

INÊS FILIPA BENTO FÉLIX

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO PAPEL DO
ÓXIDO NÍTRICO NA HIPERTENSÃO FELINA**

Orientador: Professor Pedro Faísca

Co – orientador: Professor Luís Lobo

**UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

LISBOA

2014

INÊS FILIPA BENTO FÉLIX

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO PAPEL DO
ÓXIDO NÍTRICO NA HIPERTENSÃO FELINA**

**Dissertação apresentada para a obtenção do
Grau de Mestre em Medicina Veterinária no
curso de Mestrado Integrado em Medicina
Veterinária conferido pela Universidade
Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

Orientador(a): Professor Pedro Faísca

**UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

LISBOA

2014

A. Epígrafe

No result is still a result.

*Choose a job that you love, and you will never have to
work a single day in your life.*

It's not over, until I win.

B. Dedicatórias

À minha família toda, a quem eu devo tudo aquilo que consegui, com especial carinho para a minha mãe, porque não podia ser de outra maneira.

C. Agradecimentos

Quero primeiro que tudo agradecer à minha família, que fez de mim o que sou hoje e que me proporcionou tudo o que eu precisei para chegar até aqui. Este momento não teria chegado, sem todo o suporte e incentivo que a minha família me deu.

Em segundo lugar, quero agradecer a FMV – ULHT, que me permitiu a obtenção da Licenciatura e Mestrado em Medicina Veterinária, algo com que sonho desde os meus 9 anos e aos meus orientadores que me deram todo o conhecimento e formação para que este trabalho se proporcionasse e que acreditaram em mim desde o início.

Quero também deixar um agradecimento muito especial ao Royal Veterinary College, em especial ao Jonathan Elliott, que me deu a oportunidade de visitar esta grande instituição por 6 meses, me confiou um projecto fantástico e que eu adorei realizar, proporcionando todos os recursos de que necessitei ao longo deste período e que me deu o privilégio de conhecer uma realidade tão única e magnífica, dentro do campo de Medicina Veterinária, como é a realidade presente no Reino Unido. Foi uma experiência de um valor pessoal e profissional incalculável e que me permitiu aprender imenso! Sou uma sortuda.

Quero agradecer ao Professor Pedro Faísca, que desde o início me motivou e acreditou em mim e que tanto me apoiou ao longo da minha jornada académica; à Esther Bijsmans, que tanto me ajudou e orientou durante a realização deste projecto, que puxou sempre mais e mais por mim e que ajudou o meu espírito de altruísmo e independência profissional a crescer, mostrando-me, provavelmente sem saber, que sou capaz de muito mais do que imaginava; ao Adrian Boswood, pelo apoio que me deu, por toda a cultura que me transmitiu e por me ter proporcionado uma oportunidade de aprendizagem única e muitíssimo divertida, ao ter-me deixado assistir às suas consultas, no período de tempo que passei no RVC; à Rebecca Geddes, ao Jack Lawson, à Nicola Lotter, à Elizabeth Finding, à Robyn Taylor, e à Amy Timpson, por todo o carinho, amizade, suporte e inúmeros sorrisos que me proporcionaram ao longo dos 6 meses que passei em Inglaterra – guardo-vos no meu coração com muito, muito carinho e tenho a certeza que havemos de voltar a encontrar-nos.

Deixo também um agradecimento muito especial ao Suborno Ghosh, pela enorme ajuda e pela sua paciência por me ter ajudado com as minhas amostras e à Queen Mother University of London, pela disponibilidade imensa que demonstrou ao ter-me permitido analisar os meus sangues.

Agradeço ainda a todos os meus amigos, os meus verdadeiros amigos, que também tiveram o seu papel a desempenhar neste projecto e no percurso que tive de fazer até aqui, no sentido em que uma verdadeira amizade ajuda a definir muito o carácter de uma pessoa e nos aquece o coração nos momentos mais difíceis e de maior solidão – vocês sabem quem são; e ao meu namorado por me ter acompanhado ao longo desta última jornada do meu percurso académico – nem sempre foi fácil, mas nunca me falhaste.

Por último, mas não menos importante, à minha mãe, a quem eu devo toda a minha força, coragem e determinação, que são hoje parte de mim e que são, sem dúvida, a razão para eu ter chegado até aqui. Obrigada pelo infundável e incondicional apoio e por me fazeres acreditar, dia após dia, que podemos realizar todos os nossos sonhos – sem ti, teria sido tudo muito diferente.

Palavras não conseguem descrever toda a gratidão que eu sinto em relação a todas as estas pessoas e instituições.

D. Resumo

A hipertensão sistémica é cada vez mais reconhecida como sendo uma das principais causas de morbilidade e até mesmo de mortalidade, tanto em medicina humana, como veterinária. Uma percentagem significativa de gatos com insuficiência renal crónica (IRC), acabam por desenvolver hipertensão e uma monoterapia com amlodipina é eficaz na maioria dos casos, ao contrário do que acontece com humanos, que geralmente necessitam de vários fármacos. A patofisiologia que leva a hipertensão em felinos com IRC é desconhecida e a elevada eficácia da amlodipina no controlo desta condição pode ajudar a clarificá-la. O Óxido Nítrico (ON) é um potente vasodilatador e está diminuído em humanos com IRC. Duas hipóteses foram testadas: (1) uma baixa biodisponibilidade de ON em gatos com IRC, leva a hipertensão; (2) o efeito do bloqueamento dos canais de cálcio da amlodipina é potenciado pela libertação de ON. O nitrito é um biomarcador de ON. Foram medidas as concentrações de nitrito no sangue de 3 grupos de gatos, utilizando, pela primeira vez nesta espécie, a técnica de quimioluminescência de ozono: saudáveis, IRC e hipertensos. Não foi possível chegar a nenhuma conclusão estatisticamente relevante, mas alguns dados permitiram especular que o ON é um mecanismo natural de defesa, e não uma causa de hipertensão. A eficácia da amlodipina não foi explicada. A técnica de Quimioluminescência de ozono permitiu a detecção de picos de ON nas amostras estudadas.

Palavras-chave: Óxido nítrico, nitrito, quimioluminescência de ozono, hipertensão.

Abstract

Systemic hypertension is one of the main morbidity and even mortality causes in both human and veterinary medicine. A significant percentage of cats with chronic kidney disease (CKD) develop hypertension, and amlodipine monotherapy is effective in most cases, in contrast to human medicine where a combination of medications is often required. The pathophysiology of development of hypertension in feline CKD is unclear, and the high effectiveness of amlodipine regarding the control of hypertension, may help finding the answer. Nitric Oxide (NO) is a potent vasodilator and is decreased in human CKD. Two hypotheses were tested (1) A low bioavailability of NO in cats with CKD leads to development of hypertension (2) Amlodipine's calcium-channel blocking effect is potentiated by NO release in cats. Nitrite is a biomarker of NO and whole blood nitrite concentration was measured in three groups of cats, through ozone chemiluminescence, a technique which was used for the first time in cats – healthy, CKD and hypertensive. No statistically relevant conclusion was drawn; although the data could show that NO is probably a natural defence mechanism, rather than a cause for hypertension. It does not explain the high efficacy of amlodipine treatment in cats. The ozone chemiluminescence technique did allow us to detect NO peaks on the samples studied.

Key-words: Nitric oxide, nitrite, ozone chemiluminescence, hypertension.

E. Abreviaturas, siglas e símbolos

ACVIM – American College of Veterinary Internal Medicine

BSAH – Beaumont Sainsbury's Animal Hospital

cGMP - Guanidina Monofosfato cíclica

DAN - 2,3-diaminofitaleno

DAF-2 - diaminofluoresceína-2

eSON – Sintase de óxido nítrico endotelial

Fe-ON – Óxido Nítrico férrico

HPLC – High Pressure Liquid Chromatography

iSON – Sintase de óxido nítrico induzível

IRC – Insuficiência Renal Crónica

KCN – Cianeto de Potássio

K₃Fe(CN)₆ – Potássio de cianeto férrico

NEM - *N*-ethylmaleimide

nSON – Sintase de óxido nítrico neuronal

NP-40 – Nonidet-40

O₂⁻ - Superóxido

ON – óxido nítrico

SON – óxido nítrico Sintase

O₂N – Dióxido Nítrico

ON^{*} - Radical de óxido nítrico

ON_x – Metabolitos do óxido nítrico

O₂N^{*} - Radical de Dióxido Nítrico

ONOO⁻ - Peroxinitrito

OVH - Ovariohisterectomia

PAS – Pressão Arterial Sistémica

PDSA Bow – People's Dispensary for Sick Animals, em Bow Road

QMUL – Queen Mother University of London

RSO – Espécies reactivas de oxigénio

RNNO – R-Nitrosoaminas

RSNO – R-Nitrosotióis

RVC – Royal Veterinary College

SNO-Hb – S-hemoglobinanitrosa

SNS – Sistema Nervoso Simpático

F. Índice

1. Introdução	15
1.1 Hipertensão	15
1.1.1 Fisiopatologia da hipertensão	16
1.1.1.1 Hipertensão e IRC	19
1.1.2 Avaliação da PAS	20
1.1.2.1 Indicações	21
1.1.2.2 Avaliação da PAS quando o paciente se apresenta com lesões oculares e/ou neurológicas típicas de hipertensão	22
1.1.2.3 Avaliação da PAS quando o paciente se apresenta sem lesões típicas de hipertensão	22
1.1.2.4 Métodos de avaliação da PAS	22
1.1.2.5 Protocolo para medição de PAS – métodos não-invasivos (Brown et al., 2007)	24
1.1.3 Tratamento da hipertensão	25
1.1.3.1 Amlodipina	27
1.2 Função endotelial	28
1.2.1 O Óxido Nítrico e o Ciclo do Óxido Nítrico	28
1.2.1.1 O Óxido Nítrico e a IRC	32
1.2.2 Disfunção endotelial	34
1.3 Técnicas de medição de ON no sangue	36
1.3.1 Medição de ON no sangue através de Quimioluminescência Reactiva de Ozono	37
1.3.1.1 A solução – stop	40
1.3.1.2. A técnica de Quimioluminescência Reactiva de Ozono	41
1.3.1.2.1. Processamento das amostras	41
1.3.1.2.2. A medição de ON através da Quimioluminescência Reactiva de Ozono ..	42
1.3.2 Outras técnicas utilizadas para medição de ON em amostras sanguíneas	45

1.3.2.1 Quantificação de ON em tempo real	46
1.4 Objectivos	47
2. Material e Métodos	47
2.1 A população seleccionada.....	47
2.1.1 Determinação de valores de controlo de ON em amostras sanguíneas de gatos saudáveis, utilizando a técnica de medição de Quimioluminescência.....	48
2.1.2 Comparação de valores de controlo obtidos, com valores de ON de amostras sanguíneas de gatos hipertensos	48
2.1.3 Comparação de valores de controlo obtidos, com valores de ON de amostras sanguíneas de gatos com IRC normotensos	48
2.1.4 Comparação de valores de ON obtidos a partir de amostras sanguíneas de gatos hipertensos, antes e depois do tratamento com Amlodipina	48
2.2 As consultas e a recolha de dados.....	49
2.3 A medição da PAS	50
2.4 O método de recolha	50
2.5 O processamento dos sangues – Método da quimioluminescência reactiva de ozono ...	52
2.6 A análise matemática e estatística dos resultados.....	54
2.7 Bem-Estar Animal	56
3. Resultados.....	56
3.1 Determinação de valores de controlo de ON em amostras sanguíneas de gatos saudáveis, utilizando a técnica de medição de Quimioluminescência.....	57
3.1.1 Comparação de valores obtidos entre gatos saudáveis do sexo masculino e gatos saudáveis do sexo feminino.....	58
3.2 Comparação de valores de controlo obtidos, com valores de ON de amostras sanguíneas de gatos hipertensos	58
3.3 Comparação de valores de controlo obtidos, com valores de ON de amostras sanguíneas de gatos com IRC normotensos	59

3.4 Comparação de valores de ON obtidos a partir de amostras sanguíneas de gatos hipertensos, antes e depois do tratamento com Amlodipina.....	61
4. Discussão	63
4.1 Determinação de valores de controlo de ON em amostras sanguíneas de gatos saudáveis, utilizando a técnica de medição de Quimioluminescência.....	64
4.1.2 Comparação de valores obtidos entre gatos saudáveis do sexo masculino e gatos saudáveis do sexo feminino.....	66
4.2 Comparação de valores de controlo obtidos, com valores de ON de amostras sanguíneas de gatos hipertensos	66
4.3 Comparação de valores de controlo obtidos, com valores de ON de amostras sanguíneas de gatos normotensos com IRC	67
4.4 Comparação de valores de ON obtidos a partir de amostras sanguíneas de gatos hipertensos, antes e depois do tratamento com Amlodipina.....	67
5. Conclusão.....	69
6. Bibliografia	71
7. Apêndices.....	I
APÊNDICE I	I
APÊNDICE II	II
APÊNDICE III.....	III

Índice de Tabelas

TABELA 1.....	19
TABELA 2.....	36

Índice de Figuras

<u>Figura 1</u> – Metabolismo do Óxido Nítrico.....	31
<u>Figura 2</u> – Ciclo vicioso ON/ONOO.....	32
<u>Figura 3</u> – Processamento de amostras sanguíneas.....	39
<u>Figura 4</u> – Esquema da técnica de Quimioluminescência.....	43
<u>Figura 5</u> – Transporte de amostras em gelo seco.....	52
<u>Figura 6</u> – Desproteínização das amostras.....	53
<u>Figura 7</u> – Amostras após centrifugação.....	53
<u>Figura 8</u> – Sobrenadante amostral a ser analisado.....	53
<u>Figura 9</u> – Distribuição dos valores ON em gatos saudáveis.....	58
<u>Figura 10</u> - Gráfico valores ON gatos saudáveis vs. Gatos hipertensos.....	59
<u>Figura 11</u> – Gráfico valores de ON gatos saudáveis vs. Gatos com IRC.....	60
<u>Figura 12</u> – Gráfico valores de ON em todos os grupos.....	61
<u>Figura 13</u> – Gráfico valores ON gatos hipertensos pré- e pós-tratamento.....	62
<u>Figura 14</u> - Gráfico valores ON gatos saudáveis vs. Gatos hipertensos.....	62

1. Introdução

1.1 Hipertensão

A hipertensão sistémica, refere-se a uma elevação persistente da pressão sanguínea sistémica e é cada vez mais reconhecida como sendo uma das principais causas de morbilidade e até mesmo de mortalidade, tanto em medicina humana, como em medicina veterinária (DR., 2004; Egner, Carr, & Brown, 2007; Ettinger & Feldman, 2010; He J, 1999; Luke, 1999; Maggio F, 2000; Wehner A, 2008). A hipertensão, se não for devidamente controlada, pode levar a lesões, muitas vezes devastadoras, em alguns sistemas orgânicos específicos: ocular (Crispin SM, 2001; Maggio F, 2000), sistema nervoso central (Brown CA, 2005; Jacob F, 2003), cardíaco (Chetboul V, 2003; Cortadellas O, 2006; Henik RA, 2004; Snyder PS, 2001) e renal (S. A. B. Brown, C. A.; Hendi, R., 2000; DR., 2004).

A hipertensão pode ser classificada em hipertensão primária, secundária, ou idiopática, sendo que a idiopática pode ser apenas um tipo de hipertensão que pode ser secundária a uma determinada doença (como por exemplo, uma insuficiência renal) que ainda se encontra numa fase pré-clínica, passando muitas vezes a ser caracterizada como hipertensão secundária, a partir do momento em que a doença em questão se torna detectável (S. Brown et al., 2007; Elliott J, 2003; Ettinger & Feldman, 2010).

Relativamente a alterações da PAS relacionadas com factores fisiológicos há literatura que afirma que nos cães é visível um aumento ligeiro da PAS (+ 1-3mmHg/ano), relacionado com a idade; por outro lado, nos gatos há literatura que afirma que não há alterações visíveis da PAS relacionadas com a idade, e há quem afirme que existe uma relação entre os dois factores (A. R. Bodey & Michell, 1996; A.R. Bodey & Sansom, 1998; Kobayashi et al., 1990; Mishina et al., 1998; Sparkes et al., 1999).

No que diz respeito à variação da PAS com o sexo dos animais, a literatura diz que nos cães, os machos possuem uma PAS mais elevada (<10mmHG) do que as fêmeas, relativamente aos gatos não há evidência de uma diferença significativa da PAS entre machos e fêmeas, dado que a maioria dos animais avaliados pertencentes a esta espécie são castrados (A. R. Bodey & Michell, 1996; A.R. Bodey & Sansom, 1998; Mishina et al., 1998).

Nos cães, existe também uma evidência aparente de diferentes PAS entre raças: nas raças pertencentes ao grupo dos “hounds” (como greyhounds, ou bloodhounds) verifica-se a

presença de uma PAS mais elevada (10-20mmHG) do que nos cães sem raça definida, e a PAS de outros cães de raça (não incluídos no grupo mencionado) é de 7-10mmHg mais elevada do que nos cães de raça indeterminada (A. R. Bodey & Michell, 1996; Cox, Peterson, & Detweiler, 1976; Schneider, Truex, & Knowles, 1964). Nos gatos, não há evidência de uma diferença de PAS significativa entre raças (A.R. Bodey & Sansom, 1998).

Por último, a obesidade está associada a um aumento da PAS em múltiplas espécies, tendo este facto sido estudado experimentalmente em cães; por outro lado, em gatos não se verificou diferença alguma (Alonso-Galicia et al., 1996; A.R. Bodey & Sansom, 1998; S. A. Brown, Brown, & Hendi, 2000; Davy & Hall, 2004; Dwyer et al., 2000; Joles, 1998; Montoya et al., 2006; Rocchini, Yang, & Gokee, 2004).

1.1.1 Fisiopatologia da hipertensão

A pressão sistémica é regulada por vários factores e resulta do produto entre o débito cardíaco (definido como o produto entre a frequência cardíaca e o volume cardíaco de ejeção) e a resistência vascular sistémica (que resulta da tonicidade vascular) (Ettinger & Feldman, 2010). Os factores reguladores da pressão arterial são os seguintes (Ettinger & Feldman, 2010):

- ➔ Sistema Nervoso Simpático, que vai controlar tanto a função cardíaca sistólica e diastólica, como a tonicidade vascular;
- ➔ Actividade da vasopressina e do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), que vão influenciar tanto o volume cardíaco de ejeção, como a tonicidade vascular;

Para além dos factores reguladores, existem ainda condições patológicas que influenciam os factores reguladores, acabando por os alterar e por levar ao desenvolvimento de hipertensão (Ettinger & Feldman, 2010):

- ➔ Alterações vasculares estruturais, como arteriosclerose, que influencia a tonicidade vascular;
- ➔ Presença de trombose arterial, que vai também desempenhar um importante papel no que diz respeito à tonicidade dos vasos sanguíneos.

A PAS é um problema grave e alvo de tantas preocupações, devido às lesões que um aumento crónico da mesma pode causar em vários órgãos (S. Brown et al., 2007). Em condições normais, a circulação sanguínea arterial é mantida de forma relativamente

constante através de todos estes processos autorregulatórios, sendo que sempre que a pressão arterial sistêmica (PAS) aumenta, os pequenos vasos de baixa resistência contraem, restringindo assim o fluxo sanguíneo, e sempre que esta baixa, esses mesmos vasos dilatam, por forma a manter o fluxo (Ettinger & Feldman, 2010). Quando estes processos autorregulatórios falham (quer por razões primárias, quer por razões secundárias – como sendo em resposta a uma insuficiência renal), o organismo vê-se obrigado a lidar com uma de duas coisas:

→ Uma resistência vascular inadequada - o que leva a uma sobredistensão dos pequenos vasos devido a um fluxo sanguíneo excessivo, que por sua vez leva à destruição das “tight junctions” endoteliais (Ettinger & Feldman, 2010). Este fenómeno acaba por dar origem a um extravasamento de plasma e proteína para tecidos intersticiais, o que pode, consequentemente, originar vários tipos de lesões nos órgãos mais susceptíveis a este tipo de alterações (já anteriormente mencionados), como edemas, hemorragias ou arteriosclerose – sendo que esta ultima vai por sua vez diminuir ainda mais a tonicidade vascular) (Ettinger & Feldman, 2010);

→ Uma constrição vascular excessiva - o que pode resultar em isquémia local tecidular, necrose e/ou fibrose novamente nos órgãos mais susceptíveis a este tipo de alterações (Ettinger & Feldman, 2010).

Em ambos os casos, verifica-se um comprometimento da função endotelial (Ettinger & Feldman, 2010).

Para cada um dos sistemas orgânicos mencionados (ocular, renal, nervoso central e cardíaco), vão existir lesões e, consequente e eventualmente, sintomatologias especificamente relacionadas com hipertensão, sendo que os sintomas mais óbvios são os seguintes:

→ Sistema oftalmológico: cegueira aguda, hifema e descolamento da retina completo, ou parcial (Ettinger & Feldman, 2010). Apesar da prevalência de lesões oftalmológicas em gatos com hipertensão variar, já foram publicados valores de 100% (Chetboul et al., 2003; Elliott et al., 2001; Komaromy et al., 2004; Littman, Robertson, & Bovee, 1988; Maggio et al., 2000; Sansom, Rogers, & Wood, 2004; Stiles, Polzin, & Bistner, 1994; Turner et al., 1990; Van Boxtel, 2003; van de Sandt, Stades, Boeve, & Stokhof, 2003);

- ➔ Sistema renal: perda de peso e de apetite, PU/PD, palpação renal anormal, azotemia e aumento do rácio de proteína/creatinina na urina (Ettinger & Feldman, 2010). Albuminúria também pode ocorrer e está directamente relacionada com o aumento da PAS em gatos com IRC (S. Mathur et al., 2002). A magnitude da proteinúria é também interpretada como sendo um prognóstico negativo em gatos com IRC espontânea, sendo possível diminuir o grau de proteinúria em gatos com terapia anti-hipertensiva (S. Brown et al., 2007; Elliott & Syme, 2006; King et al., 2006; H. M. Syme et al., 2006);
- ➔ Sistema nervoso central: ataques, alterações comportamentais, estupor e coma (Ettinger & Feldman, 2010). Estas alterações são mais comuns em gatos, tendo sido reportadas em 29% e 46% de gatos com hipertensão e sendo que a encefalopatia hipertensiva é mais provável em gatos com picos de hipertensão repentinos, com uma PAS superior a 180mmHg, ou ambos (Littman, 1994; S. Mathur et al., 2002);
- ➔ Sistema cardíaco: sopros ou ritmos de galope recentes (Bovee et al., 1989; ELLIOTT et al., 2001; Ettinger & Feldman, 2010; R. A. Henik, 1997; Lesser, Fox, & Bond, 1992). Inclusivamente, gatos com hipertensão ainda não diagnosticada, podem desenvolver sinais súbitos de insuficiência cardíaca congestiva após terem recebido fluidoterapia (S. Brown et al., 2007).

As alterações oftalmológicas são a apresentação clínica de hipertensão mais frequente em gatos, enquanto que em cães a hipertensão é mais frequentemente diagnosticada aquando da sua medição, após estes se apresentarem na clínica com uma condição à qual é frequentemente associada um aumento da PAS, sendo mais provável o diagnóstico de hipertensão antes de haver lesões causadas pela mesma (Bovee et al., 1989; ELLIOTT et al., 2001; Ettinger & Feldman, 2010; Jacob et al., 2003; Littman, 1994; Littman et al., 1988; Morgan, 1986; Sansom et al., 1994).

Existem graus de risco associados a lesões nestes sistemas, consoante os valores de PAS obtidos, que ajudam a classificar o grau de gravidade associado a estes últimos, como se pode observar na Tabela 1 (S. Brown et al., 2007).

