



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Matheus Pontes de Menezes

**Estudo sobre os efeitos cardiovasculares  
do extrato hidroalcoólico de folhas de Colônia (*Alpinia zerumbet*) em ratos  
espontaneamente hipertensos**

Rio de Janeiro

2020

Matheus Pontes de Menezes

**Estudo sobre os efeitos cardiovasculares do extrato hidroalcoólico de folhas de Colônia  
(*Alpinia zerumbet*) em ratos espontaneamente hipertensos**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra Dayane Teixeira Ognibene

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra Ângela de Castro Resende

Rio de Janeiro

2020

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

M543 Menezes, Matheus Pontes de.

Estudo sobre os efeitos cardiovasculares do extrato hidroalcolólico de folhas de Colônia (*Alpinia zerumbet*) em ratos espontaneamente hipertensos / Matheus Pontes de Menezes – 2020.

70f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayane Teixeira Ognibene.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ângela de Castro Resende.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Colônias (Biologia) - Teses. 2. Hipertensão - Teses. 3. Antioxidantes - Teses. 4. Alpinia. I. Ognibebe, Dayane Teixeira. II. Resende, Ângela de Castro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

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

---

Assinatura

---

Data

Matheus Pontes de Menezes

**Estudo sobre os efeitos cardiovasculares do extrato hidroalcoólico de folhas de Colônia  
(*Alpinia zerumbet*) em ratos espontaneamente hipertensos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de outubro de 2020.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra Ângela de Castro Resende

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra Dayane Teixeira Ognibene (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Cristiane Aguiar da Costa

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Caroline Fernandes dos Santos Bottino

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2020

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, à minha família que sempre me apoiou, incentivou, e sempre estivemos juntos, mesmo em momentos de dificuldades. À minha namorada Dafne, pelo apoio em todos os momentos e incentivo para a finalização deste trabalho.

À Profa. Dra. Dayane Teixeira Ognibene pela oportunidade, ensinamentos, paciência e empenho em me orientar.

Às professoras Dra Cristiane Aguiar da Costa, Dra Angela de Castro Resende, pelos ensinamentos e apoio durante todo o período de trabalho no laboratório.

À todos os amigos e colegas do LFCPM, por criar um ambiente agradável para convívio e trabalho. E principalmente à Grazielle Freitas e Izabelle Barcellos, pelos ensinamentos, paciência, e por me conceder tempo para me orientar em alguns experimentos.

À todos os meus amigos de fora e de dentro da faculdade, que contribuíram de alguma forma, seja direta ou indiretamente através de apoio para que eu finalizar este trabalho.

## RESUMO

MENEZES, Matheus Pontes de. **Estudo sobre os efeitos cardiovasculares do extrato hidroalcoólico de folhas de Colônia (*Alpinia zerumbet*) em ratos espontaneamente hipertensos.** 2020. 70f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2020.

*Alpinia zerumbet* é uma planta originária do oeste asiático e abundante no nordeste e sudeste brasileiro, onde é comumente conhecida como Colônia. Esta planta é muito utilizada na medicina popular, podendo-se destacar suas propriedades anti-hipertensiva, diurética e ansiolítica. Este estudo tem como objetivo investigar os efeitos do tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico de folhas de Colônia (AZE) sobre as alterações cardiovasculares em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Foram utilizados SHRs com 90 dias de idade tratados ou não com AZE (50mg/Kg/dia na água de beber) por 6 semanas. Ratos Wistar-Kyoto foram utilizados como controle. A pressão arterial, avaliada por pletismografia de cauda, e o peso foram avaliados semanalmente. Ao final do tratamento, a urina de 24h foi coletada e, posteriormente, os animais foram anestesiados com tiopental (70mg/Kg ip) e o sangue coletado através da punção da aorta abdominal. A aorta torácica foi isolada para análise morfológica e o leito arterial mesentérico (LAM) foi isolado e acoplado a um sistema de perfusão de órgãos para a avaliação da função vascular. Foram avaliados os níveis plasmáticos de ureia, creatinina e nitrito por ensaios colorimétricos e de angiotensina (AngII) pelo método ELISA. A carbonilação de proteínas, a peroxidação lipídica e a atividade de enzimas antioxidantes foram avaliadas no plasma por espectrofotometria. Na urina de 24h foram avaliados o volume urinário, os níveis de creatinina, ureia e de peroxidação lipídica. O tratamento com AZE normalizou a pressão arterial em SHR, mas não foi capaz de melhorar a disfunção vascular, caracterizada pela redução da resposta vasodilatadora da acetilcolina e o aumento da resposta vasoconstritora da norepinefrina no LAM. Não houve diferença entre os grupos experimentais em parâmetros como peso, volume urinário, proteinúria e níveis plasmáticos de AngII e nitrito. Na urina de SHRs foram observados níveis menores de ureia e creatinina em comparação aos controles, e o AZE foi capaz de aumentar a excreção dos mesmos. No plasma de SHRs foi observado nível aumentado de ureia em relação aos controles, sem alteração pelo tratamento, ao contrário do nível de creatinina, que foi reduzido pelo AZE. Os níveis de peroxidação lipídica foram maiores na urina de SHRs comparado aos controles e normalizados pelo tratamento, mas no plasma não houve diferença entre os grupos. Observou-se um aumento do dano em proteínas no plasma de SHRs em relação aos controles, e o AZE foi capaz de diminuir o mesmo. Foi observada uma redução da atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase no plasma de SHRs em relação aos controles. No entanto, houve aumento da atividade dessas enzimas no grupo SHR tratado com AZE. Houve hipertrofia da camada íntima-média, bem como redução do lúmen da aorta torácica de animais SHR quando comparado aos controles. O tratamento com AZE reverteu o remodelamento na aorta neste modelo de hipertensão. Os resultados mostraram que o AZE reduz a pressão arterial e o remodelamento da aorta torácica em animais SHR, o que poderia estar relacionado, em parte, ao aumento da atividade antioxidante e à redução do dano oxidativo.

Palavras-chave: *Alpinia zerumbet*. Ratos espontaneamente hipertensos. Hipertensão. Antioxidante

## ABSTRACT

MENEZES, Matheus Pontes de. **Study on the antihypertensive and cardioprotective effects of Colônia (*Alpinia zerumbet*) leaf extract in spontaneously hypertensive rats.** 2020. 70f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2020.

*Alpinia zerumbet* is a plant originally from West Asia and abundant in the northeast and southeast of Brazil, where it is commonly known as Colony. This plant is widely used in folk medicine, and its antihypertensive, diuretic and anxiolytic properties can be highlighted. This study aims to investigate the effects of chronic treatment with hydroalcoholic colony leaf extract (AZE) on cardiovascular changes in spontaneously hypertensive rats (SHR). SHRs with 90 days of age treated or not with AZE (50mg / Kg / day in drinking water) for 6 weeks were used. Wistar-Kyoto rats were used as controls. Blood pressure, assessed by tail plethysmography, and weight were assessed weekly. At the end of the treatment, the 24-hour urine was collected and, subsequently, the animals were anesthetized with thiopental (70mg / Kg ip) and the blood collected through the puncture of the abdominal aorta. The thoracic aorta was isolated for morphological analysis and the mesenteric arterial bed (LAM) was isolated and coupled to an organ perfusion system to assess vascular function. Plasma levels of urea, creatinine and nitrite were evaluated by colorimetric and angiotensin assays (AngII) by the ELISA method. Protein carbonylation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity were evaluated in plasma by spectrophotometry. In the 24-hour urine, urinary volume, creatinine, urea and lipid peroxidation levels were evaluated. **Results:** Treatment with AZE normalized blood pressure in SHR, but was not able to improve vascular dysfunction, characterized by a reduction in the vasodilator response of acetylcholine and an increase in the norepinephrine vasoconstrictor response in LAM. There was no difference between the experimental groups in parameters such as weight, urinary volume, proteinuria and plasma levels of AngII and nitrite. In the urine of SHRs, lower levels of urea and creatinine were observed compared to controls, and AZE was able to increase their excretion. In the plasma of SHRs an increased level of urea was observed in relation to the controls, without alteration by the treatment, in contrast to the level of creatinine, which was reduced by AZE. Levels of lipid peroxidation were higher in the urine of SHRs compared to controls and normalized by treatment, but in plasma there was no difference between groups. There was an increase in protein damage in the plasma of SHRs compared to controls, and AZE was able to decrease the same. A reduction in the activity of the enzymes catalase and glutathione peroxidase was observed in the plasma of SHRs compared to controls. However, there was an increase in the activity of these enzymes in the SHR group treated with AZE. There was hypertrophy of the intima-media layer, as well as a reduction in the lumen of the thoracic aorta of SHR animals when compared to controls. AZE treatment reversed the remodeling of the aorta in this model of hypertension. **Conclusion:** The results showed that AZE reduces blood pressure and remodeling of the thoracic aorta in SHR animals, which could be related, in part, to increased antioxidant activity and reduced oxidative damage.

Keywords: *Alpinia zerumbet*. Spontaneously hypertensive rats. Hypertension. Antioxidant.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Sistema Renina-Angiotensina – Via Clássica.....	16
Figura 2-	Via L-Arginina – Óxido nítrico.....	19
Figura 3-	Atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPX).....	23
Figura 4 -	Remodelamento vascular.....	26
Figura 5-	Foto ilustrativa da <i>Alpinia zerumbet</i> (Colônia).....	29
Figura 6 -	Foto ilustrativa da Pletismografia de cauda.....	33
Figura 7 -	Foto ilustrativa do Sistema de perfusão de órgãos.....	36

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Análise do ganho de peso no tratamento.....	41
Gráfico 2-	Medida de pressão arterial.....	42
Gráfico 3-	Análise da Angiotensina II circulante.....	43
Gráfico 4-	Volume urinário.....	44
Gráfico 5-	Níveis de uréia no plasma e na urina.....	45
Gráfico 6-	Níveis de creatinina no plasma e na urina.....	46
Gráfico 7-	Proteínas totais na urina.....	46
Gráfico 8-	Pressão Basal.....	47
Gráfico 9-	Resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina (ACh).....	48
Gráfico 10-	Resposta vasoconstritora induzida pela norepinefrina (NE).....	49
Gráfico 11-	Medida de Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).....	50
Gráfico 12-	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na urina e no plasma	51
Gráfico 13-	Carbonilação de proteínas.....	52
Gráfico 14-	Análise da atividade das enzimas catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD) no plasma.....	53
Gráfico 15 -	Análise morfológica da aorta .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	One-way analysis of variance
AT1	Receptor de angiotensina tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina tipo 2
AZE	Extrato hidroalcolico de folhas de colônia
BH4	Tetrahydropterina
BK	Bradicinina
cAMP	AMP cíclico
CAT	Catalase
CuZnSOD	SOD dependente de cobre-zinco
DDK	Dihidro-5,6-deidrokawaina
DOCA	Acetato de desoxicorticosterona
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECM	Matriz extracelular
ecSOD	Superóxido Dismutase extracelular dependente de cobre-zinco
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EIMA	Espessamento entre a camada íntima-média da aorta
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
ET-1	Endotelina-1
GMPc	3', 5' guanosina monofosfato cíclico
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GPX	Glutationa peroxidase
GPX-1	Glutationa peroxidase-1
GPX-2	Glutationa peroxidase-2
GPX-3	Glutationa peroxidase-3
GPX-4	Glutationa peroxidase-4
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
HAS	Hipertensão arterial sistêmica

IECA	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
LAM	Leito Arterial Mesentérico
MAPK	Quinase ativada por mitógeno
MnSOD	Superóxido Dismutase dependente de manganês
NE	Norepinefrina
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	NADPH oxidase do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
ROS	Espécie reativa de oxigênio do inglês <i>Reactive oxygen species</i>
Sec	Selenocisteína
SHR	Grupo espontaneamente hipertenso
SHR+AZE	Grupo SHR tratado com colônia
SOD	Superóxido dismutase
SRA	Sistema renina angiotensina
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TM	Transmembranares
TP	Receptor de tromboxano
UT-II	Urotensina-II
VSMC	Célula do músculo liso vascular
WKY	Grupo Wistar-Kyoto
WKY+AZE	Grupo Wistar-Kyoto tratado com colônia
XO	Xantina oxidase
XOR	Xantina óxido-redutase

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	12
1 OBJETIVOS .....	31
1.1 Objetivo geral.....	31
1.2 Objetivos específicos.....	31
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
2.1 Preparação do extrato hidroalcoólico de folhas da colônia (alpinia zerumbet).....	32
2.2 Animais .....	32
2.3 Medida dos parâmetros hemodinâmicos.....	33
2.4 Coleta de urina de 24h e análise bioquímica.....	34
2.5 Eutanásia .....	34
2.6 Análises bioquímicas na urina e no plasma .....	34
2.7 Isolamento do LAM.....	35
2.8 Reatividades do LAM às substâncias vasoativas.....	35
2.8.1. <u>Resposta vasoconstritora induzida pela norepinefrina (NE)</u> .....	36
2.8.2. <u>Resposta vasodilatadora induzida pela ACH</u> .....	36
2.9 <b>Análise de nitrito no plasma</b> .....	37
2.10 <b>Ensaio pró-oxidantes</b> .....	37
2.10.1 <u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</u> .....	37
2.10.2 <u>Carbonilação de proteínas</u> .....	38
<b>2.11 Atividade das enzimas antioxidantes em plasma</b> .....	38
2.11.1 <u>Medida da SOD</u> .....	38
2.11.2 <u>Medida da CAT</u> .....	39
2.11.3 <u>Medida da GPX</u> .....	39
2.12 <b>Análise morfológica</b> .....	40
2.12.1. <u>Aorta</u> .....	40
2.13 <b>Análise Estatística</b> .....	40
3 RESULTADO .....	41
3.1 <b>Análise do ganho de peso no tratamento</b> .....	41
3.2 <b>Medida da PA.</b> .....	41
3.3 <b>Análise da angiotensina II circulante</b> .....	42

3.4	<b>Análises bioquímicas no plasma e na urina de 24h do final do tratamento</b> .....	43
3.4.1	<u>Volume urinário</u> .....	43
3.4.2	<u>Excreção de uréia no plasma e na urina</u> .....	44
3.4.3	<u>Excreção de creatinina no plasma e na urina</u> .....	45
3.4.4	<u>Proteínas totais na urina</u> .....	46
3.5	<b>Reatividade do lam às substâncias vasoativas</b> .....	47
3.5.1	<u>Pressão basal</u> .....	47
3.5.2	<u>Resposta vasodilatadora induzida pela ACH</u> .....	47
3.5.3	<u>Resposta vasoconstritora induzida pela norepinefrina (NOR)</u> .....	48
3.6	<b>Medida de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b> .....	49
3.7	<b>Dano oxidativo</b> .....	50
3.7.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (tbars) na urina e no plasma</u> .....	50
3.7.2	<u>Carbonilação de proteínas</u> .....	51
3.8	<b>Análise da atividade das enzimas sod, cat e gpx no plasma</b> .....	52
3.9	<b>Análise morfológica da aorta</b> .....	53
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	60
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61

## INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é caracterizada por um aumento sustentável da pressão arterial (PA) nas artérias sistêmicas. A HAS é o fator de risco mais comum para complicações e doenças cardiovasculares, dentre elas: doença cardíaca coronária, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, dentre outras (OPARIL S. *et al.*, 2018).

De 1975 à 2015, o número global de pessoas acima de 25 anos com hipertensão aumentou 536 milhões, atingindo a marca de 1,13 bilhões, onde mais de 40% das pessoas acima de 25 anos possuem a doença (O'SHEA P.M. *et al.*, 2017). No Brasil, mais de 30% da população é hipertensa, sendo dessa parcela 60% de idosos, com idade acima de 60 anos (7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016). Há uma previsão de que a prevalência da doença aumentará em aproximadamente 60% nos próximos 30 anos (MONTEZANO AC., *et al.*, 2015).

Diante disso, o estudo da HAS se mostra de grande importância mundial, onde entender os mecanismos relacionados à fisiologia vascular tem sido o ponto chave para entender a patologia. Na artéria saudável, mudanças hemodinâmicas podem levar a alterações vasculares, como adaptações estruturais e funcionais geradas por moléculas sinalizadoras, que posteriormente, retornarão aos níveis basais. Essas adaptações são projetadas então para garantir a homeostase vascular, entretanto, em estados patológicos, essas mudanças adaptativas não retornam aos níveis basais, contribuindo então para o desenvolvimento de uma disfunção endotelial, presente nas doenças cardiovasculares (BROWN I.A.M., *et al.*, 2018).

Alguns dos mecanismos envolvidos nessas adaptações estão relacionados à via do sistema renina-angiotensina (SRA). O SRA se apresenta como um dos mais importantes sistemas vasoativos endócrinos, parácrinos e intrácrinos na regulação fisiológica neuronal, cardiovascular, regulação da PA e função renal. A importância do SRA no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a hipertensão, tem sido mostrado em ensaios clínicos, principalmente pela ação aumentada da angiotensina II (Ang II) através da ativação de um dos seus receptores, receptor de angiotensina tipo 1 (AT1), o qual ativado, induz vasoconstrição, disfunção endotelial, inflamação, crescimento celular e remodelamento vascular (LI X.C., *et al.*, 2017).

Estudos apontaram que a *up-regulation* do AT1 pode estar envolvido diretamente com a disfunção endotelial mencionada anteriormente. Outro fator, não mencionado, relacionado à essa disfunção é o estresse oxidativo, descrito como o desbalanço entre as ações pró-oxidantes

e antioxidantes, levando então ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), aumento esse modulado pela ativação da enzima NADPH oxidase (NOX). Vários estudos utilizando modelos animais de hipertensão mostraram a relação entre a disfunção endotelial e o estresse oxidativo, onde foram apontados também resultados significativamente menores da quantidade e atividade de antioxidantes, dentre eles, as enzimas antioxidantes (HIGASHI Y., et al., 2012; HUANG L.L. et al., 2015; IKARASHI N. et al., 2018; SOUSA L.E. et al., 2015).

A literatura aponta que a ligação entre o estresse oxidativo e a disfunção endotelial está diretamente atrelada ao alto nível celular do ânion superóxido, que pode reduzir a síntese e a biodisponibilidade do óxido nítrico, molécula vasodilatadora e produto final produzido na via l-arginina-óxido nítrico pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). O alto nível do ânion pode estar relacionado ao aumento da atividade da NOX, estimulada principalmente por hormônios como Ang II e endotelina-1 (ET-1) (KONUKOGLU D. & UZUN H., 2017).

Como mencionado anteriormente, os mecanismos envolvidos na HAS são inúmeros e complexos, e a alta prevalência global da doença a torna um grande alvo de estudos relacionados à patologia em si, e a possíveis alternativas terapêuticas. Nos dias atuais, medicamentos anti-hipertensivos tem sido usados clinicamente para tratar a hipertensão ou atenuar seus sintomas. Embora amplamente usados, muitas vezes possuem eficácia limitada, sendo por isso usados em combinação para obter eficácia desejada, o que a longo prazo pode levar a aumento do custo do tratamento, e ao aumento dos efeitos adversos. Por isso, a busca por compostos anti-hipertensivos naturais se mostra de grande importância, seja pelo custo do tratamento ou pela menor toxicidade e menores efeitos adversos (SULTANA S. & ASIF H.M., 2017).

As plantas medicinais são amplamente utilizadas na medicina popular e em sistemas tradicionais de medicina. Em todo o mundo, 80% da população depende da medicina baseada em fitoterapia. Assim, métodos científicos modernos para a busca do uso da terapia botânica são importantes para o desenvolvimento da medicina, portanto, deve-se enfatizar a conservação das populações de plantas, dentre outros motivos, para garantir fontes farmacologicamente ativas para a fitoterapia (SULTANA S. & ASIF H.M., 2017).

Desta forma, o estudo sobre o uso da *Alpinia zerumbet* como tratamento terapêutico tem se mostrado com grande potencial. A *Alpinia zerumbet* é uma espécie da família *Zingiberaceae*, presente em regiões tropicais e subtropicais no mundo (TU P.T. & TAWATA S, 2014). Nativa do oeste da Ásia, no Brasil se encontra mais ao Sudeste e Nordeste do país, popularmente conhecida como “colônia”. Tem sua utilização direcionada à confecção de chás principalmente,

utilizados por seus efeitos anti-hipertensivo, diurético, ansiolítico e antiulcerogênico, por exemplo (LAHLOU, 2003) (SANTOS *et al.*, 2011) (DE MOURA R.S., 2005).

