



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

Carolina da Silva Valentim

Efeito dos inibidores do sistema renina angiotensina aldosterona sobre os marcadores de estresse oxidativo, enzimas antioxidantes e apoptose na artéria carótida comum de ratos induzidos ao modelo de hipertensão 2R1C

Rio de Janeiro

2024

Carolina da Silva Valentim

Efeito dos inibidores do sistema renina angiotensina aldosterona sobre os marcadores de estresse oxidativo, enzimas antioxidantes e apoptose na artéria carótida comum de ratos induzidos ao modelo de hipertensão 2R1C



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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Jemima Fuentes da Silva Ribeiro

Rio de Janeiro

2024

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

V155 Valentim, Carolina da Silva.

Efeito dos inibidores do sistema renina angiotensina aldosterona sobre os marcadores de estresse oxidativo, enzimas antioxidantes e apoptose na artéria carótida comum de ratos induzidos ao modelo de hipertensão 2R1C / Carolina da Silva Valentim. – 2024.

67 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Jemima Fuentes Ribeiro da Silva

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

1. Hipertensão renovascular – Diagnóstico – Teses. 2. Estresse oxidativo – Efeitos dos fármacos – Teses. 3. Apoptose – Efeitos dos fármacos – Teses. I. Silva, Jemima Fuentes Ribeiro da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.12:615

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Carolina da Silva Valentim

Efeito dos inibidores do sistema renina angiotensina aldosterona sobre os marcadores de estresse oxidativo, enzimas antioxidantes e apoptose na artéria carótida de ratos induzidos ao modelo de hipertensão 2R1C

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

Defendida em 27 de fevereiro de 2024.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Jemima Fuentes Ribeiro da Silva (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra Vanessa Souza-Melo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Vinícius Novaes Rocha
Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos aqueles que me amam em especial minha querida avó Hilza (*Em Memória*).

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus por tudo que ELE tem feito em minha vida e por viver a sua bondade.

Agradeço aos meus pais, Roselene e Vanderlei, e a minha irmã Laryssa por sempre me apoiar e me confortar em momentos difíceis. Sou grata por ter o cuidado e o amor de vocês.

Quero agradecer a minha orientadora Jemima Fuentes pela oportunidade e acreditar em mim. O período do mestrado foi desafiador, mas vencemos! Temos uma longa jornada ainda pela frente e tenho certeza que vamos colher bons frutos.

Ao Professor Jorge José de Carvalho, por ter me aceito no laboratório e me ajudar a conquistar a pós graduação.

Aos meus amigos de longa data Guilherme, Izabella e Alexandra por proporcionarem dias leves com muitas risadas e conversas construtivas.

Quero agradecer também a todos os integrantes do LUBT por me ajudar no período de bancada, como as técnicas Ana Lúcia e Cherley, aluna de iniciação científica Raíssa e pós doc Bianca, muito obrigada. Esse trabalho está concluído devido à ajuda de vocês. Em especial aos amigos, Luciana, Priscila, Kíssila e Felipe que proporcionaram momentos de risadas e boas conversas.

Quero agradecer a pós graduação BHEX pela oportunidade e também os amigos de turma 2022.1, em especial Fábio Coelho e Ana Paula.

A banca avaliadora, obrigada por ter aceitado o convite e pelas considerações que irão agregar ainda mais o meu trabalho.

Agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Plataforma de Equipamentos Multiusuário do Instituto de Biologia da UFF por disponibilizar o microscópio eletrônico.

RESUMO

Valentim, Carolina da Silva. **Efeito dos inibidores do sistema renina angiotensina aldosterona sobre os marcadores de estresse oxidativo, enzimas antioxidantes e apoptose na artéria carótida comum de ratos induzidos ao modelo de hipertensão 2R1C.** 2024. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

O estresse oxidativo (EO) participa da fisiopatologia da hipertensão renovascular (HR) e pode levar à morte celular por ativar a via intrínseca da apoptose. Objetivamos avaliar as alterações morfofuncionais da carótida comum de ratos *Wistar* induzidos ao modelo de HR após o tratamento com Losartana, Enalapril e Espironolactona. Ratos *Wistar* machos foram induzidos à HR por clipagem da artéria renal esquerda ou cirurgia simulada (SHAM) e tratados com losartana (10mg/kg/dia) ou enalapril (10mg/kg/dia) ou espironolactona (25mg/kg/dia) ou veículo por 4 semanas, via gavagem. A eutanásia ocorreu na 8ª semana, final do experimento. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida pelo método não invasivo de pletismografia da artéria caudal. Os níveis de aldosterona plasmática foram determinados por ELISA. Bax, Bcl-2, citocromo c, caspase 3, gp91(phox) e GPX-1 foram examinados por imunohistoquímica. O conteúdo de malondialdeído (MDA) e a atividade de superóxido dismutase, catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) foram detectados por ensaio enzimático. A ultraestrutura da artéria carótida foi observada por microscopia eletrônica de transmissão. Todos os tratamentos, losartana, enalapril e espironolactona, reduziram significativamente a PAS, gp91(phox) e marcadores apoptóticos, exceto caspase 3. O enalapril aumentou a expressão de GPX-1. Os resultados acima sugeriram coletivamente que a espironolactona, losartana e enalapril trouxe efeitos benéficos promovendo alterações experimentais induzidas pela HR na PAS e marcadores de apoptose.