TABELA 1

Risk Category	Systolic BP		Diastolic BP	Risk of future TOD
I	<150	and ³	<95	Minimal
II	150–159		95–99	Mild
III	160–179		100–119	Moderate
IV	≥180		≥120	Severe

Tabela 1 – Classificação da pressão sanguínea (BP) em cães e gatos, baseada no risco de futuras lesões dos sistemas mais sensíveis à hipertensão (S. Brown et al., 2007)

1.1.1.1 Hipertensão e IRC

Conforme já foi referido, a hipertensão em gatos tem sido frequentemente associada a IRC (A.R. Bodey & Sansom, 1998; Kobayashi et al., 1990; Mishina et al., 1998; Morgan, 1986). Já foram realizados vários estudos, com o objectivo de se tentar chegar a uma percentagem específica dos gatos com IRC que em média desenvolvem hipertensão, mas estes têm obtido resultados muito discrepantes entre si, sendo que há quem tenha publicado que 19,2% dos gatos estudados com IRC desenvolveram hipertensão e há quem chegue a uma percentagem de 50,4% para a população estudada (Bijsmans et al., 2013; H.M. Syme et al., 2002).

Embora a relação entre a hipertensão e a IRC em gatos seja hoje em dia óbvia e bem conhecida, os mecanismos que levam à existência desta relação ainda são desconhecidos, tendo já sido propostas várias teorias que tentam explicar este fenómeno, – desde a activação do SRAA, retenção de sódio, ou activação do SNS - mas ainda não foi possível chegar a nenhuma conclusão específica (Bijsmans et al., 2012). Para além disso, sabe-se que se se tentar tratar a hipertensão focando o tratamento apenas num destes mecanismos propostos, geralmente não há uma resposta positiva a esse tratamento, o que sugere que os mecanismos relacionados com a IRC, que interferem com a PAS são muito complexos e que as causas da hipertensão desenvolvida são multifactoriais (Bijsmans et al., 2012).

Uma das teorias propostas para o mecanismo que leva ao desenvolvimento de hipertensão, em gatos com IRC, baseia-se na já observada baixa disponibilidade e actividade de substâncias vasodilatadoras (como é o caso do ON) e na elevada biodisponibilidade de substâncias vasoconstritoras (como a endotelina) (Bartges, Willis, & Polzin, 1996; Campese, Mitra, & Sandee, 2006). Sabe-se também que a concentração da hormona paratiróide (PTH) está aumentada na presença de IRC, o que pode levar à acumulação de cálcio intracelular no músculo liso das células vasculares, aumentando também a resposta vascular à norepinefrina (outro factor vasoconstritor) (H. Syme, 2011). Posto isto, sabe-se que a regulação da resistência vascular total periférica consegue-se através de uma relação de equilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, pelo que qualquer alteração na produção de qualquer uma destas substâncias, vai desequilibrar esta relação e a resposta vascular a este desequilíbrio pode dar origem a um aumento da PAS (Bijmans et al., 2012).

Para além disto, sabe-se que uma inibição crónica da eONS, resulta em hipertensão sistémica e glomerular, proteinúria e glomeruloesclerose (R. Zatz & C. Baylis, 1998). Há ainda quem tenha sugerido que as concentrações sanguíneas de ON possam estar diminuídas em pacientes humanos com IRC e/ou com doença renal em estado muito avançado (R. J. Schmidt & C. Baylis, 2000; Schmidt et al., 1999; R. Wever et al., 1999). Existem várias teorias que tentam explicar a razão que está por trás destes acontecimentos, sendo que uma das teorias mais populares neste momento se baseia no facto de a concentração plasmática de dimetilarginina assimétrica (ADMA) – um dos principais inibidores da actividade da ONS – se encontrar aumentada em pacientes humanos com doença renal, tendo esta elevada concentração de ADMA sendo ainda relacionada com uma elevada mortalidade e morbilidade cardiovascular (Fleck et al., 2001; Zoccali et al., 2001).

1.1.2 Avaliação da PAS

Os valores de PAS obtidos durante uma consulta devem ser avaliados conjuntamente com outros achados do exame clínico, dado que o valor obtido numa consulta, por si só, não pode ser utilizado como método de diagnóstico de hipertensão sistémica, caso não haja mais informação clínica para além desta (Ettinger & Feldman, 2010). Uma PAS acima dos valores considerados normais, nem sempre é indicativa de doença, dado que outros factores, como stress ou administração de fluídos, por exemplo, podem levar a um aumento agudo da PAS (Belew, Barlett, & Brown, 1999; Ettinger & Feldman, 2010). Tendo em conta tudo isto, existem duas abordagens diferentes para avaliar a PAS: uma para quando existem lesões

oculares e/ou neurológicas associadas a hipertensão e outra para quando não há qualquer tipo de lesões associadas aos valores obtidos (abordadas em seguida) (Ettinger & Feldman, 2010).

O valor considerado normal para uma PAS varia de animal para animal e até mesmo entre as espécies analisadas, mas é recomendado que este se mantenha abaixo dos 160mmHg, sendo este o limite definido. Os valores a ter em conta deverão ser obtidos a partir da média de, idealmente, 5 leituras de PAS efectuadas (Brown S, 2007; Ettinger & Feldman, 2010; R. G. Stepien RL et al., 2003). É importante referir que o gatos, tal como os humanos, podem sofrer da chamada hipertensão da “bata branca”, devido ao stress do transporte e ao facto de se encontrarem na clinica, sendo que um estudo demonstra inclusivamente que apenas durante o transporte de um gato até à clinica, a sua PAS pode aumentar até 30mmHg, razão pela qual esta deve ser medida com cuidado e enquadrada em cada caso (Belew et al., 1999).

1.1.2.1 Indicações

Idealmente, todos os pacientes, caninos ou felinos, deveriam ter a sua PAS avaliada – especialmente se já se encontrarem com uma idade avançada – no entanto, ela deve obrigatoriamente fazer parte da rotina de todas as consultas de animais que tenham doenças que podem predispor a hipertensão, ou que estão normalmente associadas a hipertensão sistémica, e deve ser avaliada sempre que um animal se apresente à clinica com sinais clínicos indicativos de lesão de algum dos sistemas mais sensíveis a este aumento da pressão sanguínea e já anteriormente mencionados (S. Brown et al., 2007; Ettinger & Feldman, 2010). Por outro lado, caso se detecte hipertensão e/ou lesões associadas, deve ser feito um screening pormenorizado do doente, com a finalidade de detectar qual a causa que está a originar este aumento da PAS (S. Brown et al., 2007).

As doenças mais frequentemente associadas a hipertensão em gatos são a insuficiência renal e hipertiroidismo. Em adição, sempre que houver uma alteração a nível cardíaco num gato (seja ela à auscultação, no ECG, no raio-x, ou no ecocardiograma), ou quando é possível a palpação da tiróide (em casos de hiperplasia da mesma) a PAS também deverá ser avaliada (Ettinger & Feldman, 2010). Por outro lado, no caso dos cães as mais comuns destas condições são doença renal com perda de proteína, insuficiência renal aguda ou crónica, hiperadrenocorticism, diabetes mellitus e feocromocitomas (apesar de estes últimos serem raros) e estes também devem ter a sua PAS avaliada aquando da presença de sinais

neurológicos intracranianos, ou quando há um aumento da espessura do ventrículo esquerdo de origem desconhecida (Ettinger & Feldman, 2010).

1.1.2.2 Avaliação da PAS quando o paciente se apresenta com lesões oculares e/ou neurológicas típicas de hipertensão

Nestas circunstâncias a decisão de tratar ou não de imediato o paciente para hipertensão depende dos valores obtidos na medição da PAS: Caso os valores sejam inferiores a 150mmHg, deve ser feito um exame físico mais detalhado para se descobrir uma possível causa, que não hipertensão, para as lesões encontradas e deve ser feita uma reavaliação da PAS, uma ou duas semanas mais tarde – caso esta se mantenha inferior a 150mmHg, mas ainda próxima ao limite superior, é aconselhado reavaliar os valores de PAS regularmente (em intervalos de tempo entre 1 a 3 meses) (Ettinger & Feldman, 2010).

Caso o paciente se apresente à clínica com valores de PAS superiores a 150mmHg, então devem começar a ser tratados para a hipertensão, de imediato, ou aumentar a dose do tratamento, caso este já tenha sido iniciado anteriormente (Ettinger & Feldman, 2010). Para além de um exame físico cuidado que vise descobrir qual a causa que esta por detrás da hipertensão do animal, uma a duas semanas depois, este deve ser reavaliado novamente, com o fim de verificar se a sua PAS já normalizou, ou se é necessário continuar a ajustar a dose - este check-up deverá ser feito, sempre com o mesmo intervalo de tempo, até que a PAS regularize (Ettinger & Feldman, 2010).

1.1.2.3 Avaliação da PAS quando o paciente se apresenta sem lesões típicas de hipertensão

No caso dos pacientes que se apresentam à clínica com uma doença ou algum sintoma, tipicamente associados a hipertensão, mas sem sinais clínicos típicos da mesma observáveis, sempre que a sua PAS for inferior a 150mmHg, estes devem ser reavaliados continuamente com um intervalo de tempo que varia entre 1 e 3 meses (Ettinger & Feldman, 2010). Caso a PAS destes pacientes se encontre acima dos 150mmHg, então estes devem ter a sua PAS reavaliada no espaço de uma a duas semanas, e se esta continuar igualmente elevada, deverá ser iniciado o tratamento para hipertensão, mesmo que o doente não apresente lesões típicas associadas (Ettinger & Feldman, 2010).

1.1.2.4 Métodos de avaliação da PAS

Para avaliação da pressão arterial sanguínea em Medicina Veterinária, existem três métodos disponíveis: canulação arterial (também conhecido como técnica invasiva, ou

directa), a técnica do Doppler-ultrassónico e a oscilometria de alta definição (Chetboul et al., 2010; Ettinger & Feldman, 2010; Martel et al., 2013; Wernick et al., 2012).

A técnica de canulação arterial consiste em colocar uma agulha anexada a um transdutor de pressão, directamente numa artéria (geralmente, na artéria femoral) e é tipicamente utilizada em pacientes que estejam anestesiados, sob cuidados intensivos, ou como método clínico de diagnóstico de PAS em cães, sendo que é raramente utilizada em gatos, nestas circunstâncias (Ettinger & Feldman, 2010). É recomendado o uso de anestésico local e os cães costumam tolerar esta técnica razoavelmente bem (Ettinger & Feldman, 2010). Os animais sujeitos a esta técnica devem ser cuidadosamente vigiados até uma hora após o procedimento e a complicação mais frequentemente associada ao mesmo é o hematoma (Ettinger & Feldman, 2010).

Relativamente à técnica de oscilometria de alta definição, esta envolve o uso de um sistema de detecção e medição da PAS automático e de uma braçadeira que lhe está associado e que pode ser colocado num dos membros, ou na cauda, sobre uma artéria (Ettinger & Feldman, 2010). Esta técnica é mais precisa em cães do que em gatos e pode dar origem a resultados pouco fiáveis caso o paciente não se mantenha imóvel, tenha um pulso fraco e/ou irregular, ou caso a artéria seja demasiado pequena (como acontece com a maioria dos gatos) (Ettinger & Feldman, 2010). O tamanho da braçadeira escolhido é fundamental para que se consigam obter medições precisas e esta deve ter 40% da circunferência do membro ou da cauda de um cão e 30% da circunferência do membro ou da cauda de um gato (consoante o local escolhido para medição) (Ettinger & Feldman, 2010). A técnica de oscilometria é de grande valor diagnóstico, quando é utilizada em cães e gatos anestesiados (Ettinger & Feldman, 2010).

Por último, relativamente à técnica do Doppler-ultrassónico (também conhecida como esfingomanometria com Doppler), tal como a anteriormente mencionada, é realizada através do auxílio de um cuff e o fluxo sanguíneo é detectado através da utilização de um cristal piezoeléctrico, que se encontra numa sonda de ultrassom (Ettinger & Feldman, 2010). Geralmente, o fluxo sanguíneo medido através desta técnica é avaliado na artéria superficial palmar, na artéria podal dorsal, ou no aspecto ventral da cauda do animal, dependendo do local escolhido (Ettinger & Feldman, 2010). Uma desvantagem presente nesta técnica (assim como em todas as outras) consiste no facto de, por vezes, poder aparecer um valor

completamente discrepante dos restantes, pelo que devem sempre fazer-se várias medições, até que se tenham obtido, geralmente 5, que sejam consistentes entre si e tenham surgido de forma constante (Ettinger & Feldman, 2010). Outra desvantagem também referida na literatura, consiste no facto de o Doppler depender na detecção do som resultante do fluxo sanguíneo por parte do veterinário em questão – aquilo que uns ouvem mais cedo, outros podem ouvir mais tarde, resultando numa grande variabilidade individual de leitura de valores da PAS (Chetboul et al., 2010). Esta desvantagem, pode ser contornada através do estabelecimento de guidelines consistentes, tal como sugerido pela ACVIM no seu consensus de 2007 (S. Brown et al., 2007). As vantagens desta técnica consistem de flexibilidade de medição no que diz respeito tanto às movimentações do animal, como a baixas pressões sanguíneas, vasos avaliados de pequenas dimensões, presença de arritmias (que é facilmente audível aquando da utilização deste método), ou até mesmo no que diz respeito à velocidade com que a técnica pode ser efectuada (quanto mais experiente o operador, maior a velocidade de execução do procedimento) (Ettinger & Feldman, 2010).

Na realidade, não existe ainda um consenso sobre qual a técnica não-invasiva (Doppler, ou oscilometria de alta definição) mais eficaz, dado que estas têm de ser validadas através de estudos realizados que respeitem as guidelines definidas pela ACVIM (S. Brown et al., 2007; Wernick et al., 2012). Segundo o consensus elaborado pela ACVIM em 2007 (e literatura mais recente), ainda nenhum dos métodos não-invasivos foi validado pelos critérios estabelecidos, no que diz respeito à medição não-invasiva da PAS em cães e gatos conscientes (S. Brown et al., 2007; Martel et al., 2013; Wernick et al., 2012). Foram já realizados alguns estudos que visam descobrir qual o método mais eficaz, mas até ao momento ainda nenhum foi bem sucedido, tendo sido sempre relatado que não foi observada nenhuma diferença significativa entre os métodos estudados (Chetboul et al., 2010; R. E. Jepson et al., 2012). No entanto, existem autores que defendem que o Doppler se mantém o método mais eficaz e consistente no que diz respeito à medição da PAS de cães e gatos conscientes (Ettinger & Feldman, 2010; Hsiang, Lien, & Huang, 2008).

1.1.2.5 Protocolo para medição de PAS – métodos não-invasivos (Brown et al., 2007)

Conforme já foi mencionado, deve haver um protocolo bem definido e seguido por todos os médicos veterinários que efectuem medições de PAS, por forma a tornar os métodos consistentes e possivelmente validáveis (S. Brown et al., 2007). Desta forma, a ACVIM publicou o seguinte protocolo:

- Testar a eficácia do aparelho utilizado para a medição da PAS duas vezes por ano;
- Procedimento deve estar standardizado;
- O ambiente em que o animal está inserido deverá ser silencioso, clamo, sem outros animais presentes e de preferência com o dono a acompanhar. O paciente não deve ser sedado e deverá ter a oportunidade de se adaptar à sala, antes do início das medições;
- A contenção do animal deverá ser feita de forma firme, mas gentil, permitindo ao paciente adoptar uma posição confortável, preferencialmente esternal;
- A braçadeira deverá ter 40% da circunferência do membro a medir, em cães e 30%-40% em gatos;
- A braçadeira poderá ser colocada num dos membros ou na cauda, de acordo com a conformação do animal e com a preferência do utilizador – o local escolhido deverá ficar sempre registado;
- Deverá ser sempre o(s) mesmo(s) indivíduo(s) a efectuar as medições e este(s) deverá ter um treino adequado;
- O paciente deverá encontrar-se calmo e quieto, durante as medições;
- A primeira medição, deverá ser ignorada. Pelo menos 3, e idealmente 5-7 medições consecutivas e consistentes deverão ser registados;
- Repetições deverão ser efectuadas sempre que necessário, assim como alterações ao posicionamento da braçadeira, por forma a obter valores consistentes;
- Efectuar uma média de todos os valores registados para obter um valor final da PAS;
- Devem ser mantidos registos escritos de cada medição, que incluam tamanho da braçadeira, local em que foi colocado, valores obtidos, valor final e a interpretação veterinária desses mesmos valores.

1.1.3 Tratamento da hipertensão

Em alguns casos, o tratamento ou controlo de uma doença que predispõe e/ou está associada a hipertensão num paciente, acaba por levar a uma normalização da PAS por si só, no entanto, na maioria dos casos isto não ocorre, pelo que se torna fundamental recorrer a drogas anti-hipertensivas (Ettinger & Feldman, 2010).

O tratamento da hipertensão é considerado complexo e não há nenhum protocolo específico a seguir, dado que este deve ser efectuado considerando cada caso individualmente,

tendo especialmente em conta a velocidade com que a PAS tem de ser controlada (como no caso de doentes em que há lesões evidentes associadas a hipertensão, como encefalopatia ou retinopatia – nestes casos é importante controlar-se a PAS o mais depressa possível) (Ettinger & Feldman, 2010). Para além disso, é preciso também ter em conta se o doente tem outras doenças associadas, cujos tratamentos possam estar a influenciar a pressão sanguínea, aumentando-a (como é o caso do uso de corticoesteróides, por exemplo), caso em que a dose dos princípios activos a serem utilizados devem ser, no mínimo, reduzidas o máximo possível (Ettinger & Feldman, 2010).

O tratamento anti-hipertensivo ideal é aquele que reduz a PAS abaixo de um determinado nível pré-estabelecido (segundo os guidelines estabelecidos pela ACVIM no que diz respeito ao controlo da PAS em cães e gatos, para que o risco de lesão de órgãos susceptíveis a hipertensão seja consideravelmente reduzido, os valores de PAS devem ser mantidos abaixo dos 160mmHg – ver Tabela 1, acima), sem causar uma hipotensão significativa e, conseqüentemente, sem activar massivamente os mecanismos biológicos que têm como principal função manter a PAS estabilizada (S. Brown et al., 2007; Peterson et al., 1995).

Posto isto, existem quatro grupos de fármacos principais a serem utilizados no tratamento da hipertensão: Inibidores da enzima conversora da Angiotensina (IECAs), bloqueadores dos canais de cálcio e agentes bloqueadores adrenérgicos (tanto alfa, como beta), cuja utilização para o tratamento de hipertensão felina não é tão eficaz quanto os restantes princípios activos mencionados (Bijsmans et al., 2012). Os diuréticos também podem ser utilizados (além das mencionadas podem ainda ser utilizadas outras drogas, como o caso da acepromazina, ou fenotiazina, por exemplo, ou nitroprussiato para cães com hipertensão severa - no entanto, nestas situações deve-se manter uma monitorização constante e atenta da PAS do animal em causa, para assegurar que esta não desce abaixo dos valores mínimos) (Ettinger & Feldman, 2010; R.A. Henik, Snyder, & Volk, 1997; H. Syme, 2011). A utilização de cada um destes fármacos depende de cada uma das situações, devendo ser consideradas as vantagens e desvantagens de cada um – neste projecto a atenção focar-se-á especialmente num destes grupos e num princípio activo específico: a amlodipina, pertencente aos bloqueadores dos canais de cálcio.

Para além da utilização de fármacos, existem também algumas medidas terapêuticas extra que devem ser associadas ao(s) princípio(s) activo(s) utilizado(s): escolha de dietas com baixo teor em sal – especialmente se o doente em questão tiver uma doença renal concomitante – e alto teor em potássio (apesar de ainda não ter sido claramente demonstrado que o sal desempenha efectivamente um papel activo no aumento ou diminuição da PAS em animais de estimação) e perda de peso, caso os doentes tenham excesso de peso (A Chalifoux, 1985; Bodey AR, 1996; Coulter DB, 1984; Kallet AJ, 1997; R. G. Stepien RL, 1999). Também já foi provado que a ingestão de nitrato com a dieta, consegue baixar a PAS (Larsen et al, 2006).

1.1.3.1 Amlodipina

O controlo da hipertensão em animais de estimação, especialmente em gatos, era muito complicado até à descoberta e utilização do princípio activo amlodipina (Ettinger & Feldman, 2010). Este princípio activo é altamente selectivo para as células vasculares do músculo liso e é actualmente considerado o tratamento de eleição para hipertensão felina (Cooke & Snyder, 1998; R.A. Henik et al., 1997).

Além de incluída no grupo de bloqueadores de canais de cálcio, a amlodipina está incluída num subgrupo dos bloqueadores de canais de cálcio (grupo das dihidropiridinas) cuja função não deprime a função do sistema cardiorrespiratório e não diminui a frequência cardíaca, para além de que as suas características bioquímicas resultam numa diminuição muito gradual da PAS, o que o torna um princípio activo com características excepcionais para o tratamento de hipertensão; é também um fármaco de longa duração, pelo que geralmente uma única dose diária é o suficiente para manter a PAS controlada (Cooke & Snyder, 1998; Ettinger & Feldman, 2010; Lenasi, 2003). Para além disso, a amlodipina reduz significativamente a proteinúria em gatos hipertensos, quando o rácio proteína:creatinina da urina recolhida antes do tratamento se iniciar é >0.2 , o que significa que pode ter um efeito positivo na hemodinâmica renal destes pacientes em específico (R.E. Jepson, Elliott, Brodbelt, & Syme, 2007).

Suspeita-se que a razão pela qual a amlodipina tem um efeito tão positivo no tratamento da hipertensão, esteja relacionado com um aumento da produção de um dos mais potentes vasodilatadores do organismo, o Óxido Nítrico (ON) (Hoshida et al, 1998; Lenasi, 2003; X. P. Zhang & T. H. Hintze, 1998). Estudos efectuados recentemente mostram que este

princípio activo causa a libertação de ON em culturas de células endoteliais (Hempel, Lindschau, & Maasch, 1999; X. P. Zhang & T. H. Hintze, 1998). Já foi também demonstrado noutras investigações que fármacos do grupo dos IECAs levam também à libertação de ON, levando a crer que a elevada eficácia, tanto dos IECAs como da amlodipina se relacionam com a libertação desta substância (Seyedi et al, 1995; X. Zhang & T. H. Hintze, 1998; X. P. Zhang & T. H. Hintze, 1998).

Para além da amlodipina, existe ainda outro princípio activo pertencente ao grupos dos bloqueadores de canais de cálcio, designado diltiazem, cujo principal efeito é uma diminuição da contractilidade cardíaca, sendo muito eficaz na resolução de arritmias supraventriculares, mas é apenas relativamente eficaz no que diz respeito à vasodilatação periférica, além de que não parece ser um princípio activo apropriado para ser administrado apenas uma vez por dia, contrastando com a amlodipina (Cooke & Snyder, 1998; S. Mathur et al., 2004).

1.2 Função endotelial

O endotélio reveste todos os vasos sanguíneos do corpo e actua como barreira entre a corrente sanguínea e os tecidos adjacentes e também tem um papel metabólico activo, actuando como regulador de coagulação, da função vasomotora e da inflamação (Esper et al., 2006). Ele é responsável pela homeostase cardiovascular e, quando saudável, permanece dilatado por inibição da inflamação, proliferação celular e trombose, devido à predominância de ON no equilíbrio constante que existe entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras (Deanfield, Halcox, & Rabelink, 2007).

Sabe-se que a função endotelial é influenciada pelo exercício físico (F. Ribeiro et al, 2010), pela dieta (influência essa, maioritariamente observada em doentes humanos, quando lhes é fornecida uma dieta hipocalórica, ou uma dieta hipercalórica, relevando assim a importância de uma dieta saudável) (Buscemi et al., 2012) e pela altura do ano e temperatura ambiente, sendo que esta ultima surgiu como uma hipótese dado a maior incidência de doenças cardiovasculares durante o Inverno (Widlansky et al., 2007).