## **Hipertensão Arterial Sistêmica**

A HAS se caracteriza pelo aumento estável nos níveis de pressão, tanto sistólica quanto diastólica, sendo considerado hipertenso o indivíduo que possuir níveis de PAS maior ou igual a 140 mmHg, e níveis de PAD maior ou igual a 90 mmHg (7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016). Entretanto, a American College of Cardiology e a American Heart Association, caracterizaram novos níveis de pressão arterial, sendo a hipertensão então caracterizada quando a PAS se encontra maior ou igual a 130 mmHg, e PAD maior ou igual a 80 mmHg (American College of Cardiology/American Heart Association High Blood Pressure Guideline, 2018).

A HAS representa a principal causa de morbidade e mortalidade global (SLIWA K. *et al.*, 2011), contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por doenças cardiovasculares, gerando assim um alto custo socioeconômico devido à alta frequência de internações e tratamentos hospitalares (7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016).

Cerca de 95% dos pacientes não tem conhecimento da causa da sua condição hipertensiva. Os mecanismos que contribuem para a hipertensão arterial são complexos e envolvem diversos sistemas biológicos (MONTEZANO A.C. *et al.*, 2015). Frequentemente, a HA está associada a alterações funcionais e estruturais de certos órgãos alvos, podendo ser agravada pela presença de fatores de risco, tais como: diabetes mellitus, obesidade, ingestão excessiva de sal, genética, faixa etária, dentre outras. Como consequência a essa alteração agravada por fatores de risco estão eventos como: infarto agudo do miocárdio, doença renal crônica, insuficiência cardíaca, dentre outras (7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016).

Os métodos terapêuticos relacionados a HAS se apresentam na forma não medicamentosa, com a adoção de intervenções dietéticas e atividades físicas, e apesar dos resultados terem se demonstrado eficazes, há uma perda de eficácia a médio e longo prazo. Por outro lado, há a forma medicamentosa de tratamento com o uso de fármacos para o controle da PA, se mostrando eficaz a longo prazo, e sendo capaz de reduzir significativamente a mortalidade por doenças cardiovasculares (7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016).

O tratamento da HAS visa a redução da morbimortalidade cardiovascular. Há evidências científicas através de estudos clínicos que mostram benefícios do tratamento realizado com o

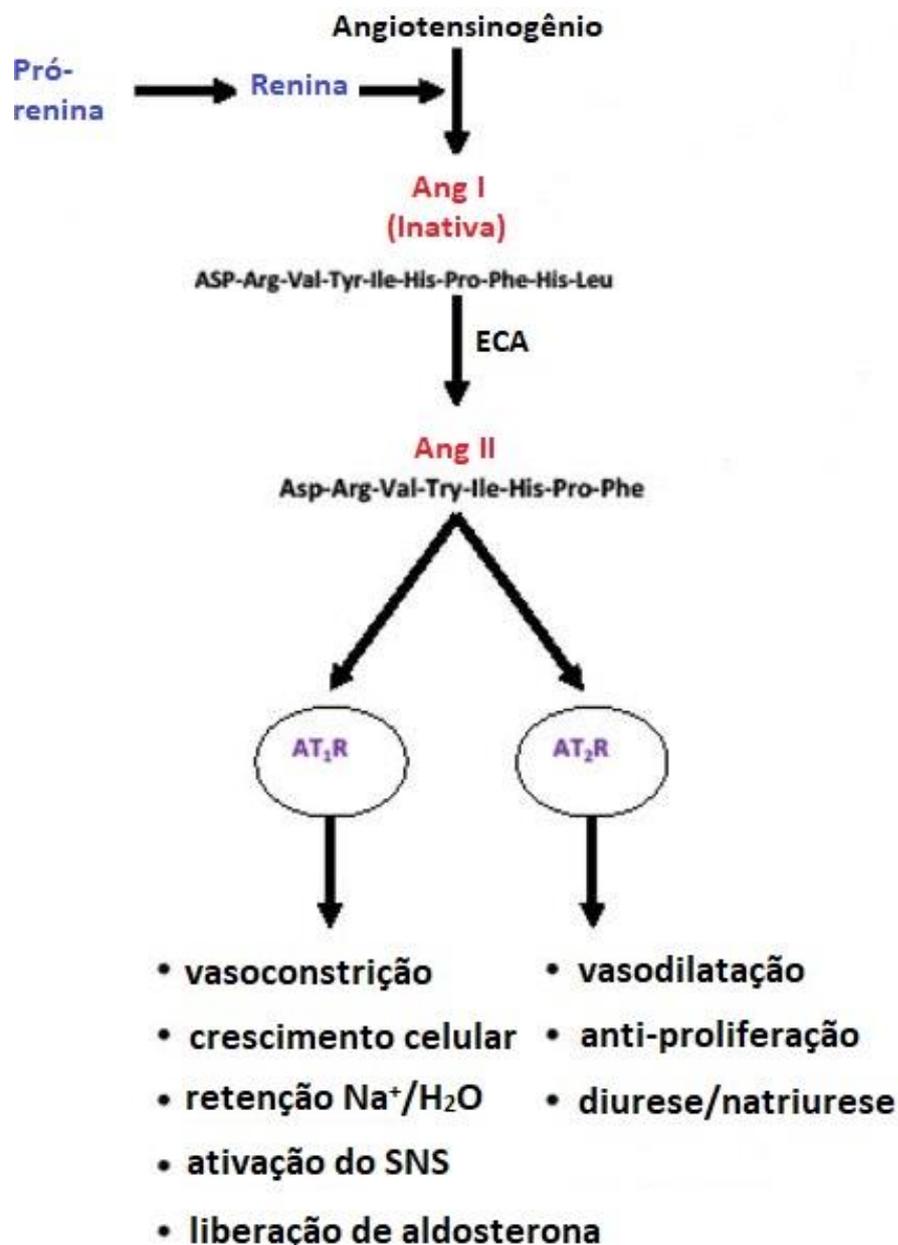
uso de diuréticos, bloqueadores beta-adrenérgicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), bloqueadores dos receptores AT1 da Ang II, dentre outros. Entretanto, além dos eventuais ajustes de dose, troca ou associação de medicamentos que podem se mostrar necessários, podem levar à eventuais aparecimentos de efeitos adversos com o uso destes tipos de fármacos, como por exemplo: fraqueza, câimbras, hipovolemia e disfunção erétil por parte dos diuréticos, broncoespasmo, bradicardia e vasoconstrição periférica por parte dos betabloqueadores, dentre outros efeitos adversos relacionados com o tipo de fármaco utilizado (TSIOUFIS C. *et al.*, 2017).

Os fármacos irão agir prevenindo ou atuando sobre mecanismos fisiopatológicos que caracterizam a HAS. Mecanismos estes que são complexos e envolvem muitos sistemas biológicos, dentre eles o sistema vascular, que apresenta alterações características, como: disfunção endotelial, remodelamento arterial e inflamação vascular. Este fenótipo pode ser influenciado pelo estresse oxidativo, gerado pelo aumento da produção de ROS e/ou diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante celular. Essas mudanças podem constituir tanto uma causa como uma consequência da PA elevada e, portanto, são alvos atraentes para a terapia anti-hipertensiva (MONTEZANO A.C. *et al.*, 2015).

### **Sistema Renina Angiotensina (SRA)**

O SRA é uma cascata peptídica a qual possui um papel fundamental na HAS, participando na regulação da PA, equilíbrio hídrico e eletrólitos, e remodelamento cardiovascular. A cascata inicia pela clivagem do angiotensinogênio derivado do fígado pela renina, secretada a partir do aparelho justaglomerular do rim, gerando angiotensina I (Ang I). A Ang I por sua vez vai ser hidrolisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) para formar Ang II, esta irá atuar em receptores específicos para angiotensina, dentre eles: AT1 e receptores de Ang II tipo 2 (AT2) (Figura 1) (VAN THIEL B.S., *et al.*, 2015).

Figura 1 - Sistema Renina-Angiotensina – Via Clássica



Fonte: Adaptado de Ali1, Hussain, 2016.

A primeira etapa da cascata é formada pela conversão do angiotensinogênio em Ang I pela enzima renina, uma aspartil protease. A renina ativa cliva os 10 aminoácidos do N-terminal da molécula de angiotensinogênio para formação de Ang I. A fonte primária de renina na circulação é o rim, regulado principalmente no aparelho justaglomerular através de dois mecanismos: barorreceptor renal, e canais de sódio. Deste modo, a excreção de renina pode ser regulada em resposta à alterações na pressão sanguínea e no balanço iônico. Os níveis de renina

então demonstram um papel importante e limitante na determinação dos níveis de Ang II, deste modo, fatores que mediam a expressão e secreção de renina tem o potencial de interferir direta e significativamente na atividade geral da via clássica do SRA (SPARKS M.A., *et al.*, 2014).

A Ang I, na etapa seguinte, será clivada, gerando um peptídeo vasoativo, a Ang II, pela ação da ECA, uma dipeptidil carboxipeptidase dependente de zinco. A ECA consiste em dois domínios, N e C, contendo cada um deles um local ativo de ligação ao cofator zinco, podendo desta forma ser inibida por agentes quelantes de metais. A ECA, localizada no endotélio vascular e liberada no plasma, possui ações diretas na fisiologia vascular, promovendo a produção de Ang II, um potente vasoconstritor, assim como, promove a degradação da bradicinina (BK), um agente vasodilatador. O bloqueio da ECA, por inibidores, se mostra eficaz como tratamento da HAS, uma vez que bloqueiam a formação de Ang II e a degradação de BK, gerando vasodilatação (DASKAYA-DIKMEN C., *et al.*, 2017; MARTIN M. & DEUSSEN A. *et al.*, 2019).

A Ang II tem efeito fisiológico principalmente por meio de dois receptores distintos: AT1 e AT2. Os receptores AT2 são expressos em toda vasculatura, principalmente em vasos de resistência, incluindo artérias coronárias, mesentéricas, renais e uterinas, dentre outros. Estudos mostraram que a ativação de receptores AT2 induz vasodilatação dependente da via NO-GMPc (DE MOURA R.S., 2004). Assim como, induz a natriurese, mantendo o equilíbrio negativo de sódio, promovendo desta forma a redução da PA, principalmente em modelo de HAS sensível ao sal (CAREY R.M., 2017).

Em contrapartida, o receptor AT1 é expresso em diversos tecidos, dentre eles: coração, rim, glândula adrenal, cérebro e tecido adiposo, possuindo assim influência direta no sistema cardiovascular. A ligação da Ang II ao receptor AT1 leva à uma mudança conformacional nas hélices transmembranares (TM) 3 e 6 e na interação entre TM2 e TM7 no receptor, gerando então uma casca de sinalização citoplasmática, com consequências como remodelamento das células do músculo liso vascular (VSMC), hipertrofia e migração celular. Estudos mostram também a atuação do receptor AT1 regulando a vasoconstrição por ativação de uma variedade de proteínas quinases intracelulares, dentre elas, as quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Estudos mostram também que essas proteínas parecem ter ação sobre a NOX, estimulando-a, e desta forma, promovendo a geração de ROS e síntese proteica, causando hipertrofia, hiperplasia e migração celular, hipertrofia cardíaca e disfunção renal. Desta forma, a ativação exacerbada do receptor AT1 leva a ativação de vias de sinalização intracelular, contribuindo assim para a remodelação vascular, dano em órgãos, doenças cardiovasculares e disfunção endotelial (KAWAI T. *et al.*, 2017).

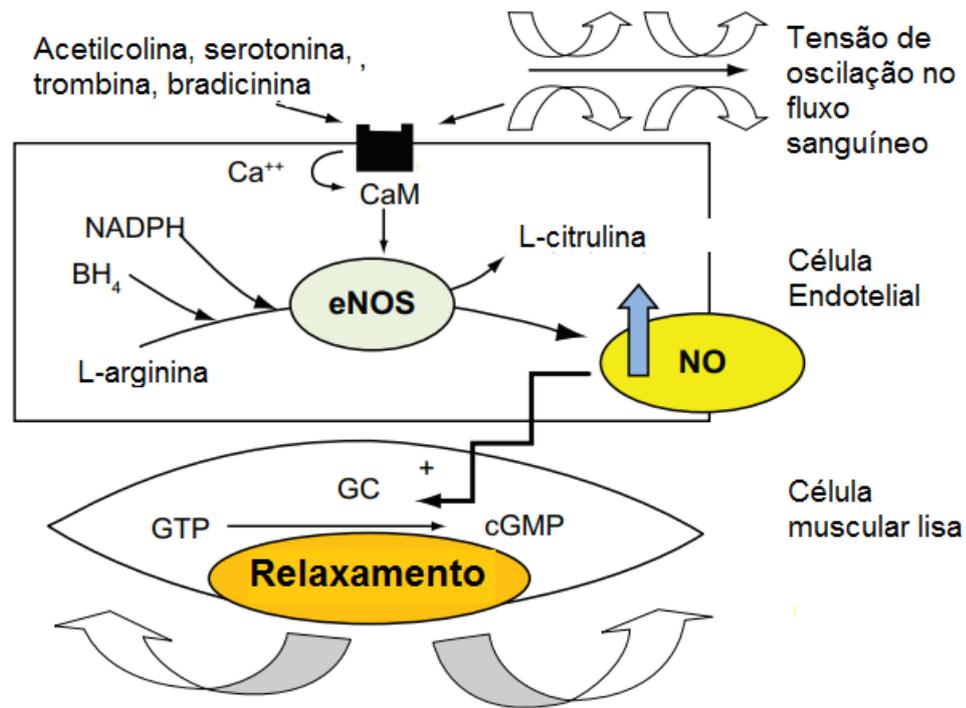
## Endotélio e Disfunção Endotelial

As células endoteliais formam uma monocamada cobrindo a superfície interna dos vasos. Esta localização permite integrar sinais físicos e neuronais do sangue e dos tecidos ao redor para então regular o tônus vascular, a adesão celular, a inflamação, o fenótipo e a proliferação do músculo liso, bem como a resistência à trombose (BOULANGER, 2016). O endotélio desempenha um papel importante na regulação do tônus vascular devido a síntese e liberação de fatores tanto de constrição (Ang II e ET-1) como relaxamento (óxido nítrico, fator hiperpolarizante derivado do endotélio, prostaciclina e cininas) (FÉLÉTOU M., 2012).

Dentre as substâncias vasodilatadoras há o óxido nítrico (NO), um gás inorgânico com um elétron desemparelhado, sendo considerado um radical livre. O NO é gerado por três isoformas de óxido nítrico sintase (NOS): NOS neuronal (nNOS), NOS induzível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS) (KNOWLES R.G. & MONCADA S., 1994). A nNOS e a eNOS são isoformas constitutivas principalmente expressas em células neuronais e endoteliais, respectivamente. Já a isoforma iNOS é expressa principalmente em células que participam do processo inflamatório, como macrófagos, estimulado por citocinas e/ou endotoxinas. A atividade da eNOS e nNOS é dependente da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ , de modo que a produção de NO em tais células é muito pequena em condições fisiológicas. Entretanto, a atividade da iNOS é independente de  $Ca^{2+}$ , representando uma alta produção de NO, estando relacionada à fisiopatologia de diversas doenças (NAGANO, 2009).

As células endoteliais metabolizam o aminoácido L-arginina através da enzima NOS para formar NO e aminoácido L-citrulina. A síntese de NO pode ser estimulada não somente por agonistas dependentes de receptores (acetilcolina (ACh) e BK), e agonistas não dependentes de receptores (ionóforos de cálcio), mas também por oscilações no fluxo sanguíneo. Oscilações essas que podem regular a transcrição do gene para eNOS, onde as células endoteliais expostas a essa mudança de fluxo mostram um aumento na produção de NO (Figura 2) (GIMBRONE M.A. & GARCÍA-CARDEÑA G., 2015).

Figura 2 -Via L-Arginina – Óxido nítrico



Fonte: Adaptado de Toblli JE, et al. 2012.

A disfunção endotelial é caracterizada por uma redução no relaxamento vascular dependente de endotélio, ocorrendo, dentre outros motivos, pela diminuição da biodisponibilidade de NO, que não apenas promove vasodilatação, como também participa da regulação da expressão de moléculas de adesão e da ativação de células musculares lisas (HIRASE T, NODE K, 2012).

Na HAS pode ocorrer uma alteração na via L-arginina/NO endotelial, promovendo a menor biodisponibilidade do NO. Essa alteração é causada por um desacoplamento da eNOS, o qual acontece devido à reação do ânion superóxido com o NO gerando uma nova ROS, o peroxinitrito. O peroxinitrito então oxida e desestabiliza a eNOS, que em sua forma desacoplada gera mais superóxido, resultando em uma piora do quadro de estresse oxidativo, assim como, uma menor biodisponibilidade de NO. Desta forma, estudos apontam que uma menor biodisponibilidade do NO seja resultado do alto nível de estresse oxidativo, sugerindo um papel central de ROS na disfunção endotelial (BRITO R. *et al.*, 2015).

Estudos vem apontando a participação direta de ROS como sinalizadores celulares importantes na célula, entretanto, em condições patológicas quando são produzidos em excesso, promovem amplamente a disfunção endotelial, mediada principalmente pelo desacoplamento

da eNOS, que está intimamente ligada ao desenvolvimento de complicações vasculares que ocorrem em distúrbios metabólicos, hipertensão, envelhecimento, dentre outros. A redução da biodisponibilidade de NO também contribui para a disfunção endotelial. A compreensão então dos mecanismos relacionados à disfunção endotelial aliada ao estresse oxidativo se mostra importante para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção de danos vasculares em doenças cardiovasculares (INCALZA M.A. *et al.*, 2018).

## **Estresse Oxidativo**

A expressão “estresse oxidativo” foi originalmente definida por Sies em 1985 como um desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes. Esse desequilíbrio gera um aumento da biodisponibilidade de ROS, o que leva a danos nos tecidos (JONES D.P. & RADI R., 2014). Por outro lado, quando em concentrações apropriadas e em localizações subcelulares definidas, ROS também desempenham um importante papel fisiológico na sinalização celular, regulação do crescimento e diferenciação celular, tônus vascular, inflamação e respostas imunes (LUSHCHAK V.I., 2014).

As ROS são consideradas moléculas que influenciam a sinalização redox. As ROS que mais se destacam na transdução de sinal são o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (RAY P.D. *et al.*, 2012). As ações de sinalização de ROS dependem do sítio subcelular gerador, tipo de espécies geradas, proximidade com antioxidantes, meia-vida da espécie, permeabilidade da membrana celular e concentração local. Entre as ROS, o peróxido de hidrogênio é particularmente importante na sinalização porque é permeável à membrana, estável e tem uma meia-vida mais longa do que os demais (MONTEZANO A.C., 2015).

As ROS regulam os receptores acoplados à proteína G (GPCR) em células vasculares, como o subtipo 1. Em VSMCs, a ativação da sinalização GPCR mediada por ROS influencia a contração celular, crescimento, migração, deposição de colágeno e ativação de metaloprotease de matriz, processos celulares importantes na regulação do tônus e da estrutura vascular. Além disso, a sinalização mediada por GPCR, através de processos redox, estimula a ativação de fatores de transcrição e genes pró-inflamatórios, produção de quimiocinas e citocinas e recrutamento e ativação de células inflamatórias que causam inflamação vascular. O aumento do estresse oxidativo muda o equilíbrio redox com consequente diminuição da

biodisponibilidade do NO, prejudicando a vasodilatação dependente de endotélio, conduzindo ao aumento da vasoconstrição mediada por GPCRs (MONTEZANO A.C., 2015).

