, le Noble FA, van Essen H. The microcirculation and hypertension. *Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*. 1992;10(7):S147-56.
137. Boudier HA. [Hypertension and microcirculation]. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*. 2002;95 Spec No 6:17-22.
138. Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*. 1999;79(2):387-423.
139. Davis MJ. Myogenic response gradient in an arteriolar network. *Am J Physiol*. 1993;264(6 Pt 2):H2168-79.
140. Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Davis GE, Hill MA, et al. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(4):H1427-33.
141. Hill MA, Zou H, Potocnik SJ, Meininger GA, Davis MJ. Invited review: arteriolar smooth muscle mechanotransduction: Ca²⁺ signaling pathways underlying myogenic reactivity. *J Appl Physiol*. 2001;91(2):973-83.
142. Dabiri Askari A, Feihl F, Waeber B. [Arterial hypertension: macrocirculation and microcirculation]. *Rev Med Suisse*. 2009;5(216):1778-80, 82.
143. Feihl F, Liaudet L, Waeber B. The macrocirculation and microcirculation of hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2009;11(3):182-9.
144. Clough GF, Norman M. The microcirculation: a target for developmental priming. *Microcirculation*. 2011;18(4):286-97.
145. James MA, Tullett J, Hemsley AG, Shore AC. Effects of aging and hypertension on the microcirculation. *Hypertension*. 2006;47(5):968-74.
146. Struijker Boudier HA. Arteriolar and capillary remodelling in hypertension. *Drugs*. 1999;59 Spec No:37-40.

147. Fox DA, Gizinski A, Morgan R, Lundy SK. Cell-cell interactions in rheumatoid arthritis synovium. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2010;36(2):311-23.
148. Ley K, Tedder TF. Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *Journal of immunology*. 1995;155(2):525-8.
149. Jung U, Norman KE, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Ley K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(8):1526-33.
150. Kunkel EJ, Ley K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circulation research*. 1996;79(6):1196-204.
151. Ramos CL, Huo Y, Jung U, Ghosh S, Manka DR, Sarembock IJ, et al. Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation research*. 1999;84(11):1237-44.
152. Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell*. 1991;65(6):961-71.
153. Kaplan NM. Establishing control of refractory hypertension. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1994;29(5):115-20.
154. Conway J. Hemodynamic aspects of essential hypertension in humans. *Physiol Rev*. 1984;64(2):617-60.
155. Vicaut E. [Role of microcirculation in hypertension]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 1999;48(9-10):636-42.
156. Vicaut E. Microcirculation and arterial hypertension. *Drugs*. 1999;59 Spec No:1-10.
157. Vicaut E. [Endothelium and hypertension]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2000;93(11 Suppl):1393-9.
158. Vicaut E. Hypertension and the microcirculation. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2003;96(9):893-903.
159. Williams RA. The pathogenesis of hypertension: an overview. *J Hum Hypertens*. 1990;4(2):69-71.
160. Williams SA, Boolell M, MacGregor GA, Smaje LH, Wasserman SM, Tooke JE. Capillary hypertension and abnormal pressure dynamics in patients with essential hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 1990;79(1):5-8.
161. Widgren BR, Berglund G, Wikstrand J, Andersson OK. Reduced venous compliance in normotensive men with positive family histories of hypertension. *J Hypertens*. 1992;10(5):459-65.
162. Hernandez N, Torres SH, Finol HJ, Vera O. Capillary changes in skeletal muscle of patients with essential hypertension. *Anat Rec*. 1999;256(4):425-32.
163. Antonios TF, Singer DR, Markandu ND, Mortimer PS, MacGregor GA. Rarefaction of skin capillaries in borderline essential hypertension suggests an early structural abnormality. *Hypertension*. 1999;34(4 Pt 1):655-8.
164. Noon JP, Walker BR, Webb DJ, Shore AC, Holton DW, Edwards HV, et al. Impaired microvascular dilatation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high blood pressure. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(8):1873-9.
165. Struijker-Boudier HA, Agabiti-Rosei E, Waeber B, Laurent S. [A new strategy in the treatment of hypertension and its lesions on the target organs]. *Presse medicale*. 2004;33(16):1146-8.