1.2.1 O Óxido Nítrico e o Ciclo do Óxido Nítrico

Dentro das três funções que um endotélio competente exerce, a mais importante no âmbito deste trabalho é a do controlo vasomotor local. Este controlo é exercido pelo ON, um gás, que é continuamente sintetizado pelo endotélio e que foi primeiramente descrito em 1980, por Furchgott e Zawadzki, como um “factor vasodilatador derivado do endotélio” e

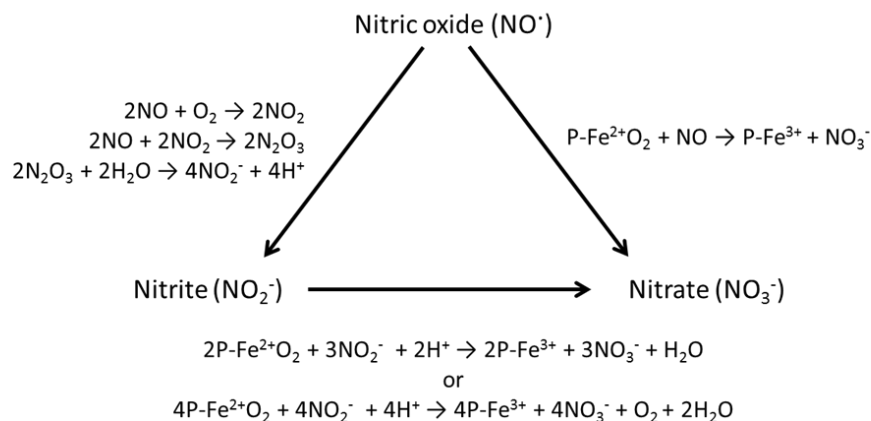
tendo sido identificado, sete anos depois, como sendo o hoje conhecido Óxido Nítrico (Dejam et al., 2005; Furchgott & Zawadzki, 1980; L.J. Ignarro et al, 1987). A sua concentração sanguínea e a sua semi-vida dependem de vários factores, que vão desde a quantidade de espécies reactivas de oxigénio (RSO), a pressão de O₂ no sangue, o pH e a concentração dos chamados metais de transição, os tióis (M. Kelm, 1999).

O ON é sintetizado por três isoformas distintas da enzima sintase de ON (SON), sendo elas SON induzível (iSON), SON neuronal (nSON) e SON endotelial (eSON) (Roe & Ren, 2012). Tanto a eSON como a nSON são expressas continuamente e são referidas como enzimas dependentes de cálcio (apesar de a eSON também poder ser activada através de um mecanismo alternativo, independente do cálcio) (Ayajiki et al, 1996). Por outro lado a expressão da iSON pode ser induzida por altos níveis de citocinas ou outros agentes inflamatórios, de forma completamente independente do cálcio, na maior parte das células vasculares (incluindo células endoteliais, células do músculo liso e macrófagos) (Balligand et al., 1994; Buttery et al., 1996; Demosthenous et al., 2011; Geller et al., 1993; Gross et al, 1991). A síntese do ON propriamente dita, ocorre através da actividade da já referida SON, que cataliza a conversão da L-arginina em L-citrulina e ON, utilizando vários cofactores para esta finalidade, sendo os mais importantes a tetrahydrobiopterina (BH₄), a calmodulina e o NADPH (L.J. Ignarro, 1996).

De forma muito básica, o ciclo do óxido nítrico pode ser resumido a três grandes reacções: a activação da enzima guanilato ciclase (que depois leva a vasodilatação), a sua destruição, ou metabolização por reacção com a oxihemoglobina e a sua transformação em peroxinitrito, por reacção com moléculas de oxigénio (Beckman & Koppenol, 1996; Dejam et al., 2005; M.P. Doyle & Hoekstra, 1981).

Abordando o primeiro, dos três “braços” de que é constituído este ciclo, o ON actua através da activação da enzima guanilato ciclase (activação essa conseguida quando o ON atinge uma concentração sanguínea mínima de 5nM), presente nas células do músculo liso e esta vai, por sua vez, activar a guanidina monofosfato cíclica (cGMP) que vai, ulteriormente levar ao relaxamento do músculo liso vascular através da activação da proteína kinase dependente da actividade da cGMP (Beckman & Koppenol, 1996; Loscalzo & Welch, 1995; Rapoport, Draznin, & Murad, 1983).

No segundo “braço” do ciclo, vem a metabolização do ON. Este processo de metabolização é eficientemente ilustrado pela Figura 1, abaixo. Explicando o ilustrado na Figura 1, quando o ON é produzido, sendo este um gás, difunde-se automaticamente pelas células do músculo liso endotelial, mas também para a corrente sanguínea, onde uma percentagem irá reagir com a oxihemoglobina intraeritrocitária para formar nitrato (que se vai juntar ao pool de nitrato vascular já existente, dado que existem varias fontes de ingestão de nitrato no meio ambiente) e outra percentagem será oxidada e formará nitrito (M. Kelm, 1999; Wang et al., 2004). Por sua vez, o nitrito formado, após um curto espaço de tempo, acabará por reagir também com a oxihemoglobina intraeritrocitária, para dar também origem a nitrato (Kosaka & Tyuma, 1987). Em todas as reacções aqui descritas, ao metabolizar o ON e o nitrito, a oxihemoglobina, transformar-se-á em metahemoglobina, produto esse que não tem a capacidade de reagir com o ON, nem com o nitrito (Dejam et al., 2005). No entanto, sabe-se que o nitrito pode ainda reagir com a deoxihemoglobina, presente em situações de hipóxia, para dar novamente origem a ON mais metahemoglobina (reacção não ilustrada na Figura 1), sugerindo desta forma que o ON é um potente vasodilatador presente até mesmo em situações de agressões vasculares hipóxicas (Cosby et al., 2003; M. P. Doyle et al., 1981; Hunter et al., 2004). Todo este processo descrito, ajudou a colocar a hipótese e a posteriormente concluir que os eritrócitos são considerados as maiores fontes de armazenamento de nitrito (que é, por sua vez, considerado o melhor precursor de ON) no sangue (Dejam et al., 2005). De notar que o endotélio pode produzir quantidades de ON 10 a 40 vezes superiores, às que são realmente necessárias para activar a guanilato ciclase, dado que a maioria do ON produzido acaba por ser “perdido” para o compartimento vascular – mesmo depois do ON se ter difundido para o músculo liso promovendo o seu relaxamento, este volta novamente a difundir-se para os eritrócitos (Beckman & Koppenol, 1996; Malinski & Taha, 1992).



P-Fe²⁺ = haem-containing protein

Figura 1 – Metabolismo do Óxido Nítrico (Bryan & Grisham, 2007)

Focando agora a atenção no terceiro e último caminho que o ciclo do óxido nítrico pode tomar, é importante mencionar que apesar do óxido nítrico ser tão benéfico e importante para o organismo e para a saúde vascular e endotelial, este pode ter igualmente efeitos muito deletérios para o organismo (Beckman & Koppenol, 1996). Quando existe uma agressão vascular grave e prolongada, ou quando existe a presença de um agente de stress que pode inclusivamente levar ao desenvolvimento de algumas doenças (como é o caso de traumas físicos, exposição a solventes orgânicos voláteis, exposição a alguns tipos de pesticidas, trauma craniano, infecção por toxoplasmose, entre outros), o equilíbrio bioquímico entre a taxa de formação e a taxa de destruição do ON é perturbado (Beckman & Koppenol, 1996; Pall, 2007). Quando não existe oxihemoglobina suficiente para perpetuar a destruição do ON formado, este começa a acumular-se e a sua concentração passa dos nanomolares, para os micromolares, originando assim uma competição direta entre o ON e a enzima anti-oxidante superóxido dismutase, pela molécula superóxido (O₂⁻), cujas concentrações são mantidas muito baixas por esta mesma enzima (geralmente 1 a 5% do consumo total de oxigénio é reduzido a superóxido) (Beckman & Koppenol, 1996; Imlay & Fridovich, 1991). O óxido nítrico é a única molécula biológica conhecida a ser produzida em quantidades suficientemente altas para conseguir competir com esta enzima (Beckman & Koppenol, 1996). Neste caso, o ON começa a reagir instantaneamente com a molécula O₂⁻, levando à formação de uma substância designada peroxinitrito (ONOO⁻) (Pall, 2007). O ONOO⁻ é uma molécula oxidante, que pode ter grandes consequências a níveis especificamente vasculares, participando activamente em fenómenos como a aterosclerose, mas também a níveis de

saúde no sentido lato da questão, dado que se sabe que moléculas oxidantes, podem levar ao início de processos oncológicos, por exemplo (Beckman & Koppenol, 1996).

Obviamente que uma reação como esta, não está somente dependente das substâncias mencionadas, mas de muitas outras moléculas, como está ilustrado na Figura 2. Dado que este projecto não está focado nesta vertente do ON, este caminho do ciclo não será abordado em pormenor.

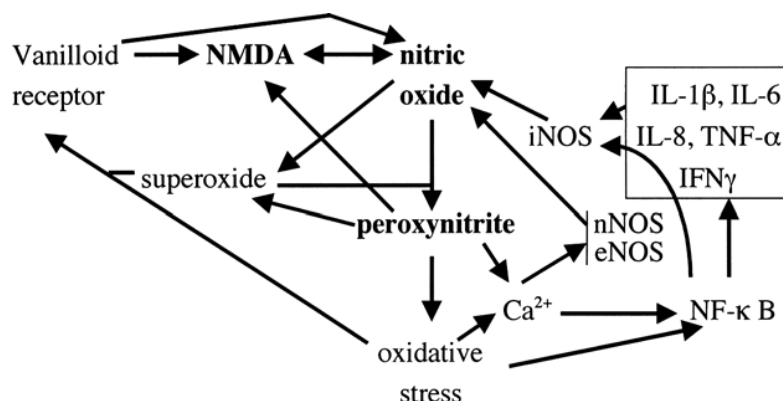


Figura 2 – Ciclo vicioso ON/ONOO⁻ (Pall, 2007)

Mencionou-se que o que leva à activação deste ciclo, são determinados factores específicos que levam ao desenvolvimento de doenças que se sabem estar relacionados com a actividade do ON, no ciclo vicioso ON/ONOO⁻ (sensibilidade múltipla a químicos, fibromialgia, síndrome de fadiga crónica, ou stress pós-traumático), mas também se sabe que, por exemplo, nem todos os traumas físicos, levam a fibromialgia, pelo que existem outros factores adicionais, relacionados com a activação deste ciclo, para além das agressões propriamente ditas (Pall, 2007). Estes factores adicionais são possivelmente a dieta, o estado do sistema imunitário e a genética de cada individuo (Pall, 2007).

1.2.1.1 O Óxido Nítrico e a IRC

Sabe-se que existe um aumento da ocorrência de eventos cardiovasculares, inflamação, stress oxidativo, assim como disfunção endotelial em pacientes com IRC, até mesmo quando se considera que a doença está ainda num estado inicial (Baigent, Burbury, & Wheeler, 2000; Foley, Parfrey, & Sarnak, 1998; Himmelfarb, 2004; Landray et al., 2004; Oberg et al., 2004; Thambyrajah et al., 2000).

Sabe-se também que a aterosclerose prematura é uma das causas primárias de morbilidade e mortalidade em pacientes com IRC (de Lemos & Hillis, 1996). O ON é um dos

principais factores envolvidos no efeito endotelial anti-ateroesclerótico e a IRC já foi associada a uma deficiência da biodisponibilidade de ON, na ausência de factores de risco concomitantes que justifiquem este fenómeno, tendo sido inclusivamente demonstrada em crianças (Kari et al., 1997; Sorensen et al., 1994; Stroes et al., 1995; R. M. Wever et al., 1998). No entanto, está ainda por explicar o porquê desta deficiência da biodisponibilidade de ON, podendo esta estar relacionada com uma diminuição da sua produção (diminuição da actividade da NOS, por aumento da concentração sanguínea do seu inibidor ADMA, ou por diminuição da biodisponibilidade do principal substrato da NOS, a L-arginina, sintetizada nos túbulos renais proximais), um aumento da sua degradação (dado que a IRC também já foi associada a um aumento da concentração sanguínea de radicais de oxigénio, que inactivam a actividade do ON), ou ambos (Bergstrom, Alvestrand, & Furst, 1990; Bouby et al., 1993; Durak et al., 1994; Haklar, Yegenaga, & Yalcin, 1995; Kari et al., 1997; MacAllister et al., 1996; Reyes et al., 1992; Vallance et al., 1992).

Há estudos que indicam que a diminuição da biodisponibilidade de ON está relacionada com diminuição da sua produção e há ainda quem afirme que este fenómeno é multifactorial, não estando apenas relacionado com uma das causas acima mencionadas (Baylis, 2008; R. Wever et al., 1999).

Apesar de tudo o que já foi mencionado, está ainda por provar até que ponto é que esta diminuição da biodisponibilidade de ON em pacientes com IRC influencia o seu estado de saúde e que tipo de consequências é que poderá trazer, razão pela qual têm sido feitos alguns estudos em animais cujo objectivo é tentar responder a estas questões. Nestes estudos, realizados em coelhos, porcos da índia e ratos anestesiados, foi induzido um bloqueio crónico da síntese basal de ON, tendo sido demonstrado que após este bloqueio os animais desenvolvem hipertensão sistémica persistente (Aisaka et al., 1989; Rees, Palmer, & Moncada, 1989; M. O. Ribeiro, De Nucci, & Zatz, 1991; Zatz & de Nucci, 1991). Para além desta hipertensão persistente, foi também demonstrado que a diminuição da concentração basal de ON causa um aumento da degradação fisiológica renal, contribuindo para a evolução de uma hipotética IRC, sendo que quanto mais baixos forem os valores sanguíneos basais de ON, maior a severidade de lesões renais (R. Zatz & C. Baylis, 1998).

Em 2000, foi realizado um estudo em humanos que utilizava pacientes com IRC e um grupo de controlo (ao qual pertenciam apenas indivíduos saudáveis) que visava observar de

que forma variavam as concentrações sanguíneas e urinárias de ON, bem como a PAS de cada um, através da ingestão de uma dieta com baixa concentração de ONx durante 24h, que demonstrou que, ao fim dessas 24h a PAS dos pacientes com IRC estava consideravelmente mais elevada do que no grupo de controlo (apesar de 12, dos 13 pacientes pertencentes a este grupo, estarem sob terapia anti-hipertensiva), que a excreção urinária de ONx, estava diminuída nesses mesmos pacientes e, consequentemente, que a produção endógena de ON estava também diminuída (R.J. Schmidt & C. Baylis, 2000). O facto de os pacientes com IRC terem exibido uma PAS consideravelmente mais elevada do que a dos elementos pertencentes ao grupo de controlo, ao fim das 24h, sugere que existe um estímulo hipertensivo contínuo e persistente, além de uma hipervolemia, dado que praticamente todos eles estão sob o efeito de uma terapia anti-hipertensiva (R.J. Schmidt & C. Baylis, 2000).

1.2.2 Disfunção endotelial

A disfunção endotelial é um estado patológico causado por um desequilíbrio entre substâncias com propriedades vasodilatadores, antimitóticas e antitrombogénicas (isto é, factores vasodilatadores resultantes do endotélio) e substâncias com propriedades vasoconstritoras, mitogénicas e trombogénicas (ou seja, factores vasoconstritores derivados do endotélio) (Andreas J. Flammer et al., 2012).

A disfunção endotelial em medicina humana, está associada a vários factores predisponentes a aterosclerose e doenças cardiovasculares (Brunner et al., 2005). Mais especificamente, a disfunção endotelial pode predispor, por exemplo, a um enfarte do miocárdio através do reduzido fluxo sanguíneo na circulação coronária e do aumento da probabilidade da formação de trombos (Lerman et al., 2007).

Este desequilíbrio acontece, quando há uma activação do endotélio (activação essa que ocorre não só em situações naturais, como mecanismo de defesa do organismo, mas também quando há exposição cardiovascular a factores de risco de agressão vascular – como é o caso de uma elevação da concentração de proteínas inflamatórias, ou da ocorrência de um evento isquémico - em resposta a uma agressão, que vai levar a um aumento considerável da produção e concentração de ON no sangue, levando à competição deste com a enzima superóxido dismutase, e favorecendo o ciclo do ON no sentido da produção do peroxinitrito (como já foi abordado anteriormente), levando assim a toda uma cascata de eventos danosos e prejudiciais ao endotélio e à saúde de um individuo no geral (Beckman & Koppenol, 1996).

Existem duas formas distintas de medir a função endotelial num indivíduo: testes que avaliam os movimentos vasculares que estão dependentes do endotélio e medição de marcadores circulantes da função endotelial. Relativamente à primeira categoria, o método gold-standard não invasivo utilizado é o teste da vasodilatação mediada pelo fluxo sanguíneo (Deanfield et al., 2007). Esta avaliação baseia-se na oclusão temporária da circulação braquial de um indivíduo através da utilização de um cuff (como os utilizados para medir a PAS), que ao ser esvaziado, vai provocar hiperémia no local que foi temporariamente privado de circulação sanguínea, levando a um aumento da pressão laminar presente nos vasos locais (Celermajer et al., 1992; Corretti et al., 2002). Num endotélio saudável, este aumento repentino da pressão vascular, vai activar funcionalmente a eSON, levando a uma vasodilatação mediada pelo ON (Joannides et al., 1995).

Por outro lado, pode também proceder-se, como já foi mencionado, à medição de marcadores sanguíneos da função endotelial (Deanfield et al., 2007). Esta medição pode ser conseguida através da medição da actividade de substâncias vasoactivas, produzidas directamente pelo endotélio, como é o caso do ON e de substâncias presentes no seu ciclo de produção (como a L-arginina, por exemplo), ou da endotelina-1 (A.J. Flammer & Lüscher, 2010).

Para além destes, a abordagem também pode ser feita de outra maneira: dado que se sabe que a inflamação excessiva e a coagulação põem em causa a função endotelial (Margetic, 2012) e tendo em conta que a inflamação, coagulação e fibrinólise estão intimamente relacionadas com factores circulantes destas funções - como o factor vonWillebrand, o activador do plasminogénio tecidual e o inibidor do activador de plaquetas - estes também podem ser medidos como forma de avaliar a função endotelial (Medcalf, 2007). Tendo em conta a mesma linha de pensamento, marcadores circulantes da inflamação (como a proteína C-reactiva) (A.J. Flammer & Lüscher, 2010), ou marcadores de activação leucocitária (como é o caso da mieloperoxidase) (Ridker et al., 2004), também podem ser utilizados como marcadores indirectos da função endotelial (Singer & Granger, 2007).

Por último, marcadores de stress oxidativo (LDL oxidada) e factores pró-angiogénicos (como o factor de crescimento do endotélio vascular), também podem ser úteis para a avaliação da função endotelial (A.J. Flammer & Lüscher, 2010).

1.3 Técnicas de medição de ON no sangue

Tendo em conta o debate que existe actualmente relativamente ao ON e à sua função exacta *in vivo*, torna-se fundamental o desenvolvimento de metodologias precisas e reproduzíveis para isolar e quantificar o ON (MacArthur, Shiva, & Gladwin, 2007). Nos últimos anos, os valores de ON publicados têm-se revelado tão variáveis, quanto as diferentes técnicas utilizadas para se efectuar a sua medição, o que ilustra o quão importante é a descoberta de metodologias concretamente validadas e robustas (Giustarini et al., 2004; MacArthur et al., 2007; Tsikas, 2005). Por exemplo, os valores de nitrito documentados presentes no plasma, variam entre o indetectável e os 26µM (Gorenflo et al., 2001; Meulemans & Delsenne, 1994). Estas diferenças devem-se não só às variações presentes nas técnicas de processamento de amostras, na contaminação de nitrito durante esse mesmo processamento e nos diferentes ensaios efectuados, mas também à especificidade das técnicas utilizadas (ou falta dela) para detecção de espécies resultantes de ON (Kim-Shapiro et al., 2004; MacArthur et al., 2007; Stamler, 2004). Na Tabela 2, é possível observar-se um conjunto de valores de nitrito encontrados através da utilização de vários tipos de técnicas de medição, em diferentes tipos de amostras, publicados por diversos estudos, que ilustram a dificuldade presente na obtenção de valores reais desta substância (MacArthur et al., 2007).

Matriz amostral	Nitrito (Nm)	LDI	Metodologia
Eritrocitos	263 ± 150	1 Nm	I ₃ ⁻ CL
	288 ± 47	1 Nm	I ₃ ⁻ CL
Plasma	144 ± 11	1 Nm	I ₃ ⁻ CL
	172 ± 35	5 Nm	Cobre/Iodina/Iodeto CL
	200 ± 20	10 Nm	FIA com Griess
	205 ± 21	1 Nm	I ₃ ⁻ CL
	200 ± 100	100 Nm	HPLC com Griess
	221 ± 72	50 Nm	Griess
	305 ± 23	10 Nm	I ₃ ⁻ CL/HPLC/FIA com Griess
	550	50 Nm	HPLC
	1300 – 13000	1500 Nm	Griess
	1800 ± 400	22 fmol	GC-MS
	23500 – 31000	50 Nm	HPLC
Soro	523 ± 72	50 fmol	GC-MS
	3700 ± 600	1000 Nm	Griess: Cu-Cd alloy
	4900 ± 1200	500 Nm	Griess: VC ₃
	5000 – 20000	700 Nm	Griess: enzimatico
Sangue inteiro	100 – 400	2 Nm	FIA com Griess
	143 ± 7 (venoso)	1 Nm	I ₃ ⁻ CL

176 ± 10 (arterial)	1 Nm	I ₃ ⁻ CL
181 ± 29	1 Nm	I ₃ ⁻ CL
240 ± 98	1 Nm	I ₃ ⁻ CL

Tabela 2 – Resumo de valores obtidos para a concentração de nitrito em humanos saudáveis, em diferentes tipos de amostra sanguínea, conseguidos por grupos diferentes e através da utilização de vários tipos de técnicas de medição (MacArthur et al., 2007)

Legenda: CL = Quimioluminescência; FIA = análise de fluxo de injeção; HPLC = Cromatografia líquida de alta pressão

As dificuldades na quantificação de ON em amostras sanguíneas surgem por uma variedade de razões, como a presença ubíqua de nitrito num laboratório (como em água da torneira, ou utensílios de vidro), que pode resultar em inúmeros problemas de contaminação, que por sua vez podem levar a uma sobrevalorização dos níveis de concentração de ON encontrados e, consequentemente, documentados (MacArthur et al., 2007). Por outro lado, o facto de o nitrito ter uma semi-vida sanguínea tão curta, devido à sua reacção com a hemoglobina (explicada em pormenor mais a frente), pode levar à sua rápida degradação e valores obtidos abaixo dos reais, se não houver um correcto processamento laboratorial das amostras em estudo (Dejam et al., 2005; Giustarini et al., 2004; Tsikas, 2005). Para além de tudo isto, há que ter em conta a presença em muito baixas concentrações de proteínas modificadas por ON, que exigem a utilização de métodos altamente sensíveis, com limites de detecção muito baixos, para que estas sejam medidas e tidas em consideração (MacArthur et al., 2007). Assim, o método ideal teria de ser um método com alta sensibilidade e especificidade, assim como teria de envolver um processamento de amostras que limite ao máximo a possibilidade de contaminação e degradação das mesmas (MacArthur et al., 2007). A técnica de Quimioluminescência Reactiva de Ozono, juntamente com outras técnicas redutoras e de processamento de amostras sanguíneas, é actualmente a técnica mais utilizada e que reúne todas estas características (MacArthur et al., 2007).