Existe uma variedade de fontes enzimáticas e não-enzimáticas de ROS presentes nos vasos sanguíneos. Dentre as fontes enzimáticas destacam-se, a NOX, NOS desacoplada, e xantina oxidase (XO). A NOX, fonte geradora de superóxido, catalisa a redução de oxigênio molecular em superóxido, através da doação de elétrons pelo NADPH. No sistema cardiovascular, três subunidades da NOX foram identificadas: a NOX1, NOX2 e NOX4. A NOX1 é expressa em VSMCs e células endoteliais, e possui envolvimento com processos de migração, crescimento celular e hipertrofia. A NOX 2 é expressa em cardiomiócitos e VSMCs, células neuronais e células imunes, possuindo participação em processos de defesa imune e angiogênese. E a NOX4 é expressa em cardiomiócitos, VSMCs e células renais, com participação em processos de migração, crescimento e diferenciação celular (CIFUENTES-PAGANO E. *et al.*, 2014; YOUSEFIAN M. *et al.*, 2019)

A NOX Tem sua regulação mediada por sinal mecânico, associado ao aumento da tensão mecânica produzida pelo aumento do fluxo sanguíneo, relacionado ao aumento da vasoconstrição, e humoral, sendo Ang II, ET-1 e *urotensina-II* (UT-II) seus principais ativadores. O efeito mais conhecido do superóxido derivado da NOX é a inativação do NO pela formação de peroxinitrito, desregulando a função vasodilatadora dependente de endotélio, o que caracteriza a disfunção endotelial. Assim, estudos mostraram que a ativação da NOX está diretamente ligada à patologia vascular na HAS (R. BRITO & G. CASTILLO, 2015).

A eNOS se apresenta também como uma fonte geradora de ROS, quando a deficiência ou oxidação da L-arginina e da tetrahydropterina (BH4) – co-fator essencial na produção de NO – estão associados com o desacoplamento da via L-arginina-NO, resultando na diminuição da formação de NO, e no aumento da produção de ROS mediado pela eNOS. A NOX é a fonte inicial para a geração de ROS, gerando superóxido, que combinado ao NO sintetizado forma peroxinitrito. O peroxinitrito oxida e desestabiliza eNOS para a produção de mais superóxido. O aumento de superóxido também participa na oxidação de BH4, altamente sensível à oxidação, auxiliando no desacoplamento da eNOS (KUZKAYA *et al.*, 2003; ZOU *et al.*, 2004).

XO é uma das duas formas convertidas de xantina óxido-redutase (XOR), sendo amplamente distribuída em vários órgãos, incluindo o fígado, intestino, pulmão, rim, coração, cérebro e plasma. Seu papel no catabolismo de purina e no de outros análogos de purina tem sido amplamente estudado (ADEHIN A. & BOLAJI O.O., 2015). A XO mostrou ser outra fonte primária de superóxido, onde é geralmente conhecida como a enzima final do catabolismo de purina em humanos, catalisando a hidroxilação da hipoxantina em xantina, e xantina em ácido

úrico, produzindo radical superóxido (VÁNYOLÓS A., *et al.*, 2014). Estudos mostraram um aumento da atividade de XO em condições inflamatórias e em doenças cardiovasculares. Há relatos também de que o ácido úrico e as ROS sejam simultaneamente produzidos por XO, o próprio ácido úrico estimula a formação de ROS e inibe a produção de óxido nítrico (NO), exercendo assim efeitos desfavoráveis diretos na função endotelial (KLISIC A. *et al.*, 2017).

Por outro lado, é importante a manutenção do equilíbrio entre oxidação e antioxição em sistemas biológicos saudáveis. Em condições fisiológicas, o sistema de defesa antioxidante humano inclui antioxidantes endógenos, por exemplo, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) (Figura 3), no entanto, há os antioxidantes exógenos, por exemplo, ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E) e polifenóis (BOUAYED J. & BOHN T., 2010).

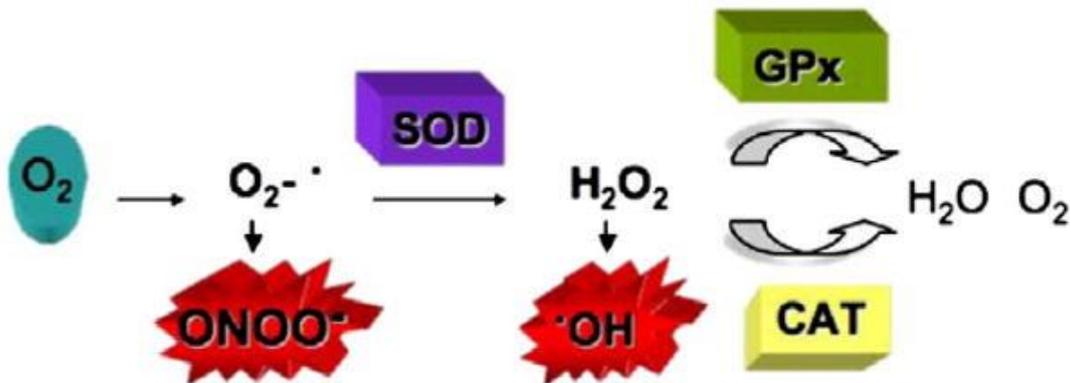
A SOD é a primeira linha de defesa antioxidante, catalisando a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Três isoformas de SOD foram descritas em seres humanos. A forma citosólica dependente de cobre-zinco (CuZnSOD, SOD1), a forma mitocondrial dependente de manganês (MnSOD, SOD2) e a forma extracelular cobre-zinco-dependente (ecSOD, SOD3). Cada isoforma é dependente de um metal de transição redox em seu sítio ativo para catalisar a dismutação do superóxido. Estudos mostraram que a ecSOD é a principal reguladora da biodisponibilidade de NO, através da sua atividade de eliminação de superóxido, desempenhando um papel importante nos transtornos cardiovasculares. A ecSOD está presente, principalmente, em vasos sanguíneos, coração, pulmões, bexiga (BRESCIANI G. *et al.*, 2015).

O peróxido de hidrogênio, em níveis baixos, desencadeia respostas adaptativas que aumentam a resistência celular aos oxidantes, aumentando a expressão de enzimas antioxidantes. Entretanto, se mostra tóxico em altas concentrações, desencadeando apoptose e gerando radicais hidroxila. Assim, os níveis intracelulares de peróxido de hidrogênio são regulados pela atividade de enzimas metabolizadoras, dentre elas a CAT, presente principalmente nos peroxissomos e na mitocôndria, que irá quebrar a molécula de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. (MARTINS D. & ENGLISH A.M., 2014).

Outra família de enzimas antioxidantes são as GPxs, enzimas homólogas à GPx-1 de mamífero contendo selenocisteína (Sec) que usa GSH (glutathione reduzida) como um co-substrato obrigatório na redução do peróxido de hidrogênio em água. A GPx-1 é um dos membros mais abundantes da família de enzimas GPx que inclui uma enzima específica do epitélio que é altamente expressa no intestino (GPx-2); um subtipo expresso no rim e pulmões e secretado no plasma (GPx-3); e GPx-4, que é amplamente expressa e difere em sua

especificidade de substrato em comparação com os outros membros da família. Conseqüentemente, a GPx-1 é uma enzima antioxidante crucial envolvida na prevenção do acúmulo prejudicial de peróxido de hidrogênio intracelular. Está presente em todos os compartimentos celulares, por exemplo, citosol, mitocôndrias e, em algumas células, nos peroxissomos. Estudos demonstraram que a GPx-1 é mais eficaz do que a CAT na remoção de peróxidos intracelulares em muitas condições fisiológicas. O efeito da GPx-1 foi estudado em processos de modulação em que os oxidantes participam ativamente, incluindo crescimento celular anormal e respostas proliferativas; respostas patológicas adaptativas, como apoptose ou inflamação; e processos de lesões teciduais, tais como aqueles envolvidos na aterogênese, toxicidade de drogas e lesões por isquemia e perfusão. Além disso, estudos em humanos mostraram a participação da GPx-1 em alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares (LUBOS E., *et al.*, 2011).

Figura 3 - Atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPX)



Fonte: Velazquez I, 2009.

Dentre os agentes antioxidantes exógenos podemos citar a vitamina C, que é um dos vários compostos que fazem parte da primeira linha de defesa do corpo contra os danos celulares por radicais livres, neutralizando diretamente os radicais livres. Entretanto, em uma concentração mais elevada induz oxidação, seja gerando ROS ou inibindo os sistemas antioxidantes na presença de ferro, o que, por sua vez, induz a peroxidação lipídica (CHAKRABORTHY A., *et al.*, 2014).

A vitamina E, por sua vez, é o antioxidante neutralizador de radicais mais abundante e potente *in vivo*. É lipofílica e tem efeitos antioxidantes dentro de membranas biológicas e lipoproteínas em conjunto com a vitamina C, hidrofílica. As vitaminas E e C inibem a oxidação da LDL de forma sinérgica. Quando a vitamina E neutraliza os radicais peroxila ao se ligar a

eles, convertendo-os em moléculas menos reativas, se converte em sua forma oxidada, que pode ser reduzida pela vitamina C ou outros compostos redutores para regenerar a vitamina E (NIKI E., 2015).

Já os polifenóis, importantes agentes antioxidantes, são divididos em grupos com base em sua estrutura química. Existem 10 ou mais classes de polifenóis, mas as quatro principais classes são os ácidos fenólicos, flavonóides, stilbenos e lignanas, tendo cada um deles subclasses com centenas de representantes, podendo ser encontrados em diversos tipos de vegetais (MYBURGH K.H., 2014). Os polifenóis presentes nos alimentos podem ajudar a limitar o dano oxidativo atuando diretamente sobre ROS e/ou estimular sistemas de defesa endógenos, como as enzimas antioxidantes. Os grupos fenólicos nos polifenóis podem receber um elétron para formar radicais fenoxil relativamente estáveis, interrompendo as reações de oxidação nos componentes celulares. A eficiência dos polifenóis como compostos antioxidantes depende muito da sua estrutura química (LANDETE J.M., 2013).

Estudos demonstraram que pacientes hipertensos e alguns modelos animais de HAS tiveram produção excessiva de ROS, assim como, menor atividade antioxidante, o que foi relacionado ao aumento dos níveis de PA. Evidenciando, assim, a relação entre o aumento do estresse oxidativo e a HAS (R. BRITO & G. CASTILLO, 2015). Somado a essas evidências, estudos demonstraram que culturas de células do músculo liso vascular e de artérias isoladas de ratos e humanos hipertensos apresentaram níveis altos de ROS, sinalização redox-dependente amplificada, e atividade antioxidante reduzida. Classes de agentes anti-hipertensivos como bloqueadores beta-adrenérgicos, antagonistas de receptores de angiotensina, e bloqueadores de canais de cálcio, tem eficácia, em parte, pela diminuição do estresse oxidativo vascular (R. BRITO & G. CASTILLO, 2015).

## **Remodelamento**

### Aorta

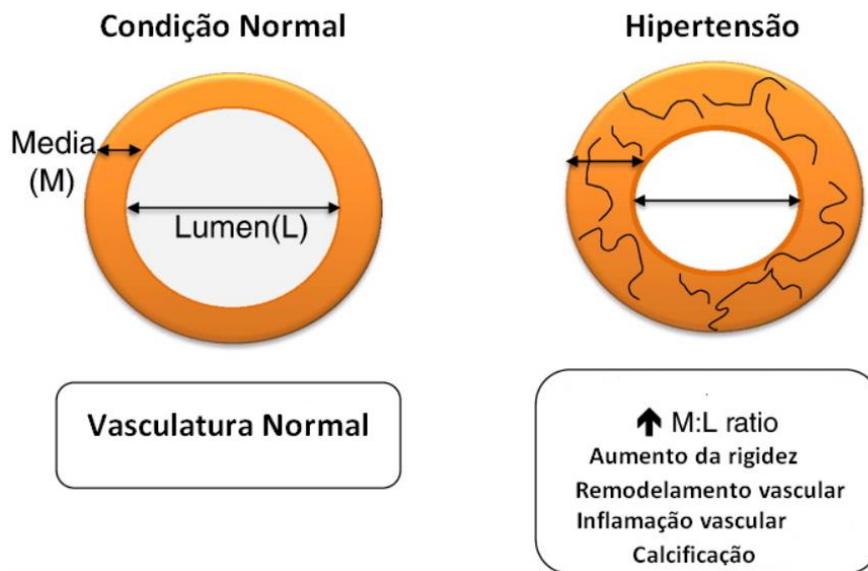
Os órgãos, tecidos e células vivos são projetados de forma a funcionarem otimamente, se adaptando funcionalmente às demandas mecânicas, remodelando sua geometria, estrutura e propriedades. O remodelamento do tecido é essencial para os sistemas vivos, atraindo grande

interesse para estudos (HAYASHI K. & NAIKI T., 2008). As células vasculares detectam e respondem ativamente a diversos estímulos, incluindo forças mecânicas, agentes vasoativos, fatores humorais e mediadores inflamatórios e trombóticos. As artérias de condutância, especialmente a aorta, são bem adaptadas às mudanças cíclicas na pressão sanguínea que as forçam a expandir durante a sístole e se retrair durante a diástole, amortecendo as variações pontuais de pressão, de modo que o fluxo sanguíneo em vasos menores e menos elásticos permaneça relativamente constante ao longo do ciclo cardíaco e essa tensão em microvasos é minimizada. (LEMARIÉ C.A., *et al.*, 2009). O controle vasomotor (contração/relaxamento) está relacionado à rápida adaptação do diâmetro do vaso, onde as alterações na estrutura se apresentam como um processo dinâmico que ocorre em resposta a modificações hemodinâmicas à longo prazo (SAVOIA C. & VOLPE M., 2011).

O remodelamento vascular está associado a alterações tanto do diâmetro luminal, quanto de mudanças na camada média (hipertrófica, eutrófica ou hipotrófica), devido ao aumento do fluxo sanguíneo. Entretanto, se o aumento da pressão em si ou outros fatores são responsáveis pelo início do remodelamento vascular não se tem conhecimento. Deste modo, o crescimento ou a apoptose, a contração ou o relaxamento, a senescência, a calcificação, a produção ou a degradação da matriz extracelular (ECM) alterada e a inflamação resultam então em mudanças estruturais (SAVOIA C. & VOLPE M., 2011).

Na HAS, o remodelamento das artérias de maior calibre, como a aorta, é caracterizado, principalmente, pelo aumento da espessura da camada íntima-média (15-40%). O espessamento da parede permite uma compensação pelo aumento da PA e tende a normalizar o estresse na circunferência da parede (LAURENT S. & BOUTOUYRIE P., 2015). O aumento da espessura se deve às alterações estruturais da parede das artérias de maior calibre, incluindo deposição de colágeno e fibronectina, e fragmentação de elastina, o que leva a um aumento da espessura e rigidez da parede arterial (Figura 4) (BRIET M. & SCHIFFRIN E.L., 2012).

Figura 4 - Remodelamento vascular



Fonte: Adam H, 2015.

Estudos mostraram a participação direta da Ang II, por meio dos receptores AT1, promovendo uma mudança de um fenótipo contrátil para um proliferativo e sintético de VSMCs, levando à alterações na contratilidade, além de hipertrofia, proliferação vascular e secreção de mediadores contráteis, mitogênicos, pró-fibróticos e inflamatórios. Esse quadro inflamatório vascular é caracterizado pelo recrutamento de células imunológicas dentre elas: monócitos e linfócitos, além de levar à produção de citocinas quimiotáticas. A Ang II tem ações pró-inflamatórias significativas induzindo a produção de ROS, citocinas, moléculas de adesão e ativação de genes inflamatórios redox-sensíveis em células vasculares (MONTEZANO A.C. *et al.*, 2015).

Esse quadro inflamatório vai levar também à ativação de outro componente importante nesse remodelamento, as metaloproteinases (MMPs), uma família de endoproteinases dependentes de zinco. As MMPs tem sua expressão e atividade aumentada durante o processo inflamatório, sendo secretadas por macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células endoteliais, dentre outras, e sua secreção promovida por citocinas pró-inflamatórias. As MMPs então vão atuar no processo de remodelamento e degradação de proteínas da ECM promovendo a proliferação, migração e diferenciação celular, desempenhando assim um papel importante na angiogênese, apoptose e reparo tecidual (WANG X. & KHALIL R.A., 2018).

Todas essas mudanças fenotípicas nas quais as células se tornam secretoras, migratórias, proliferativas e senescentes, além do aumento do quadro inflamatório, facilitam o remodelamento arterial, tais como o espessamento da camada íntima-média, fibrose,

calcificação e aneurismas associados a uma diminuição da vasodilatação dependente de endotélio e aumento da rigidez. Estudos mostraram que a inibição da Ang II efetivamente previne/trata o remodelamento estrutural arterial, diminuindo a rigidez e melhorando a função endotelial vascular em modelos animais (WANG M. *et al.*, 2015).

### **Ratos espontaneamente hipertensos (SHR)**

Existem vários modelos animais de hipertensão, incluindo hipertensão renovascular de Goldblatt (GH) (MATSUMOTO & HAYASHI, 1994), hipertensão DOCA-salt (acetato de desoxicorticosterona) (ORMSBEE & RYAN, 1973) (BERTHON *et al.*, 2002), bandagem aórtica/ligadura (FUNG & LIU, 1989) (FRIDEZ *et al.*, 2001) e o modelo SHR (MARQUE *et al.*, 1999). A hipertensão em SHRs é baseada geneticamente e, nesse sentido, é considerada análoga à hipertensão essencial humana (GREENWALD & BERRY, 1978).

A linhagem SHR foi originada a partir do cruzamento de ratos Wistar-Kyoto, provenientes de uma linhagem normotensa, mas que apresentavam níveis altos de PA. A hipertensão se desenvolve naturalmente ao longo de 2-5 meses de idade (DORNAS W.C. & SILVA M.E., 2011). A linhagem SHR tem sido amplamente utilizada como modelo de hipertensão. Os ratos, comparado à linhagem controle Wistar Kyoto, apresentam diferenças no fenótipo cardíaco, como: aumento da massa cardíaca, tolerância isquêmica cardíaca comprometida, susceptibilidade a arritmias ventriculares, e insuficiência cardíaca (NECKÁR J. *et al.*, 2011).

A elevação da pressão nos SHR começa a se desenvolver nas primeiras 4 semanas de vida, atingindo níveis sistólicos de aproximadamente 130 à 140 mmHg, atingindo seu valor máximo em 10 semanas de vida, onde atinge níveis sistólicos de 180 mmHg, raramente ultrapassando níveis acima de 200 mmHg. Nas primeiras semanas, os SHRs já mostram sinais do aumento do débito cardíaco, mas uma resistência periférica total em níveis normais, no entanto, à medida que a pressão estabiliza em valores altos, o débito cardíaco retorna ao normal, e os vasos já hipertrofiados produzem então um aumento da resistência periférica total. Entre a 14<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> semanas, a patologia renal começa a se desenvolver, e já nas 30 semanas de idade possui taxas de filtração glomerular 20 à 30% mais comprometidos, comprometimento esse que não está presente nas fêmeas SHR, juntamente com um quadro de proteinúria 6 vezes menor quando comparados aos machos (ZAHRAA MOHAMMED-ALI *et al.*, 2017)

O aumento do débito cardíaco nas primeiras semanas irá contribuir para o desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda, acompanhando o desenvolvimento da hipertensão. Esse quadro de hipertrofia cardíaca irá gerar, aos 12 meses de vida, um quadro de fibrose miocárdica local, aumentando com a idade, chegando a quadros de insuficiência cardíaca em alguns animais com 18 meses de idade (DORNAS W.C. & SILVA M.E., 2011).

Como citado anteriormente, a causa patológica da hipertensão no modelo SHR é genética e embora os avanços genéticos tenham demonstrado a participação do cromossomo 13, ainda não foram identificados genes específicos para a patologia no modelo. Entretanto, os estudos mostraram a presença do gene para renina no cromossomo 13, assim como a participação direta do sistema renina-angiotensina-aldosterona no desenvolvimento da hipertensão nos SHR. Estudos apontaram também um aumento nos níveis de renina plasmática nos SHR jovens, coincidindo com o aumento da pressão sistêmica, assim como, um aumento nos níveis plasmáticos de Ang II, e atividade da ECA, corroborando com o papel chave do sistema renina-angiotensina-aldosterona na hipertensão dos SHR (PETER G. ANDERSON *et al.*, 2000; SUGANO M. *et al.*, 2000).