Palavras-chave: 2R1C; SRAA; Estresse oxidativo; Apoptose.

ABSTRACT

VALENTIM, Carolina da Silva. *Effect of inhibitors of the renin angiotensin aldosterone system on markers of oxidative stress, antioxidant enzymes and apoptosis in the common carotid artery of rats induced in the 2K1C hypertension model*. 2024. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Oxidative stress (OS) participates in the pathophysiology of renovascular hypertension (RH) and can lead to cell death by activating the intrinsic apoptosis pathway. We aimed to evaluate the morphofunctional changes in the common carotid artery of *Wistar* rats induced in the HR model after treatment with Losartan, Enalapril and Spironolactone. Male *Wistar* rats were induced to HR by left renal artery clipping or sham surgery (SHAM) and treated with losartan (10mg/kg/day) or enalapril (10mg/kg/day) or spironolactone (25mg/kg/day) or vehicle for 4 weeks, via gavage. Euthanasia occurred in the 8th week, the end of the experiment. Systolic blood pressure (SBP) was measured using the non-invasive method of caudal artery plethysmography. Plasma aldosterone levels were determined by ELISA. Bax, Bcl-2, cytochrome c, caspase 3, gp91(phox), and GPX-1 were examined by immunohistochemistry. Malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase, catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities were detected by enzymatic assay. The ultrastructure of the carotid artery was observed by transmission electron microscopy. All treatments, losartan, enalapril and spironolactone, significantly reduced SBP, gp91(phox) and apoptotic markers, except caspase 3. Enalapril increased GPX-1 expression. The above results collectively suggested that spironolactone, losartan and enalapril brought beneficial effects by promoting experimental HR-induced changes in SBP and apoptosis markers.

Keywords: 2K1C; RAAS; Oxidative stress; Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fases da hipertensão renovascular 2R1C.....	16
Figura 2	Corte transversal de uma artéria elástica com as suas respectivas túnicas.....	18
Figura 3	Bifurcação carotídea de um roedor.....	19
Figura 4	Via clássica do Sistema renina angiotensina Aldosterona.....	21
Figura 5	Reações envolvidas no Estresse oxidativo (EO).....	24
Figura 6	Desenho experimental	31
Figura 7	Medidor de pressão arterial - método não invasivo.....	33
Tabela 1	Anticorpos primários utilizados na Imunohistoquímica.....	34
Figura 8:	Mensuração da área marcada – Região de interesse.....	35
Figura 9	Evolução da pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg) dos animais estudados.....	39
Figura 10	Dosagem de Aldosterona (pg/mL) dos animais estudados	40
Figura 11	Análise ultraestrutural da artéria carótida dos animais dos grupos experimentais.....	41
Figura 12:	Coloração de hematoxilina e eosina na artéria carótida dos grupos experimentais.....	42
Figura 13	Imunomarcção e quantificação do anticorpo anti-CYBB para a subunidade GP91phox da NADPH oxidase 2 na artéria carótida dos grupos experimentais.....	43
Figura 14	Imunomarcção e quantificação do anticorpo anti-GPX1 na artéria carótida dos grupos experimentais.....	44
Figura 15	Análise das enzimas antioxidantes.....	45

Figura 16	Análise de enzima anti oxidante e pró oxidante.....	46
Figura 17	Imunomarcção e quantificação do anticorpo anti-BAX na artéria carótida dos grupos experimentais.....	47
Figura 18	Imunomarcção e quantificação para o anticorpo anti-BCL-2 na artéria carótida dos grupos experimentais.....	48
Figura 19	Imunomarcção e quantificação do anticorpo anti-citocromo c na artéria carótida dos grupos experimentais.....	49
Figura 20	Imunomarcção e quantificação para o anticorpo anti-caspase 3 clivada na artéria carótida dos grupos experimentais.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC – Artéria carótida comum

ACE – Artéria carótida externa

ACI – Artéria carótida interna

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

ANOVA – Análise de Variância

AT1R– Receptor AT1

BCA – Ácido bicinconínico

CAT – Catalase

CML - Células musculares lisas

DAB – Diaminobenzidina

DIABLO – Proteína de ligação-IAP direta com baixo pI

ECA – Enzima conversora de angiotensina

EO – Estresse oxidativo

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FDA – Food and Drug Administration