166. Sabri A, Samuel JL, Marotte F, Poitevin P, Rappaport L, Levy BI. Microvasculature in angiotensin II-dependent cardiac hypertrophy in the rat. *Hypertension*. 1998;32(2):371-5.
167. Kobayashi N, Yanaka H, Tojo A, Kobayashi K, Matsuoka H. Effects of amlodipine on nitric oxide synthase mRNA expression and coronary microcirculation in prolonged nitric oxide blockade-induced hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;34(2):173-81.

168. Folkow B, Hallback M, Noresson E. Vascular resistance and reactivity of the microcirculation in hypertension. *Blood vessels*. 1978;15(1-3):33-45.
169. le Noble JL, Tangelder GJ, Slaaf DW, van Essen H, Reneman RS, Struyker-Boudier HA. A functional morphometric study of the cremaster muscle microcirculation in young spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*. 1990;8(8):741-8.
170. Boegehold MA, Johnson MD, Overbeck HW. Pressure-independent arteriolar rarefaction in hypertension. *The American journal of physiology*. 1991;261(1 Pt 2):H83-7.
171. Mulvany MJ. Resistance vessel structure and the pathogenesis of hypertension. *Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*. 1993;11(5):S7-12.
172. Zhang WW, Ma KC, Andersen O, Sourander P, Tollesson PO, Olsson Y. The microvascular changes in cases of hereditary multi-infarct disease of the brain. *Acta neuropathologica*. 1994;87(3):317-24.
173. Ringelstein EB, Nabavi DG. Cerebral small vessel diseases: cerebral microangiopathies. *Current opinion in neurology*. 2005;18(2):179-88.
174. Meirelles Pereira LM, Mandarim-de-Lacerda CA. Effect of antihypertensive drugs on the myocardial microvessels in rats with nitric oxide blockade. *Pathology, research and practice*. 2000;196(5):305-11.
175. Levy BI, Duriez M, Samuel JL. Coronary microvasculature alteration in hypertensive rats. Effect of treatment with a diuretic and an ACE inhibitor. *American journal of hypertension*. 2001;14(1):7-13.
176. Freitas F, Estado V, Carvalho VF, Torres RC, Lessa MA, Tibirica E. Cardiac microvascular rarefaction in hyperthyroidism-induced left ventricle dysfunction. *Microcirculation*. 2013;20(7):590-8.
177. Freitas F, Estado V, Lessa MA, Tibirica E. Cardiac microvascular rarefaction in hyperthyroid rats is reversed by losartan, diltiazem, and propranolol. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2015;29(1):31-40.
178. Kubis N, Besnard S, Silvestre JS, Feletou M, Huang PL, Levy BI, et al. Decreased arteriolar density in endothelial nitric oxide synthase knockout mice is due to hypertension, not to the constitutive defect in endothelial nitric oxide synthase enzyme. *Journal of hypertension*. 2002;20(2):273-80.
179. Rodrigues SF, Granger DN. Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue barriers*. 2015;3(1-2):e978720.
180. Szekanecz Z, Koch AE. Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2004;30(1):97-114.
181. Sukriti S, Tauseef M, Yazbeck P, Mehta D. Mechanisms regulating endothelial permeability. *Pulmonary circulation*. 2014;4(4):535-51.
182. Ivanov AN, Norkin IA, Puchin'ian DM, Shirokov V, Zhdanova O. [Endothelial cell adhesion molecules]. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2014;45(4):34-49.
183. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological reviews*. 2006;86(1):279-367.
184. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annual review of biomedical engineering*. 2007;9:121-67.
185. van den Berg BM, Nieuwdorp M, Stoes ES, Vink H. Glycocalyx and endothelial (dys) function: from mice to men. *Pharmacological reports : PR*. 2006;58 Suppl:75-80.
186. van den Berg B, Vink H. Glycocalyx perturbation: cause or consequence of damage to the vasculature? *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006;290(6):H2174-5.
187. Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circulation research*. 2005;97(11):1093-107.

188. Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert reviews in molecular medicine*. 2009;11:e19.
189. Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1123:134-45.
190. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of cell biology*. 1963;17:375-412.
191. Constantinescu E, Alexandru D, Alexandru V, Raicu M, Simionescu M. Endothelial cell-derived foam cells fail to express adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) for monocytes. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*. 2000;32(2):195-201.
192. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews*. 2004;84(3):869-901.