1.3.1 Medição de ON no sangue através de Quimioluminescência Reactiva de Ozono

A técnica de Quimioluminescência Reactiva de Ozono, é a técnica laboratorial mais fiável, sensível e globalmente utilizada para a detecção de ON em amostras de sangue, não tendo ainda sido utilizada em amostras sanguíneas de gatos (Pinder et al., 2008).

Conforme já foi descrito, sabe-se que o Óxido Nítrico, sendo um gás é um componente bastante instável tendo uma semi-vida de apenas 1.8ms (Liu, 1998). Assim sendo, torna-se completamente complicado medir directamente as concentrações de Óxido Nítrico em amostras sanguíneas. Tendo em conta que o Óxido Nítrico tem dois metabolitos, o

nitrito e o nitrato, é através das medições das concentrações destes mesmos metabolitos que se têm estudado as concentrações de ON *in vivo* (Tsikas, 2008). Ambos os metabolitos são novamente convertidos em ON tanto por bactérias da flora comensal intestinal, como por bactérias pertencentes ao tracto urogenital (Lundberg et al., 1997; Lundberg et al., 2004). No entanto, sabe-se que o nitrato é uma substância cuja presença no meio ambiente é ubiqüitária (e cuja concentração sanguínea pode, conseqüentemente, variar com a dieta) e que também se forma na saliva, no tracto gastrointestinal (através de bactérias sintetizadoras de nitrato), através da desnitrificação de algumas enzimas hepáticas, que pode ser inalado através de alguns gases atmosféricos (óxidos de nitrogénio), ou até mesmo influenciada pela função renal (M. Kelm, 1999; Tannenbaum et al., 1979; Tsikas, 2008). Neste sentido, concluiu-se que a medição de nitrito, ainda que este também esteja presente em vários locais (como na água, por exemplo), é mais fiável do que a medição de nitrito e nitrato juntos, ou somente de nitrato, no que diz respeito ao ON propriamente dito e a sua actividade (Lauer et al., 2001).

No entanto, também o nitrito tem uma semi-vida muito curta (apenas 10,2min), após a qual também este se começa a metabolizar em nitrato, pelo que, imediatamente após a recolha de uma amostra sanguínea na qual se pretenda medir a concentração de nitrito, esta deve ser colocada numa chamada solução-stop, que impede a metabolização deste componente em nitrato ou novamente em ON, permitindo que a amostra seja armazenada e analisada mais tarde (Dejam et al., 2005; MacArthur et al., 2007; Mildred M. Pelletier et al., 2006).

Resumindo, existem três formas diferentes de preparar o sangue para análise por Quimioluminescência Reactiva de Ozono, para pesquisa de ON:

- ➔ Sangue inteiro: técnica que envolve a recolha de sangue e adição do mesmo à solução – stop, num rácio de 4:1, para posterior armazenamento a -80°C (armazenamento considerado estável durante vários meses) e análise (Piknova & Schechter, 2011). O processo que se segue ao armazenamento é a Desproteinização (mencionado mais à frente, neste capítulo) (Piknova & Schechter, 2011).
- ➔ Eritrócitos: neste caso as amostras são recolhidas e imediatamente centrifugadas para separar os eritrócitos do plasma, sendo os primeiros pipetados para a solução – stop, também num rácio de 4:1 (Piknova & Schechter, 2011). Após este passo, as amostras devem ser ou armazenadas a -

80°C até a sua análise ser possível, ou então deverão passar em seguida ao passo da Desproteínização (Piknova & Schechter, 2011).

- ➔ Plasma: as amostras são recolhidas e imediatamente centrifugadas, para separar novamente o plasma dos eritrócitos (Piknova & Schechter, 2011). Neste caso, é recolhido e armazenado o plasma, naturalmente, sem necessidade de o colocar em solução – stop, caso este se encontre translúcido e sem evidências de hemólise (Piknova & Schechter, 2011). Caso exista hemólise, então tem de ser utilizada uma solução – stop conforme descrito anteriormente (Piknova & Schechter, 2011). Após se ter procedido à recolha do plasma, este pode ser analisado de imediato, ou armazenado a -80°C durante o período de tempo que for necessário (Piknova & Schechter, 2011). Para este processo, não é necessário recorrer ao passo de Desproteínização, antes de se começar a análise do sangue (Piknova & Schechter, 2011).

A Figura 3, ilustra o processo descrito neste parágrafo.

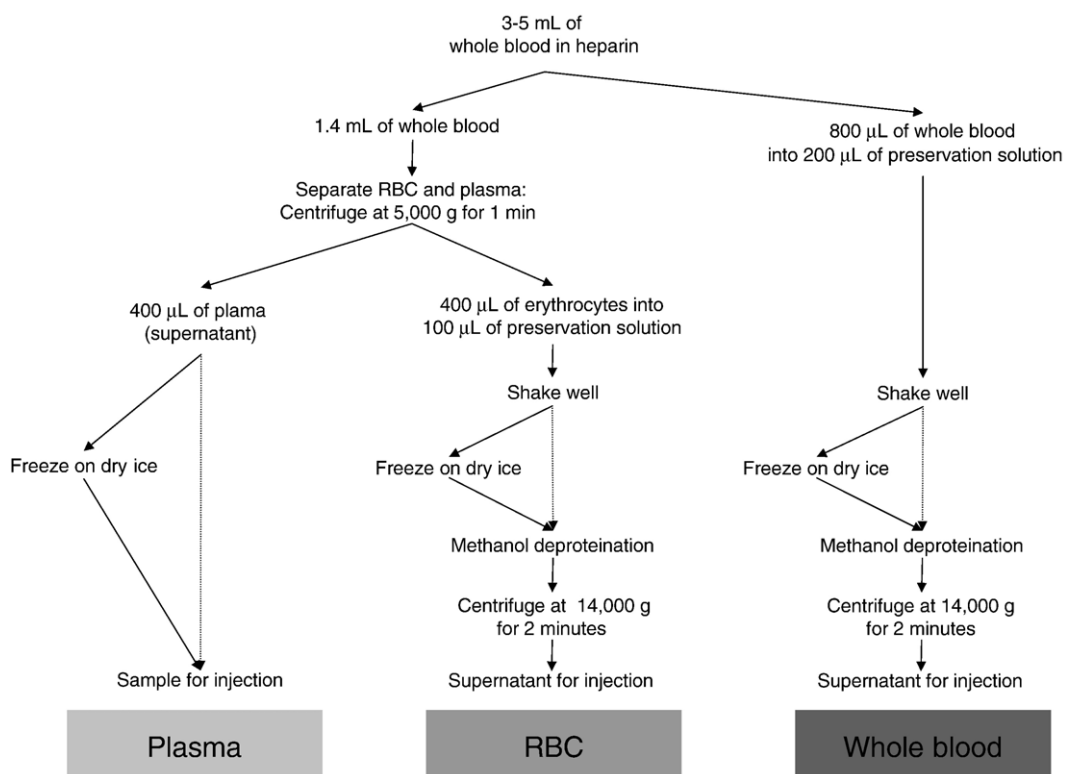


Figura 3 – Guia esquemático para o processamento de amostras sanguíneas para determinação de nitrito em sangue inteiro, eritrócitos e plasma (Piknova & Schechter, 2011)

Para além de tudo o que já foi referido nesta secção, é importante que os animais a serem amostrados para análise façam ou um jejum de algumas horas, ou tenham acesso a uma dieta livre de nitrito e nitrato, por forma a tornar os resultados o mais precisos possível (Bryan & Grisham, 2007).

1.3.1.1 A solução – stop

A solução – stop, ou a solução de cianeto férrico, é uma solução que consiste de 3 elementos diferentes, sendo que cada um deles tem um papel específico para impedir que o nitrito se metabolize em nitrato e manter a sua concentração estável durante o período de tempo que assim se desejar (MacArthur et al., 2007; M. M. Pelletier et al., 2006; Piknova & Schechter, 2011).

A solução – stop é constituída pelos seguintes componentes:

- ➔ Potássio de cianeto férrico ($K_3Fe(CN)_6$, 800Mm) – é o principal reagente desta solução, sendo que reage com a oxihemoglobina e deoxihemoglobina presente nos eritrócitos, transformando-a em metahemoglobina, ao reagir com os componentes férricos do grupo heme, segundo a seguinte reação(Dejam et al., 2005; Piknova & Schechter, 2011). Este fenómeno, impede que o nitrito seja metabolizado em nitrato (no caso da oxihemoglobina) ou em ON (no caso da deoxihemoglobina) dado que o componente presente na metahemoglobina, não reage com o nitrito (M. M. Pelletier et al., 2006).
- ➔ Nonidet-40 (NP-40) – deve ser adicionado num volume de 10% do volume total da solução e o seu papel é o de um agente citolítico, sendo que solubiliza as membranas eritrocitárias, o que permite que o $K_3Fe(CN)_6$ aceda a hemoglobina, permitindo que se de a reação anteriormente mencionada (Dejam et al., 2005; M. M. Pelletier et al., 2006).
- ➔ *N*-ethylmaleimide (NEM, 100 Mm) – cujo papel é o de um alquilante de elementos de tiol, que previne que se formem RSNO, componentes que iriam interferir com a medição de ON, dado que dão origem a ON e ao componente reactivo do mesmo (ON^*) (Dejam et al., 2005; M. M. Pelletier et al., 2006; Piknova & Schechter, 2011).
- ➔ Água Millipore (entenda-se por “água millipore”, água completamente livre de nitritos e nitratos) – os cristais de $K_3Fe(CN)_6$ e de NEM, têm de ser dissolvidos e

tendo em conta os altos valores de nitrito presentes ubiquitariamente, especialmente na água (cujas concentrações de nitrito são de aproximadamente $137 \pm 45 \text{ Nm}$), deve ser utilizada uma água com concentrações indetectáveis desta substância, evitando a contaminação da solução – stop, ao máximo (M. M. Pelletier et al., 2006).

A solução deverá ser utilizada num rácio de 4:1 (sangue inteiro:solução – stop) e poderá ser mantida a temperatura ambiente durante 24h, sem perder propriedades de eficácia, ou refrigerada a 4°C durante 4 dias (Dejam et al., 2005; M. M. Pelletier et al., 2006).

Foi comprovado que, usando a solução – stop, o facto de congelar e descongelar as amostras e recorrer a metanol durante o processamento das mesmas, não põe em causa a eficácia do processo de medição e é igualmente eficaz ao método de centrifugação e medição imediatamente após a recolha (Dejam et al., 2005).

1.3.1.2. A técnica de Quimioluminescência Reactiva de Ozono

1.3.1.2.1. Processamento das amostras

Este passo é considerado um dos mais importantes, no processo de medição e quantificação de ON, independentemente do método utilizado, dado que é preciso um cuidado extremo para se conseguirem preservar os metabolitos que se querem analisar e para evitar a contaminação das amostras (Bryan & Grisham, 2007).

Conforme já foi brevemente mencionado acima e conforme ilustrado na Figura 3, mais acima, existem três formas de processar as amostras para serem posteriormente analisadas para pesquisa de ON, utilizando a técnica de Quimioluminescência Reactiva de Ozono (Piknova & Schechter, 2011). Após todo o processo de recolha das amostras e correcto tratamento e armazenamento (se for caso disso), segue-se o processo de Desproteínização (excepto no caso do tratamento do Plasma) (Piknova & Schechter, 2011).

As proteínas são precipitadas através da adição de metanol frio às amostras, num rácio 1:1 (v/v) e devem ser vigorosamente misturadas através do auxílio de um vortex (Piknova & Schechter, 2011). As proteínas são então separadas de toda a amostra, através de um processo de centrifugação, sendo posteriormente pipetadas para um novo tubo, ou eppendorf e estão então prontas para serem analisadas, para pesquisa de ON (Piknova & Schechter, 2011).

Tendo em conta que este passo dilui significativamente o nitrito nas amostras, este não é recomendado quando se esperam níveis baixos desta substância, situação em que se deve utilizar o dobro da quantidade da solução “Anti-espuma” (designada Antifoam B) no procedimento – este passo também é recomendado caso as amostras a analisar contenham grandes níveis de proteína, dado que são as próprias proteínas sanguíneas que levam à formação de espuma no vaso de reação (Piknova & Schechter, 2011).

Para este processo, existem alguns autores que utilizam metanol num rácio de 1:1 (v/v), com múltiplas centrifugações, até que o sobrenadante se apresente translúcido (Nagababu & Rifkind, 2007) e outros que mencionam a utilização de metanol num rácio de 1:2 (v/v, amostra/metanol) e de uma única centrifugação (Hendgen-Cotta et al., 2008).

É necessário manter quantidades baixas (aproximadamente 1MI) de todas as soluções que são utilizadas no tratamento e processamento das amostras recolhidas (solução – stop, metanol, água, ou qualquer outra solução de tratamento adicional), por forma a facilitar a correcção de contaminações que podem ocorrer ao longo de todo o procedimento (Piknova & Schechter, 2011). Todas estas soluções utilizadas deverão ser analisadas em conjunto com as amostras recolhidas, para averiguar se há algum tipo de contaminação das mesmas (Piknova & Schechter, 2011).

1.3.1.2.2. A medição de ON através da Quimioluminescência Reactiva de Ozono

Na Figura 4, encontra-se um desenho esquemático de todo o mecanismo e aparelhagem técnica que fazem parte da técnica de quimioluminescência reactiva, para ajudar a melhor compreender os passos que serão descritos em seguida.

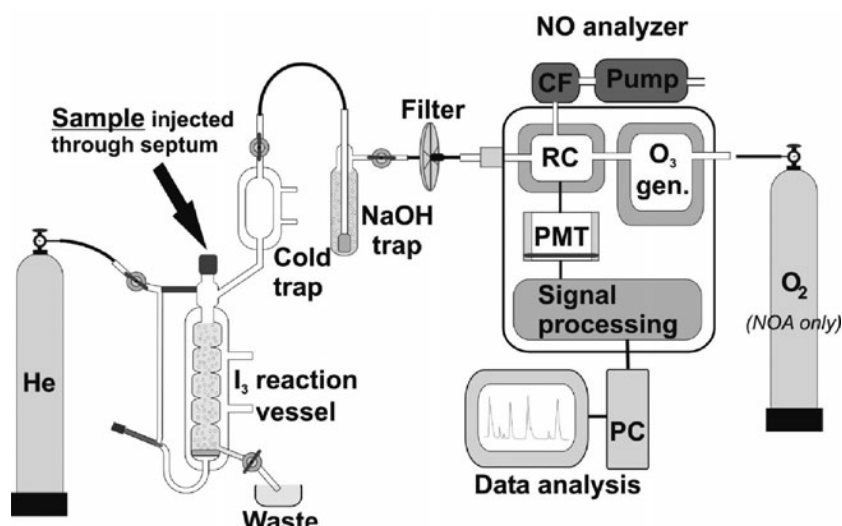
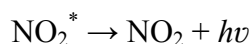
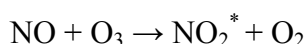


Figura 4 – Mecanismo e aparelhagem técnica utilizada para a técnica de quimioluminescência reactiva por Ozono (Piknova & Schechter, 2011).

Resumidamente, o ON em forma de gás livre é expelido do vaso de reacção por um gás inerte transportador (que pode ser Hélio, Azoto ou Árgon) e que se encontra misturado com uma solução redox dentro do mesmo (solução essa que tem como objectivo a conversão de ON_x em ON), para dentro do analisador de ON (Piknova & Schechter, 2011). Dentro do analisador, dá-se então uma reacção entre o ON e Ozono (O_3), para dar origem a dióxido nítrico (NO_2) no seu estado activado, ou em forma de radical – NO_2^* (MacArthur et al., 2007; Piknova & Schechter, 2011). Aquando da sua desactivação, este liberta um fotão visível ($h\nu$) da região infravermelha do espectro da luz, que é então detectado por um tubo fotomultiplicador no analisador, que acaba por gerar um sinal eléctrico (MacArthur et al., 2007; Piknova & Schechter, 2011). A intensidade de luz gerada é proporcional à concentração de ON presente na câmara de reacção do analisador e, através da utilização de curvas de calibração adequadas, poderá ser relacionada a uma concentração específica de ON na amostra analisada (Piknova & Schechter, 2011). Este é o princípio da quimioluminescência para a detecção de ON e é ilustrado pelas seguintes equações (MacArthur et al., 2007; Piknova & Schechter, 2011):



A especificidade deste método para o ON, deve-se às propriedades únicas da molécula de ON, como a sua capacidade de existir como um gás livre e o facto de reagir rapidamente com Ozono (Archer, 1993).

Apenas ON em forma de gás livre é detectado por esta técnica (Piknova & Schechter, 2011). Para a sua detecção ser possível, há que converter os seus metabolitos novamente em ON livre previamente à sua quantificação através da utilização de soluções redox (Piknova & Schechter, 2011).

Por volta de 2007, a solução redox que era mais amplamente utilizada para esta técnica era uma solução de tri-iodeto (I_3^-) ácido, sendo que esta deveria ser preparada diariamente, ou sempre que se quisesse efectuar esta técnica e cuja composição inclui iodeto de potássio (KI), iodina, água destilada e ácido acético glacial (Feelisch et al., 2002; Marley et al., 2000; Samouilov & Zweier, 1998; Yang et al., 2003).

A detecção de ON através desta técnica é altamente sensível, sendo que os seus limites de detecção são inferiores a 1pmol e os seus limites de quantificação são próximos a 1Nm em matrizes biológicas, dependendo do volume de amostra injectado no vaso de razão (Feelisch et al., 2002; Samouilov & Zweier, 1998; Yang et al., 2003). Para além disso, já foi comprovado que a medição de nitrito através desta técnica é mais eficaz quando comparada com outras técnicas utilizadas para o mesmo fim (como o caso da técnica de Griess combinada com análise por injeção de fluxo e ensaios HPLC) (Dejam et al., 2005).

Para que se consigam calcular as concentrações de nitrito numa determinada amostra, implica que exista uma conversão do sinal emitido pelo analisador de ON, em concentrações factuais, através da utilização de uma curva standard (MacArthur et al., 2007). Assim, as concentrações de nitrito presentes numa determinada amostra, serão calculadas pelo analisador de ON consoante a seguinte equação (MacArthur et al., 2007):

$$[\text{Nitrito}] = \frac{\text{Área}}{\text{Declive} \times \text{Volume injectado}}$$

Em que a “Área”, representa a área abaixo da curva da solução a ser analisada, o “Declive”, representa o declive da curva standard (área/pmol) e o “Volume injectado” representa o volume de solução que foi injectado no analisador de ON (μL), sendo que tudo

isto vai resultar numa concentração de nitrito da amostra a analisar, em μM (M. M. Pelletier et al., 2006).

1.3.2 Outras técnicas utilizadas para medição de ON em amostras sanguíneas

Outras técnicas utilizadas para a medição de ON em amostras biológicas, acabaram por ser ultrapassadas pela técnica de Quimioluminescência reactiva, dado que as técnicas anteriormente utilizadas mediam ou nitrito e nitrato em conjunto, ou então apenas alguns dos substratos pertencentes ao ciclo do ON, como RSNOs (Bryan & Grisham, 2007). Para além disso, os limites de detecção da Quimioluminescência são muito inferiores aos das restantes técnicas, o que lhe confere uma maior sensibilidade (Bryan & Grisham, 2007). Essas técnicas incluem, entre outras, a determinação de nitrito e nitrato, utilizando o reagente de Griess (este reagente pode entrar em varias técnicas diferentes: determinação colorimétrica de NO_x , determinação por cromatografia líquida de alta sensibilidade e determinação fluorimétrica) e a determinação de RSNOs também através de métodos colorimétricos e fluorométricos (Bryan & Grisham, 2007).

As técnicas que incluem o reagente de Griess, baseiam-se, muito basicamente, na conversão do nitrato presente nas amostras, em nitrito e este, por sua vez, dá origem (através de duas reacções bioquímicas intermédias) a um azo-composto cromofórico que absorve fortemente na área dos 540nm, podendo então ser identificado com o auxílio de um espectrofotómetro (Grisham, Johnson, & Lancaster, 1996). As reacções e os procedimentos que antecedem a reacção de Griess e que têm como objectivo a separação e conversão do nitrato em nitrito, variam de técnica para técnica e não serão abordadas neste trabalho devido à alta complexidade bioquímica que cada uma envolve.

Entre as técnicas colorimétricas e fluorométricas, a principal diferença reside nos limites de detecção de cada uma, sendo que na primeira estes se encontram entre os 0,5 e os 100 μM e na segunda, entre os 50 e 100 nM (Wink et al., 1999).

Para além destas existem outras técnicas, tais como a de ressonância paramagnética de electrões, um ensaio com oxihemoglobina, a utilização de bioensaios, ou a utilização de diferentes eléctrodos electroquímicos (Gryglewski, Moncada, & Palmer, 1986; Henry et al., 1991; M. Kelm et al., 1988). Para além destas, existe ainda uma outra técnica que permite a medição indirecta de ON através do seu segundo mensageiro, o monofosfato de guanosina ciclica (cGMP) (Berkels, Purol-Schnabel, & Roesen, 2001).

Como já foi mencionado, foram feitos já vários estudos que têm como objectivo descobrir qual dos métodos é o mais eficaz para se recorrer à quantificação de ON em amostras biológicas, sendo que actualmente ainda existe muita controvérsia relativamente a este assunto (Bryan & Grisham, 2007). No entanto, parece haver um maior consenso no que diz respeito à técnica de quimioluminescência reactiva ser a mais eficaz, sensível e com menor probabilidade de contaminação das amostras analisadas, aquando do seu processamento (Bryan & Grisham, 2007).

1.3.2.1 Quantificação de ON em tempo real

Em 2010, Takarada *et al.* Publicaram no European Heart Journal um estudo em que anunciaram um novo e promissor método para detecção de ON em tempo real, testando-o pela primeira vez na circulação coronária de pacientes humanos com Cardiomiopatia Dilatada não-isquémica e em pacientes saudáveis que serviram de grupo de controlo (Takarada et al., 2010). Este método foi baseado numa publicação de 2001, em que Berkels *et al.* utilizam um sensor eletroquímico selectivo especificamente para o ON, para a quantificação do mesmo em plasma sanguíneo, demonstrando pela primeira vez que era possível quantificar este gás em amostras biológicas, através da utilização de um eléctrodo electroquímico (Berkels et al., 2001). Tendo por base este novo método, desenvolveu-se então um sensor de ON integrado num catéter que tem a capacidade de medir concentrações intra-arteriais de ON *in-vivo* e que se provou ter alta sensibilidade e selectividade para ON, quando comparado com outros métodos de quantificação de ON, sendo que esta técnica tem um limite de detecção de 0,08nM (Goto & Mochizuki, 2008; Mochizuki et al., 2003; Neishi et al., 2005).

Os resultados deste estudo comprovaram, pela primeira vez, que o sensor de ON pode ser utilizado para avaliação clínica da função endotelial em pacientes com doenças cardiovasculares, através da medição directa das concentrações de ON presentes na circulação coronária destes pacientes (Takarada et al., 2010). Este facto vai permitir uma melhor caracterização da fisiologia e patofisiologia do ON e pode abrir novas oportunidades terapêuticas e de diagnostico em humanos (Takarada et al., 2010).

1.4 Objectivos

Este projecto contém um objectivo principal:

Estabelecer uma ligação entre o ON sanguíneo e o desenvolvimento de hipertensão, em gatos.