### **Extrato hidroalcoólico da folha da Colônia**

*Alpinia zerumbet* (Figura 5) é uma espécie aromática da família *Zingiberaceae*, distribuída por regiões tropicais e subtropicais no mundo (TU P.T. & Tawata S, 2014). Originária do Oeste da Ásia, no Brasil se encontra mais ao Sudeste e Nordeste do país, onde é popularmente conhecida como “colônia”. Tem sua utilização direcionada à confecção de chás principalmente, utilizados por seus efeitos anti-hipertensivo, diurético, ansiolítico e antiulcerogênico, por exemplo (LAHLOU, 2003) (SANTOS *et al.*, 2011) (DE MOURA R.S., 2005).

Figura 5 - Alpinia Zerumbet (colônia)



Fonte: Adaptado de A Contributory Role of Shell Ginger, 2018.

Plantas em geral necessitam de mecanismos que garantam a elas sobreviver em meio a estresses externos e certas mudanças fisiológicas, fatores estes que estão ligados à produção de radicais livres e ROS pela célula, que levam ao dano oxidativo intracelular. Assim, em resposta a essas alterações, são sintetizados metabólitos secundários para defesa celular contra o estresse oxidativo. Dentre esses metabólicos, compostos fenólicos e óleos essenciais possuem um papel fundamental (ELZAAWELY A. *et al.*, 2006).

Compostos fenólicos estão amplamente distribuídos em plantas, e se mostram presentes através de cor e sabor em vegetais e frutas. Acima disso, desempenham um papel importante na resistência da planta contra radicais livres, e na defesa contra infecções microbianas. (ELZAAWELY A. *et al.*, 2007).

Evidências apresentadas por diversos estudos já vem apontando que a inserção de fontes de polifenóis, como frutas e vegetais, na dieta estão associados à uma melhora na progressão de doenças cardiovasculares, assim como, melhora no perfil lipídico, redução da geração de ROS, levando à um aumento da capacidade antioxidante do próprio corpo, contribuindo assim para a melhora da função cardiovascular no organismo (SERINO A. & SALAZAR G., 2018).

Estudos químicos mostraram que as folhas de *Alpinia zerumbet* são ricas em flavonoides, uma classe de polifenóis, como [(+)-catequina, (+)-epicatequina, rutina, quercetina, kaempferol 3-O-rutinosídeo, kaempferol 3-O-glucoronídeo, kaempferol] (MPALATINOS M.A *et al.*, 1998).

Esses flavonoides presentes nas folhas de *Alpinia zerumbet* tem exibido benefícios no tratamento de algumas patologias cardiovasculares. Paulino E.T. *et al.*, 2019 mostrou o efeito cardioprotetor do extrato hidroalcoólico das folhas de colônia em modelo de infarto induzido por isoproteronol, sugerindo que o mecanismo relacionado a tal efeito seria o efeito cardio-depressivo desencadeado pelo bloqueio de canais de cálcio do tipo L, bem como, sua ação antioxidante (PAULINO E.T. *et al.*, 2019).

Estudos demonstraram também, que o extrato hidroalcoólico obtido a partir de folhas de Colônia induz um efeito vasodilatador dependente de endotélio. Esse efeito parece ser dependente da via NO-GMPc (3', 5' guanosina monofosfato cíclico) e tem a participação de receptores B2 da BK. Além disso, este extrato promove um efeito anti-hipertensivo em modelo DOCA-sal (DE MOURA R.S. *et al.*, 2005).

Os benefícios dos polifenóis podem estar relacionados com a sua atividade antioxidante, ao efeito vasodilatador (ROCHA *et al.*, 2007; KHURANA S. *et al.*, 2013) e a sua ação anti-hipertensiva (DE MOURA R.S. *et al.*, 2002; KHURANA *et al.*, 2013), bem como sua capacidade de reduzir os níveis de colesterol (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010) e o desenvolvimento de placas ateroscleróticas (WADDINGTON *et al.*, 2004; KHURANA *et al.*, 2013).

A maior parte dos estudos relacionados a planta *Alpinia zerumbet* engloba o tratamento de fisiopatologias com os óleos essenciais presentes na planta. Os óleos essenciais são óleos aromáticos líquidos, voláteis e lipofílicos, extraído de diferentes partes da planta, como folhas, sementes, flores e cascas. Os óleos são encontrados em diferentes tipos de plantas, onde são usados popularmente para dar sabor e odor aos alimentos, de acordo com os constituintes do óleo presente na planta (TONGNUANCHAN P & BENJAKUL S, 2014)

Kavapironas como a DDK (Dihidro-5,6-deidrokawaina) compõe a maior parte dos óleos essenciais presentes na folha de *Alpinia*. Compostos esses que garantem a planta uma ação defensiva contra fungos e insetos (A. ELZAAWELY, 2006). Estudos com os óleos essenciais da *Alpinia* já apontaram um efeito vasodilatador (PINTO *et al.*, 2009), anti-hipertensivo (LAHLOU *et al.*, 2003) e protetor contra lesão de células endoteliais aórticas e inflamação (Ji Y.P. *et al.*, 2019), além de atividade fungicida (LIMA *et al.*, 1993), bloqueio da excitabilidade neural (LEAL-CARDOSO *et al.*, 2004) e atividade antioxidante (A. ELZAAWELY *et al.*, 2006).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as ações do extrato hidroalcoólico de folhas de *A. zerumbet* em ratos SHR, com vistas ao aumento do arsenal terapêutico para o tratamento da hipertensão arterial humana.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento terapêutico crônico com o extrato hidroalcoólico de folhas da Colônia (AZE) sobre as alterações cardiovasculares observadas em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

### 1.2. Objetivos específicos

Avaliar no modelo SHR, se o tratamento com AZE modifica:

- a) Os parâmetros hemodinâmicos;
- b) O sistema renina-angiotensina;
- c) A função renal;
- d) A disfunção endotelial;
- e) O estresse oxidativo;
- f) O remodelamento arterial.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Preparação do extrato hidroalcoólico de folhas da Colônia (*Alpinia zerumbet*)

Foram utilizadas folhas de Colônia provenientes do Jardim do Palácio do Catete (Rio de Janeiro, RJ) fornecidos pela nossa colaboradora Prof.a Dr.a Cristiane Pimentel Victório (UEZO). Para a obtenção do extrato, as folhas obtidas foram superficialmente limpas, e posteriormente deixadas a secar em temperatura ambiente durante aproximadamente 30 dias. As folhas foram então cortadas em pequenos pedaços e extraídas à quente, e misturada à uma solução de etanol e água, na proporção de 50 g de folhas secas para 800 ml de etanol/água (1:1), e acondicionado em frasco âmbar sob refrigeração. O extrato foi agitado periodicamente por 2 a 4 horas durante aproximadamente 15 dias. Em seguida, o extrato foi filtrado em filtro Whatman nº 1 e submetido à evaporação do etanol à baixa pressão. O resíduo foi liofilizado e mantido a -20°C até o uso (DE MOURA R.S., 2005). A quantificação de polifenóis totais nos extratos foi avaliada pelo método de Folin–Ciocalteu (Singleton and Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, 1965), mostrando uma média de 1,56 mg/g de amostra analisada.

### 2.2. Animais

Os animais foram obtidos do biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em ciclo de claro-escuro de 12 h, com presença de luz a partir das 6:00 h da manhã, sendo os experimentos realizados durante o dia. Os animais tiveram livre acesso à ração e água. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de animais Experimentais do IBRAG-UERJ (nº52/2016)

Para o estudo sobre o efeito do tratamento crônico com o extrato, foram utilizados 20 ratos SHR e 20 ratos Wistar-Kyoto (WKY), com 90 dias de idade, pesando entre 300 e 430 g. O tratamento teve início a partir da estabilização da hipertensão dos ratos SHR

(PAS>200mmHg e/ou PAD>150mmHg), transcorrendo durante 6 semanas. Portanto, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

- Grupo WKY (n=10): Ratos WKY que receberam apenas água da 1ª semana à 6ª semana de tratamento.

- Grupo WKY + AZE (n=10): Ratos WKY que receberam o AZE (50mg/kg/dia) misturado na água de beber da 1ª semana à 6ª semana de tratamento.

- Grupo SHR (n=10): Ratos SHR que receberam apenas água da 1ª semana à 6ª semana de tratamento.

- Grupo SHR + AZE (n=10): Ratos SHR que receberam o AZE (50mg/kg/dia) misturado na água de beber da 1ª semana à 6ª semana de tratamento.

### 2.3. Medida dos parâmetros hemodinâmicos

As medidas da PAS, PAD e PAM (mm Hg), foram realizadas de modo não invasivo, pela técnica de pletismografia de cauda, por meio do aparelho CODAHT2 (Kent Scientific) (Figura 6). Nesse método, um garrote e um sensor de pulso são colocados em torno da cauda do animal, e através do volume de sangue que flui pela cauda, os dados de pressão são registrados. As medidas foram realizadas uma vez por semana durante o período de 6 semanas do tratamento. Os animais foram treinados por 2 semanas, antes do período experimental, para minimizar o estresse durante a medida da PA.

Figura 6 - Técnica de pletismografia de cauda



#### 2.4. Coleta de urina de 24h e análise bioquímica

Após 6 semanas de tratamento, os ratos foram alocados em gaiolas metabólicas para a coleta de urina de 24 h, sendo avaliado o volume urinário. Alíquotas de urina foram guardadas à -80 °C para posterior análise de proteinúria, ureia e creatinina.

As análises de proteinúria (resultados expressos em mg/24h) e ureia (g/24 h) foram realizadas através de kit comercial da Biotécnica®, enquanto que a creatinina (mg/24 h) foi determinada pela utilização do kit comercial da Bioclin®.

#### 2.5. Eutanásia

Após a coleta da urina de 24 h, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (70 mg/kg) por via intraperitoneal. Após certificado que o animal estava anestesiado, foi realizada a laparotomia, com posterior coleta de sangue através de punção da artéria aorta abdominal, assim como isolamento do leito arterial mesentérico (LAM), da artéria aorta torácica e do coração. O LAM foi utilizado imediatamente para o experimento de reatividade vascular. A aorta foi preservada em formalina tamponada para posterior análise morfológica.

#### 2.6. Análises bioquímicas na urina e no plasma

Os níveis de uréia, proteinúria e creatinina foram determinadas por método colorimétrico através de kits comerciais (Bioclin®). Os níveis de Ang II foram avaliados por kit comercial ELISA (Elabscience®).

## 2.7. Isolamento do LAM.

As preparações de LAM foram isoladas de ratos dos 4 grupos experimentais, conforme descrito por McGregor (1965). O LAM foi estendido para o exterior da cavidade abdominal e envolto em gaze umedecida com solução de Krebs [composição em mM: NaCl (118.3); KCl (4.7); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (2.5); MgSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O (1.2); NaHCO<sub>3</sub> (25.0); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2); glicose (11.1); ácido etilenodiamino tetra acético – EDTA (0.026)]. Os ramos pancreático, duodenal, íleo-cólico e cólico direito da artéria mesentérica superior foram ligados e seccionados. O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada na sua origem, à altura da artéria aorta abdominal e canulada com um tubo de polietileno (PE 50, Clay Adams Brand CA – Becton Dickinson) preenchido com solução de Krebs. Em seguida, o intestino delgado foi separado do leito vascular, cortando-se rente à borda intestinal, e a preparação lavada com solução de Krebs para os experimentos de reatividade vascular.

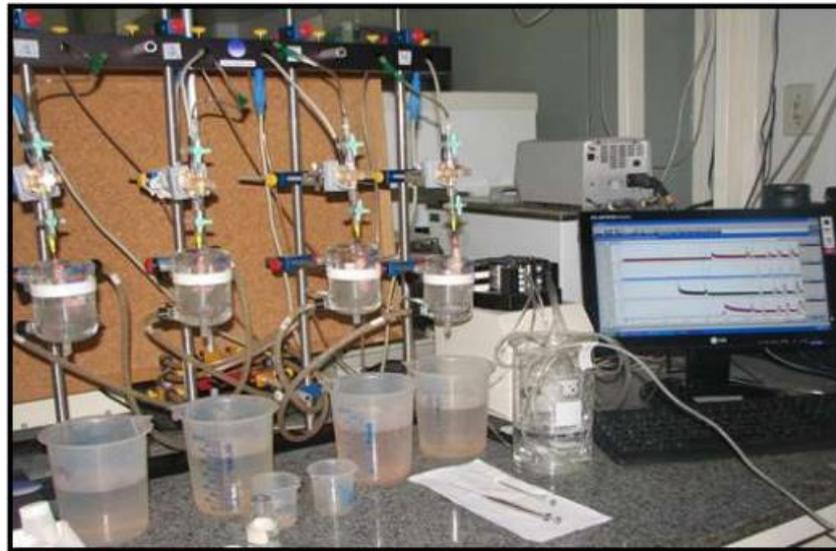
## 2.8. Reatividades do LAM às substâncias vasoativas

Após o isolamento, o LAM foi acoplado a um sistema de perfusão de órgãos. A preparação vascular foi colocada em uma cuba (volume de 10 mL) e constantemente perfundida por meio da cânula inserida na artéria mesentérica superior que foi conectada a uma bomba peristáltica (Model MINIPULS 3, Gilson®, LB, França) (Figura 7). A solução de Krebs, mantida à 37 °C e aerada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> /5% CO<sub>2</sub>) foi infundida à velocidade constante de 4 mL /min e a pressão de perfusão registrada continuamente em um computador através do programa LabChart Reader 7 (SP, Brasil), por meio de um transdutor de pressão (PowerLab 4/30, SA, Austrália). Os experimentos foram precedidos de um período de 30 min de estabilização da preparação. Em seguida, foi testada a viabilidade dos vasos mesentéricos por meio de injeção “in bolus” de 120 µmol de KCl.

A resposta vasoconstritora foi expressa pelo aumento na pressão de perfusão (mm Hg) e a resposta vasodilatadora foi expressa em termos de % de queda da resposta pressora induzida pela norepinefrina (NE). As injeções “in bolus” das substâncias utilizadas nos experimentos foram realizadas por meio de um injetor acoplado ao sistema de perfusão, por meio de

microseringas de 10 e 100  $\mu\text{l}$  (Hamilton). O intervalo entre as injeções foi de aproximadamente 5 min, permitindo sempre o retorno e estabilização da pressão de perfusão aos níveis anteriores e as injeções foram administradas em volumes que variam de 5 a 50  $\mu\text{l}$ .

Figura 7 - Sistema de perfusão de órgãos



#### 2.8.1. Resposta vasoconstritora induzida pela norepinefrina (NE)

Após a obtenção de uma resposta consistente promovida pelo KCl, a resposta pressora induzida pela NE foi avaliada através da injeção de doses crescentes (1-1000 nmol) no LAM na pressão de perfusão basal.

#### 2.8.2. Resposta vasodilatadora induzida pela ACh

Em LAM isolado dos animais, após a lavagem com Krebs e retorno à pressão basal, iniciou-se o período de sensibilização vascular, no qual a NE foi adicionada à solução de perfusão, em concentração suficiente (10-30  $\mu\text{M}$ ) para estabilizar a pressão de perfusão em

torno de 80-100 mm Hg. Após a obtenção de uma resposta pressora induzida pela NE, foi testado então a função endotelial vascular, com injeções de ACh (1-300 pmol), que produz um efeito vasodilatador dependente da liberação de NO pelas células endoteliais.

## 2.9. **Análise de nitrito no plasma**

O NO possui um tempo de vida curto, por isso, a medida da produção do mesmo é mensurada pela formação do nitrito ( $\text{NO}_2$ ), um produto de degradação estável e não volátil. A dosagem de nitrito pode ser realizada pelo método de Griess no qual o princípio de reação é baseado na formação de um azo composto. O nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina formando um composto azo estável de coloração púrpura. 100ul de plasma foi adicionado em cada poço de placa de ELISA. Posteriormente, foi adicionado 50 ul da solução 1 (sulfanilamida 1% em solução de ácido fosfórico a 2,5% (200 mg sulfanilamida + 600  $\mu\text{l}$  de ácido fosfórico + 19,4 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  deslitada)). Após 10 minutos, foi adicionado 50 $\mu\text{l}$  da solução 2 (N-naftil-etilenodiamina 0,1% em solução de ácido fosfórico a 2,5% (20 mg de N-naftil-etilenodiamina + 600  $\mu\text{l}$  de ácido fosfórico + 19,4 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ )) e analisado em comprimento de onda de 540 nm (GREEN *et al.*, 1982; SUN *et al.*, 2003).

## 2.10. **Ensaio Pró-oxidantes**

### 2.10.1. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)

A medida do dano em lipídeos de membrana é utilizada para avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídeos de membrana é determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (por exemplo, malondialdeído-MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBARs) formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microsomas. MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo (DRAPPER H.H & HADLEY M.,1990). Foram utilizados

200 µL de amostra de plasma, diluídos em 600 µL de TCA. As amostras foram centrifugadas por 10 min em 1000 rpm à 4°C. Posteriormente foram separados 300 µL do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionados 300 µL de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (95°C) por trinta minutos para que ocorresse a reação. Deixou-se esfriar por 5 min e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (532 nm).

### 2.10.2. Carbonilação de proteínas

A medida do dano de oxidação em proteínas é determinado nos ataque dos radicais livres aos resíduos de proteínas para gerar produtos com o grupamento carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de carbonil é determinado espectrofotometricamente (370 nm), usando um coeficiente 22.0000 molar<sup>-1</sup> em nmol/mg de proteínas (LEVINE et al., 1990).

Foram utilizados 200µL de amostra de plasma em duplicata para este experimento. Foram então realizadas lavagens com solução de HCL-acetona, TCA 10%, TCA 20%, TCA 30%, e etanol-acetato de etila. Em cada uma das lavagem as amostras foram centrifugadas por 3 min à 14000 rpm, à 4°C, e descartado o sobrenadante. Posteriormente, uma parte da duplicata das amostras foi incubada com 2,4-dinitropheniylhydrazine e a outra parte da duplicata incubada com HCl 2M por 1 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Todas as amostras foram incubadas com guanidina 6M a 60°C por trinta min. As amostras foram centrifugadas, e foi realizada a leitura da absorbância do sobrenadante em espectrofotômetro (370 nm).

## 2.11. **Atividade das enzimas antioxidantes em plasma**

### 2.11.1. Medida da SOD

A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A determinação da sua atividade baseou-se na medida da concentração de adenocromo, formado na oxidação da noradrenalina pelo ânion superóxido (BANNISTER & CALABRESE, 1987). Foram utilizados 10, 20 e 30 µL de cada amostra de plasma em cubetas separadas. As

amostras foram incubadas com 970  $\mu\text{L}$  tampão glicina (3,75 mg/mL de água destilada) e 40  $\mu\text{L}$  de norepinefrina (19 mg/mL de água destilada + 15  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de HCl fumegante). Também foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  da enzima catalase (1,2 mg/ml de água destilada) ao meio para retirar o peróxido de hidrogênio formado pela reação catalisada pela SOD. A concentração de adenocromo foi medida a cada 10 s por 180 s, por espectrofotometria (480 nm).

### 2.11.2. Medida da CAT

A CAT é uma hemoproteína que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio, formando oxigênio molecular e água. A atividade foi avaliada através do consumo de peróxido de hidrogênio pela reação. Foram utilizados 20  $\mu\text{L}$  de amostra de plasma em cubetas de quartzo. As amostras foram incubadas com 2 mL de tampão fosfato e peróxido de hidrogênio (0.16%). A concentração de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi avaliada durante sessenta segundos por espectrofotometria (240 nm) em um intervalo de trinta segundos (AEBI, 1984).

### 2.11.3. Medida da GPx

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para  $\text{H}_2\text{O}$  e álcool, usando a GSH como doador de elétrons. Ela está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 340 nm. Foram utilizados 200  $\mu\text{L}$  de amostra de plasma em cubetas. As amostras foram incubadas com 1800  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato, GSH (2 mM), glutathione redutase (GR) (0.11 mg/mL) e azida sódica (0,065 mg/mL) durante 10 min. Após o tempo de incubação, NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas as leituras e um intervalo de 180 s. Posteriormente,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por 240 s. O decaimento da NADPH foi determinado por espectrofotometria (340 nm) (FLOHÉ L. & GUNZLER W.A., 1984).