193. Ghitescu L, Fixman A, Simionescu M, Simionescu N. Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *The Journal of cell biology*. 1986;102(4):1304-11.
194. Miyawaki-Shimizu K, Predescu D, Shimizu J, Broman M, Predescu S, Malik AB. siRNA-induced caveolin-1 knockdown in mice increases lung vascular permeability via the junctional pathway. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2006;290(2):L405-13.
195. Waschke J, Burger S, Curry FR, Drenckhahn D, Adamson RH. Activation of Rac-1 and Cdc42 stabilizes the microvascular endothelial barrier. *Histochemistry and cell biology*. 2006;125(4):397-406.
196. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1989;3(9):2007-18.
197. van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. *Journal of anatomy*. 2002;200(6):549-60.
198. Clough G, Michel CC, Phillips ME. Inflammatory changes in permeability and ultrastructure of single vessels in the frog mesenteric microcirculation. *The Journal of physiology*. 1988;395:99-114.
199. Michel CC. The investigation of capillary permeability in single vessels. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum*. 1979;463:67-74.
200. Eckman PL, King WM, Brunson JG. Studies on the blood brain barrier. I. Effects produced by a single injection of gramnegative endotoxin on the permeability of the cerebral vessels. *The American journal of pathology*. 1958;34(4):631-43.
201. Imaizumi S, Kondo T, Deli MA, Gobel G, Joo F, Epstein CJ, et al. The influence of oxygen free radicals on the permeability of the monolayer of cultured brain endothelial cells. *Neurochemistry international*. 1996;29(2):205-11.
202. Albelda SM, Sampson PM, Haselton FR, McNiff JM, Mueller SN, Williams SK, et al. Permeability characteristics of cultured endothelial cell monolayers. *Journal of applied physiology*. 1988;64(1):308-22.
203. Yuan F, Leunig M, Berk DA, Jain RK. Microvascular permeability of albumin, vascular surface area, and vascular volume measured in human adenocarcinoma LS174T using dorsal chamber in SCID mice. *Microvascular research*. 1993;45(3):269-89.
204. Yuan Y, Chilian WM, Granger HJ, Zawieja DC. Permeability to albumin in isolated coronary venules. *The American journal of physiology*. 1993;265(2 Pt 2):H543-52.
205. Warboys CM, Toh HB, Fraser PA. Role of NADPH oxidase in retinal microvascular permeability increase by RAGE activation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(3):1319-28.
206. Fraser PA, Smaje LH, Verrinder A. Microvascular pressures and filtration coefficients in the cat mesentery. *The Journal of physiology*. 1978;283:439-56.

207. Mason JC, Curry FE, Michel CC. The effects of proteins upon the filtration coefficient of individually perfused frog mesenteric capillaries. *Microvascular research*. 1977;13(2):185-202.
208. Sarker MH, Fraser PA. The role of guanylyl cyclases in the permeability response to inflammatory mediators in pial venular capillaries in the rat. *The Journal of physiology*. 2002;540(Pt 1):209-18.
209. Marceau F, Barabe J, St-Pierre S, Regoli D. Kinin receptors in experimental inflammation. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1980;58(5):536-42.
210. Regoli D, Barabe J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacological reviews*. 1980;32(1):1-46.
211. Trabold F, Pons S, Hagege AA, Bloch-Faure M, Alhenc-Gelas F, Giudicelli JF, et al. Cardiovascular phenotypes of kinin B2 receptor- and tissue kallikrein-deficient mice. *Hypertension*. 2002;40(1):90-5.
212. Sarker MH, Hu DE, Fraser PA. Acute effects of bradykinin on cerebral microvascular permeability in the anaesthetized rat. *The Journal of physiology*. 2000;528 Pt 1:177-87.
213. Katanosaka K, Banik RK, Giron R, Higashi T, Tominaga M, Mizumura K. Contribution of TRPV1 to the bradykinin-evoked nociceptive behavior and excitation of cutaneous sensory neurons. *Neuroscience research*. 2008;62(3):168-75.
214. Calixto JB. Multiple mechanisms of bradykinin-induced contraction in rat and guinea pig smooth muscles in vitro. *European journal of pharmacology*. 1995;281(3):279-88.