Para cumprir com este objectivo, foram estabelecidos 4 sub-objectivos mais específicos, cujos resultados permitirão alguma discussão e especulação, relativamente ao objectivo principal:

1. Determinar valores de controlo de ON em amostras sanguíneas de gatos saudáveis, utilizando a técnica de medição de Quimioluminescência.
 - a. Comparar valores de ON obtidos em animais do sexo masculino aos valores obtidos em animais do sexo feminino.
2. Comparar valores de controlo obtidos em (1), com valores de ON de amostras sanguíneas de gatos hipertensos (com várias causas de hipertensão), com o fim de verificar se há alguma alteração.
3. Comparar valores de controlo obtidos em (1), com valores de ON de amostras sanguíneas de gatos com IRC normotensos ($PAS > 160\text{mmHg}$).
 - a. Comparar valores obtidos em (3) com valores de gatos hipertensos.
4. Comparar valores de ON obtidos a partir de amostras sanguíneas de gatos hipertensos (com várias causas de hipertensão) antes de iniciarem tratamento com amlodipina, com os valores obtidos a partir de amostras sanguíneas desses mesmos gatos, após o sucesso do tratamento (ou seja, após a estabilização da sua PAS)
 - a. Comparar valores obtidos em (4) com valores obtidos em (1).

2. Material e Métodos

O estudo aqui relatado, consiste de um estudo piloto realizado para a tese de doutoramento da Esther Bijsmans, doutoranda do RVC.

2.1 A população seleccionada

Para este estudo e tendo em conta os sub-objectivos definidos, foram seleccionados gatos pertencentes a duas clínicas distintas: PDSA Bow e BSAH. Todos os gatos têm uma idade a partir dos 10 anos e os que foram escolhidos para este estudo, tendo em conta os 4 subobjectivos definidos, foram os seguintes:

2.1.1 Determinação de valores de controlo de ON em amostras sanguíneas de gatos saudáveis, utilizando a técnica de medição de Quimioluminescência

- Gatos saudáveis: este grupo seria definido pelos gatos que se apresentavam às consultas, num período de 6 em 6 meses e aos quais seria sempre retirada uma amostra de sangue e outra de urina, por forma a poderem ser realizados painéis bioquímicos de rotina que permitiam avaliar o estado de saúde do animal.

2.1.2 Comparação de valores de controlo obtidos, com valores de ON de amostras sanguíneas de gatos hipertensos

- Gatos hipertensos, ainda sem qualquer tipo de tratamento (isto é, cuja condição hipertensa é diagnosticada no dia da consulta): neste grupo seriam incluídos todos os gatos que se apresentavam na consulta com PAS > 160mmHg e lesões oculares visíveis ao exame oftalmológico do fundo do olho, ou com PAS > 160mmHg em duas visitas seguidas, ainda que não tivessem lesões oculares presentes. A estes gatos seria sempre recolhida uma amostra de sangue antes do início do tratamento, para investigação de causas primárias responsáveis pelo desenvolvimento da hipertensão. Neste estudo, a causa da hipertensão é irrelevante neste grupo de gatos.

2.1.3 Comparação de valores de controlo obtidos, com valores de ON de amostras sanguíneas de gatos com IRC normotensos

- Gatos com IRC normotensos: incluem-se neste grupo todos os gatos que tenham valores de Creatinina superiores a 177 e valores de densidade urinária inferiores a 1,035 e uma PAS < 160mmHg. Todos os gatos aqui incluídos iniciaram dieta renal da Royal Canin, imediatamente após o diagnóstico da sua condição e apresentavam-se na consulta no máximo de 8 em 8 semanas (dependendo do estado de evolução da doença e da resposta renal ao tratamento fornecido).

2.1.4 Comparação de valores de ON obtidos a partir de amostras sanguíneas de gatos hipertensos, antes e depois do tratamento com Amlodipina

- Gatos hipertensos (conforme definidos em 2.1.2). Este grupo, por sua vez, subdivide-se em dois:
 - o Gatos hipertensos pré-tratamento com amlodipina (ou seja, que começaram o tratamento com amlodipina no dia em que se recolheu a primeira amostra de sangue, devido a presença de sinais de hipertensão)

- Gatos hipertensos pós-tratamento com amlodipina (inclui os mesmos gatos presentes no sub-grupo mencionado acima, mas aqui encontram-se as amostras recolhidas numa fase em que a PAS já se encontra estabilizada devido ao efeito da amlodipina)

Nota: entenda-se por “sinais de hipertensão” – gatos com PAS > 160mmHg e lesões oculares visíveis ao exame oftalmológico do fundo do olho, ou com PAS > 160mmHg em duas visitas seguidas, ainda que não tivessem lesões oculares presentes.

2.2 As consultas e a recolha de dados

As clínicas visitadas consistem de duas clínicas de cães e gatos diferentes, em dois locais distintos: PDSA Bow e BSAH.

Em cada visita seriam vistos apenas gatos com idade a partir dos 10 anos e que tivessem uma ou varias das seguintes condições: hipertensão idiopática, IRC e hipertiroidismo. Cada gato seria referenciado para estas consultas por médicos veterinários dentro das próprias clínicas, ou de qualquer outra clínica, sendo que o sistema em vigor era como um sistema de referência para uma consulta de especialidade – desde que fossem gatos com pelo menos 10 anos de idade e cujas análises sanguíneas/urinárias revelassem resultados suspeitos para qualquer uma das condições acima referenciadas, poderiam ser referenciados para esta “clínica felina”. Para além dos gatos que sofram de alguma das três condições acima referidas, foram ainda recrutados alguns gatos saudáveis para a clínica (estes são vistos apenas duas vezes por ano), por forma a haver a possibilidade de armazenar amostras que poderão eventualmente servir de referência. Dentro do grupo dos gatos saudáveis, existem ainda gatos obesos pertencentes ao BSAH recrutados para um estudo dietético da Royal Canin, que tinha por base avaliar a resposta destes animais a uma ração específica para animais obesos.

Uma consulta de rotina deveria ter uma duração ideal de 10 minutos e seria constituída por quatro partes diferentes:

- Recolha da história
- Medição da PAS
- Exame de estado geral (onde se incluía exame fúndico oftalmológico - apenas em casos em que os animais apresentam uma PAS > 160mmHg)

- Recolha de amostras

Nenhum dos animais é sedado e todo este processo é efectuado através da ajuda fundamental de bons métodos de contenção (que utilizam o mínimo de força e contenção possível, dependendo de cada animal) realizados por uma enfermeira.

2.3 A medição da PAS

Foi utilizado um método indirecto de medição da PAS (Doppler com ultrasom) e os valores foram obtidos a partir de gatos conscientes, através da utilização de um protocolo standardizado de acordo com as guidelines da ACVIM. Foram sempre utilizados os mesmos aparelhos Doppler aquando da realização deste estudo. O stress e a ansiedade foram reduzidos o mais possível, através da execução das medições de PAS numa sala o mais silenciosa e calma possível e dando a cada animal um período de aclimatização de cerca de 10 minutos, antes de cada medição (período durante o qual era recolhida a história clínica). Os gatos foram sempre gentilmente contidos (raras vezes foi necessária contenção) ou tinham a sua PAS medida ainda dentro da sua caixa de transporte e a braçadeira foi sempre colocada num dos membros anteriores (consoante a posição preferida pelo animal). De acordo com o estabelecido pelas guidelines da ACVIM, foram tiradas várias medições seguidas a cada animal, até que se obtivessem 5 valores coerentes consecutivos, sendo que a primeira leitura foi sempre rejeitada.

Relativamente à técnica propriamente dita, a braçadeira utilizada foi escolhida consoante a medição obtida no membro anterior de cada gato (membro com circunferência inferior a 7cm, braçadeira de 2,5; membro com circunferência superior a 7cm, braçadeira de 3,3). Foi aplicado gel no membro a ser utilizado para efectuar as medições, de forma a tornar o processo mais fácil, melhorando o contacto da sonda com a pele. Nenhum animal foi tosquiado. O volume do Doppler foi adequadamente ajustado, para permitir a audição de um sinal claro. A braçadeira era manualmente insuflada, até que o sinal do pulso deixasse de ser audível e depois seria gradualmente desinsuflado. O valor a partir do qual o pulso se tornava novamente audível, era o valor registado para a PAS – neste caso foi apenas registada a pressão arterial sistólica.

2.4 O método de recolha

Toda a fase incluída nesta secção foi executada tendo por base o mencionado por Piknova (2011) e Pelletier *et al.* (2006), para amostras de sangue inteiro.

Neste projecto de investigação, o método utilizado para medir as quantidades de Óxido Nítrico presente nos sangues recolhidos foi o método de preservação de nitrito em solução de cianeto-férrico, para posterior análise por quimioluminescência reactiva. Segundo este protocolo, a solução de preservação (também muitas vezes mencionada como solução – “stop”) utilizada era feita de raiz todas as semanas, de acordo com o protocolo apresentado na secção *Apêndices* (Apêndice I).

Após a solução estar pronta, esta seria pipetada para tubos de heparina de 1ml, num rácio de sangue:solução de 4:1 – ou seja, seriam pipetados 200µL de solução, aos quais depois se juntariam 800µL de sangue. Tanto os tubos de heparina, como o tubo principal de onde foi pipetada a solução, devem ser mantidos sempre a uma temperatura de refrigeração de 4°C.

O sangue recolhido, seria proveniente da veia jugular dos gatos pertencentes à população seleccionada, tendo sido recolhido utilizando uma agulha de 22G, uma seringa de 10ml, sem sedação dos animais e recorrendo a tricotomia da zona circundante à veia jugular. Imediatamente após a recolha do sangue, este seria colocado, ainda com a agulha posta, primeiramente no tubo de heparina que continha a solução – “stop” (800µL – medição feita através da marca de 1ml presente no tubo), sendo a agulha descartada em seguida, e o restante sangue colocado nos restantes tubos (heparina, seco e EDTA) que depois seriam enviados para análises de rotina laboratoriais, evitando a contaminação do sangue com a solução de cianeto – férrico.

Uma vez que o sangue esteja dentro do tubo com a solução – “stop”, este deve ser agitado vigorosamente – se possível através da utilização de um vortex (há que ter em conta que a solução – “stop” tem uma consistência mais elevada do que o sangue, pelo que é necessário haver uma homogeneização rigorosa de ambos, de forma a que o sangue não coagule ao fim de uns minutos. Após todo este processo o sangue deve ser armazenado a uma temperatura de 4°C. Chegando ao laboratório, o passo seguinte passaria pela lavagem de 4 eppendorfs de 500µL para cada sangue conseguido, utilizando água Millipore. Após a lavagem estar concluída, pipeta-se então 250µL de cada amostra de sangue (diluído na solução – “stop”) para cada um dos 4 eppendorfs. Concluído este processo, todos os tubos de heparina e os 4 eppendorfs de cada tubo, seriam identificados e armazenados a uma temperatura de -80°C, até ser possível proceder à análise dos mesmos.

Nota: optou-se por armazenar cada amostra de sangue em 4 eppendorfs diferentes, por uma questão prática. Desta forma, se for necessário repetir a análise de alguma amostra por qualquer razão (como algo no processamento ter falhado, ocorrência de algum imprevisto, ou simplesmente porque não se confia no resultado obtido posteriormente à análise matemática do mesmo), já o sangue se encontra correctamente armazenado e pronto para ser transportado até ao laboratório para análise.

2.5 O processamento dos sangues – Método da quimioluminescência reactiva de ozono

As amostras foram todas processadas e analisadas segundo o método da quimioluminescência reactiva de ozono, num laboratório que pertence ao Centre of Clinical Pharmacology, William Harvey Research Institute^m, através de um analisador de ON (NOA 280^a, Sievers#).

O transporte das amostras desde as instalações do RVC até ao Centre of Clinical Pharmacology, William Harvey Research Institute^m foi feito através da utilização de gelo seco, para garantir que as amostras de sangue não descongelavam antes do tempo e eram mantidas a uma temperatura indicada ao longo de todo o processo de transporte.



Figura 5 – Transporte das amostras em gelo seco

Chegando ao laboratório, todo o procedimento é dividido em duas fases: o processamento das amostras e a análise das mesmas através do método da quimioluminescência reactiva. Toda a fase do processamento das amostras encontra-se descrita no Apêndice II deste trabalho. Tendo concluído esta fase do procedimento, passa-se

então à fase da análise propriamente dita. Nesta fase foram analisados 20 μ L de cada amostra, sendo que todas as amostras, à exceção das 8 primeiras (que foram analisadas 3 vezes cada uma), foram sujeitas a medição duas vezes cada. Em seguida, foram marcados os picos de NO visualizados no monitor correspondente ao aparelho, que por sua vez calculou as áreas de cada um desses picos marcados e fez a correspondência das mesmas à concentração de Óxido Nítrico presente em cada pico. Os valores obtidos finais são fornecidos como um valor de concentração X μ M (em que 1 μ M corresponde a 1picomole/ μ L) (Sievers, 2001).



Figura 6 – Desproteinização



Figura 7 – Amostras após centrifugação



Figura 8 – Sobrenadante a ser analisado pelo NOA

Os valores mínimos identificados pela máquina de quimioluminescência reactiva, são de aproximadamente 1 picomole (0,001 nanomole) e os máximos de 400 picomoles no modo de Alta Sensibilidade, sendo que em modo de Baixa Sensibilidade são detectados valores entre ~0.1 nanomoles e os 200-250 nanomoles, pelo que os valores obtidos devem estar compreendidos entre estes valores (Sievers, 2001). Neste caso específico, foi utilizado o modo de Alta Sensibilidade (Sievers, 2001). O reagente redutor (presente no vaso de expulsão) nesta técnica continha 0.09M de iodeto de potássio em ácido acético glacial.

2.6 A análise matemática e estatística dos resultados

Tendo concluído a fase de análise dos resultados, passou-se então à fase de análise matemática e estatística dos mesmos. Para esta fase foram utilizados os programas Microsoft Excel 2010 e IBM SPSS Statistics 21.

O primeiro passo desta fase seria calcular a média de cada conjunto de duas medições, para cada amostra, respectivos desvios-padrão, para ulteriormente se poder chegar aos coeficientes de variação e avaliar qual a consistência dos valores obtidos, por forma a decidir se estes são efectivamente credíveis.

Em seguida, deve transformar-se os valores obtidos na análise realizada, através do método de quimioluminescência reactiva, em valores reais. Isto é, recalculer os valores obtidos nos 20µL analisados e ver a quanto é que esses valores correspondem no volume total sanguíneo de um gato. Para este efeito, foram realizados uma série de cálculos que serão descritos de seguida.

Admita-se que “X” representa a variável em estudo (valores de Óxido Nítrico medidos). Desta forma foram efectuados os seguintes cálculos:

1. Alteração de unidades: tendo em conta que os valores calculados pelo computador são fornecidos em microMolares (µM – valor de concentração micromole/L), por uma questão de prática e conveniência estes foram então convertidos para nanoMolares (Nm – valor de concentração nanomol/L). Para este passo, basta multiplicar X por 1000. Este passo tem apenas como objectivo facilitar a conversão de micromoles para nanomoles, dado que se torna mais prático trabalhar em nanomoles.
2. Com o passo referido em (1), passa a ter-se uma dada concentração de NO (em nanomoles), num L de solução (XnM). Para se saber exactamente quantos nanomoles (nmol) existem em cada 20µL de solução analisados, consegue-se através de uma regra de três simples afirmar que:

$$Xnmol/20\mu L \text{ de solução} = XnM \times 20\mu L / 1000000 \mu L$$

Isto é, se num Litro, existe uma dada concentração de NO (XnM), então em 20µL vai existir Xnanomoles(Xnmol).

3. Assumindo que não há contaminação da solução – stop, nem do metanol com NO (se todo o protocolo for correctamente efectuado, sendo que a água Millipore deve ser substituída todas as semanas e que a solução devera ser feita de raiz também

semanalmente, juntamente com uma correcta lavagem dos materiais e seguindo as condições de armazenamento adequadas, será seguro afirmar com algum grau de confiança que não devera haver qualquer tipo de contaminação), pode então afirmar-se que o valor obtido em (3) é exactamente o mesmo valor que se vai observar nos 800µL de sangue recolhidos e introduzidos nos tubos de heparina.

Para garantir um grau de confiança de 100% neste passo, deverão ser armazenados, todas as semanas, juntamente com as respectivas amostras recolhidas, pelo menos dois eppendorfs que contenham apenas a solução – stop (geralmente identificados como “Controlo”), para que possam ser também analisadas pelo método de quimioluminescência reactiva, juntamente com o metanol utilizado para o processamento das amostras. Deste modo, poderão obter-se valores mais precisos da concentração exacta de NO₂ no sangue recolhido, reduzindo assim a possibilidade de serem considerados valores resultantes de contaminação. Assim, caso exista contaminação de alguma das soluções, o valor de NO obtido nos sangues correspondentes à solução (ou soluções) contaminada(s), basta efectuar-se o seguinte cálculo:

$$X = (Y - (0.1 \times [\text{solução} - \text{stop}] + 0.5 \times [\text{metanol}])) \times 2.5$$

(Mildred M. Pelletier et al., 2006)

Nesta equação, “Y” refere-se à concentração de NO medida na solução analisada de 20µL; “[solução – stop]” refere-se à concentração de NO encontrado na solução – stop; “[metanol]” refere-se à concentração de NO encontrado no metanol utilizado no processamento das amostras; 0.1 corrige para o NO medido que se encontra a contaminar a solução – stop; 0.5 corrige para o NO medido que se encontra a contaminar o metanol; 2.5 corrige para a diluição da amostra em metanol (1:1) e solução – stop (4:1).

4. Tendo então o valor final de ON em nanomoles, nos 20µL analisados, deve então voltar a transformar-se este valor, num valor de concentração – Nm. Para isso basta multiplicar-se o valor obtido em (3) por 1000000.
5. Por último, para se obter o valor final deve então dividir-se o valor obtido em (4) pela quantidade de sangue recolhida (neste projecto foram utilizados dois factores de

diluição diferentes, pelo que os valores obtidos vão ser divididos por 7,5ml ou 8,0ml, dependendo do período de tempo em que as amostras foram recolhidas). Após este passo final, obtém-se então o valor correspondente ao valor real de ON da amostra de sangue recolhida.

A fase seguinte será então fazer uma análise estatística dos dados. Nesta fase será primeiramente avaliado se os valores obtidos se encontram Normalmente distribuídos, através da observação de um histograma e do teste de Normalidade de Shapiro – Wilk. São também realizados gráficos do tipo Boxplot, para se visualizar como se encontram distribuídos os valores amostrais de forma geral, facilitando assim a sua análise. Em seguida, efectuem-se as análises estatísticas correspondentes (testes paramétricos, ou não paramétricos, dependendo da distribuição dos valores – Gaussiana ou não) e testam-se as hipóteses em estudo.

2.7 Bem-Estar Animal

Todos os clientes que pretendam fazer parte das clínicas mencionadas têm de assinar um documento de consentimento, que afirma que os donos concordam que sempre que for necessário recolher sangue e urina para as análises de rotina dos gatos, sejam armazenados excessos destas recolhas no RVC para fins de pesquisa e investigação – ou seja, nunca se recolhia sangue ou urina unicamente para fins de pesquisa ou investigação académica, mas sim sempre que era relevante para o animal (geralmente num animal cujas condições se encontram controladas, são recolhidas amostras para análises a cada 3 ou 4 meses. Este intervalo de tempo muda, de acordo com os sintomas dos animais ou com o estado de evolução das doenças de cada um). Todo este processo está aprovado pelo *RVC Welfare and Ethics committee*

3. Resultados

Para este estudo, foram recolhidos um total de 46 amostras de sangue sendo que: 18 deles pertencem ao grupo dos gatos saudáveis, 18 ao grupo de animais normotensos com IRC, 5 a animais que se enquadram no grupo de gatos hipertensos antes do início do tratamento com amlodipina e outros 5 correspondentes aos mesmos gatos, mas já depois de terem a sua PAS estabilizada devido ao tratamento efectuado.

A recolha das amostras foi realizada entre os dias 8 de Outubro, de 2013 e 22 de Janeiro, de 2014. Todas as amostras foram recolhidas entre as 9h e as 13h30 e todos os animais estavam potencial e idealmente em jejum.

Os cálculos efectuados para cada amostra, foram os descritos em Materiais e Métodos. No total de amostras analisadas (46 amostras), foram excluídas todas as que apresentavam um Coeficiente de Variação (CV) superior a 20. Dado que 7 destas mesmas amostras apresentaram um CV acima do desejado, foram estatisticamente analisadas 39 amostras. Estas 39 amostras dividiram-se pelos vários grupos existentes, da seguinte forma:

- ➔ Animais Saudáveis: 14 (35.9%)
 - Animais do sexo feminino: 3 (21,43%)
 - Animais do sexo masculino: 11 (78,57%)
- ➔ Animais com IRC normotensos: 15 (38.46%)
- ➔ Animais hipertensos pré-tratamento com amlodipina: 5 (12.82%)
- ➔ Animais hipertensos pós-tratamento com amlodipina: 5 (12.82%)

Para pormenores mais detalhados sobre os animais amostrados, consultar a tabela presente no Apêndice 3.

Para todos os grupos foram realizados testes de normalidade da distribuição dos dados, tendo-se concluído que esta é efectivamente normal.

3.1 Determinação de valores de controlo de ON em amostras sanguíneas de gatos saudáveis, utilizando a técnica de medição de Quimioluminescência

Conforme já foi mencionado, foram estudadas 14 amostras sanguíneas diferentes, provenientes de gatos saudáveis. A média de valores obtidos para este grupo de animais foi 667.6 nM de ON, sendo este o valor estabelecido como o valor normal para este estudo, dado que o grupo de animais saudáveis funciona como grupo controlo. O seu desvio padrão foi 162.9, sendo que o valor máximo registado foi 962,5 nM e o mínimo foi 362,5.

A distribuição dos valores obtidos é a seguinte:

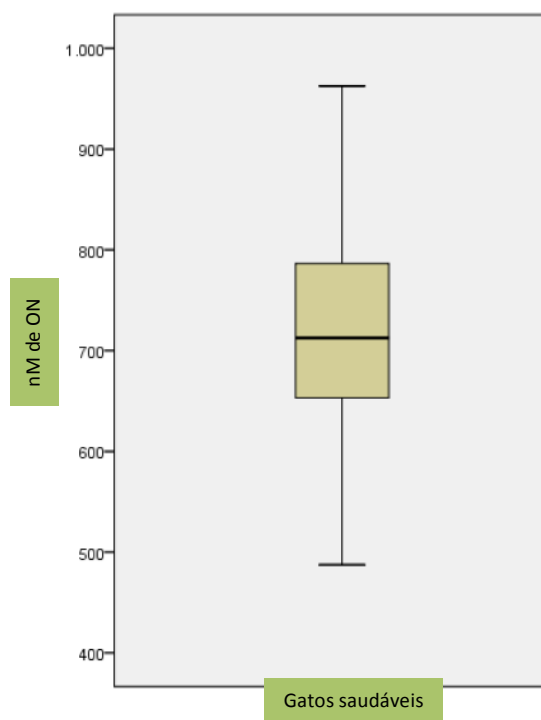


Figura 9 – Distribuição dos valores obtidos para gatos saudáveis

3.1.1 Comparação de valores obtidos entre gatos saudáveis do sexo masculino e gatos saudáveis do sexo feminino

No que diz respeito ao sexo dos animais saudáveis, tem-se que 3 destes 14 gatos, são do sexo feminino (total correspondente a 21,43% da população estudada neste grupo) e 11 são do sexo masculino (para um total percentual correspondente a 78,57%).

A média de valores de concentração de ON sanguíneo encontrada para as fêmeas foi 753,3 nM, enquanto que para os machos foi de 644,24 nM.

Foi realizado um teste – t para estudar a influência do sexo dos gatos saudáveis nos valores de concentração sanguínea de ON, no qual se obteve um p-value = 0,085.

3.2 Comparação de valores de controlo obtidos, com valores de ON de amostras sanguíneas de gatos hipertensos

A população de animais hipertensos é constituída por 5 gatos (12,82% do total da população estudada), cuja causa de hipertensão não é significativa e cuja PAS ainda não foi estabilizada com tratamento adequado. A média registada para este grupo é de 761.67 nM,

com um desvio padrão de 149.28. O valor mínimo registado foi 586,67nM e o máximo foi 1000 nM.