## 2.12. Análise morfológica

### 2.12.1. Aorta

A aorta torácica dos ratos foi isolada de todos os grupos experimentais, fixada em paraformaldeído 4%, pH 7,4, e incluída em bloco de paraplast plus (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). Fatias de 3  $\mu\text{m}$  foram coradas com hematoxilina e eosina, possibilitando a análise do espessura entre a camada íntima-média da aorta (EIMA-região delimitada entre as lâminas elásticas interna e externa), e da área do lúmen. As imagens digitais foram capturadas (formato JPEG, colorida 36-bit, 1360-1024 pixels, objetiva de 4x para o lúmen e 20x para camada íntima-média) com uma câmera LC Evolution e um microscópio de luz Olympus BX51 e as análises foram realizadas com o programa Image-Pro Plus versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

## 2.13. Análise Estatística

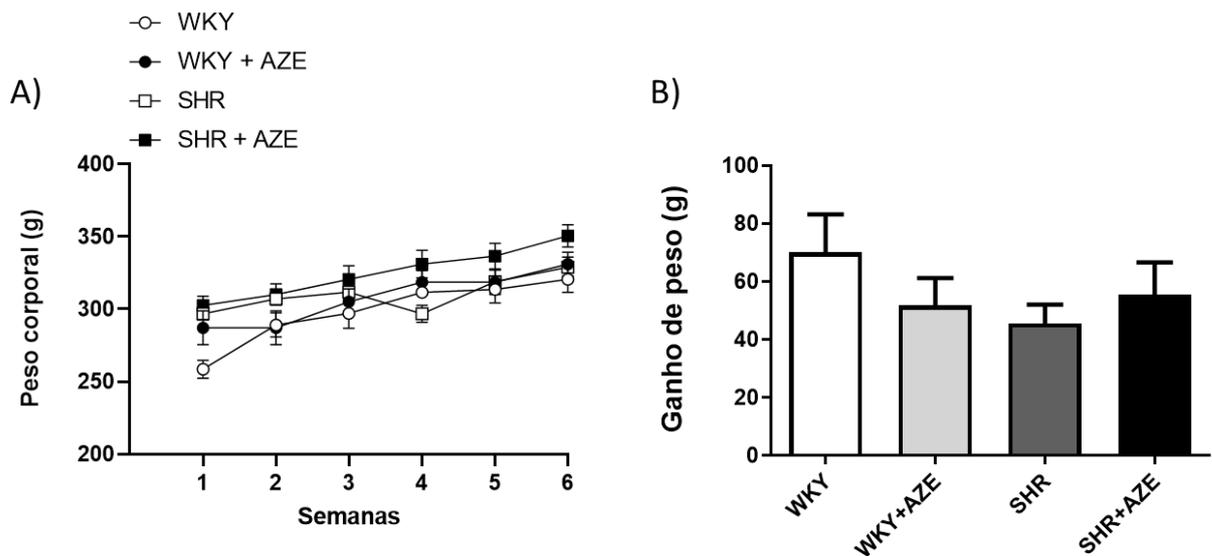
Os resultados em gráfico de barra foram expressos como média acompanhada do erro padrão da média ( $X \pm \text{e.p.m}$ ) e foram analisados por meio de “One-way analysis of variance” (ANOVA), com posterior utilização do teste de Tukey. E os gráficos de linha foram expressos como média acompanhada do erro padrão da média ( $X \pm \text{e.p.m}$ ) e foram analisados por meio de “Two-way analysis of variance” (ANOVA), com posterior utilização do teste de Tukey.

### 3. RESULTADO

#### 3.1. Análise do ganho de peso no tratamento

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto ao peso e ao ganho de peso durante o tratamento (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Peso corporal (A) e ganho de peso (B) de animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10 animais por grupo

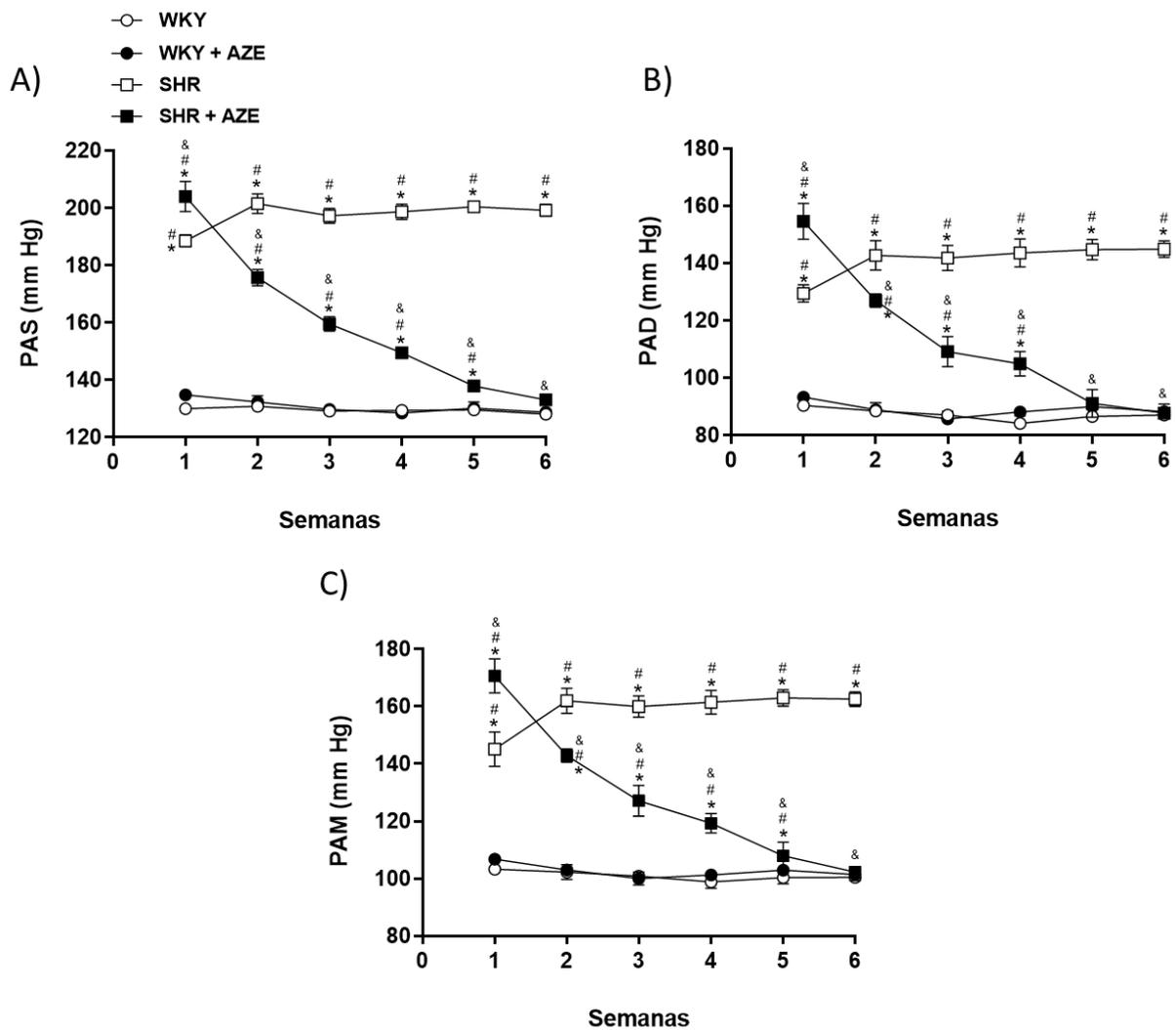


#### 3.2. Medida da PA

As pressões arteriais sistólica, diastólica e média apresentaram-se 39% maiores ( $p < 0.05$ ) nos animais do grupo SHR, e 63% maiores no grupo SHR+AZE antes de iniciar o tratamento, quando comparado aos controles. A PA foi mantida elevada no grupo SHR durante todo o período experimental. Além disso, as pressões foram 37% menores ( $p < 0,05$ ) no grupo SHR+AZE quando comparado ao grupo SHR ao final do experimento, chegando a atingir níveis normotensos. Deste modo, o tratamento com AZE foi capaz de reduzir os níveis de

pressão nos ratos SHR. O tratamento não alterou os níveis de pressões arteriais em condições normotensas (Gráfico 2).

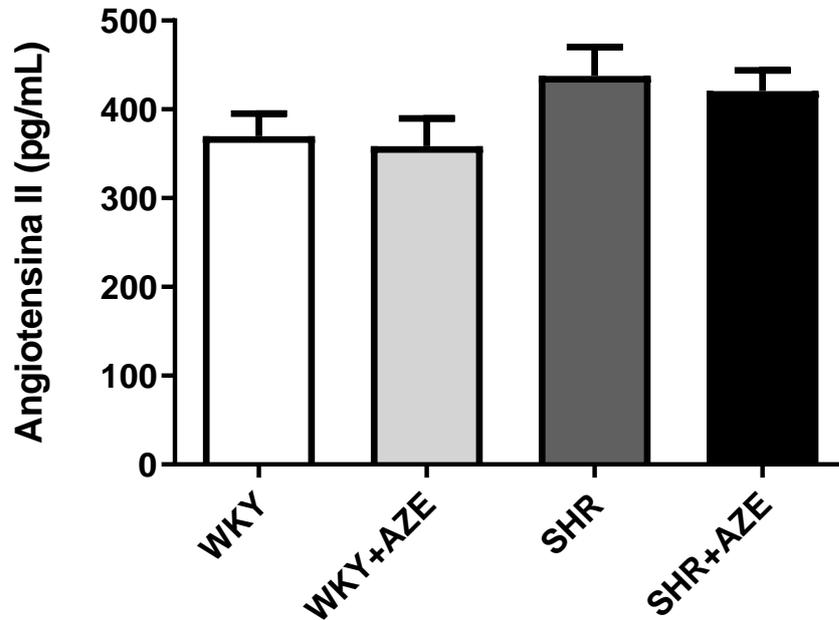
Gráfico 2 - Pressão arterial sistólica (A), diastólica (B) e média (C) nos animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10 animais por grupo.  $P < 0,05$ : \* vs WKY; # vs WKY+AZE; & vs SHR



### 3.3. Análise da Angiotensina II circulante

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto aos níveis plasmáticos de Angiotensina II (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Níveis de Ang II no plasma de animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10 animais por grupo

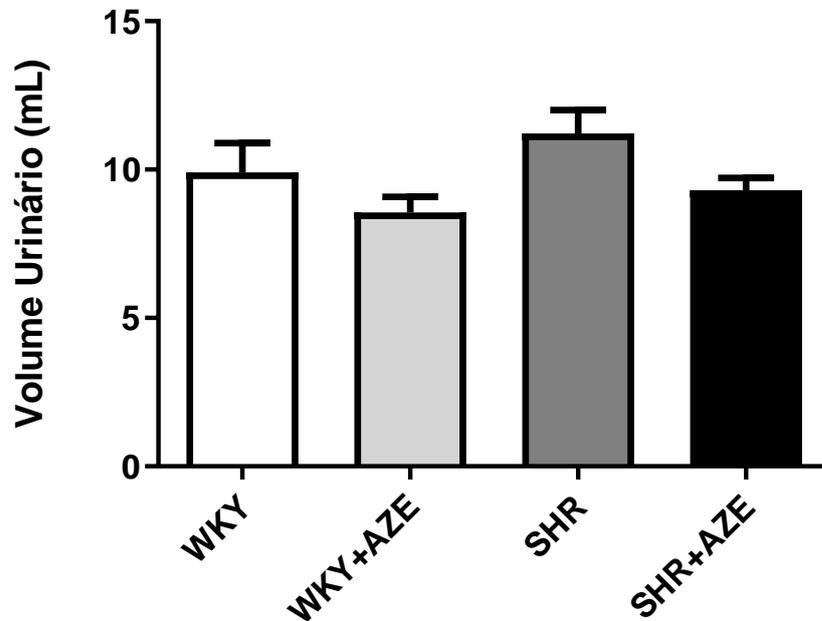


#### 3.4. Análises bioquímicas no plasma e na urina de 24h do final do tratamento

##### 3.4.1. Volume Urinário

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto ao volume total urinário de 24h (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Volume urinário de 24h de animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10 animais por grupo



### 3.4.2. Excreção de uréia no plasma e na urina.

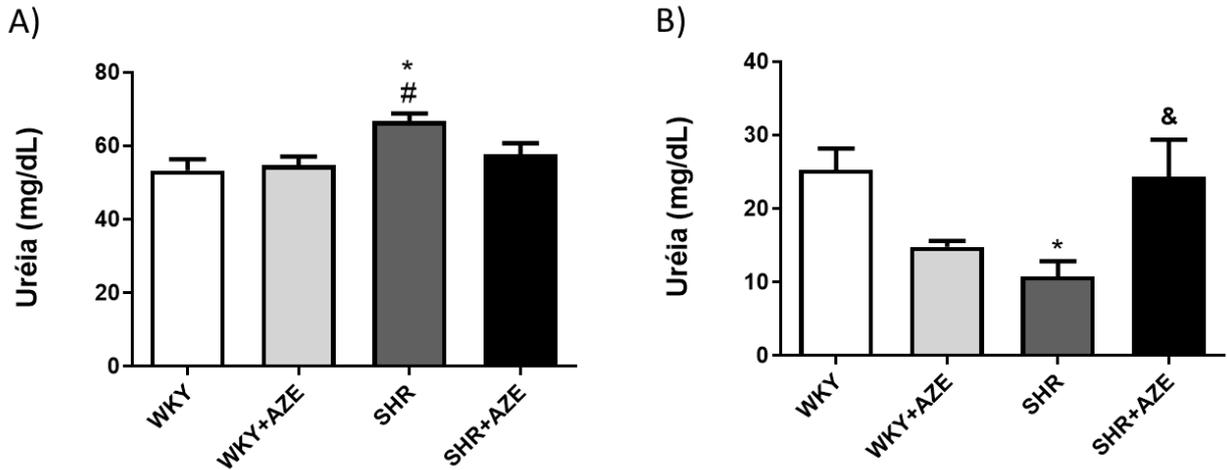
Os níveis plasmáticos de ureia (Gráfico 5A) apresentaram-se 22% maiores ( $p < 0,05$ ) no grupo SHR em comparação aos grupos controles.

Com relação aos níveis de excreção de uréia na urina (Gráfico 5B), os resultados mostraram níveis 60% menores ( $p < 0,05$ ) no grupo SHR em comparação ao grupo WKY. O tratamento com o AZE aumentou em 140% ( $p < 0,05$ ) a excreção de ureia na urina de animais do grupo SHR+AZE em relação ao grupo SHR não tratado, sem levar a alterações estatisticamente significativas nos níveis plasmáticos.

**Gráfico 5:** Níveis de uréia no plasma (A) e na urina (B) dos animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10 animais por grupo.  $P < 0,05$ : \* vs WKY; # vs WKY+AZE; & vs SHR.

**Gráfico 5:** Níveis de uréia no plasma (A) e na urina (B) dos animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10 animais por grupo.  $P < 0,05$ : \* vs WKY; # vs WKY+AZE; & vs SHR.

Gráfico 5 - Níveis de uréia no plasma (A) e na urina (B) dos animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10 animais por grupo. P<0,05: \* vs WKY; # vs WKY+AZE; & vs SHR

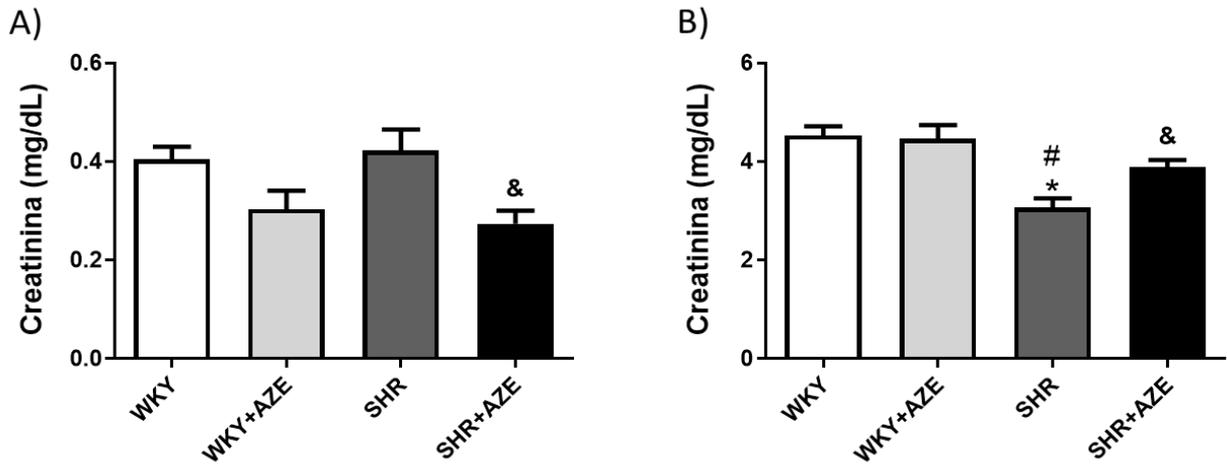


### 3.4.3. Excreção de creatinina no plasma e na urina

Não foram observadas diferenças significativas quanto aos níveis de creatinina no plasma (Gráfico 6A) entre os grupos controle e os grupos hipertensos. O tratamento com o AZE, entretanto, diminuiu em 36% esses níveis no grupo SHR+AZE, apresentando valores menores ( $p<0,05$ ) quando comparado ao grupo SHR.

A excreção de creatinina na urina (Gráfico 6B) foi 33% menor ( $p<0,05$ ) no grupo SHR em comparação aos grupos controles. O tratamento com o AZE foi capaz de aumentar ( $p<0,05$ ) em 28% esses níveis no grupo SHR+AZE, apresentando valores estatisticamente iguais aos grupos WKY e WKY+AZE.

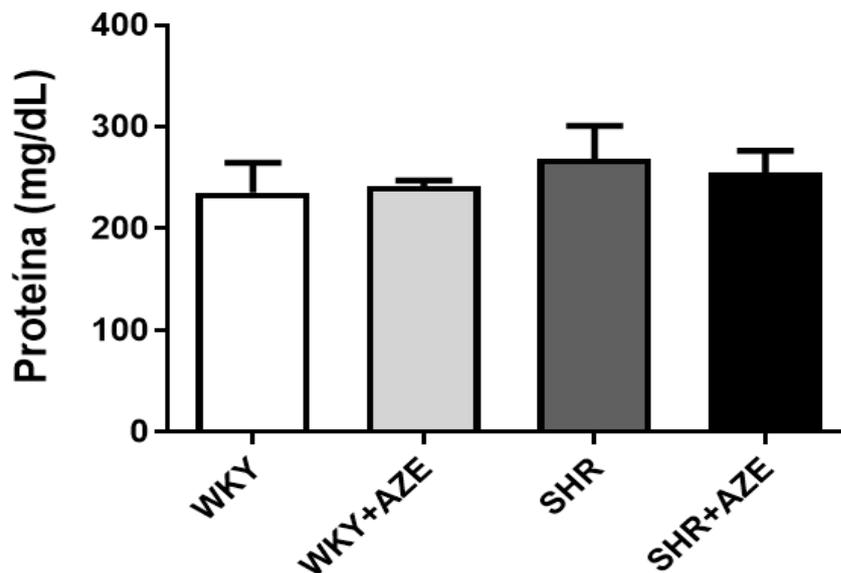
Gráfico 6 - Níveis de creatinina no plasma (A) e na urina (B) dos animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10 animais por grupo.  $P < 0,05$ : \* vs WKY; # vs WKY+AZE; & vs SHR



#### 3.4.4. Proteínas totais na urina

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto à excreção de proteínas totais na urina (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Níveis de proteínas totais na urina dos animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10 animais por grupo

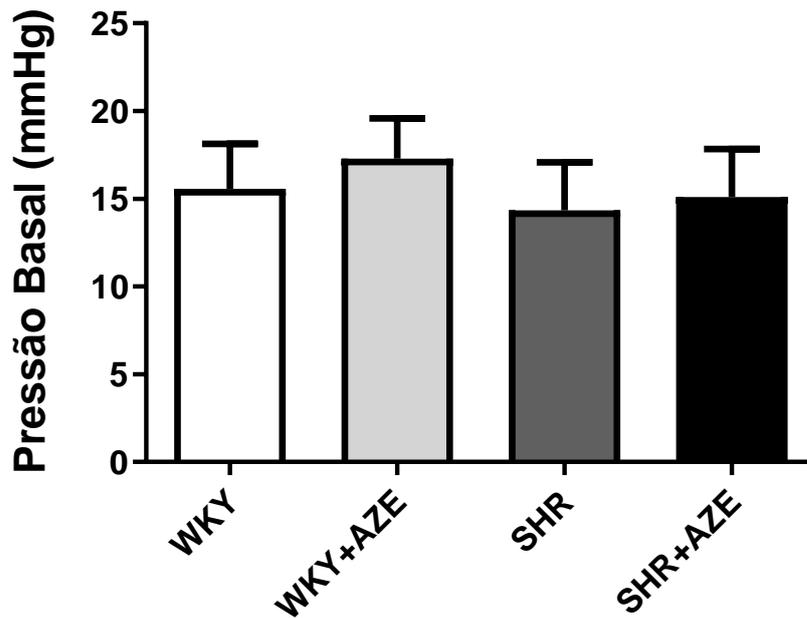


### 3.5. Reatividade do LAM às substâncias vasoativas

#### 3.5.1. Pressão Basal

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto ao nível de pressão basal no LAM dos diferentes grupos experimentais antes de iniciar os experimentos de reatividade vascular (Gráfico 8).