215. Easton AS, Abbott NJ. Bradykinin increases permeability by calcium and 5-lipoxygenase in the ECV304/C6 cell culture model of the blood-brain barrier. *Brain research*. 2002;953(1-2):157-69.
216. Woodfin A, Hu DE, Sarker M, Kurokawa T, Fraser P. Acute NADPH oxidase activation potentiates cerebrovascular permeability response to bradykinin in ischemia-reperfusion. *Free radical biology & medicine*. 2011;50(4):518-24.
217. Boric MP, Roblero JS, Duran WN. Quantitation of bradykinin-induced microvascular leakage of FITC-dextran in rat cremaster muscle. *Microvascular research*. 1987;33(3):397-412.
218. Saulpaw CE, Joyner WL. Bradykinin and tumor necrosis factor-alpha alter albumin transport in vivo: a comparative study. *Microvascular research*. 1997;54(3):221-32.
219. Shimizu S, Ishii M, Yamamoto T, Kawanishi T, Momose K, Kuroiwa Y. Bradykinin induces generation of reactive oxygen species in bovine aortic endothelial cells. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*. 1994;84(3):301-14.
220. Wambi-Kiesse CO, Katusic ZS. Inhibition of copper/zinc superoxide dismutase impairs NO-mediated endothelium-dependent relaxations. *The American journal of physiology*. 1999;276(3 Pt 2):H1043-8.
221. Gavins FN, Chatterjee BE. Intravital microscopy for the study of mouse microcirculation in anti-inflammatory drug research: focus on the mesentery and cremaster preparations. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2004;49(1):1-14.
222. Xu L, Dong XW, Shen LL, Li FF, Jiang JX, Cao R, et al. Simvastatin delivery via inhalation attenuates airway inflammation in a murine model of asthma. *International immunopharmacology*. 2012;12(4):556-64.
223. McKay A, Leung BP, McInnes IB, Thomson NC, Liew FY. A novel anti-inflammatory role of simvastatin in a murine model of allergic asthma. *Journal of immunology*. 2004;172(5):2903-8.
224. Prueksaritanont T, Gorham LM, Ma B, Liu L, Yu X, Zhao JJ, et al. In vitro metabolism of simvastatin in humans [SBT]identification of metabolizing enzymes and effect of the drug on hepatic P450s. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1997;25(10):1191-9.

225. Kita T, Brown MS, Goldstein JL. Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in livers of mice treated with mevinolin, a competitive inhibitor of the reductase. *The Journal of clinical investigation*. 1980;66(5):1094-100.
226. Palmer G, Chobaz V, Talabot-Ayer D, Taylor S, So A, Gabay C, et al. Assessment of the efficacy of different statins in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(12):4051-9.
227. Feldstein CA. Statins in hypertension: are they a new class of antihypertensive agents? *American journal of therapeutics*. 2010;17(3):255-62.
228. Liao J, Farmer JA. Statins as adjunctive therapy in the management of hypertension. *Current atherosclerosis reports*. 2010;12(5):349-54.
229. Rajagopalan S, Zannad F, Radauceanu A, Glazer R, Jia Y, Prescott MF, et al. Effects of valsartan alone versus valsartan/simvastatin combination on ambulatory blood pressure, C-reactive protein, lipoproteins, and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with hyperlipidemia and hypertension. *The American journal of cardiology*. 2007;100(2):222-6.
230. Ikeda T, Sakurai J, Nakayama D, Takahashi Y, Matsuo K, Shibuya Y, et al. Pravastatin has an additional depressor effect in patients undergoing long-term treatment with antihypertensive drugs. *American journal of hypertension*. 2004;17(6):502-6.
231. Ghiadoni L, Taddei S, Virdis A. Hypertension and endothelial dysfunction: therapeutic approach. *Current vascular pharmacology*. 2012;10(1):42-60.
232. Guazzi M, Phillips SA, Arena R, Lavie CJ. Endothelial dysfunction and lung capillary injury in cardiovascular diseases. *Progress in cardiovascular diseases*. 2015;57(5):454-62.
233. Gkaliagkousi E, Gavriilaki E, Triantafyllou A, Douma S. Clinical Significance of Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension. *Current hypertension reports*. 2015;17(11):85.