Ao comparar os valores obtidos neste grupo e no anterior, obtém-se o seguinte gráfico:

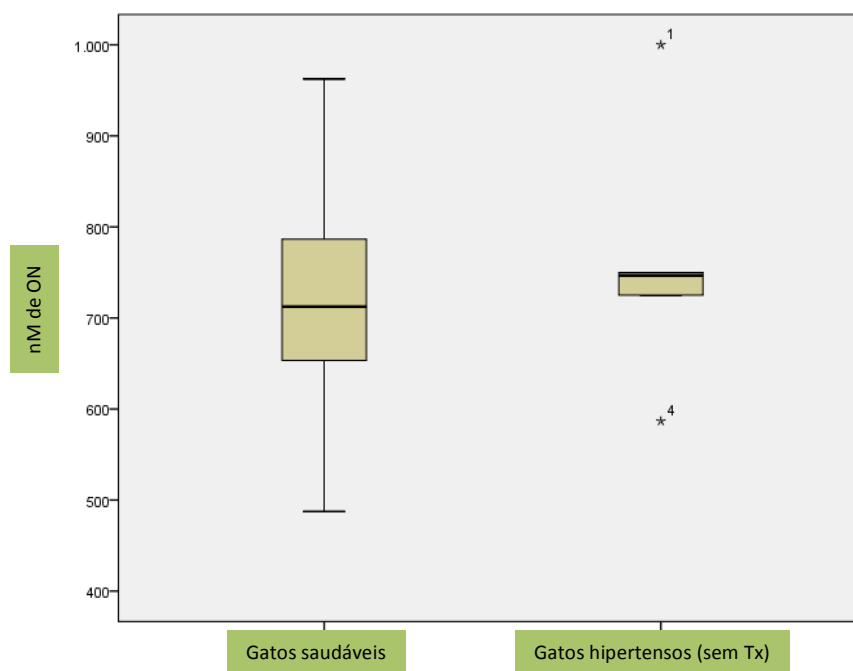


Figura 10 – Comparação de valores sanguíneos de ON entre gatos saudáveis e hipertensos

Foi realizado um teste-T de amostras independentes para estes dois grupos de animais, no qual se obteve um p-value = 0,392.

3.3 Comparação de valores controlo obtidos, com valores de ON de amostras sanguíneas de gatos com IRC normotensos

Foram analisadas 15 amostras de gatos normotensos com IRC (correspondentes a 38,46% do total populacional). A média dos valores obtidos para este foi de 648.9 nM e o desvio padrão foi 220.62. O valor máximo registado foi 1133,33 nM e o mínimo foi 266,67 nM.

Ao observar e comparar a distribuição de valores deste grupo, com o chamado “grupo de controlo”, tem-se o seguinte gráfico:

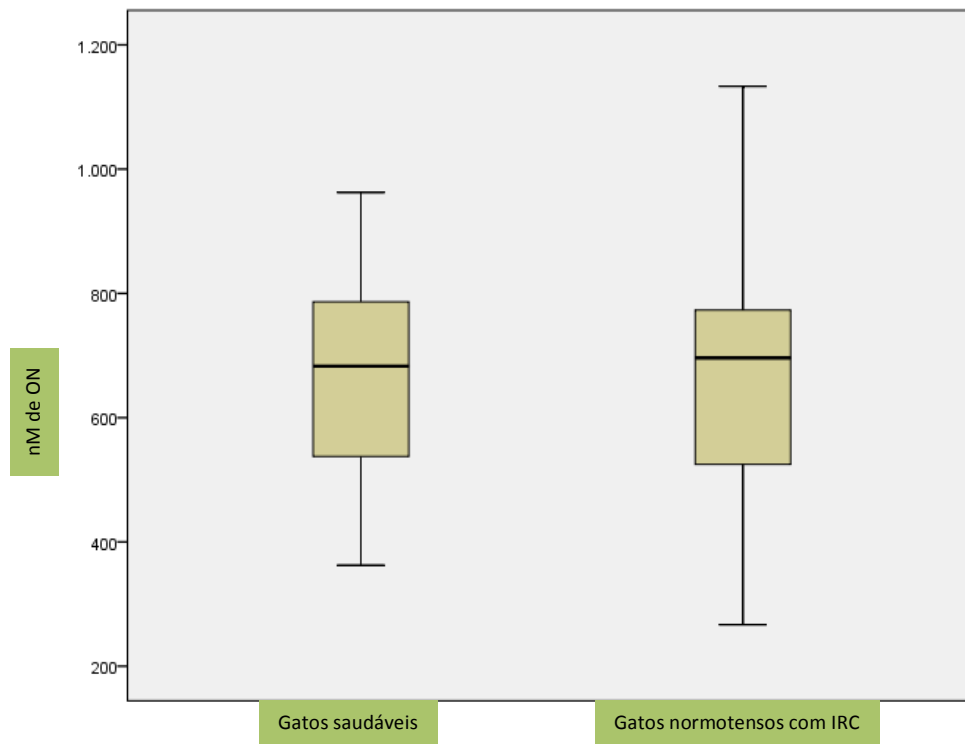


Figura 11 – Comparação dos valores sanguíneos de ON entre os animais saudáveis e os animais normotensos com IRC

Ao realizar um teste-T de amostras independentes para estes dois grupos, obteve-se um p-value = 0,327.

Observando de forma geral, a distribuição de valores entre os três grupos acima mencionados (saudáveis + gatos normotensos com IRC + hipertensos não tratados), o gráfico obtido é o seguinte:

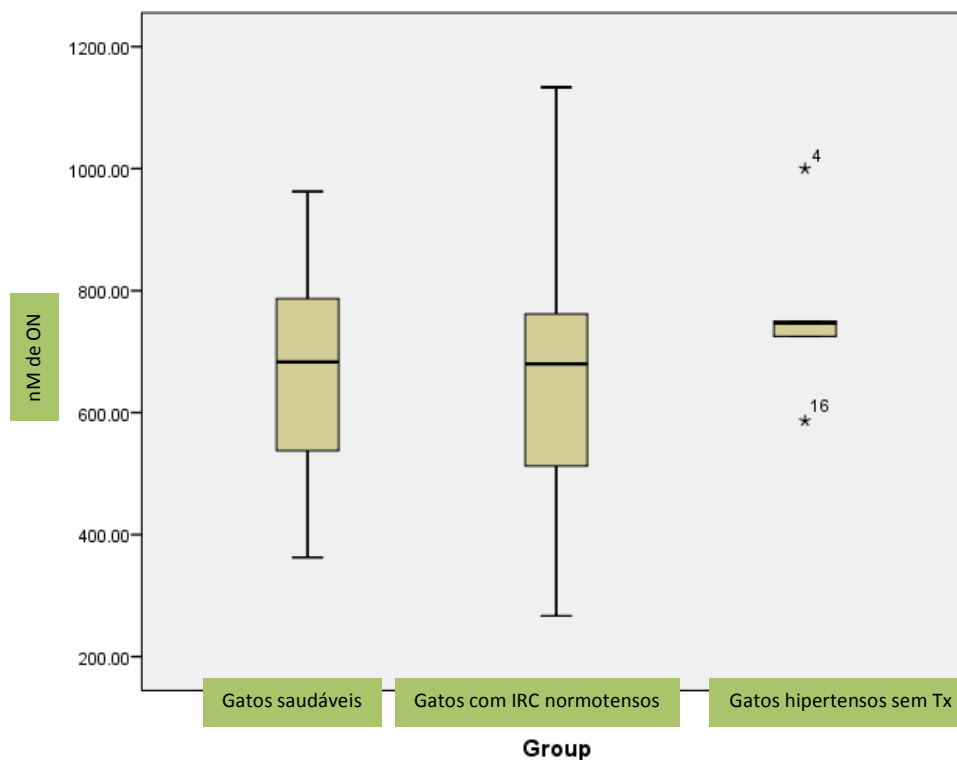


Figura 12 – Comparação dos valores de concentração sanguínea de ON obtidos nos grupos estudados

Realizou-se ainda um teste ANOVA, a fim de verificar a presença de uma eventual ligação entre estes 3 grupos de gatos e os valores de concentração sanguínea de ON obtidos, tendo sido obtido um p-value = 0,518

3.4 Comparação de valores de ON obtidos a partir de amostras sanguíneas de gatos hipertensos, antes e depois do tratamento com Amlodipina

Neste grupo foram estudados 5 animais hipertensos antes do início do tratamento com Amlodipina e após o sucesso do mesmo, isto é, após a estabilização da PAS destes 5 animais. A média obtida antes do início do tratamento foi (conforme mencionada acima) 761.67 nM, com um desvio padrão de 149.28. O valor mínimo registado foi 586,67nM e o máximo foi 1000 nM. Relativamente à média registada para estes mesmos animais, após a estabilização da sua PAS, o valor médio obtido foi 613,99 nM, com um desvio padrão de 146,55 nM. Já o valor máximo obtido foi 786,67 nM e o mínimo, 425 nM.

Ao observar a distribuição destes valores num gráfico, tem-se o seguinte:

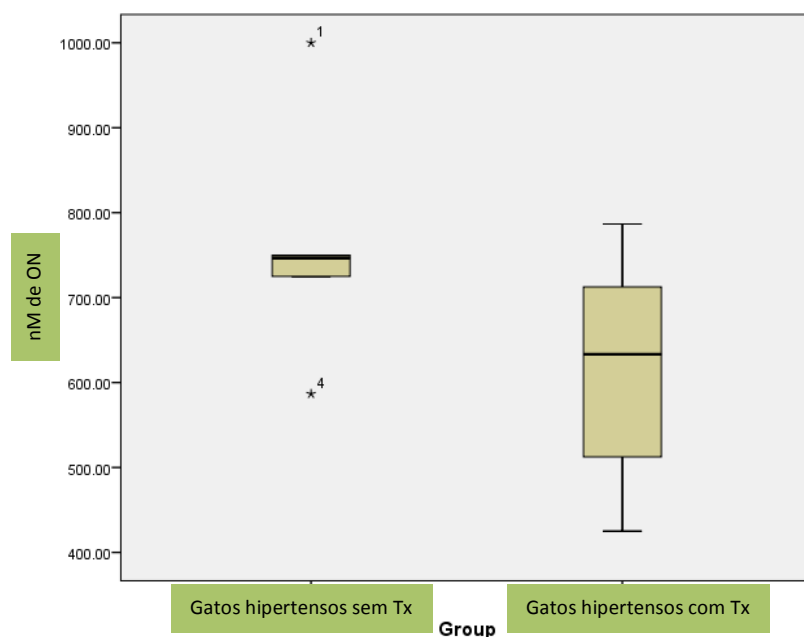


Figura 13 – Comparação entre os valores de ON obtidos em gatos hipertensos, antes e depois do tratamento com amlodipina.

Por forma a comparar esta distribuição de valores com a distribuição dos valores obtidos no grupo de controlo, tem-se o seguinte gráfico:

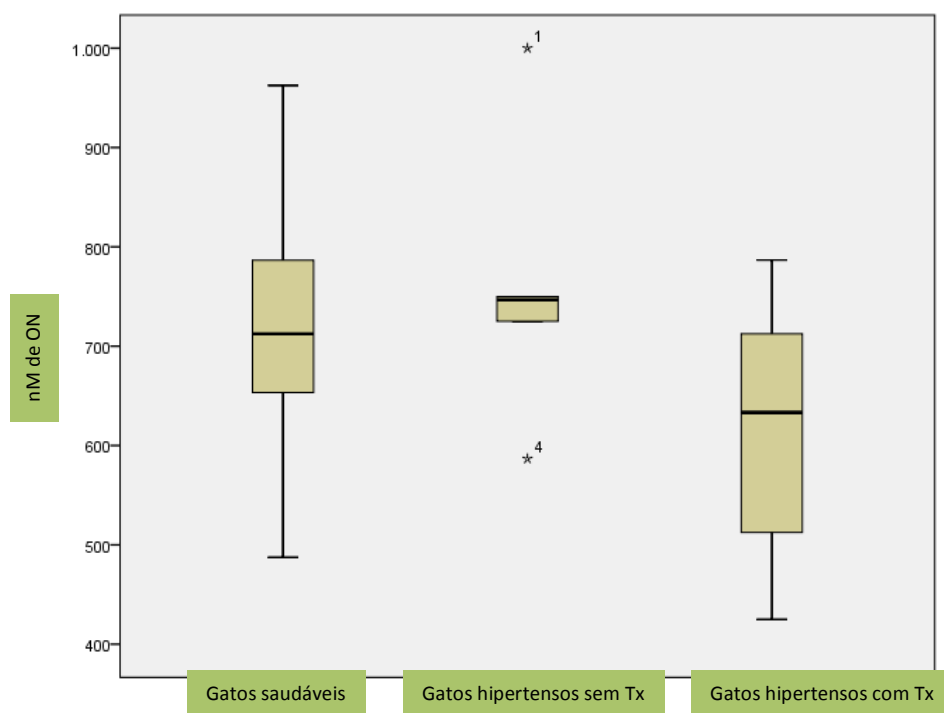


Figura 14 – Comparação dos valores de concentração sanguínea de ON entre os grupos de animais saudáveis e hipertensos, antes e depois do tratamento com Amlodipina

Realizou-se, por fim, um teste-T de amostras emparelhadas com os valores de ON obtidos antes e depois do tratamento com Amlodipina e o p-value obtido foi de 0,463.

Por ultimo, após terem sido realizados todos estes testes estatísticos, verificou-se ainda qual a força dos mesmos, isto é, calculou-se quantas amostras seriam necessárias para que a estatística conseguisse tirar dos valores obtidos conclusões reais e substanciais (com um grau de certeza de 80%, para um p-value inferior a 0,05), sendo que o valor obtido para N, para comparação entre os grupos saudável e normotensos com IRC, foi de 1192 animais para cada grupo; por outro lado, calculou-se que seriam necessários apenas 10 gatos para o grupo de animais hipertensos, antes e depois do tratamento, para se tirarem conclusões, com o mesmo grau de certeza.

4. Discussão

Primeiro que tudo, e de forma geral, deverá ser mencionado que, apesar de normalmente se rejeitarem todos os valores obtidos que tenham um CV superior a 10, neste estudo optou-se por se rejeitar apenas os valores obtidos com um CV superior a 20, dado que as concentrações em estudo eram muito baixas (o que faz com que uma diferença mínima, cause uma grande variação nos CVs), levando à rejeição de 7 amostras no total das 46, que não foram tidas em conta nos testes estatísticos efectuados, pois o seu CV revelava que os valores obtidos na leitura e análise das amostras, foram muito provavelmente devidos ao acaso, tendo um grau de confiança mínimo.

De notar que as primeiras 7 amostras foram analisadas 3 vezes (isto é, em três injeções diferentes), enquanto que as restantes foram analisadas apenas 2 vezes cada uma. Dado que estas 3 injeções resultavam num CV muito elevado (porque havia sempre um valor significativamente mais elevado, que os outros dois), optou-se por se eliminar o valor mais discrepante dos cálculos (o que levou a uma diminuição do CV para valores inferiores a 10 em 5 dos 7 casos e para valores inferiores a 20 em 100% dos casos) e por se repetir a análise dessas mesmas amostras uma segunda vez (com duas injeções cada uma). Após esta segunda análise, compararam-se os CVs obtidos em cada uma e escolheu-se utilizar na estatística os valores com o CV mais baixo, dado que o seu grau de confiança é maior.

4.1 Determinação de valores de controlo de ON em amostras sanguíneas de gatos saudáveis, utilizando a técnica de medição de Quimioluminescência

Para começar, o primeiro sub-objectivo colocado, concretizou-se: sendo a quimioluminescência uma técnica que previamente ainda não tinha sido utilizada para medir as concentrações sanguíneas de óxido nítrico em gatos, havia dúvidas relativamente à sua eficácia. Após a realização deste estudo, tornou-se possível afirmar que esta técnica demonstra efectivamente resultados positivos para os fins desejados, tendo sido sempre possível a detecção de picos de ON (ainda que muito baixos, sugerindo valores de concentração não muito elevados) nas amostras sanguíneas analisadas e, consequentemente, o estabelecimento de valores controlo – valores obtidos no grupo de gatos saudáveis. De referir, que os valores obtidos neste grupo de animais são, de facto, valores que se distribuem por um intervalo relativamente grande, isto é, que se encontram muito dispersos. Uma provável explicação para este resultado, reside no stress animal. Sendo o ON uma substância vasodilatadora libertada continuamente no organismo e tendo em conta que a actividade da sua enzima sintetizadora aumenta sempre que há um registo do aumento da turbulência vascular, é seguro afirmar que o stress pode ser um dos factores estimulantes da síntese de ON. Posto isto, é possível colocar a hipótese de que a elevada dispersão de valores obtidos no grupo de animais saudáveis, se relaciona com o facto de uns estarem mais habituados à manipulação (não ficando stressados com a mesma e libertando menos ON aquando da recolha de sangue) e outros não, ficando mais stressados e hipertensos devido a este facto (o que resulta numa maior libertação de ON).

De mencionar também que, por forma a tornar os resultados obtidos o mais fiáveis possível e até mesmo, menos dispersos, os gatos em estudo deveriam todos estar sob a mesma dieta (dado que uma grande parte de nitritos e nitratos presentes no organismo são ingeridos pela dieta) e deveriam também todos ingerir água millipore fresca (isto é, água livre de nitritos e nitratos), diminuindo assim as probabilidades de as concentrações finais de ON obtidas derivarem de factores externos, que não os estudados e também para possibilitar uma maior coerência entre os vários resultados, evitando ao máximo variações individuais que possam existir devido à dieta.

Para além destas possíveis explicações, existe ainda o erro laboratorial. Neste projecto, houve erros dignos de registo e que influenciam não apenas os resultados do grupo de

controlo, mas de todos o grupos analisados e estudados. As que seriam mais fáceis de controlar e que são atribuídas a erro pessoal são duas:

- ➔ Deveriam ter sido analisadas, conjuntamente com os sangues, amostras “brancas” das soluções-stop, que foram preparadas semanalmente, por forma a saber se havia alguma contaminação de nitritos (que, como já foi mencionado, existem ubiqüitariamente na água e no material de vidro presente no laboratório) associada apenas à forma como esta foi preparada e não ao sangue analisado. Desta maneira, seria possível associar valores de contaminação da solução, aos valores finais obtidos, podendo estes ser subtraídos aos valores finais obtidos nas amostras da semana correspondente a cada solução, o que permitiria a obtenção de valores mais reais e fidedignos. Para além disto, seria ainda possível melhorar a técnica de produção da solução-stop, dado que se existisse contaminação seria possível ter a certeza de que alguma coisa poderia ser melhorada, apesar de ser difícil eliminar por completo a presença de substâncias ubiqüitárias.
- ➔ A água millipore utilizada para lavar a instrumentação de laboratório e preparar a solução-stop deveria ter sido renovada semanalmente, como medida de prevenção de desenvolvimento de contaminação da água, que iria também posteriormente contaminar a solução. Como não se efectuou este processo, a água acabou por ficar contaminada, a partir de um período de tempo incerto, sendo que esta apenas foi substituída quando esta contaminação se tornou visível. Este facto acabou certamente por levar à contaminação da solução-stop utilizada para armazenar as amostras. Devido a não se ter realizado o passo anterior, não foi possível eliminar esta contaminação dos valores finais obtidos na análise das amostras.

A acrescentar a estes dois factores que influenciam a contaminação das amostras mencionados acima, deve ainda mencionar-se que todo o processamento natural das amostras para este estudo tem vários passos que podem certamente influenciar os níveis de ON obtidos no final, dado que podem levar a contaminação das amostras: para além dos que já foram mencionados (contaminação da solução, por erro do operador, ou por factores intrínsecos ao ambiente em que se trabalha), existe ainda o processo de recolha do sangue (que idealmente deve ser o mais rápido possível), o armazenamento do sangue a temperaturas adequadas, uma lavagem correcta dos materiais em que as amostras vão ser mantidas e dos que vão ser utilizados para as manipular, todo o processamento que antecede a análise do sangue

recolhido (desproteínização, centrifugação, separação do sobrenadante) e mesmo o próprio processo de análise do ON, que implica injeções recorrentes da amostra no analisador. Toda esta manipulação acaba por influenciar, certamente, os valores obtidos, justificando também o porquê de haver tanta discrepância entre os valores sugeridos pela literatura e o facto de ser tão complicado conseguir-se valores de referência de ON.

4.1.2 Comparação de valores obtidos entre gatos saudáveis do sexo masculino e gatos saudáveis do sexo feminino

Relativamente à influência do sexo dos gatos, nos valores obtidos, o p-value obtido foi o mais baixo de todos, tendo-se registado um valor de 0,085, o que sugere que com o aumento da amostra populacional, talvez se torne possível diminuir este valor para um que seja estatisticamente significativo. Segundo os valores obtidos, estes sugerem que os gatos do sexo feminino possam ter uma capacidade de produção de ON maior do que os machos – o que se torna interessante quando se verifica que dos 5 gatos pertencentes ao grupo dos hipertensos, apenas 1 é do sexo feminino. Este achado torna-se interessante, quando comparado com o que vem escrito nas referências bibliográficas citadas neste trabalho e referentes a esta componente, que, tal como já foi referido, mencionam que até à data não foi comprovada a existência de diferenças entre sexo, no que diz respeito ao desenvolvimento de hipertensão em gatos (apenas em cães).

4.2 Comparação de valores de controlo obtidos, com valores de ON de amostras sanguíneas de gatos hipertensos

Ao contrário do esperado, segundo a teoria, e conforme se pode observar nos gráficos apresentados, os gatos hipertensos apresentam valores de concentração sanguínea de ON distribuídos num intervalo muito mais pequeno e elevado do que os animais saudáveis. Estes dados apontam para um ON que actua como mecanismo de defesa do organismo (isto é, quando se verifica um aumento da PAS e consequente aumento da turbulência vascular, a libertação do ON vai aumentar, na tentativa de aliviar a alta PAS observada), em vez de um ON causador da hipertensão – esperava-se que uma diminuição da produção basal de ON fosse a causa do desenvolvimento de hipertensão.

No entanto, é de relevar que nenhuma destas conclusões é estatisticamente relevante, tendo em conta os p-values obtidos.

Para além disto, deve ser referido que os grupos de animais a serem estudados futuramente deveriam ser mais homogéneos, no sentido em que se deveria estabelecer que tipo de animais hipertensos se devem incluir no estudo (neste estudo foram estudados animais com hipertiroidismo, IRC e hipertensos idiopáticos, o que pode levar à obtenção de valores diferentes, devido às diferentes condições que cada animal tem e ao facto de ser desconhecida a forma como cada uma destas patologias interage com a produção de ON). Esta homogeneização de grupos, leva a que os dados obtidos sejam mais coerentes.

4.3 Comparação de valores de controlo obtidos, com valores de ON de amostras sanguíneas de gatos normotensos com IRC

Tendo em conta os p-values obtidos (todos superiores a 0,05), não há evidência estatística suficiente para rejeitar a hipótese nula colocada, isto é, não se pode afirmar que existe uma diminuição das concentrações de ON em gatos normotensos com IRC. Por outro lado, também não se pode afirmar o contrário, dado que o número necessário de amostras para se tirar uma conclusão suficientemente forte para este estudo está abaixo do desejado. Tendo em conta que neste caso (animais saudáveis vs. animais normotensos com IRC), se tem uma amostragem de apenas 29 animais (14 para o primeiro grupo e 15 para o segundo), os dados obtidos neste estudo ficaram muito aquém do número desejado, por variadas razões, sendo a principal o curto espaço de tempo em que a recolha de amostras foi efectuada (de 8 de Outubro, a 22 de Janeiro).