Gráfico 8 -Nível de pressão basal do LAM de animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10 animais por grupo

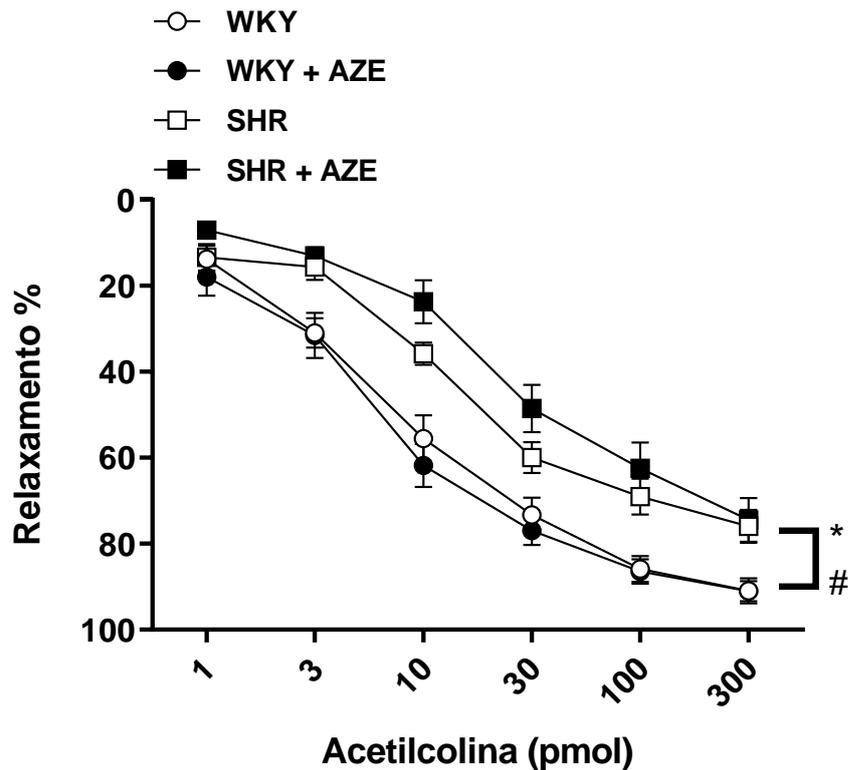


#### 3.5.2. Resposta vasodilatadora induzida pela Ach

A ACh produziu uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi 19% menor ( $p < 0,05$ ) em LAM de animais dos grupos SHR e SHR+AZE quando comparado aos grupos

WKY e WKY+AZE. Sendo assim, o tratamento com o AZE não foi capaz de influenciar a resposta vasodilatadora da ACh, que promove vasodilatação dependente da liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Efeito vasodilatador induzido pela ACh em LAM de animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10 animais por grupo. P<0,05

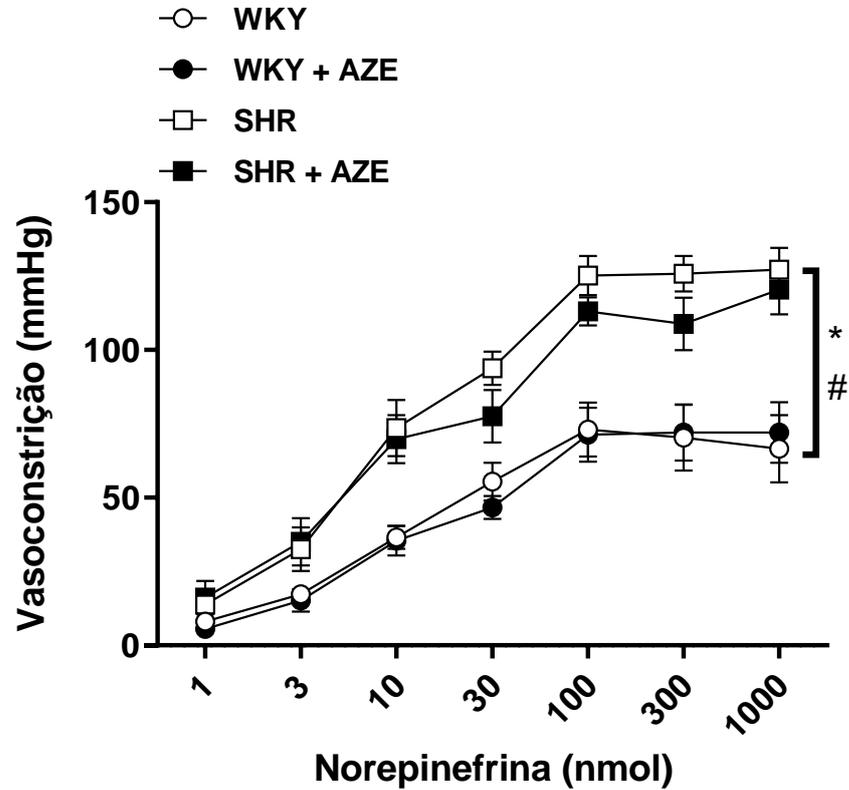


: \* vs WKY; # vs WKY+AZE.

### 3.5.3. Resposta vasoconstritora induzida pela norepinefrina (NE)

A Norepinefrina produziu uma resposta vasoconstritora em LAM de todos os grupos experimentais. Essa resposta foi significativamente 76% maior (p<0,05) nos grupos SHR e SHR+AZE quando comparado aos grupos WKY e WKY+AZE. Deste modo, o tratamento com o AZE não interferiu na resposta vasoconstritora da norepinefrina (Gráfico 10).

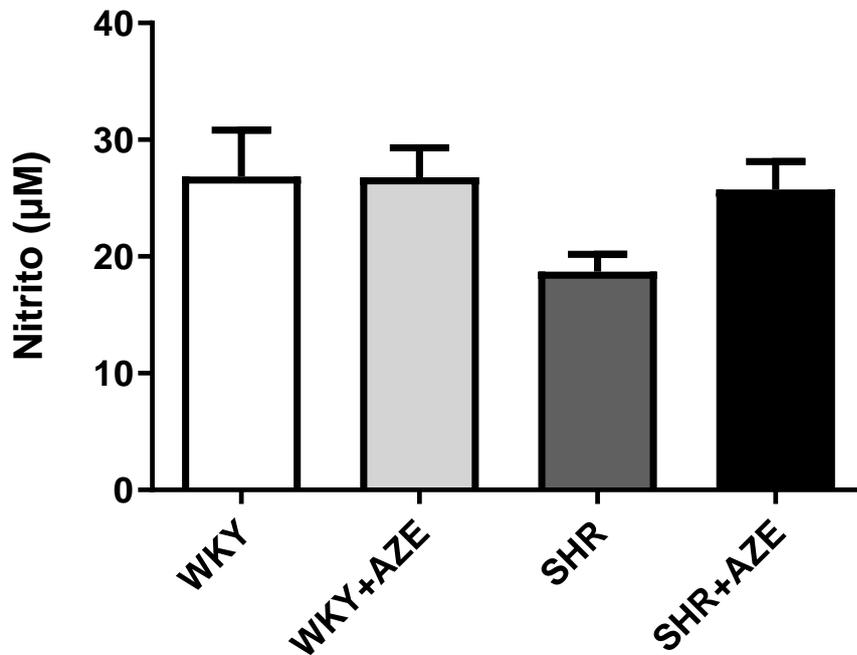
Gráfico 10 - Efeito vasoconstritor induzido pela norepinefrina em LAM de animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10 animais por grupo. P<0,05: \* vs WKY; # vs WKY+AZE



### 3.6. Medida de Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ )

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto aos níveis de nitrito no plasma (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Níveis de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) em amostra de plasma de animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10 animais por grupo



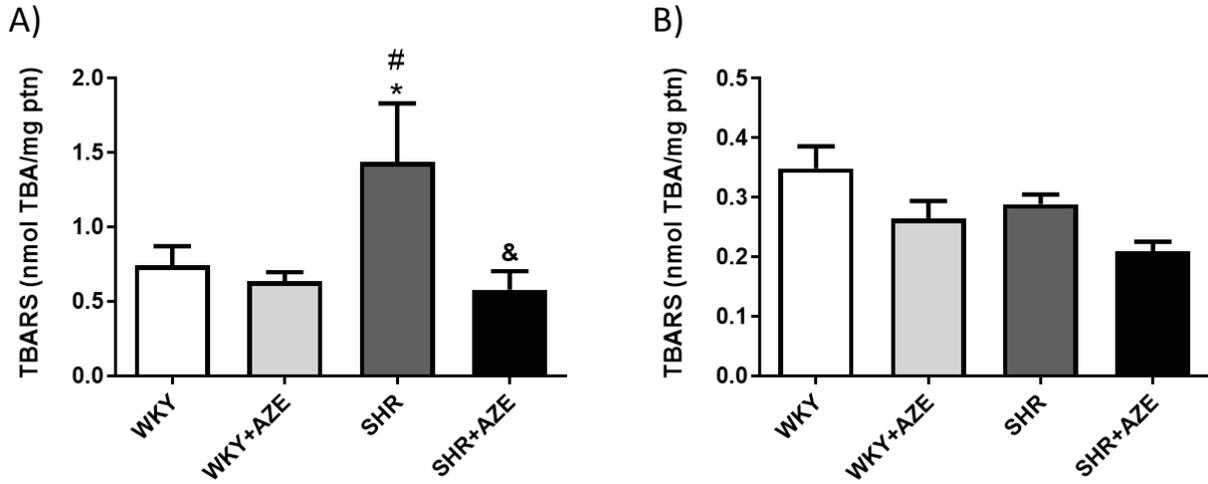
### 3.7. Dano oxidativo

#### 3.7.1. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na urina e no plasma

Os níveis de TBARS na urina (Gráfico 10A) foram 104% maiores ( $p < 0,05$ ) no grupo SHR em comparação aos grupos controles. O tratamento com a AZE foi capaz de diminuir ( $p < 0,05$ ) esses níveis no grupo SHR+AZE em 64%, apresentando valores comparáveis aos grupos WKY e WKY+AZE.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto aos níveis de TBARS no plasma (Gráfico 10B).

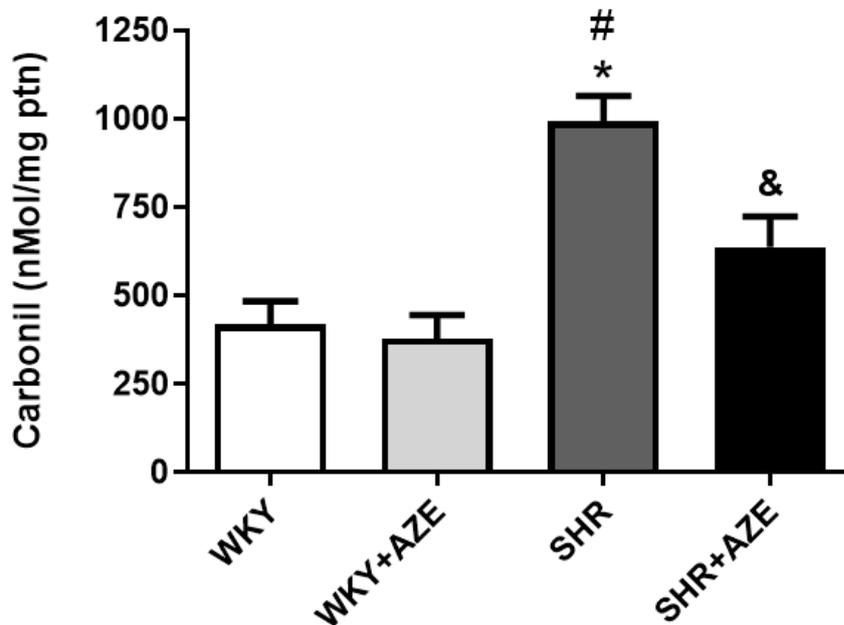
Gráfico 12 - Níveis de TBARS na urina (A) e no plasma (B) dos animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10 animais por grupo. \* vs WKY; # vs WKY+AZE; & vs SHR



### 3.7.2. Carbonilação de proteínas

Os níveis plasmáticos de carbonil foram 148% maiores ( $p < 0,05$ ) no grupo SHR em comparação aos grupos controles. O tratamento com o AZE foi capaz de diminuir ( $p < 0,05$ ) esses níveis no grupo SHR+AZE em 36%, apresentando valores estatisticamente iguais aos grupos WKY e WKY+AZE (Gráfico 11).

Gráfico 13 - Níveis plasmáticos de carbonil no plasma dos animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 8 animais por grupo. \* vs WKY; # vs WKY+AZE; & vs SHR

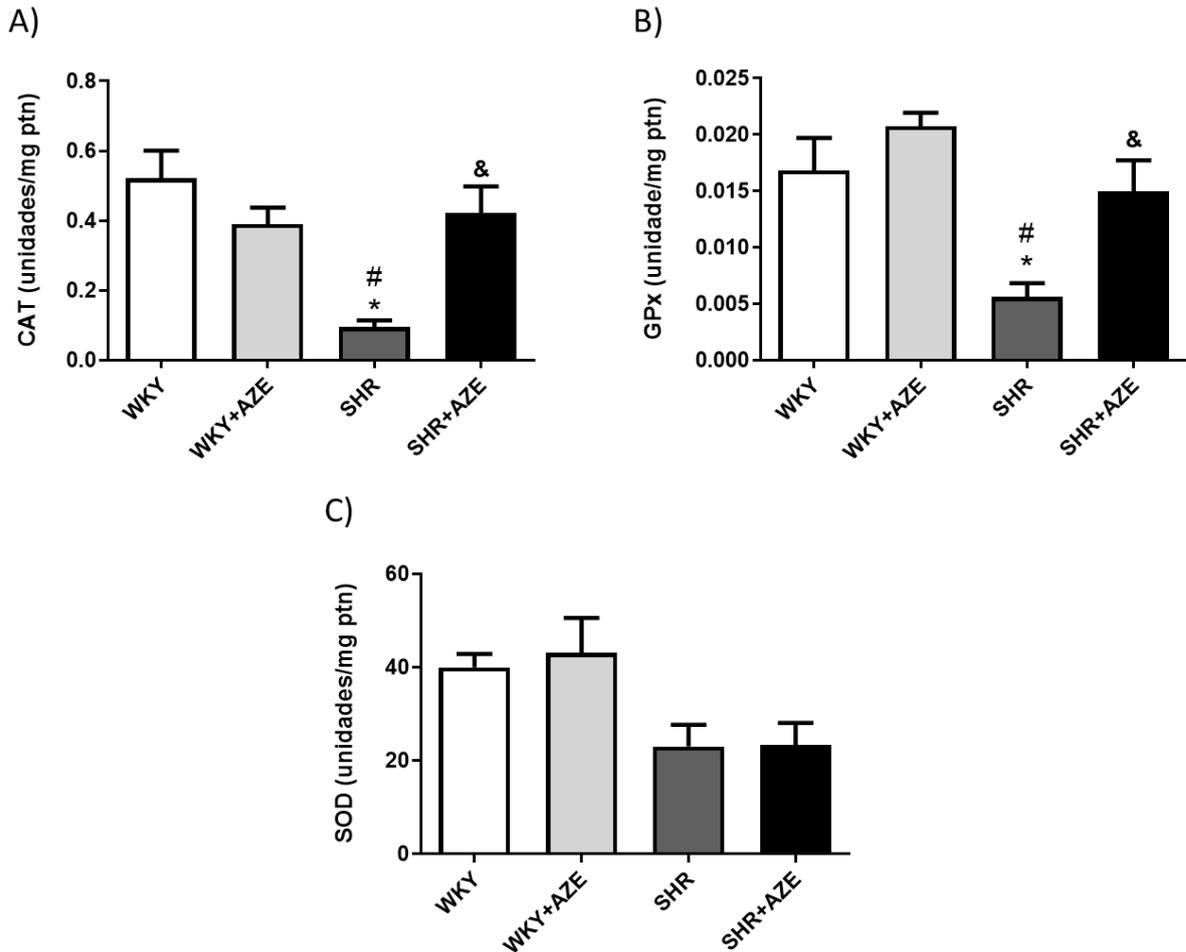


### 3.8. Análise da atividade das enzimas SOD, CAT e GPX no plasma

Foi observado um nível de atividade menor ( $p < 0,05$ ) das enzimas CAT e GPX, 80% e 72%, respectivamente, no plasma de animais do grupo SHR quando comparado aos grupos controles WKY e WKY+AZE. O tratamento com o AZE foi capaz de aumentar ( $p < 0,05$ ) a atividade antioxidante da CAT em 344%, e a atividade da GPx em 100% no grupo SHR+AZE em comparação ao grupo SHR, alcançando níveis estatisticamente iguais aos grupos controle WKY e WKY+AZE (Gráfico 14A e B).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto à atividade da SOD (Gráfico 14C).

Gráfico 14 - Atividade das enzimas antioxidantes CAT (A), GPX (B) e SOD (C) no plasma de animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 6 animais por grupo.  $P < 0,05$ : \* vs WKY; # vs WKY+AZE; & vs SHR



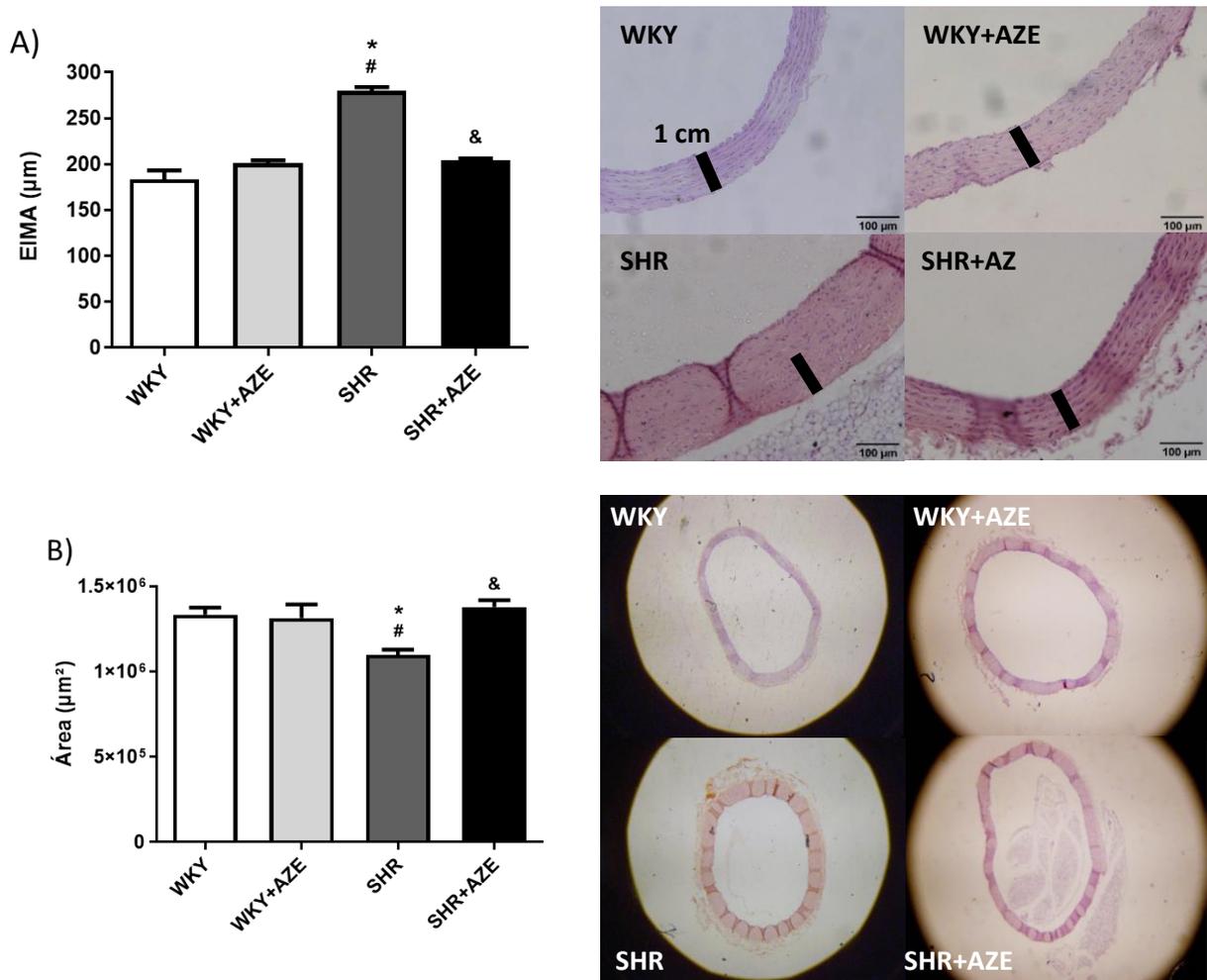
### 3.9. Análise morfológica da aorta

Foi observado em anéis da artéria aorta de animais do grupo SHR um aumento ( $p < 0,05$ ) de 47% da EIMA quando comparado aos grupos controle WKY e WKY+AZE. O tratamento com o AZE foi capaz de reverter esse quadro, mostrando em anéis de aorta do grupo SHR+AZE uma diminuição ( $p < 0,05$ ) de 27% da EIMA, sendo comparável estatisticamente aos grupos WKY e WKY+AZE (Gráfico 13A).