234. Ma MM, Li SY, Wang M, Guan YY. Simvastatin attenuated cerebrovascular cell proliferation in the development of hypertension through Rho/Rho-kinase pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012;59(6):576-82.
235. Debbabi H, Bonnin P, Levy BI. Effects of blood pressure control with perindopril/indapamide on the microcirculation in hypertensive patients. *American journal of hypertension*. 2010;23(10):1136-43.
236. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes care*. 2008;31 Suppl 2:S170-80.
237. Mougenot N, Mediani O, Lechat P. Bisoprolol and hydrochlorothiazide effects on cardiovascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacological research*. 2005;51(4):359-65.
238. Nascimento AR, Lessa MA, Sabino B, Bousquet P, Tibirica E. Microvascular effects of centrally acting antihypertensive drugs in spontaneously hypertensive rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2010;55(3):240-7.
239. Kaiser SE, Sanjuliani AF, Estado V, Gomes MB, Tibirica E. Antihypertensive treatment improves microvascular rarefaction and reactivity in low-risk hypertensive individuals. *Microcirculation*. 2013;20(8):703-16.
240. Ito H, Torii M, Suzuki T. Decreased superoxide dismutase activity and increased superoxide anion production in cardiac hypertrophy of spontaneously hypertensive rats. *Clinical and experimental hypertension*. 1995;17(5):803-16.
241. Suzuki H, DeLano FA, Parks DA, Jamshidi N, Granger DN, Ishii H, et al. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(8):4754-9.
242. Wu R, Millette E, Wu L, de Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Journal of hypertension*. 2001;19(4):741-8.

243. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(3):399-405.
244. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(11):1527-36.
245. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002;105(25):3017-24.
246. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103(5):634-7.
247. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(3):391-7.
248. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*. 2001;103(24):2885-90.
249. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nature medicine*. 2003;9(11):1370-6.
250. Schmid-Schonbein GW, Seiffge D, DeLano FA, Shen K, Zweifach BW. Leukocyte counts and activation in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Hypertension*. 1991;17(3):323-30.
251. Hopps E, Lo Presti R, Caimi G. Pathophysiology of polymorphonuclear leukocyte in arterial hypertension. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2009;41(3):209-18.
252. Cullen P, Rauterberg J, Lorkowski S. The pathogenesis of atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol*. 2005(170):3-70.
253. Cernuda-Morollon E, Ridley AJ. Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells. *Circulation research*. 2006;98(6):757-67.
254. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nature medicine*. 2001;7(6):687-92.
255. Shen K, Sung KL, Whittemore DE, DeLano FA, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. Properties of circulating leukocytes in spontaneously hypertensive rats. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 1995;73(7-8):491-500.
256. Kristal B, Shurtz-Swirski R, Chezard J, Manaster J, Levy R, Shapiro G, et al. Participation of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. *American journal of hypertension*. 1998;11(8 Pt 1):921-8.
257. Dahlof B. Prevention of stroke in patients with hypertension. *The American journal of cardiology*. 2007;100(3A):17J-24J.
258. Sierra C, Domenech M, Camafort M, Coca A. Hypertension and mild cognitive impairment. *Current hypertension reports*. 2012;14(6):548-55.
259. Wei L, Lin SZ, Tajima A, Nakata H, Acuff V, Patlak C, et al. Cerebral glucose utilization and blood flow in adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1992;20(4):501-10.
260. Zhou Q, Dong Y, Huang L, Yang S, Chen W. Study of cerebrovascular reserve capacity by magnetic resonance perfusion weighted imaging and photoacoustic imaging. *Magnetic resonance imaging*. 2009;27(2):155-62.

261. Lee TH, Liu HL, Yang ST, Yang JT, Yeh MY, Lin JR. Effects of aging and hypertension on cerebral ischemic susceptibility: evidenced by MR diffusion-perfusion study in rat. *Experimental neurology*. 2011;227(2):314-21.
262. Grabowski M, Mattsson B, Nordborg C, Johansson BB. Brain capillary density and cerebral blood flow after occlusion of the middle cerebral artery in normotensive Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*. 1993;11(12):1363-8.
263. Heinert G, Casadei B, Paterson DJ. Hypercapnic cerebral blood flow in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*. 1998;16(10):1491-8.
264. Kim T, Richard Jennings J, Kim SG. Regional cerebral blood flow and arterial blood volume and their reactivity to hypercapnia in hypertensive and normotensive rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2014;34(3):408-14.