Ao observar a distribuição de valores nos gráficos, não existe qualquer diferença visível na mesma entre estes dois grupos.

Por último, é importante mencionar que, idealmente, os valores obtidos no grupo de gatos normotensos com IRC, deveriam ser comparados não só com os valores do grupo de controlo, mas também com valores de gatos com IRC hipertensos, ainda sem tratamento, para que seja possível observar de que forma responde o ON ao IRC em duas situações distintas. Não foi possível incluir este grupo neste estudo, devido ao curto período de tempo em que a recolha de amostras consideradas ideais, foi possível.

4.4 Comparação de valores de ON obtidos a partir de amostras sanguíneas de gatos hipertensos, antes e depois do tratamento com Amlodipina

Tendo em conta os p-values obtidos (todos superiores a 0,05), não há evidência estatística suficiente para rejeitar a hipótese nula colocada, isto é, não se pode afirmar que a

amlodipina causa um aumento da libertação de ON, em comparação com animais hipertensos, ainda sem o seu tratamento iniciado, apesar de também não se poder afirmar o contrário, dado que, para se poderem tirar conclusões estatisticamente relevantes para este grupo (animais hipertensos, antes e depois do tratamento), seriam apenas precisos 10 gatos. Tendo em conta que este estudo avaliou 5, existe algum grau de confiança nos resultados obtidos para estes casos (ainda que estatisticamente irrelevante).

Ao observar os gráficos, existe uma diferença óbvia (mas estatisticamente irrelevante) nos valores de concentração sanguínea de ON observados antes e depois do tratamento da hipertensão, com devida estabilização da PAS – de relevar que nesta situação, os animais analisados são os mesmos, pelo que os valores obtidos são coerentes e comparáveis. De notar que, após a estabilização da PAS os valores se distribuem de forma muito semelhante aos valores obtidos para o grupo de controlo.

Assim sendo e resumindo o que já foi mencionado, tem-se que: os valores obtidos para os animais saudáveis e os valores obtidos para os animais normotensos com IRC, são semelhantes; os valores obtidos para os animais hipertensos ainda não tratados, encontram-se num intervalo mais curto e elevado, do que os dos animais saudáveis; os valores obtidos no grupo de gatos tratados para a hipertensão distribuem-se de forma muito semelhante aos valores obtidos no grupo de gatos saudáveis.

Em termos futuros, este estudo deverá ter continuidade por forma a aumentar o máximo possível a amostra de gatos em estudo e possibilitar conclusões mais fidedignas. Por forma a aumentar este grau de certeza, o ideal seria mesmo a realização da segunda parte deste estudo utilizando um placebo – ou seja, no que diz respeito à observação de níveis sanguíneos de ON em gatos hipertensos pré- e pós-tratamento, o ideal seria administrar a amlodipina a alguns destes gatos e um placebo a outros, sendo que depois se poderia comparar os valores finais de concentração sanguínea de ON entre estes dois grupos e também entre os níveis obtidos antes do início do tratamento, permitindo ao investigador tirar conclusões 100% fidedignas. Por outro lado, seria muito difícil realizar este estudo desta forma (apesar de esta ser a forma ideal), por razões éticas, dado que isto implicaria que animais hipertensos não fossem adequadamente tratados durante um determinado período de tempo, o que pode levar a lesões graves ou ao agravamento de doenças concomitantes.

5. Conclusão

Como já foi mencionado anteriormente, não foi possível retirar do estudo efectuado nenhuma conclusão estatisticamente relevante, relativa à influência que o ON pode eventualmente ter no desenvolvimento de hipertensão em animais com IRC, no entanto, olhando para os testes que foram feitos para determinar qual o tamanho da população que deve ser estudada para os valores aqui obtidos e para os gráficos que foram aqui apresentados, o facto de serem necessários 1192 animais em cada um destes dois grupos (saudável e normotensos com IRC) e o facto de não ser observável nenhuma diferença nos gráficos que ilustram a distribuição dos valores obtidos, permite afirmar que possivelmente não vai haver nenhuma diferença estatisticamente relevante entre estes animais, mesmo ao atingir-se o tamanho da amostragem desejado, dado que é necessário avaliar-se uma população tão grande para se tirarem conclusões com um grau de certeza de 80%. Este facto é por si só interessante, dado que se sabe que em humanos existe efectivamente uma diferença entre estes grupos.

No entanto, como já foi também referido, é observável uma diferença entre os grupos de animais saudáveis e hipertensos, sem tratamento, quando se visualizam as concentrações finais obtidas, o que, por si só, pode sugerir que, com um aumento relativo da população a ser estudada, essa diferença pode ser ainda mais evidenciada, razão pela qual se devem continuar a estudar as hipóteses aqui colocadas. Para além disto, esta diferença da distribuição de valores, é inclusivamente surpreendente, no sentido em que não corresponde ao esperado (teoricamente, esperava-se que a amlodipina causasse uma maior libertação de ON, ajudando assim a resolver a hipertensão), dado que os valores obtidos após a estabilização da PAS deixaram de estar tão concentrados em intervalos mais elevados. A observação deste facto pode significar que o ON é apenas um mecanismo de defesa do organismo, em vez da causa para o desenvolvimento de hipertensão, o que justifica as concentrações mais baixas após a resolução deste problema, e o facto de estas estarem tão elevadas em comparação com os restantes grupos, antes do tratamento ser iniciado. Este facto aponta para um diferente mecanismo de acção da amlodipina, que não o aumento da libertação de ON, já que este não contribui para o tratamento, actuando apenas de forma a compensar as alterações fisiológicas observadas a nível da PAS.

Relativamente à influência do sexo dos gatos nos valores de concentração sanguínea de ON, um aumento da amostra populacional em estudo poderá revelar conclusões interessantes – os resultados aqui obtidos sugerem que as fêmeas produzem mais ON do que

os machos, o que vai inclusivamente de encontro ao facto de apenas 1 dos gatos hipertensos ser do sexo feminino, permitindo colocar a hipótese de as fêmeas terem menos probabilidades de desenvolver hipertensão, devido ao facto de produzirem mais ON naturalmente.

6. Bibliografia

- A Chalifoux, A. D., D Blais, N Larivière, and N Pelletier. (1985). Evaluation of the arterial blood pressure of dogs by two noninvasive methods. *Can J Comp Med*, 49(4), 419-423.
- Aisaka, K., Gross, S. S., Griffith, O. W., & Levi, R. (1989). NG-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? *Biochem Biophys Res Commun*, 160(2), 881-886.
- Alonso-Galicia, M., Brands, M. W., Zappe, D. H., & Hall, J. E. (1996). Hypertension in obese Zucker rats. Role of angiotensin II and adrenergic activity. *Hypertension*, 28(6), 1047-1054.
- Archer, S. (1993). Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J*, 7(2), 349-360.
- Ayajiki, K., Kindermann, M., Hecker, M., Fleming, I., & Busse, R. (1996). Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res.*, 78(5), 750-758.
- Baigent, C., Burbury, K., & Wheeler, D. (2000). Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet*, 356(9224), 147-152. doi: 10.1016/s0140-6736(00)02456-9
- Balligand, J. L., Ungureanu-Longrois, D., Simmons, W. W., Pimental, D., Malinski, T. A., Kapturczak, M., . . . al., e. (1994). Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem.*, 269(44), 27580-27588.
- Bartges, J. W., Willis, A. M., & Polzin, D. J. (1996). Hypertension and renal disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 26(6), 1331-1345.
- Baylis, C. (2008). Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294, 1 - 9. doi: 10.1152/ajprenal.00424.2007
- 10.1152/ajprenal.00424.2007.-The
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *American Physiological Society*, 271, 1424-1437.
- Belew, A. M., Barlett, T., & Brown, S. A. (1999). Evaluation of the white-coat effect in cats. *J Vet Intern Med.*, 13(2), 134-142.
- Bergstrom, J., Alvestrand, A., & Furst, P. (1990). Plasma and muscle free amino acids in maintenance hemodialysis patients without protein malnutrition. *Kidney Int*, 38(1), 108-114.
- Berkels, R., Purol-Schnabel, S., & Roesen, R. (2001). A new method to measure nitrate nitrite with a NO sensitive electrode 2001. *Journal of Applied Physiology*, 90, 317-320.
- Bijsmans, E. S., Jepson, R. E., Chang, Y. M., Syme, H. M., & Elliott, J. (2013). Changes in systolic blood pressure over time in cats with Chronic Kidney Disease. *American College of Veterinary Internal Medicine*.
- Bijsmans, E. S., Jepson, R. E., Syme, H. M., & Elliott, J. (2012). The Association Between Hypertension and Chronic Kidney Disease in Cats and the Available Management Options *CVL - Companion Animals*, 1(4), 121-131.
- Bodey AR, M. A. (1996). Epidemiological study of blood pressure in domestic dogs. *J Small Anim Pract.*, 37(3), 116-125.
- Bodey, A. R., & Michell, A. R. (1996). Epidemiological study of blood pressure in domestic dogs. *J Small Anim Pract*, 37(3), 116-125.
- Bodey, A. R., & Sansom, J. (1998). Epidemiological study of blood pressure in domestic cats. *J Small Anim Pract.*, 39(12), 567-573.
- Bouby, N., Hassler, C., Parvy, P., & Bankir, L. (1993). Renal synthesis of arginine in chronic renal failure: in vivo and in vitro studies in rats with 5/6 nephrectomy. *Kidney Int*, 44(4), 676-683.
- Bovee, K. C., Littman, M. P., Crabtree, B. J., & Aguirre, G. (1989). Essential hypertension in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 195(1), 81-86.
- Brown CA, M. J., Mathur S, Brown SA. (2005). Hypertensive encephalopathy in cats with reduced renal function. *Vet Pathol.*, 42(5), 642-649.

- Brown S, A. C., Bagley R, Carr A, Cowgill L, Davidson M, Egner B, Elliott J, Henik R, Labato M, Littman M, Polzin D, Ross L, Snyder P, Stepien R; American College of Veterinary Internal Medicine. (2007). Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J Vet Intern Med.*, 21(3), 542-558.
- Brown, S., Atkins, C., Bagley, R., Carr, A., Cowgill, L., Davidson, M., . . . Stepien, R. (2007). ACVIM consensus statement: Guidelines for the Identification, Evaluation, and Management of Systemic Hypertension in Dogs and Cats. *J Vet Intern Med*, 21, 542 - 558.
- Brown, S. A., Brown, C. A., & Hendi, R. (2000). Does systemic hypertension damage the canine kidney? (abstr). . *J Vet Intern Med*, 14, 351.
- Brown, S. A. B., C. A.; Hendi, R. (2000). Does systemic hypertension damage the canine kidney? *Journal Of Veterinary Internal Medicine.*, 14(3), 351.
- Brunner, H., Cockcroft, J. R., Deanfield, J., Donald, A., Ferrannini, E., Halcox, J., . . . Webb, D. J. (2005). Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension*. *Journal of Hypertension*, 23(2), 233-246.
- Bryan, N. S., & Grisham, M. B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med*, 43(5), 645-657. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026
- Buscemi, S., Cosentino, L., Rosafio, G., Morgana, M., Mattina, A., Sprini, D., . . . Rini, G. B. (2012). Effects of hypocaloric diets with different glycemic indexes on endothelial function and glycemic variability in overweight and in obese adult patients at increased cardiovascular risk. *Clinical Nutrition*(0). doi: 10.1016/j.clnu.2012.10.006
- Buttery, L. D., Springall, D. R., Chester, A. H., Evans, T. J., Standfield, E. N., Parums, D. V., . . . Polak, J. M. (1996). Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest.*, 75(1), 77-85.
- Campese, V. M., Mitra, N., & Sandee, D. (2006). Hypertension in renal parenchymal disease: why is it so resistant to treatment? *Kidney Int.*, 69(6), 967-973.
- Celermajer, D. S., Sorensen, K., Gooch, V., Sullivan, I., Lloyd, J., Deanfield, J., & Spiegelhalter, D. (1992). Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *The Lancet*, 340(8828), 1111-1115.
- Chetboul, V., Lefebvre, H. P., Pinhas, C., Clerc, B., Boussouf, M., & Pouchelon, J. L. (2003). Spontaneous feline hypertension: clinical and echocardiographic abnormalities, and survival rate. *J Vet Intern Med*, 17(1), 89-95.
- Chetboul V, L. H., Pinhas C, Clerc B, Boussouf M, Pouchelon JL. (2003). Spontaneous feline hypertension: clinical and echocardiographic abnormalities, and survival rate. *J Vet Intern Med.*, 17(1), 89-95.
- Chetboul, V., Tissier, R., Gouni, V., Almeida, V., Lefebvre, H., Concordet, D., . . . Pouchelon, J.-L. (2010). Comparison of Doppler ultrasonography and high-definition oscillometry for blood pressure measurements in healthy awake dogs. *AJVR*, 71(7), 766 - 772.
- Cooke, K. L., & Snyder, P. S. (1998). Calcium channel blockers in veterinary medicine. *J Vet Intern Med.*(12), 123-131.
- Corretti, M. C., Anderson, T. J., Benjamin, E. J., Celermajer, D., Charbonneau, F., Creager, M. A., . . . Vogel, R. (2002). Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*, 39(2), 257-265.
- Cortadellas O, d. P. M., Bayón A, Albert A, Talavera J. (2006). Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. *J Vet Intern Med.*, 20(4), 941-947.
- Cosby, K., Partovi, K. S., Crawford, J. H., Patel, R. P., Reiter, C. D., Martyr, S., . . . Gladwin, M. T. (2003). Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med*, 9(12), 1498-1505. doi: 10.1038/nm954

- Coulter DB, K. J. J. (1984). Blood pressures obtained by indirect measurement in conscious dogs. *J Am Vet Med Assoc.*, 184(11), 1375-1378.
- Cox, R. H., Peterson, L. H., & Detweiler, D. K. (1976). Comparison of arterial hemodynamics in the mongrel dog and the racing greyhound. *Am J Physiol*, 230(1), 211-218.
- Crispin SM, M. J. (2001). Systemic hypertensive disease and the feline fundus. *Vet Ophthalmol.*, 4(2), 131-140.
- Davy, K. P., & Hall, J. E. (2004). Obesity and hypertension: two epidemics or one? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286(5), R803-813. doi: 10.1152/ajpregu.00707.2003
- de Lemos, J. A., & Hillis, L. D. (1996). Diagnosis and management of coronary artery disease in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*, 7(10), 2044-2054.
- Deanfield, J. E., Halcox, J. P., & Rabelink, T. J. (2007). Endothelial function and dysfunction. *Circulation*, 115(10), 1285-1295.
- Dejam, A., Hunter, C. J., Pelletier, M. M., Hsu, L. L., Machado, R. F., Shiva, S., . . . Schechter, A. N. (2005). Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood*, 106(2), 734-739. doi: 10.1182/blood-2005-02-0567
- Demosthenous, M., Antoniadis, C., Tousoulis, D., Margaritis, M., Marinou, K., & Stefanadis, C. (2011). Endothelial nitric oxide synthase in the vascular wall: Mechanisms regulating its expression and enzymatic function. *Artery Research*, 5(2), 37-49. doi: 10.1016/j.artres.2011.03.003
- Doyle, M. P., & Hoekstra, J. W. (1981). Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem.*, 14(4), 351-358.
- Doyle, M. P., Pickering, R. A., DeWeert, T. M., Hoekstra, J. W., & Pater, D. (1981). Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites. *J Biol Chem*, 256(23), 12393-12398.
- DR., F. (2004). Association of systemic hypertension with renal injury in dogs with induced renal failure. *J Vet Intern Med.*, 18(3), 289-294.
- Durak, I., Akyol, O., Basesme, E., Canbolat, O., & Kavutcu, M. (1994). Reduced erythrocyte defense mechanisms against free radical toxicity in patients with chronic renal failure. *Nephron*, 66(1), 76-80.
- Dwyer, T. M., Banks, S. A., Alonso-Galicia, M., Cockrell, K., Carroll, J. F., Bigler, S. A., & Hall, J. E. (2000). Distribution of renal medullary hyaluronan in lean and obese rabbits. *Kidney Int*, 58(2), 721-729. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00218.x
- Egner, B., Carr, A., & Brown, S. (2007). *Essential facts on blood pressure in dogs and cats* (4th ed. Vol. 1): BE VetVerlag.
- ELLIOTT, J., BARBER, P. J., SYME, H. M., RAWLINGS, J. M., & MARKWE, P. J. (2001). Feline hypertension clinical findings and response to antihypertensive treatment in 30 cases.
- Elliott J, F. M., Syme HM. (2003). Idiopathic feline hypertension: epidemiological study. *Proc 13th ECVIM-CA Congress*, 754.
- Elliott, J., & Syme, H. M. (2006). Proteinuria in chronic kidney disease in cats--prognostic marker or therapeutic target? *J Vet Intern Med*, 20(5), 1052-1053.
- Esper, R., Nordaby, R., Vilarino, J., Paragano, A., Cacharron, J., & Machado, R. (2006). Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular Diabetology*, 5(1), 4.
- Ettinger, S. J., & Feldman, E. C. (2010). *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (S. Elsevier Ed. Seventh Edition ed. Vol. 1). Canada: Penny Rudolph.
- Feelisch, M., Rassaf, T., Mnaimneh, S., Singh, N., Bryan, N. S., Jourdain, D., & Kelm, M. (2002). Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J*, 16(13), 1775-1785. doi: 10.1096/fj.02-0363com
- Flammer, A. J., Anderson, T., Celermajer, D. S., Creager, M. A., Deanfield, J., Ganz, P., . . . Lerman, A. (2012). The Assessment of Endothelial Function: From Research Into Clinical Practice. *Circulation*, 126(6), 753-767. doi: 10.1161/circulationaha.112.093245

- Flammer, A. J., & Lüscher, T. F. (2010). Three decades of endothelium research. *Swiss Med Wkly*, 140, w13122.
- Fleck, C., Janz, A., Schweitzer, F., Karge, E., Schwertfeger, M., & Stein, G. (2001). Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients. *Kidney Int Suppl*, 78, S14-18.
- Foley, R. N., Parfrey, P. S., & Sarnak, M. J. (1998). Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis*, 32(5 Suppl 3), S112-119.
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-376. doi: 10.1038/288373a0
- Geller, D. A., Lowenstein, C. J., Shapiro, R. A., Nussler, A. K., Di Silvio, M., Wang, S. C., . . . Billiar, T. R. (1993). Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(8), 3491-3495.
- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Colombo, R., Milzani, A., & Rossi, R. (2004). Adaptation of the Griess Reaction for Detection of Nitrite in Human Plasma. *Free Radical Research*, 38(11), 1235-1240. doi: 10.1080/10715760400017327
- Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., Dalle-Donne, I., & Rossi, R. (2004). Nitric oxide, S-nitrosothiols and hemoglobin: is methodology the key? *Trends Pharmacol Sci*, 25(6), 311-316. doi: 10.1016/j.tips.2004.04.009
- Gorenflo, M., Zheng, C., Poge, A., Bettendorf, M., Werle, E., Fiehn, W., & Ulmer, H. E. (2001). Metabolites of the L-arginine-NO pathway in patients with left-to-right shunt. *Clin Lab*, 47(9-10), 441-447.
- Goto, M., & Mochizuki, S. (2008). Plasma detection of NO by a catheter. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 46(5), 509-516. doi: 10.1007/s11517-008-0333-z.
- Grisham, M. B., Johnson, G. G., & Lancaster, J. R., Jr. (1996). Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol*, 268, 237-246.
- Gross, S. S., Jaffe, E. A., Levi, R., & Kilbourn, R. G. (1991). Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.*, 178(3), 823-829.
- Gryglewski, R. J., Moncada, S., & Palmer, R. M. (1986). Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 87(4), 685-694.
- Haklar, G., Yegenaga, I., & Yalcin, A. S. (1995). Evaluation of oxidant stress in chronic hemodialysis patients: use of different parameters. *Clin Chim Acta*, 234(1-2), 109-114.
- He J, W. P. (1999). Elevated systolic blood pressure and risk of cardiovascular and renal disease: overview of evidence from observational epidemiologic studies and randomized controlled trials. *Am Heart J*, 138, 211-219.
- Hempel, A., Lindschau, C., & Maasch, C. (1999). Calcium antagonists ameliorate ischemia-induced endothelial permeability by inhibiting protein kinase. *Circulation Research* 99, 2523-2529.
- Hendgen-Cotta, U., Grau, M., Rasaaf, T., Gharinin, P., Kelm, M., & Kleinbongard, P. (2008). Reductive gas-phase chemiluminescence and flow injection analysis for measurement of nitric oxide pool in biological matrices. *Method Enzymol* 441, 295-315.
- Henik, R. A. (1997). Systemic hypertension and its management. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 27(6), 1355-1372.
- Henik, R. A., Snyder, P. S., & Volk, L. M. (1997). Treatment of systemic hypertension in cats with amlodipine besylate. *J Am Anim Hosp Assoc.* , 33(3), 226-234.
- Henik RA, S. R., Bortnowski HB. (2004). Spectrum of M-mode echocardiographic abnormalities in 75 cats with systemic hypertension. *J Am Anim Hosp Assoc.*, 40(5), 359-363.

- Henry, Y., Ducrocq, C., Drapier, J. C., Servent, D., Pellat, C., & Guissani, A. (1991). Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells. *Eur Biophys J*, 20(1), 1-15.
- Himmelfarb, J. (2004). Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg? *Semin Dial*, 17(6), 449-454. doi: 10.1111/j.0894-0959.2004.17605.x
- Hoshida, S., Yamashita, N., Kuzuya, T., & Hori, M. (1998). Reduction in infarct size by chronic amlodipine treatment in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 138, 163-170.
- Hsiang, T. Y., Lien, Y. H., & Huang, H. P. (2008). Indirect measurement of systemic blood pressure in conscious dogs in a clinical setting. *J Vet Med Sci*, 70(5), 449-453.
- Hunter, C. J., Dejam, A., Blood, A. B., Shields, H., Kim-Shapiro, D. B., Machado, R. F., . . . Gladwin, M. T. (2004). Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator. *Nat Med*, 10(10), 1122-1127. doi: 10.1038/nm1109
- Ignarro, L. J. (1996). Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int Suppl.*, 55, 2-5.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 84(24), 9265-9269.
- Imlay, J. A., & Fridovich, I. (1991). Assay of metabolic superoxide production in Escherichia coli. *J Biol Chem.*, 266(11), 6957-6965.
- Jacob F, P. D., Osborne CA, Neaton JD, Lekcharoensuk C, Allen TA, Kirk CA, Swanson LL. (2003). Association between initial systolic blood pressure and risk of developing a uremic crisis or of dying in dogs with chronic renal failure. *J Am Vet Med Assoc.*, 222(3), 322-329.
- Jacob, F., Polzin, D. J., Osborne, C. A., Neaton, J. D., Lekcharoensuk, C., Allen, T. A., . . . Swanson, L. L. (2003). Association between initial systolic blood pressure and risk of developing a uremic crisis or of dying in dogs with chronic renal failure. *J Am Vet Med Assoc*, 222(3), 322-329.
- Jepson, R. E., Elliott, J., Brodbelt, D., & Syme, H. M. (2007). Effect of control of systolic blood pressure on survival in cats with systemic hypertension. *J Vet Intern Med.*, 21(3), 402-409.
- Jepson, R. E., Hartley, V., Mendl, M., Caney, S. M., & Gould, D. J. (2005). A comparison of CAT Doppler and oscillometric Memoprint machines for non-invasive blood pressure measurement in conscious cats. *J Feline Med Surg*, 7(3), 147-152. doi: 10.1016/j.jfms.2004.08.003
- Joannides, R., Haefeli, W. E., Linder, L., Richard, V., Thuillez, C., & Lüscher, T. F. (1995). Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*, 91(5), 1314-1319.
- Joles, J. A. (1998). Obesity in dogs: effects on renal function, blood pressure, and renal disease. *Vet Q*, 20(4), 117-120. doi: 10.1080/01652176.1998.9694854
- Kallet AJ, C. L., Kass PH. (1997). Comparison of blood pressure measurements obtained in dogs by use of indirect oscillometry in a veterinary clinic versus at home. *J Am Vet Med Assoc.*, 210(5), 651-654.
- Kari, J. A., Donald, A. E., Vallance, D. T., Bruckdorfer, K. R., Leone, A., Mullen, M. J., . . . Rees, L. (1997). Physiology and biochemistry of endothelial function in children with chronic renal failure. *Kidney Int*, 52(2), 468-472.
- Kelm, M. (1999). Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*, 1411(2-3), 273-289.
- Kelm, M., Feelisch, M., Spahr, R., Piper, H.-N., Noack, E., & Schrader, J. (1988). Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 154(1), 236-244. doi: 10.1016/0006-291X(88)90675-4
- Kim-Shapiro, D. B., Patel, R. P., Schechter, A. N., Gladwin, M. T., Cannon, R. O., & Hogg, N. (2004). How do red blood cells dilate blood vessels?--Reply. *Circ Res*, 95(3), e10.
- King, J. N., Gunn-Moore, D. A., Tasker, S., Gleadhill, A., & Strehlau, G. (2006). Tolerability and efficacy of benazepril in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*, 20(5), 1054-1064.