GPX – Glutathione peroxidase

HR – Hipertensão renovascular

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

LELI – lâmina elástica limitante interna

MDA – Malonaldeído

N – Núcleo

NO – Óxido nítrico

ONOO – Peroxinitrito

O₂⁻ – Ânion superóxido

PAS – Pressão arterial sistólica

PA - Pressão arterial

SHR– Rato espontaneamente hipertenso

SOD – Superóxido dismutase

SRAA – Sistema renina angiotensina aldosterona

TBARS –Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBS – Tampão tris

TCA – ácido tricloroacético

TA – Túnica adventícia

TI – Túnica íntima

TM – Túnica média

1R1C – 1 rim e 1 clipe

2R1C – 2 Rins 1 clipe

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
1.1 A hipertensão renovascular.....	14
1.2 Modelo experimental de hipertensão renovascular.....	15
1.3 Artéria carótida.....	17
1.4 Sistema renina angiotensina aldosterona.....	20
1.5 Estresse Oxidativo.....	22
1.6 Apoptose	25
1.7 Losartana.....	26
1.8 Enalapril.....	27
1.9 Espironolactona.....	28
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivos gerais.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Animais e grupos experimentais.....	30
3.2 Indução da hipertensão renovascular (HR).....	31
3.3 Análise da pressão arterial sistólica (PAS).....	32
3.4 Eutanásia, obtenção do sangue e amostras teciduais.....	33
3.5 Microscopia ótica	33

3.6	Microscopia eletrônica de transmissão.....	36
3.7	Atividade Enzimática.....	37
3.8	ELISA.....	38
3.9	Análise estatística.....	38
4.	RESULTADOS.....	39
4.1	Avaliação pressão arterial sistólica (PAS).....	39
4.2	ELISA - Aldosterona.....	40
4.3	Avaliação ultraestrutural da artéria carótida	40
4.4	Coloração de Hematoxilina e Eosina.....	41
4.5	Avaliação e quantificação da expressão de GP91phox e GPX1 por imunohistoquímica	42
4.6	Avaliação dos tratamentos sobre o dano oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes na artéria carótida	45
4.7	Análises dos tratamentos sobre as proteínas envolvidas na apoptose.....	46
5	DISCUSSÃO.....	51
	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO – Comitê de ética em pesquisa.....	67

INTRODUÇÃO

1 REVISÃO DA LITERATURA

A hipertensão renovascular (HR) é uma das principais causas de hipertensão secundária que pode ser revertida (Barroso *et al.*, 2021). É também a forma de hipertensão resistente menos reconhecida na prática clínica (Mannemuddhu *et al.*, 2020). O aumento da pressão arterial é devido à redução da perfusão renal (Goldblatt *et al.*, 1934), que geralmente é causada por estenose parcial ou completa de uma ou ambas as artérias ou de seus ramos (Malachias, 2016). Os estudos de Goldblatt demonstraram que a indução de uma estenose de 60% na artéria renal esquerda pela inserção de um clipe de prata de 0,2 mm de espessura reduziu a perfusão renal e aumentou a renina plasmática através da ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que mimetiza a hipertensão humana (Goldblatt *et al.*, 1934). Estudos anteriores utilizando ratos hipertensos do modelo de 2 rins, 1 clipe (2R1C) de Goldblatt demonstraram níveis aumentados da enzima conversora de angiotensina (ECA) nos tecidos (Poasakate *et al.*, 2022), angiotensina I (ANG I) e angiotensina II (ANG II) (Martins-Oliveira *et al.*, 2018), e receptor AT1R (Santuzzi *et al.*, 2015; Matos *et al.*, 2020). Aumentos nos níveis sistêmicos de renina (Kaur e Muthuraman, 2016), ANG I (Martins-Oliveira *et al.*, 2013), Ang II também foram observadas (Martins-Oliveira *et al.*, 2013). No entanto, os níveis plasmáticos de aldosterona foram medidos em apenas um estudo neste modelo 2R1C (Botros *et al.*, 2005). Na HR, a manutenção da pressão arterial (PA) elevada é atribuída às ações da Ang II, que são mediadas pelo receptor AT1 (Weber e Dieter, 2014). Essas ações incluem vasoconstrição, retenção de líquidos (Botros *et al.*, 2005), remodelação vascular, inflamação e estresse oxidativo (Martins-Oliveira *et al.*, 2013; Martins-Oliveira *et al.*, 2018). Além disso, o aumento da produção de Ang II estimula a NADPH oxidase, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no vaso. Isso ocorre especificamente nas células endoteliais e no músculo liso, desencadeando estresse oxidativo (Masi *et al.*, 2019). Na aorta de ratos hipertensos 2R1C, houve aumento do ânion superóxido (Martins-Oliveira *et al.*, 2018) expressão de gp91phox, eNOS e iNOS e menor biodisponibilidade de óxido nítrico (Santuzzi *et al.*, 2015).