265. Yamori Y, Horie R. Developmental course of hypertension and regional cerebral blood flow in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1977;8(4):456-61.
266. Tanaka N, Katayama Y, Katsumata T, Otori T, Nishiyama Y. Effects of long-term administration of HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, on stroke events and local cerebral blood flow in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Brain research*. 2007;1169:125-32.
267. Nishimura Y, Ito T, Saavedra JM. Angiotensin II AT(1) blockade normalizes cerebrovascular autoregulation and reduces cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2000;31(10):2478-86.
268. Ito T, Yamakawa H, Bregonzio C, Terron JA, Falcon-Neri A, Saavedra JM. Protection against ischemia and improvement of cerebral blood flow in genetically hypertensive rats by chronic pretreatment with an angiotensin II AT1 antagonist. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2002;33(9):2297-303.
269. Yamakawa H, Jezova M, Ando H, Saavedra JM. Normalization of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II AT1 receptor inhibition. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2003;23(3):371-80.
270. Ando H, Zhou J, Macova M, Imboden H, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2004;35(7):1726-31.
271. Zhou J, Ando H, Macova M, Dou J, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 receptor blockade abolishes brain microvascular inflammation and heat shock protein responses in hypertensive rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005;25(7):878-86.
272. Edvinsson L, Hardebo JE, Owman C. Effects of angiotensin II on cerebral blood vessels. *Acta physiologica Scandinavica*. 1979;105(3):381-3.
273. Naveri L, Stromberg C, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 receptor mediated contraction of the perfused rat cerebral artery. *Neuroreport*. 1994;5(17):2278-80.
274. Saavedra JM, Nishimura Y. Angiotensin and cerebral blood flow. *Cellular and molecular neurobiology*. 1999;19(5):553-73.
275. Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocrine reviews*. 1992;13(2):329-80.
276. Nishimura Y, Xu T, Jöhren O, Hauser W, Saavedra JM. The angiotensin AT1 receptor antagonist CV-11974 regulates cerebral blood flow and brain angiotensin AT1 receptor expression. *Basic research in cardiology*. 1998;93 Suppl 2:63-8.
277. Haberl RL, Anneser F, Villringer A, Einhaupl KM. Angiotensin II induces endothelium-dependent vasodilation of rat cerebral arterioles. *The American journal of physiology*. 1990;258(6 Pt 2):H1840-6.

278. Henrion D, Kubis N, Levy BI. Physiological and pathophysiological functions of the AT(2) subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation. *Hypertension*. 2001;38(5):1150-7.
279. Zhou J, Pavel J, Macova M, Yu ZX, Imboden H, Ge L, et al. AT1 receptor blockade regulates the local angiotensin II system in cerebral microvessels from spontaneously hypertensive rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2006;37(5):1271-6.
280. Nickenig G, Baumer AT, Temur Y, Kebben D, Jockenhovel F, Bohm M. Statin-sensitive dysregulated AT1 receptor function and density in hypercholesterolemic men. *Circulation*. 1999;100(21):2131-4.
281. Ichiki T, Takeda K, Tokunou T, Iino N, Egashira K, Shimokawa H, et al. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor by hydrophobic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(12):1896-901.
282. Gao L, Wang W, Li YL, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, et al. Simvastatin therapy normalizes sympathetic neural control in experimental heart failure: roles of angiotensin II type 1 receptors and NAD(P)H oxidase. *Circulation*. 2005;112(12):1763-70.
283. Padia SH, Carey RM. AT2 receptors: beneficial counter-regulatory role in cardiovascular and renal function. *Pflugers Arch*. 2013;465(1):99-110.
284. Sumners C, Horiuchi M, Widdop RE, McCarthy C, Unger T, Steckelings UM. Protective arms of the renin-angiotensin-system in neurological disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013;40(8):580-8.
285. Dechend R, Fiebler A, Lindschau C, Bischoff H, Muller D, Park JK, et al. Modulating angiotensin II-induced inflammation by HMG Co-A reductase inhibition. *American journal of hypertension*. 2001;14(6 Pt 2):55S-61S.
286. Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, et al. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circulation research*. 2002;91(11):1038-45.