- Kobayashi, D. L., Peterson, M. E., Graves, T. K., Lesser, M., & Nichols, C. E. (1990). Hypertension in cats with chronic renal failure or hyperthyroidism. *J Vet Intern Med.*, 4(2), 58-62.
- Komaromy, A. M., Andrew, S. E., Denis, H. M., Brooks, D. E., & Gelatt, K. N. (2004). Hypertensive retinopathy and choroidopathy in a cat. *Vet Ophthalmol*, 7(1), 3-9.
- Kosaka, H., & Tyuma, I. (1987). Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhemoglobin by nitrite. *Environ Health Perspect.*, 73, 147-151.
- Landray, M. J., Wheeler, D. C., Lip, G. Y., Newman, D. J., Blann, A. D., McGlynn, F. J., . . . Baigent, C. (2004). Inflammation, endothelial dysfunction, and platelet activation in patients with chronic kidney disease: the chronic renal impairment in Birmingham (CRIB) study. *Am J Kidney Dis*, 43(2), 244-253.
- Larsen, F. J., Ekblom, B., Sahlin, K., Lundberg, J. O., & Weitzberg, E. (2006). Effects of Dietary Nitrate on Blood Pressure in Healthy Volunteers. *N Engl J Med*, 355, 2792-2793. doi: 10.1056/NEJMc062800
- Lauer, T., Preik, M., Rassaf, T., Strauer, B. E., Deussen, A., Martin Feelisch, & Kelm, M. (2001). Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action.
- Lenasi, H. (2003). Amlodipine activates the endothelial nitric oxide synthase by altering phosphorylation on Ser1177 and Thr495. *Cardiovascular Research*, 59(4), 844-853. doi: 10.1016/s0008-6363(03)00505-4
- Lerman, A., Holmes, D. R., Herrmann, J., & Gersh, B. J. (2007). Microcirculatory dysfunction in ST-elevation myocardial infarction: cause, consequence, or both? *European Heart Journal*, 28(7), 788-797. doi: 10.1093/eurheartj/ehl501
- Lesser, M., Fox, P. R., & Bond, B. R. (1992). Assessment of hypertension in 40 cats with left ventricular hypertrophy by Doppler-shift sphygmomanometry. *Journal of Small Animal Practice*, 33(2), 55-58.
- Littman, M. P. (1994). Spontaneous systemic hypertension in 24 cats. *J Vet Intern Med*, 8(2), 79-86.
- Littman, M. P., Robertson, J. L., & Bovee, K. C. (1988). Spontaneous systemic hypertension in dogs: five cases (1981-1983). *J Am Vet Med Assoc*, 193(4), 486-494.
- Liu, X. (1998). Diffusion-limited Reaction of Free Nitric Oxide with Erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(30), 18709-18713. doi: 10.1074/jbc.273.30.18709
- Loscalzo, J., & Welch, G. (1995). Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 38(2), 87-104. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0033-0620\(05\)80001-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0033-0620(05)80001-5)
- Luke, R. G. (1999). Hypertensive nephrosclerosis: pathogenesis and prevalence *Nephrol Dial Transplant.*, 14(10), 2271-2278.
- Lundberg, J. O., Carlsson, S., Engstrand, L., Morcos, E., Wiklund, N. P., & Weitzberg, E. (1997). Urinary nitrite: more than a marker of infection. *Urology*, 50(2), 189-191. doi: 10.1016/S0090-4295(97)00257-4
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., Cole, J. A., & Benjamin, N. (2004). Nitrate, bacteria and human health. *Nat Rev Microbiol*, 2(7), 593-602. doi: 10.1038/nrmicro929
- MacAllister, R. J., Rambaek, M. H., Vallance, P., Williams, D., Hoffmann, K. H., & Ritz, E. (1996). Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 11(12), 2449-2452.
- MacArthur, P. H., Shiva, S., & Gladwin, M. T. (2007). Measurement of circulating nitrite and S-nitrosothiols by reductive chemiluminescence. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 851(1-2), 93-105. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.12.012
- Maggio, F., DeFrancesco, T. C., Atkins, C. E., Pizzirani, S., Gilger, B. C., & Davidson, M. G. (2000). Ocular lesions associated with systemic hypertension in cats: 69 cases (1985-1998). *J Am Vet Med Assoc*, 217(5), 695-702.

- Maggio F, D. T., Atkins CE, Pizzirani S, Gilger BC, Davidson MG. (2000). Ocular lesions associated with systemic hypertension in cats: 69 cases (1985-1998). *J Am Vet Med Assoc.*, 217(5), 695-702.
- Malinski, T., & Taha, Z. (1992). Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature*, 358(6388), 676-678. doi: 10.1038/358676a0
- Margetic, S. (2012). Inflammation and haemostasis. *Biochemia medica : casopis Hrvatskoga društva medicinskih biokemicara / HDMB*, 22(1), 49-62.
- Marley, R., Feelisch, M., Holt, S., & Moore, K. (2000). A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. *Free Radic Res*, 32(1), 1-9.
- Martel, E., Egner, B., Brown, S. A., King, J. N., Laveissiere, A., Champeroux, P., & Richard, S. (2013). Comparison of high-definition oscillometry — a non-invasive technology for arterial blood pressure measurement — with a direct invasive method using radio-telemetry in awake healthy cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 0(0), 1 - 10. doi: 10.1177/1098612X13495025
- Mathur, S., Brown, C., Dietrich, U., Munday, J., Newell, M., Sheldon, S., . . . Brown, S. (2004). Evaluation of a technique of inducing hypertensive renal insufficiency in cats. *Am J Vet Res.*, 65(7), 1006-1013.
- Mathur, S., Syme, H., Brown, C. A., Elliot, J., Moore, P. A., Newell, M. A., . . . Brown, S. A. (2002). Effects of the calcium channel antagonist amlodipine in cats with surgically induced hypertensive renal insufficiency.
- Medcalf, R. L. (2007). Fibrinolysis, inflammation, and regulation of the plasminogen activating system. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5, 132-142. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02464.x
- Meulemans, A., & Delsenne, F. (1994). Measurement of nitrite and nitrate levels in biological samples by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 660(2), 401-404.
- Mishina, M., Watanabe, T., Fujii, K., Maeda, H., Wakao, Y., & Takahashi, M. (1998). Non-invasive blood pressure measurements in cats: clinical significance of hypertension associated with chronic renal failure. *J Vet Med Sci.*, 60(7), 805-808.
- Mochizuki, S., Miyasaka, T., Goto, M., Ogasawara, Y., Yada, T., Akiyama, M., . . . Yoshida, K. (2003). Measurement of acetylcholine-induced endothelium-derived nitric oxide in aorta using a newly developed catheter-type nitric oxide sensor. *Biochem Biophys Res Commun*, 306(2), 505-508.
- Montoya, J. A., Morris, P. J., Bautista, I., Juste, M. C., Suarez, L., Pena, C., . . . Rawlings, J. (2006). Hypertension: a risk factor associated with weight status in dogs. *J Nutr*, 136(7 Suppl), 2011S-2013S.
- Morgan, R. V. (1986). Systemic hypertension in four cats: ocular and medical findings. *J Am Anim Hosp Assoc.*, 22, 615-621.
- Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (2007). Measurement of plasma nitrite by chemiluminescence without interference of S-, N-nitroso and nitrated species. *Free Radic Biol Med*, 42(8), 1146-1154. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.029
- Neishi, Y., Mochizuki, S., Miyasaka, T., Kawamoto, T., Kume, T., Sukmawan, R., . . . Goto, M. (2005). Evaluation of bioavailability of nitric oxide in coronary circulation by direct measurement of plasma nitric oxide concentration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(32), 11456-11461. doi: 10.1073/pnas.0501392102
- Oberg, B. P., McMenamin, E., Lucas, F. L., McMonagle, E., Morrow, J., Ikizler, T. A., & Himmelfarb, J. (2004). Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int*, 65(3), 1009-1016. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00465.x
- Pall, M. L. (2007). Nitric oxide synthase partial uncoupling as a key switching mechanism for the NO/ONOO- cycle. *Med Hypotheses*, 69(4), 821-825. doi: 10.1016/j.mehy.2007.01.070

- Pelletier, M. M., Kleinbongard, P., Ringwood, L., Hito, R., Hunter, C. J., Schechter, A. N., . . . Dejam, A. (2006). The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: pitfalls and solutions. *Free Radic Biol Med*, 41(4), 541-548. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.001
- Pelletier, M. M., Kleinbongard, P., Ringwood, L., Hito, R., Hunter, C. J., Schechter, A. N., . . . Dejam, A. (2006). The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: Pitfalls and solutions. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(4), 541-548. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.001
- Peterson, J. C., Adler, S., Burkart, J. M., Greene, T., Hebert, L. A., Hunsicker, L. G., . . . Seifter, J. L. (1995). Blood pressure control, proteinuria, and the progression of renal disease. The Modification of Diet in Renal Disease Study. *Ann Intern Med.*, 123(10), 754-762.
- Piknova, B., & Schechter, A. N. (2011). Measurement of nitrite in blood samples using the ferricyanide-based hemoglobin oxidation assay. *Methods Mol Biol*, 704, 39-56. doi: 10.1007/978-1-61737-964-2_4
- Pinder, A. G., Rogers, S. C., Khalatbari, A., Ingram, T. E., & James, P. E. (2008). The measurement of nitric oxide and its metabolites in biological samples by ozone-based chemiluminescence. *Methods Mol Biol*, 476, 11-28.
- Rapoport, R. M., Draznin, M. B., & Murad, F. (1983). Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*, 306(5939), 174-176.
- Rees, D. D., Palmer, R. M., & Moncada, S. (1989). Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(9), 3375-3378.
- Reyes, A. A., Purkerson, M. L., Karl, I., & Klahr, S. (1992). Dietary supplementation with L-arginine ameliorates the progression of renal disease in rats with subtotal nephrectomy. *Am J Kidney Dis*, 20(2), 168-176.
- Ribeiro, F., Alves, A. J., Duarte, J. A., & Oliveira, J. (2010). Is exercise training an effective therapy targeting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation? *International journal of cardiology*, 141(3), 214-221.
- Ribeiro, M. O., De Nucci, G., & Zatz, R. (1991). Persistent arterial hypertension by chronic blockade of nitric oxide synthesis. *Journal Of The American Society Of Nephrology.*, 2(3), 512.
- Ridker, P. M., Brown, N. J., Vaughan, D. E., Harrison, D. G., & Mehta, J. L. (2004). Established and Emerging Plasma Biomarkers in the Prediction of First Atherothrombotic Events. *Circulation*, 109(25 suppl 1), IV-6-IV-19. doi: 10.1161/01.cir.0000133444.17867.56
- Rocchini, A. P., Yang, J. Q., & Gokee, A. (2004). Hypertension and insulin resistance are not directly related in obese dogs. *Hypertension*, 43(5), 1011-1016. doi: 10.1161/01.HYP.0000123073.48855.e9
- Roe, N. D., & Ren, J. (2012). Nitric oxide synthase uncoupling: a therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vascul Pharmacol*, 57(5-6), 168-172. doi: 10.1016/j.vph.2012.02.004
- Samouilov, A., & Zweier, J. L. (1998). Development of chemiluminescence-based methods for specific quantitation of nitrosylated thiols. *Anal Biochem*, 258(2), 322-330. doi: 10.1006/abio.1998.2609
- Sansom, J., Barnett, K. C., Dunn, K. A., Smith, K. C., & Dennis, R. (1994). ocular disease associated with hypertension in 16 cats *Journal of Small Animal Practice*, 35, 604 - 611. doi: 10.1111/j.1748-5827.1994.tb03835.x
- Sansom, J., Rogers, K., & Wood, J. L. (2004). Blood pressure assessment in healthy cats and cats with hypertensive retinopathy. *Am J Vet Res*, 65(2), 245-252.
- Schmidt, R. J., & Baylis, C. (2000). Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. *Kidney Int*, 58(3), 1261-1266. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00281.x
- Schmidt, R. J., & Baylis, C. (2000). Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. *Kidney Int*, 58(3), 1261 - 1266. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00281.x

- Schmidt, R. J., Yokota, S., Tracy, T. S., Sorkin, M. I., & Baylis, C. (1999). Nitric oxide production is low in end-stage renal disease patients on peritoneal dialysis. *Am J Physiol*, 276(5 Pt 2), F794-797.
- Schneider, H. P., Truex, R. C., & Knowles, J. O. (1964). COMPARATIVE OBSERVATIONS OF THE HEARTS OF MONGREL AND GREYHOUND DOGS. *Anat Rec*, 149, 173-179.
- Seyedi, N., Xu, X., Nasjletti, A., & Hintze, T. H. (1995). Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension*, 26(1), 164-170.
- Sievers. (2001). Nitric Oxide Analyzer Operation and Maintenance Manual.
- Singer, G., & Granger, N. (2007). Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. *Microcirculation*, 14(4-5), 375-387.
- Snyder, P. S. Amlodipine a randomized blinded clinical trial in 9 cats with systemic hypertension.
- Snyder PS, S. D., Jones GL. (2001). Effect of amlodipine on echocardiographic variables in cats with systemic hypertension. *J Vet Intern Med.*, 15(1), 52-56.
- Sorensen, K. E., Celermajer, D. S., Georgakopoulos, D., Hatcher, G., Betteridge, D. J., & Deanfield, J. E. (1994). Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. *J Clin Invest*, 93(1), 50-55. doi: 10.1172/jci116983
- Sparkes, A. H., Caney, S. M., King, M. C., & Gruffydd-Jones, T. J. (1999). Inter- and intraindividual variation in Doppler ultrasonic indirect blood pressure measurements in healthy cats. *J Vet Intern Med*, 13(4), 314-318.
- Stamler, J. S. (2004). S-nitrosothiols in the blood: roles, amounts, and methods of analysis. *Circ Res*, 94(4), 414-417. doi: 10.1161/01.RES.0000122071.55721.BC
- Stepien RL, R. G. (1999). Clinical comparison of three methods to measure blood pressure in nonsedated dogs. *J Am Vet Med Assoc.*, 215(11), 1623-1628.
- Stepien RL, R. G., Henik RA, Wenholz L, Thomas CB. (2003). Comparative diagnostic test characteristics of oscillometric and Doppler ultrasonographic methods in the detection of systolic hypertension in dogs. *J Vet Intern Med.*, 17(1), 65-72.
- Stiles, J., Polzin, D. J., & Bistner, S. I. (1994). The Prevalence of Retinopathy in Cats with Systemic Hypertension and Chronic Renal Failure or Hyperthyroidism. *J Am Anim Hosp Assoc*, 30(6), 564 - 572.
- Stroes, E. S., Koomans, H. A., de Bruin, T. W., & Rabelink, T. J. (1995). Vascular function in the forearm of hypercholesterolaemic patients off and on lipid-lowering medication. *Lancet*, 346(8973), 467-471.
- Syme, H. (2011). Hypertension in small animal kidney disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 41(1), 63-89. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.11.002.
- Syme, H. M., BARBER, P. J., Markwell, P. J., & Elliott, J. (2002). Prevalence of systolic hypertension in cats with chronic renal failure at initial evaluation. *J Am Vet Med Assoc.*, 220(12), 1799-1804.
- Syme, H. M., Markwell, P. J., Pfeiffer, D., & Elliott, J. (2006). Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria. *J Vet Intern Med*, 20(3), 528-535.
- Takarada, S., Imanishi, T., Goto, M., Mochizuki, S., Ikejima, H., Tsujioka, H., . . . Akasaka, T. (2010). First evaluation of real time NO changes in the coronary circulation in patients with non-ichaemic cardiomyopathy using a catheter type sensor 2010. *European Heart Journal*, 31, 2862-2870. doi: 10.1093/eurheartj/ehq156
- 10.1093/eurheartj/ehq279
- Tannenbaum, S. R., Moran, D., Rand, W., Cuello, C., & Correa, P. (1979). Gastric cancer in Colombia. IV. Nitrite and other ions in gastric contents of residents from a high-risk region. *J Natl Cancer Inst*, 62(1), 9-12.
- Thambyrajah, J., Landray, M. J., McGlynn, F. J., Jones, H. J., Wheeler, D. C., & Townend, J. N. (2000). Abnormalities of endothelial function in patients with predialysis renal failure. *Heart*, 83(2), 205-209.

- Tsikas, D. (2005). Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res*, 39(8), 797-815. doi: 10.1080/10715760500053651
- Tsikas, D. (2008). A critical review and discussion of analytical methods in the L-arginine/nitric oxide area of basic and clinical research. *Anal Biochem*, 379(2), 139-163. doi: 10.1016/j.ab.2008.04.018
- Turner, J. L., Brogdon, J. D., Lees, G. E., & Greco, D. S. (1990). idiopathic hypertension in a cat with secondary hypertensive retinopathy associated with high salt diet *Journal of the American Animal Hospital Association*, 26(6), 647-651
- Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., & Moncada, S. (1992). Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*, 339(8793), 572 - 575.
- Van Boxel, S. A. (2003). Hypertensive retinopathy in a cat. *Can Vet J*, 44(2), 147-149.
- van de Sandt, R. R., Stades, F. C., Boeve, M. H., & Stokhof, A. A. (2003). [Arterial hypertension in the cat. A pathobiologic and clinical review with emphasis on the ophthalmologic aspects]. *Tijdschr Diergeneeskde*, 128(1), 2-10.
- Wang, X., Tanus-Santos, J. E., Reiter, C. D., Dejam, A., Shiva, S., Smith, R. D., . . . Gladwin, M. T. (2004). Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(31), 11477-11482.
- Wehner A, H. K., Hirschberger J. (2008). Associations between proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non-renal diseases. *Vet Rec.*, 162(5), 141-147.
- Wernick, M., Hopfner, R., Francey, T., & Howard, J. (2012). Comparison of arterial blood pressure measurements and hypertensive scores obtained by use of three indirect measurement devices in hospitalized dogs. *JAVMA*, 240(8), 962 - 968.
- Wever, R., Boer, P., Hijmering, M., Stroes, E., Verhaar, M., Kastelein, J., . . . Rabelink, T. (1999). Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(5), 1168-1172.
- Wever, R. M., Luscher, T. F., Cosentino, F., & Rabelink, T. J. (1998). Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 97(1), 108-112.
- Widlansky, M. E., Vita, J. A., Keyes, M. J., Larson, M. G., Hamburg, N. M., Levy, D., . . . Benjamin, E. J. (2007). Relation of season and temperature to endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in subjects without clinical evidence of cardiovascular disease (from the Framingham Heart Study). *The American Journal of Cardiology*, 100(3), 518-523.
- Wink, D. A., Kim, S., Coffin, D., Cook, J. C., Vodovotz, Y., Chistodoulou, D., . . . Grisham, M. B. (1999). Detection of S-nitrosothiols by fluorometric and colorimetric methods. *Methods Enzymol*, 301, 201-211.
- Yang, B. K., Vivas, E. X., Reiter, C. D., & Gladwin, M. T. (2003). Methodologies for the Sensitive and Specific Measurement of S -nitrosothiols, Iron-nitrosyls, and Nitrite in Biological Samples. *Free Radic Res*, 37(1), 1-10. doi: 10.1080/1071576021000033112
- Zatz, R., & Baylis, C. (1998). Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*, 32(6), 958-964.
- Zatz, R., & Baylis, C. (1998). Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension.*, 32(6), 958-964.
- Zatz, R., & de Nucci, G. (1991). Effects of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation. *Am J Physiol*, 261(2 Pt 2), F360-363.
- Zhang, X., & Hintze, T. H. (1998). ACE inhibitors stimulate nitric oxide production to modulate myocardial oxygen consumption. *Circulation*, 97, 576 - 580. doi: 10.1161/01.CIR.97.6.576
- Zhang, X. P., & Hintze, T. H. (1998). Amlodipine releases nitric oxide from canine coronary microvessels: An unexpected mechanism of action of a calcium channel-blocking agent. *Circulation*, 97, 576-580.

Zoccali, C., Bode-Boger, S., Mallamaci, F., Benedetto, F., Tripepi, G., Malatino, L., . . . Boger, R. (2001). Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*, 358(9299), 2113-2117.

7. Apêndices

APÊNDICE I

Protocolo para 1Ml da solução de cianeto – férrico/solução – “stop” (Pelletier et al., 2006)

Materiais necessários:

- Água Millipore (água fresca destilada através de Milli – Q)
- $K_3Fe(CN)_6$ – Potássio de cianeto férrico (III)
- N-ethylmaleimide (NEM)
- Nonidet P40 (octyl phenoxy polyethoxy ethanol)
- Vortex
- Tubos de 50Ml
- Espátula
- Balança de precisão
- Pipeta de 1000 μ L

Protocolo

1. Lavar o tubo de 50Ml onde se pretende colocar a solução de cianeto – férrico com água Millipore
2. Lavar a espátula a utilizar com água Millipore
3. Pesar 1,32g de $K_3Fe(CN)_6$ e colocar no tubo de 50Ml
4. Pesar 0,0665g de NEM e colocar no tubo de 50Ml, juntamente com o $K_3Fe(CN)_6$
5. Adicionar 4,5Ml de água Millipore aos dois reagentes
6. Homogeneizar solução no vortex, até que todos os cristais de $K_3Fe(CN)_6$ desapareçam
7. Adicionar 0,5Ml de Nonidet P40 à solução já homogeneizada (é importante que este componente seja adicionado apenas no final do passo “6”, dado que se trata de um sabão)
8. Misturar manualmente e de forma cuidada para evitar a formação de espuma
9. Identificar tubo
10. Refrigerar

Nota: A solução, depois de feita, devera ser sempre mantida refrigerada (4°C).

APÊNDICE II

Processamento das amostras recolhidas de sangue inteiro, previamente à análise das mesmas pelo método de quimiluminescência reactiva

1. Descongelar amostras – simplesmente retirá-las do gelo seco e esperar
 - a. Assim que as amostras estiverem descongeladas, estas deverão ser sempre mantidas em gelo (excepto quando estão a ser utilizadas)
2. Misturar todas as amostras com o auxílio de um vortex, para assegurar a correcta homogeneização das mesmas
3. Adicionar metanol às amostras, num volume igual ao volume das mesmas (1:1) – neste caso 250µL
4. Homogeneizar as amostras novamente com o auxílio de um vortex
5. Centrifugar as amostras já misturadas (13000g, 5 minutos, 4°C)
6. Pipetar o sobrenadante resultante para um Eppendorf novo e correctamente identificado
7. Amostras encontram-se prontas para análise

Nota: manter as amostras sempre refrigeradas através da utilização de gelo, assim que descongelar