Foi observado também uma área 17% menor ( $p < 0,05$ ) do lúmen arterial em animais do grupo SHR quando comparado aos grupos WKY e WKY+AZE. O tratamento com o AZE também foi capaz de reverter esse quadro, mostrando em anéis de aorta do grupo SHR+AZE

um aumento ( $p < 0,05$ ) de 26% do lúmen, sendo comparável aos grupos WKY e WKY+AZE (Gráfico 13B).

Gráfico 15 - Análise histológica da aorta. Espessura da camada media da aorta (A) e área do lúmen arterial (B) nos animais dos grupos WKY, WKY+AZE, SHR e SHR+AZE. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=6$  animais por grupo.  $P < 0,05$ : \* vs WKY; # vs WKY+AZE; & vs SHR. (Barra de escala (A): 100 micrômetros, aumento 20x; (B): aumento 4x).



#### 4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos os efeitos do tratamento crônico com o extrato hidroalcólico de folhas de Colônia (AZE) sobre as alterações cardiovasculares em ratos espontaneamente hipertensos, um modelo experimental que mimetiza as principais características da hipertensão essencial humana. Ainda, avaliamos possíveis mecanismos envolvidos no efeito anti-hipertensivo do extrato.

O modelo SHR tem se mostrado de grande importância para o entendimento da fisiopatologia da HAS, mimetizando as condições da hipertensão essencial humana. Apesar de ter origem genética, e complexa, estudos já mostraram que assim como em outras doenças cardiovasculares, há uma participação chave do SRA na fisiopatologia da hipertensão em ratos SHR, desencadeando diversas alterações cardiovasculares características da hipertensão. (PETER G. ANDERSON et al., p784, 2000; SUGANO M. et al., 2000).

Nosso estudo então demonstrou o desenvolvimento de alterações cardiovasculares em ratos SHR, caracterizado pelo aumento nos níveis de PA, disfunção endotelial, indícios de alterações na função renal, estresse oxidativo, e alterações vasculares demonstrada pela diminuição do lúmen arterial como consequência de um aumento da espessura da camada íntima-média da aorta, corroborando assim com dados da literatura (ALIEV O.L. et al., 2015 ; GLUAIS P. et al., 2005; ZHANG J. et al., 2016; KOBAYASHI N. et al., 2005; JIN L. et al., 2017).

Dados do presente estudo revelaram pela primeira vez que animais SHR adultos, com hipertensão estabelecida, quando tratados cronicamente com o extrato hidroalcólico de folhas de Colônia, apresentam expressiva redução da PA, demonstrando seu efeito anti-hipertensivo neste modelo. Estudos químicos já mostraram que as folhas de *Alpinia zerumbet* são ricas em flavonoides, uma classe de polifenóis, como: [(+)-catequina, (+)-epicatequina, rutina, quercetina, kaempferol 3-O-rutinosídeo, kaempferol 3-O-glucoronídeo, kaempferol], que estão ligados direta ou indiretamente aos efeitos antioxidante, anti-hipertensivo, ansiolítico, vasodilatador, dentre outros, presentes na folha. (MPALATINOS M.A. et al., 1998).

Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa também mostraram o efeito anti-hipertensivo desse extrato em modelo DOCA-sal, atrelado à isso, mostrou também seu efeito vasodilatador, o qual é dependente da via NO-GMPc e tem a participação de receptores B2 da BK, mostrando assim o potencial do extrato hidroalcólico de folhas de Colônia como anti-hipertensivo (DE MOURA R.S., 2005).

O presente estudo também mostrou um aumento da resposta vasoconstritora induzida por NE, e também uma redução da resposta vasodilatadora induzida por ACh, um agente que promove vasodilatação dependente de endotélio, em LAM isolado de ratos SHR, comprovando que neste modelo é observada uma disfunção endotelial. Nossos resultados corroboram os dados de KONG X *et al.*, (2015), que observaram uma menor resposta vasodilatadora induzida pela ACh em anéis de aorta de ratos SHR comparados a ratos normotensos. Essa menor resposta vasodilatadora estaria ligada diretamente à disfunção endotelial presente em ratos SHR, causado principalmente pela queda da biodisponibilidade de NO, e por uma menor ativação da eNOS.

O NO, por sua vez, é metabolizado no organismo ao interagir com o oxigênio molecular e moléculas de água, formando os produtos nitrito e nitrato, desta forma, a menor concentração de NO leva então a níveis menores de nitrito circulante comprovando assim a presença de uma disfunção endotelial. Nosso estudo não mostrou diferença significativa de nitrito no plasma de ratos SHR quando comparados aos controles, resultado contrario ao mostrado por GRATON M.E. *et al.*, (2019). Entretanto, a análise do mesmo diretamente no LAM, poderia nos fornecer uma relação melhor entre o NO e a disfunção endotelial presente neste modelo.

Em nosso estudo, os resultados mostraram que o tratamento com o extrato de folhas da Colônia não foi capaz de melhorar significativamente tanto a disfunção vascular, como os níveis plasmáticos de nitrito no plasma observada neste modelo experimental, mostrando que os mecanismos associados ao efeito anti-hipertensivo das folhas da colônia não estão relacionados a uma melhora desses parâmetros, diferente do que ocorre com o extrato hidroalcolico do caroço do açaí (COSTA C.A. *et al.*, 2012), também estudado pelo nosso grupo.

Estudos experimentais e clínicos sugerem um papel relevante da Ang II na lesão de órgãos induzida por hipertensão, por ser um potente vasoconstritor, pró-oxidativo, pró-inflamatório, dentre outros. Assim como, mostram um papel fundamental na sustentabilidade elevada da PA em ratos SHR, principalmente pela hiperativação de receptores AT1 (CASTRO-MORENO P. *et al.*, 2012; SILVA S.D. *et al.*, 2017). Nosso estudo não mostrou diferença significativa nos níveis de Ang II circulantes em ratos SHR quando comparados aos WKY. NAITO Y. *et al.*, 2009 observou o mesmo padrão, relacionando essa não diferença a um padrão encontrado no modelo SHR dependendo da idade do animal. Não foi observado também diferença significativa quanto ao tratamento com o extrato nesse modelo, mostrando que apesar da melhora da PA, o mecanismo relacionado não está ligado à redução dos níveis da Ang II circulante, podendo estar ligado à uma menor ativação tecidual de receptores AT1 ou uma

maior ativação de receptores AT<sub>2</sub>, porém, são necessários mais estudos relacionados a esse parâmetro.

Com relação ao ganho de peso, os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos, entretanto, estudos mostraram o uso do composto DDK presente na *Alpinia zerumbet* em adipócitos, com aumento de AMP cíclico (cAMP) intracelular, liberação de glicerol, inibindo acúmulo de lipídios e reduzindo o teor de triglicerídeos (TU P.T. & TAWATA S., 2014). Entretanto, o SHR não é um modelo adequado para a avaliação dos possíveis efeitos metabólicos do extrato, podendo assim explicar a ausência de efeito sobre o peso neste modelo.

A utilização da *Alpinia zerumbet* na medicina popular através de chás mostrou ser eficaz em diversos aspectos, dentre eles, seu uso como diurético. Laranja S.M. et al., (1992), em estudo clínico do chá feito a partir da planta, administrou o chá em 4 períodos com intervalos de 2h por dose, e constatou um aumento da diurese com a administração de chá feito a partir da planta. Entretanto, esse aumento só foi encontrado em um dos quatro períodos de administração do chá, não constatando assim uma ação diurética efetiva. No presente estudo, não foi observada diferença significativa entre os grupos com relação à diurese de 24h, corroborando com resultados anteriores do nosso grupo (dados não publicados), onde não foram encontradas diferenças com relação ao aumento da diurese na administração aguda do extrato hidroalcoólico de folhas de *Alpinia zerumbet* em ratos Wistar, sendo necessário assim mais estudos para a comprovação da eficácia diurética do extrato.

Nosso estudo mostrou também um aumento dos níveis plasmáticos de uréia e uma diminuição da excreção de uréia e creatinina na urina de ratos SHR em comparação aos grupos controles, corroborando com os dados de LUO W.M. et al., 2015, mostrando assim um indicio do início da disfunção renal presente no modelo SHR. O grupo SHR tratado mostrou um aumento significativo dos níveis de excreção de uréia e creatinina na urina, mostrando assim um possível efeito renoprotetor relacionado ao extrato hidroalcoólico de folhas de *Alpinia zerumbet*.

Com relação à proteinúria, não foram encontradas diferenças entre os grupos, entretanto, GAN Z. et al., 2018 mostrou um estudo relacionado à função renal em ratos SHR em diferentes idades, mostrando que ratos SHR com 12 semanas de idade não possuem um quadro de proteinúria, ao contrario de ratos com 20 semanas que já demonstram um quadro acentuado de proteinúria, constatando assim a evolução da disfunção renal no modelo SHR.

A relação entre estresse oxidativo e hipertensão tem sido demonstrada em diferentes modelos de hipertensão (GOÇMEN A.Y. et al., 2014; TANITO M. et al., 2004; GHOSH M. et

al.,2004; DOBRIAN A.D. et al., 2001). PAREDES M.D. et al. (2018) e CONDEZO-HOYOS L. et al. (2012), por exemplo, mostraram em seus estudos danos em lipídeos de membrana no modelo SHR, através de níveis aumentados de TBARs na urina, plasma e rim. CONDEZO-HOYOS L. et al. (2012) mostrou ainda um quadro de dano oxidativo em proteínas, através de níveis aumentados de carbonilação de proteína em ratos SHR comparados à ratos WKY, mostrando assim a presença de um quadro de estresse oxidativo no modelo SHR. Em nosso estudo, não observamos diferença em danos de lipídeos de membrana no plasma, entretanto, foram observados níveis aumentados de TBARs na urina, assim como, níveis aumentados de carbonilação de proteínas no plasma de ratos SHR em comparação com os controles, corroborando com os dados da literatura.

Nosso estudo demonstrou também que o tratamento com o extrato hidroalcolico de folhas de *Alpinia zerumbet* foi capaz de diminuir tanto os danos de lipídeos de membrana na urina quanto os níveis de dano em proteínas em ratos SHR, mostrando assim o efeito antioxidante da planta já comprovado na literatura por estudos utilizando o óleo essencial extraído da colônia (SHEN X.C. et al., 2012).

Esse quadro de estresse oxidativo presente no modelo SHR está relacionado principalmente à uma menor atividade das enzimas antioxidantes. Estudos de JAKOVLJEVIC B. et al. (2018), LEE S.K. et al. (2010) e YANG Y.M. et al. (2018) mostraram uma menor atividade das enzimas CAT, GPx, e SOD, respectivamente, em ratos SHR, enzimas relacionadas à defesa antioxidante endógena, corroborando com dados do estudo apresentado. Entretanto, os mecanismos relacionados à diminuição da atividade dessas enzimas no modelo SHR ainda é incerto. LEE S.K. et al. (2010) em seu estudo relatou a diferença na atividade da GPx em diversos órgãos e diferentes idades dos animais deste modelo, onde foi encontrada uma menor atividade da GPx no coração e eritrócitos de SHRs com idade entre 32 e 34 semanas de idade, e um aumento da atividade da GPx no coração mas menor no fígado de SHRs com 18 semanas de idade, e nenhuma diferença com relação a atividade da GPx no cérebro de SHRs com 11 à 15 semanas de idade, dados comparados com ratos WKY da mesma idade.

Nosso estudo mostrou que o tratamento com o extrato hidroalcolico de folhas de *Alpinia zerumbet* foi capaz de melhorar a atividade da CAT e GPx, contribuindo para o efeito antioxidante do extrato. Mostramos assim pela primeira vez o efeito antioxidante relacionado à uma melhora da atividade antioxidante das enzimas CAT e GPx no modelo SHR. Entretanto, não observamos uma melhora na atividade da SOD nesse modelo pelo extrato hidroalcolico de folhas de colônia.

Nosso trabalho mostrou também o desenvolvimento de hipertrofia na parede arterial na aorta em ratos SHR, caracterizado pelo aumento da espessura da camada íntima-média, juntamente com a diminuição do diâmetro do lúmen arterial, corroborando com os dados de GU Q. et al. (2014) e PAREDES M.D. et al. (2018). O tratamento com o extrato também reduziu a espessura da camada média da aorta em animais SHR, conseqüentemente aumentando o diâmetro do lúmen arterial, mostrando um efeito sobre a estrutura deste vaso, o que pode contribuir para o efeito benéfico do tratamento, podendo então, estar associado direta ou indiretamente aos efeitos anti-hipertensivo e antioxidante mostrado pelo extrato hidroalcolico da colônia neste modelo. Essa reversão do remodelamento presente no modelo SHR gerado pelo tratamento pode estar, ainda, associada a uma modulação do SRA local, levando à uma menor ativação dos receptores AT1, diminuindo a deposição de colágeno tipo I, fibronectina e recrutamento celular (ZHOU W. et al., 2014; ROMERO-NAVA R. et al., 2016). Entretanto, são necessários mais estudos para entender o mecanismo associado a essa melhora do remodelamento arterial.

## CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento crônico com o extrato hidroalcolólico de folhas de Colônia (*Alpinia zerumbet*) reduz a PA e a hipertrofia da artéria aorta, assim como, reduz o quadro de estresse oxidativo, e mostra um potencial efeito renoprotetor, em ratos espontaneamente hipertensos, um modelo experimental que mimetiza as principais características da hipertensão essencial em humanos. Estes efeitos benéficos podem estar relacionados ao seu efeito vasodilatador, mostrado previamente pelo nosso grupo de pesquisa, e ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes. No entanto, ainda são necessários estudos para esclarecer os mecanismos envolvidos neste efeito benéfico induzido pelo extrato.

## REFERÊNCIAS

- ADEHIN, Ayorinde; BOLAJI, Oluseye Oladotun. Distribution of xanthine oxidase activity in a Nigerian population. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, n. 6, p. 687–690, 2015.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- ALI, Quaisar; HUSSAIN, Tahir. AT2 receptor: Its role in obesity associated hypertension. **International Journal of Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 1, n. 1, p. 15–19, 2012.
- ALIEV, O. I.; ANISHCHENKO, A. M.; SIDEKHMENOVA, A. V.; *et al.* Quantitative Indexes of Leukocytes in Spontaneously Hypertensive Rats During Various Periods of Arterial Hypertension Development. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 159, n. 6, p. 715–717, 2015.
- ANDERSON, Peter G.; BISHOP, Sanford P.; PETERSON, J. Thomas. Cardiovascular Research. *In: The Laboratory Rat*. [s.l.]: Elsevier, 2006, p. 773–802.
- BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 32, p. 279–312, 1987.
- BERTHON, Nathalie; LAURANT, Pascal; HAYOZ, Daniel; *et al.* Magnesium supplementation and deoxycorticosterone acetate--salt hypertension: effect on arterial mechanical properties and on activity of endothelin-1. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 80, n. 6, p. 553–561, 2002.
- BOUAYED, Jaouad; BOHN, Torsten. Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 4, p. 228–237, 2010.
- BOULANGER, Chantal M. Endothelium. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 36, n. 4, p. e26–e31, 2016.
- BRESCIANI, Guilherme; DA CRUZ, Ivana Beatrice Mânica; GONZÁLEZ-GALLEGO, Javier. Manganese Superoxide Dismutase and Oxidative Stress Modulation. *In: Advances in Clinical Chemistry*. [s.l.]: Elsevier, 2015, v. 68, p. 87–130.
- BRIET, Marie; SCHIFFRIN, Ernesto L. Treatment of Arterial Remodeling in Essential Hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 15, n. 1, p. 3–9, 2013.
- BRITO, R.; CASTILLO, G.; GONZÁLEZ, J.; *et al.* Oxidative Stress in Hypertension: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 123, n. 06, p. 325–335, 2015.
- BROWN, Isola A.M.; DIEDERICH, Lukas; GOOD, Miranda E.; *et al.* Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 38, n. 9, p. 1969–1985, 2018.

CAREY, Robert M. Update on angiotensin AT<sub>2</sub> receptors: **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, p. 1, 2016.

CASTRO-MORENO, P.; PARDO, J. P.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; *et al.* Captopril avoids hypertension, the increase in plasma angiotensin II but increases angiotensin 1-7 and angiotensin II-induced perfusion pressure in isolated kidney in SHR. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 32, n. 3–4, p. 61–69, 2012.

CHAKRABORTHY, Aratirika; RAMANI, Pratibha; SHERLIN, HeraldJustin; *et al.* Antioxidant and pro-oxidant activity of Vitamin C in oral environment. **Indian Journal of Dental Research**, v. 25, n. 4, p. 499, 2014.

CIFUENTES-PAGANO, Eugenia; MEIJLES, Daniel N.; PAGANO, Patrick J. The Quest for Selective Nox Inhibitors and Therapeutics: Challenges, Triumphs and Pitfalls. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 17, p. 2741–2754, 2014.

CONDEZO-HOYOS, Luis; ARRIBAS, Silvia M.; ABDERRAHIM, Fátima; *et al.* Liver growth factor treatment reverses vascular and plasmatic oxidative stress in spontaneously hypertensive rats: **Journal of Hypertension**, v. 30, n. 6, p. 1185–1194, 2012.

DA COSTA, Cristiane Aguiar; DE OLIVEIRA, Paola Raquel Braz; DE BEM, Grazielle Freitas; *et al.* Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 12, p. 1199–1209, 2012.

DASKAYA-DIKMEN, Ceren; YUCETEPE, Aysun; KARBANCIUGLU-GULER, Funda; *et al.* Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides from Plants. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 316, 2017.

DE MOURA, R. Soares; EMILIANO, A. F.; DE CARVALHO, L. C. R. Marins; *et al.* Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 288–294, 2005.

DE OLIVEIRA, Paola Raquel B.; DA COSTA, Cristiane A.; DE BEM, Grazielle F.; *et al.* Euterpe oleracea Mart.-Derived Polyphenols Protect Mice from Diet-Induced Obesity and Fatty Liver by Regulating Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Excretion. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0143721, 2015.

DOBRIAN, A. D.; DAVIES, M. J.; SCHRIVER, S. D.; *et al.* Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 37, n. 2 Pt 2, p. 554–560, 2001.