287. Ruperez M, Rodrigues-Diez R, Blanco-Colio LM, Sanchez-Lopez E, Rodriguez-Vita J, Esteban V, et al. HMG-CoA reductase inhibitors decrease angiotensin II-induced vascular fibrosis: role of RhoA/ROCK and MAPK pathways. *Hypertension*. 2007;50(2):377-83.
288. Sugimoto K, Fujimura A. Different effects of simvastatin and pravastatin on adrenal sensitivity to angiotensin II. *British journal of clinical pharmacology*. 2003;56(6):696-7.
289. Bayorh MA, Ganafa AA, Eatman D, Walton M, Feuerstein GZ. Simvastatin and losartan enhance nitric oxide and reduce oxidative stress in salt-induced hypertension. *American journal of hypertension*. 2005;18(11):1496-502.
290. Dell'Omo G, Bandinelli S, Penno G, Pedrinelli R, Mariani M. Simvastatin, capillary permeability, and acetylcholine-mediated vasomotion in atherosclerotic, hypercholesterolemic men. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2000;68(4):427-34.
291. van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, Negre-Aminou P, Lankelma J, Emeis JJ, van Hinsbergh VW. Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation*. 2000;102(23):2803-9.
292. Mooradian AD, Haas MJ, Batejko O, Hovsepyan M, Feman SS. Statins ameliorate endothelial barrier permeability changes in the cerebral tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 2005;54(10):2977-82.
293. Jacobson JR, Barnard JW, Grigoryev DN, Ma SF, Tudor RM, Garcia JG. Simvastatin attenuates vascular leak and inflammation in murine inflammatory lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2005;288(6):L1026-32.
294. Beziaud T, Ru Chen X, El Shafey N, Frechou M, Teng F, Palmier B, et al. Simvastatin in traumatic brain injury: effect on brain edema mechanisms. *Critical care medicine*. 2011;39(10):2300-7.
295. Yang D, Knight RA, Han Y, Karki K, Zhang J, Ding C, et al. Vascular recovery promoted by atorvastatin and simvastatin after experimental intracerebral hemorrhage:

- magnetic resonance imaging and histological study. *Journal of neurosurgery*. 2011;114(4):1135-42.
296. Nagaraja TN, Knight RA, Croxen RL, Konda KP, Fenstermacher JD. Acute neurovascular unit protection by simvastatin in transient cerebral ischemia. *Neurological research*. 2006;28(8):826-30.
297. Narotam PK, Rodell TC, Nadvi SS, Bhoola KD, Troha JM, Parbhoo Singh R, et al. Traumatic brain contusions: a clinical role for the kinin antagonist CP-0127. *Acta neurochirurgica*. 1998;140(8):793-802; discussion -3.
298. Raidoo DM, Bhoola KD. Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacology & therapeutics*. 1998;79(2):105-27.
299. Relton JK, Beckey VE, Hanson WL, Whalley ET. CP-0597, a selective bradykinin B2 receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1997;28(7):1430-6.
300. Touzani O, Boutin H, Chuquet J, Rothwell N. Potential mechanisms of interleukin-1 involvement in cerebral ischaemia. *Journal of neuroimmunology*. 1999;100(1-2):203-15.
301. Sobey CG. Bradykinin B2 receptor antagonism: a new direction for acute stroke therapy? *British journal of pharmacology*. 2003;139(8):1369-71.
302. Matsubara T, Ziff M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *Journal of immunology*. 1986;137(10):3295-8.
303. Yang D, Elner SG, Bian ZM, Till GO, Petty HR, Elner VM. Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells. *Experimental eye research*. 2007;85(4):462-72.
304. Ximenes VF, Kanegae MP, Rissato SR, Galhiane MS. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;457(2):134-41.
305. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Konkol C, Sauer H, et al. Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Molecular pharmacology*. 2001;59(3):646-54.
306. Hordijk PL. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circulation research*. 2006;98(4):453-62.
307. Ma T, Xue Y. RhoA-mediated potential regulation of blood-tumor barrier permeability by bradykinin. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2010;42(1):67-73.
308. Chen W, Pendyala S, Natarajan V, Garcia JG, Jacobson JR. Endothelial cell barrier protection by simvastatin: GTPase regulation and NADPH oxidase inhibition. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;295(4):L575-83.