DORNAS, Waleska C.; SILVA, Marcelo E. Animal models for the study of arterial hypertension. **Journal of Biosciences**, v. 36, n. 4, p. 731–737, 2011.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421–431, 1990.

ELZAAWELY, A; XUAN, T; KOYAMA, H; *et al.* Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1648–1653, 2007.

ELZAAWELY, Abdelnaser A.; XUAN, Tran D.; TAWATA, Shinkichi. Changes in essential oil, kava pyrones and total phenolics of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. leaves exposed to copper sulphate. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 3, p. 347–353, 2007.

FÉLÉTOU, Michel; KÖHLER, Ralf; VANHOUTTE, Paul M. Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. **Annals of Medicine**, v. 44, n. 7, p. 694–716, 2012.  
FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114–121, 1984.

FRIDEZ, P.; RACHEV, A.; MEISTER, J. J.; *et al.* Model of geometrical and smooth muscle tone adaptation of carotid artery subject to step change in pressure. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, n. 6, p. H2752-2760, 2001.

GAN, Zhongyuan; HUANG, Dan; JIANG, Jiaye; *et al.* Captopril alleviates hypertension-induced renal damage, inflammation, and NF- $\kappa$ B activation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 11, p. e7338, 2018.

GHOSH, Mahua; WANG, Hui Di; MCNEILL, J. Robert. Role of oxidative stress and nitric oxide in regulation of spontaneous tone in aorta of DOCA-salt hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 4, p. 562–573, 2004.

GIMBRONE, Michael A.; GARCÍA-CARDEÑA, Guillermo. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 118, n. 4, p. 620–636, 2016.

GLUAIS, Pascale; LONCHAMPT, Michel; MORROW, Jason D.; *et al.* Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, n. 6, p. 834–845, 2005.

GRATON, Murilo E.; POTJE, Simone R.; TROIANO, Jéssica A.; *et al.* Apocynin alters redox signaling in conductance and resistance vessels of spontaneously hypertensive rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 134, p. 53–63, 2019.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GREENWALD, S. E.; BERRY, C. L. Static mechanical properties and chemical composition of the aorta of spontaneously hypertensive rats: a comparison with the effects of induced hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 12, n. 6, p. 364–372, 1978.

HARVEY, Adam; MONTEZANO, Augusto C.; TOUYZ, Rhian M. Vascular biology of ageing-Implications in hypertension. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 83, p. 112–121, 2015.

HAYASHI, Kozaburo; NAIKI, Takeru. Adaptation and remodeling of vascular wall; biomechanical response to hypertension. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 2, n. 1, p. 3–19, 2009.

HIGASHI, Yukihiro; KIHARA, Yasuki; NOMA, Kensuke. Endothelial dysfunction and hypertension in aging. **Hypertension Research**, v. 35, n. 11, p. 1039–1047, 2012.

HIRASE, Tetsuaki; NODE, Koichi. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 302, n. 3, p. H499–H505, 2012.

HUANG, Ling-ling; PAN, Chen; WANG, Li; *et al.* Protective effects of grape seed proanthocyanidins on cardiovascular remodeling in DOCA-salt hypertension rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 8, p. 841–849, 2015.

IKARASHI, Nobutomo; TODA, Takahiro; HATAKEYAMA, Yusuke; *et al.* Anti-Hypertensive Effects of Acacia Polyphenol in Spontaneously Hypertensive Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 700, 2018.

INCALZA, Maria Angela; D'ORIA, Rossella; NATALICCHIO, Annalisa; *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v. 100, p. 1–19, 2018.

JAKOVLJEVIC, Biljana; NIKOLIC TURNIC, Tamara; JEREMIC, Nevena; *et al.* The impact of aerobic and anaerobic training regimes on blood pressure in normotensive and hypertensive rats: focus on redox changes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 454, n. 1–2, p. 111–121, 2019.

JI, Yun-peng; SHI, Ting-yu; ZHANG, Yan-yan; *et al.* Essential oil from Fructus Alpinia zerumbet (fruit of Alpinia zerumbet (Pers.) Burt. et Smith) protected against aortic endothelial cell injury and inflammation in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 237, p. 149–158, 2019.

JIN, Li; PIAO, Zhe Hao; SUN, Simei; *et al.* Gallic Acid Reduces Blood Pressure and Attenuates Oxidative Stress and Cardiac Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15607, 2017.

JONES, Dean P.; RADI, Rafael. Redox Pioneer: Professor Helmut Sies. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 18, p. 2459–2468, 2014.

KAWAI, Tatsuo; FORRESTER, Steven J.; O'BRIEN, Shannon; *et al.* AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. **Pharmacological Research**, v. 125, p. 4–13, 2017.

KHURANA, Sandhya; VENKATARAMAN, Krishnan; HOLLINGSWORTH, Amanda; *et al.* Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. **Nutrients**, v. 5, n. 10, p. 3779–3827, 2013.

KJELDSEN, Sverre E.; STRAND, Arne; JULIUS, Stevo; *et al.* Mechanism of Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker Action in the Regression of Left Ventricular Hypertrophy. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 8, n. 7, p. 487–492, 2006.

KLISIC, Aleksandra; KOCIC, Gordana; KAVARIC, Nebojsa; *et al.* Xanthine oxidase and uric acid as independent predictors of albuminuria in patients with diabetes mellitus type 2. **Clinical and Experimental Medicine**, 2017.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **The Biochemical Journal**, v. 298 ( Pt 2), p. 249–258, 1994.

KOBAYASHI, Nobuhiko; DELANO, Frank A.; SCHMID-SCHÖNBEIN, Geert W. Oxidative stress promotes endothelial cell apoptosis and loss of microvessels in the spontaneously hypertensive rats. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 10, p. 2114–2121, 2005.

KONG, Xiang; LI, Wei; GUO, Li-qun; *et al.* Sesamin enhances nitric oxide bioactivity in aortas of spontaneously hypertensive rats. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v. 9, n. 5, p. 314–324, 2015.

KONUKOGLU, Dildar; UZUN, Hafize. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *In*: ISLAM, Md. Shahidul (Org.). **Hypertension: from basic research to clinical practice**. Cham: Springer International Publishing, 2016, v. 956, p. 511–540. (Advances in Experimental Medicine and Biology).

KUZKAYA, Nermin; WEISSMANN, Norbert; HARRISON, David G.; *et al.* Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 25, p. 22546–22554, 2003.

LAHLOU, Saad; INTERAMINENSE, Leylliane Fátima Leal; LEAL-CARDOSO, José Henrique; *et al.* Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 323–330, 2003.

LANDETE, J. M. Dietary Intake of Natural Antioxidants: Vitamins and Polyphenols. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 7, p. 706–721, 2013.

LARANJA, Sandra M. R.; BERGAMASCHI, Cassia M.; SCHOR, Nestor. Evaluation of acute administration of natural products with potential diuretic effects, in humans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. suppl 2, p. 237–240, 1991.

LAURENT, S.; BOUTOUYRIE, P. The Structural Factor of Hypertension: Large and Small Artery Alterations. **Circulation Research**, v. 116, n. 6, p. 1007–1021, 2015.

LEAL-CARDOSO, J. H.; MOREIRA, M. R.; DA CRUZ, G. M. Pinto; *et al.* Effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 11, n. 6, p. 549–553, 2004.

LEE, S. K.; ARUNKUMAR, Sundaram; SIRAJUDEEN, K. N. S.; *et al.* Glutathione system in young spontaneously hypertensive rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 321–327, 2010.

- LEMARIÉ, Catherine A.; THARAUX, Pierre-Louis; LEHOUX, Stéphanie. Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, n. 3, p. 433–439, 2010.
- LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464–478, 1990.
- LI, Xiao C.; ZHANG, Jianfeng; ZHUO, Jia L. The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system: Physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases. **Pharmacological Research**, v. 125, p. 21–38, 2017.
- LIMA, E. O.; GOMPERTZ, O. F.; GIESBRECHT, A. M.; *et al.* In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v. 36, n. 9–10, p. 333–336, 1993.
- LIU, S. Q.; FUNG, Y. C. Relationship between hypertension, hypertrophy, and opening angle of zero-stress state of arteries following aortic constriction. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 111, n. 4, p. 325–335, 1989.
- LUBOS, Edith; LOSCALZO, Joseph; HANDY, Diane E. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 7, p. 1957–1997, 2011.
- LUO, Wei-min; KONG, Jing; GONG, Yan; *et al.* Tongxinluo Protects against Hypertensive Kidney Injury in Spontaneously-Hypertensive Rats by Inhibiting Oxidative Stress and Activating Forkhead Box O1 Signaling. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0145130, 2015.
- LUSHCHAK, Volodymyr I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 2014.
- MALACHIAS, Mvb; SOUZA, Wksb; PLAVNIK, Fl; *et al.* Capítulo 1 - Conceituação, Epidemiologia e Prevenção Primária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, 2016.
- MARQUE, V.; KIEFFER, P.; ATKINSON, J.; *et al.* Elastic properties and composition of the aortic wall in old spontaneously hypertensive rats. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 34, n. 3, p. 415–422, 1999.
- MARTIN, Melanie; DEUSSEN, Andreas. Effects of natural peptides from food proteins on angiotensin converting enzyme activity and hypertension. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 8, p. 1264–1283, 2019.
- MARTINS, Dorival; ENGLISH, Ann M. Catalase activity is stimulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rich culture medium and is required for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance and adaptation in yeast. **Redox Biology**, v. 2, p. 308–313, 2014.
- MATSUMOTO, T.; HAYASHI, K. Mechanical and dimensional adaptation of rat aorta to hypertension. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 116, n. 3, p. 278–283, 1994.
- MOHAMMED-ALI, Zahraa. Chapter 16 - Animal Models of Kidney Disease. **Urinary Tract**, p. 39, .

- MONTEZANO, Augusto C.; DULAK-LIS, Maria; TSIROPOULOU, Sofia; *et al.* Oxidative Stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, n. 5, p. 631–641, 2015.
- MONTEZANO, Augusto C.; NGUYEN DINH CAT, Aurelie; RIOS, Francisco J.; *et al.* Angiotensin II and Vascular Injury. **Current Hypertension Reports**, v. 16, n. 6, p. 431, 2014.
- MPALANTINOS, M A; DE MOURA, R Soares; PARENTE, J P; *et al.* Biologically active flavonoids and kava pyrones from the aqueous extract of *Alpinia zerumbet*. **Phytother. Res.**, p. 3, 1998.
- MYBURGH, Kathryn H. Polyphenol Supplementation: Benefits for Exercise Performance or Oxidative Stress? **Sports Medicine**, v. 44, n. S1, p. 57–70, 2014.
- NAGANO, Tetsuo. Bioimaging Probes for Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 45, n. 2, p. 111–124, 2009.
- NAITO, Yoshiro; TSUJINO, Takeshi; MATSUMOTO, Mika; *et al.* The Mechanism of Distinct Diurnal Variations of Renin-Angiotensin System in Aorta and Heart of Spontaneously Hypertensive Rats. *Clinical and Experimental Hypertension*, v. 31, n. 8, p. 625–638, 2009.
- NECKÁŘ, Jan; ŠILHAVÝ, Jan; ZÍDEK, Václav; *et al.* CD36 overexpression predisposes to arrhythmias but reduces infarct size in spontaneously hypertensive rats: gene expression profile analysis. **Physiological Genomics**, v. 44, n. 2, p. 173–182, 2012.
- NIKI, Etsuo. Evidence for beneficial effects of vitamin E. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 30, n. 5, p. 571–579, 2015.
- OPARIL, Suzanne; ACELAJADO, Maria Czarina; BAKRIS, George L.; *et al.* Hypertension. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18014, 2018.
- ORMSBEE, H. S.; RYAN, C. F. Production of hypertension with desoxycorticosterone acetate-impregnated silicone rubber implants. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 2, p. 255–257, 1973.
- O'SHEA, P.M.; GRIFFIN, T.P.; FITZGIBBON, M. Hypertension: The role of biochemistry in the diagnosis and management. **Clinica Chimica Acta**, v. 465, p. 131–143, 2017.
- PAREDES, María; ROMECÍN, Paola; ATUCHA, Noemí; *et al.* Moderate Effect of Flavonoids on Vascular and Renal Function in Spontaneously Hypertensive Rats. **Nutrients**, v. 10, n. 8, p. 1107, 2018.
- PAULINO, Emanuel Tenório; BARROS FERREIRA, Amanda Karine; DA SILVA, Jessyka Carolina Galvão; *et al.* Cardioprotective effects induced by hydroalcoholic extract of leaves of *Alpinia zerumbet* on myocardial infarction in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 242, p. 112037, 2019.

PINTO, Nilson V.; ASSREUY, Ana Maria S.; COELHO-DE-SOUZA, Andreлина N.; *et al.* Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole in rats. **Phytomedicine**, v. 16, n. 12, p. 1151–1155, 2009.

RAY, Paul D.; HUANG, Bo-Wen; TSUJI, Yoshiaki. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 981–990, 2012.

ROCHA, A. P. M.; CARVALHO, L. C. R. M.; SOUSA, M. a. V.; *et al.* Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascular Pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 97–104, 2007.  
ROMERO-NAVA, R.; RODRIGUEZ, J. E.; RESÉNDIZ-ALBOR, A. A.; *et al.* Changes in protein and gene expression of angiotensin II receptors (AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub>) in aorta of diabetic and hypertensive rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 38, n. 1, p. 56–62, 2016.

SANTOS, B. A.; ROMAN-CAMPOS, D.; CARVALHO, M. S.; *et al.* Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca<sup>2+</sup> current blockade. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 18, n. 7, p. 539–543, 2011.

SAVOIA, Carmine; VOLPE, Massimo. Angiotensin receptor modulation and cardiovascular remodeling. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS**, v. 12, n. 3, p. 381–384, 2011.

SERINO, Alexa; SALAZAR, Gloria. Protective Role of Polyphenols against Vascular Inflammation, Aging and Cardiovascular Disease. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 53, 2018.

SHEN, Xiang-Chun; TAO, Ling; LI, Wan-Kui; *et al.* Evidence-based antioxidant activity of the essential oil from *Fructus A. zerumbet* on cultured human umbilical vein endothelial cells' injury induced by ox-LDL. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, p. 174, 2012.

SILVA, Sebastião D.; JARA, Zaira P.; PERES, Roseli; *et al.* Temporal changes in cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling induced by exercise in hypertension: Role for local angiotensin II reduction. **PloS One**, v. 12, n. 12, p. e0189535, 2017.

SLIWA, Karen; STEWART, Simon; GERSH, Bernard J. Hypertension: a global perspective. **Circulation**, v. 123, n. 24, p. 2892–2896, 2011.

SOARES DE MOURA, R.; COSTA VIANA, F. S.; SOUZA, M. a. V.; *et al.* Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 11, p. 1515–1520, 2002.

SOARES DE MOURA, R.; RESENDE, A. C.; EMILIANO, A. F.; *et al.* The role of bradykinin, AT<sub>2</sub> and angiotensin 1-7 receptors in the EDRF-dependent vasodilator effect of angiotensin II on the isolated mesenteric vascular bed of the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 5, p. 860–866, 2004.

SOUSA, L. E.; MAGALHÃES, W. G.; BEZERRA, F. S.; *et al.* Exercise training restores oxidative stress and nitric oxide synthases in the rostral ventrolateral medulla of renovascular hypertensive rats. **Free Radical Research**, v. 49, n. 11, p. 1335–1343, 2015.

SPARKS, Matthew A.; CROWLEY, Steven D.; GURLEY, Susan B.; *et al.* Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. *In*: TERJUNG, Ronald (Org.). **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014, p. 1201–1228.

SUGANO, Masahiro; TSUCHIDA, Keiko; SAWADA, Shojiro; *et al.* Reduction of plasma angiotensin II to normal levels by antisense oligodeoxynucleotides against liver angiotensinogen cannot completely attenuate vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats: **Journal of Hypertension**, v. 18, n. 6, p. 725–731, 2000.

SULTANA, Sabira; ASIF, Hafiz Muhammad. Review: Medicinal plants combating against hypertension: A green antihypertensive approach. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 6, p. 2311–2319, 2017.

SUN, Jie; ZHANG, Xueji; BRODERICK, Mark; *et al.* Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, v. 3, n. 8, p. 276–284, 2003.

TANITO, Masaki; NAKAMURA, Hajime; KWON, Yong-Won; *et al.* Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 6, n. 1, p. 89–97, 2004.

TESCHKE, Rolf; XUAN, Tran Dang. Viewpoint: A Contributory Role of Shell Ginger (*Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm) for Human Longevity in Okinawa, Japan? **Nutrients**, v. 10, n. 2, 2018.

TOBLLI, Jorge Eduardo; DIGENNARO, Federico; GIANI, Jorge Fernando; *et al.* Nebivolol: impact on cardiac and endothelial function and clinical utility. **Vascular Health and Risk Management**, v. 8, p. 151–160, 2012.

TONGNUANCHAN, Phakawat; BENJAKUL, Soottawat. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, p. R1231–1249, 2014.

TSIOUFIS, Costas; THOMOPOULOS, Costas. Combination drug treatment in hypertension. **Pharmacological Research**, v. 125, p. 266–271, 2017.

TU, Pham Thi Be; TAWATA, Shinkichi. Anti-obesity effects of hispidin and *Alpinia zerumbet* bioactives in 3T3-L1 adipocytes. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 10, p. 16656–16671, 2014.

VAN THIEL, Bibi S.; VAN DER PLUIJM, Ingrid; TE RIET, Luuk; *et al.* The renin–angiotensin system and its involvement in vascular disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 763, p. 3–14, 2015.

VÁNYOLÓS, Attila; ORBÁN-GYAPAI, Orsolya; HOHMANN, Judit. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Hungarian Wild-Growing Mushrooms: XANTHINE OXIDASE

INHIBITORY ACTIVITY OF MUSHROOMS. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 8, p. 1204–1210, 2014.

VELÁZQUEZ, Ixane; PLAUD, Marinés; WOJNA, Valerie; *et al.* Antioxidant enzyme dysfunction in monocytes and CSF of Hispanic women with HIV-associated cognitive impairment. **Journal of Neuroimmunology**, v. 206, n. 1–2, p. 106–111, 2009.

WADDINGTON, Emma; PUDDEY, Ian B; CROFT, Kevin D. Red wine polyphenolic compounds inhibit atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice independently of effects on lipid peroxidation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 1, p. 54–61, 2004.

WANG, Xi; KHALIL, Raouf A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *In: Advances in Pharmacology*. [s.l.]: Elsevier, 2018, v. 81, p. 241–330.

WANG, Mingyi; KIM, Soo Hyuk; MONTICONE, Robert E.; *et al.* Matrix Metalloproteinases Promote Arterial Remodeling in Aging, Hypertension, and Atherosclerosis. **Hypertension**, v. 65, n. 4, p. 698–703, 2015.

WHELTON, Paul K.; CAREY, Robert M.; ARONOW, Wilbert S.; *et al.* 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 71, n. 19, p. e127–e248, 2018.

YANG, Di; FÉLÉTOU, Michel; BOULANGER, Chantal M.; *et al.* Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 1, p. 104–110, 2002.

YANG, Di; GLUAIS, Pascale; ZHANG, Ji Nan; *et al.* Nitric oxide and inactivation of the endothelium-dependent contracting factor released by acetylcholine in spontaneously hypertensive rat. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 815–820, 2004.

YANG, Yan-Min; SHI, Rong-Hua; XU, Chuan-Xiang; *et al.* BRD4 expression in patients with essential hypertension and its effect on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 12, n. 12, p. e107–e117, 2018.

YOUSEFIAN, Mozhdeh; SHAKOUR, Neda; HOSSEINZADEH, Hossein; *et al.* The natural phenolic compounds as modulators of NADPH oxidases in hypertension. **Phytomedicine**, v. 55, p. 200–213, 2019.

ZHANG, Jun; FALLAHZADEH, Mohammad Kazem; MCCULLOUGH, Peter A. Aging Male Spontaneously Hypertensive Rat as an Animal Model for the Evaluation of the Interplay between Contrast-Induced Acute Kidney Injury and Cardiorenal Syndrome in Humans. **Cardiorenal Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

ZHOU, Wugang; HONG, Mona; ZHANG, Ke; *et al.* Mechanisms of Improved Aortic Stiffness by Arotinolol in Spontaneously Hypertensive Rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88722, 2014.