ROS participa da ativação da via intrínseca da apoptose celular através da modulação das proteínas BAX/Bcl-2 (Redza-Dutordoir e Averill-Bates, 2016). Um aumento na relação BAX/Bcl-2 libera citocromo c no citosol, formando um complexo de apoptossomo e levando à ativação de caspases (Redza-Dutordoir e Averill-Bates, 2016). O enalapril e o losartan, que são inibidores dos receptores ECA e AT1 respectivamente, são os medicamentos de primeira

linha no tratamento da hipertensão. Eles são eficazes na redução da pressão arterial sistêmica e dos níveis plasmáticos de Ang II (Schölkens *et al.*, 1991; Siragy, 2008). Portanto, foram escolhidos para o tratamento da HR, que é dependente da Ang II (Elliott, 2008). Porém, o bloqueio de diferentes etapas deste sistema pode levar a mecanismos de escape com a ativação de diferentes vias (Lakkis *et al.*, 2003). Embora a terapia combinada seja mais eficaz na redução da PA do que a monoterapia, esta diferença não é observada na remodelação vascular induzida pela hipertensão, que é independente da PA (Schölkens *et al.*, 1991; Corrêa *et al.*, 2020). A espironolactona, um antagonista da aldosterona, é usada como terapia complementar em pacientes que não respondem aos medicamentos anti-hipertensivos habituais. Funciona como um diurético que poupa o potássio nos túbulos distais do rim, levando à diminuição do volume sanguíneo e da PA. Além disso, modula indiretamente o SRAA. Sua ação como antagonista da aldosterona pode auxiliar na redução do remodelamento vascular (Carone *et al.*, 2017). Nosso objetivo foi avaliar o efeito dos anti-hipertensivos no estresse oxidativo e na PA, uma vez que os efeitos dos medicamentos no remodelamento vascular são independentes da PA, e cada terapia pode ativar diferentes vias do SRAA.

1.1 A hipertensão renovascular

Os tratamentos medicamentosos devem levar em consideração a origem da hipertensão, que atualmente, distinguem-se duas formas: a primária (essencial) e a secundária. Na hipertensão primária, a mais prevalente na população, fatores genéticos e ambientais operam através de interações a vias bioquímicas e fisiopatológicas que modificam os sistemas reguladores cardiovasculares (Mancia *et al.*, 2023), desta forma, uma ampla gama de tratamentos são propostos para um ou mais mecanismos fisiopatológicos. A hipertensão secundária tem origem em causas específicas como, por exemplo, apneia do sono, feocromocitoma, doença renal parenquimatosa, síndrome de cushing, aldosteronismo primário, hipertireoidismo/hipotireoidismo e hipertensão renovascular, dentre outras (Póvoa, 2019). Embora representem somente 5 a 15% de todos os casos de hipertensão, a HR frequentemente cursa para uma hipertensão grave ou persistente manifestando risco elevado e/ou muito elevado de morbidade e mortalidade (Póvoa, 2019). Como apresentam alto potencial de reversibilidade, requerem identificação precisa de sua causa para a seleção de um tratamento medicamentoso eficaz ou intervenção apropriada.

De todos os tipos de hipertensão secundária, a HR é a mais comum. Esta condição é caracterizada pelo aumento persistente da pressão arterial sistêmica (PAS) devido a um processo estenótico progressivo da artéria renal levando a hipoperfusão hemodinâmica do rim, como encontrado nos trabalhos de John Loesch e Harry Golblatt em 1933-1934 (Herrmann e Textor, 2018). Segundo a 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial (Malachias, 2016), essa doença é causada pela estenose de uma ou ambas as artérias renais ou de seus ramos.

A oclusão aterosclerótica e a displasia fibromuscular são consideradas as principais causas de HR. A displasia fibromuscular acomete principalmente mulheres com faixa etária média de 43 anos e o tabagismo pode ser um fator de risco (Herrmann e Textor, 2018). Essa doença vascular leva ao estreitamento das artérias, o que difere da aterosclerose e acúmulo de placas, assim o diagnóstico é realizado por exame de imagem como angiografia (Khoury e Gornik, 2017). Já a estenose da artéria renal aterosclerótica acomete indivíduos tabagistas ou que apresentam hiperlipidemia, diabetes e hipertensão. O exame de doppler scan que avalia os vasos sanguíneos demonstrou que 6,8% de idosos, acima de 65 anos, possui doença renovascular com oclusão >60% (Herrmann e Textor, 2018).

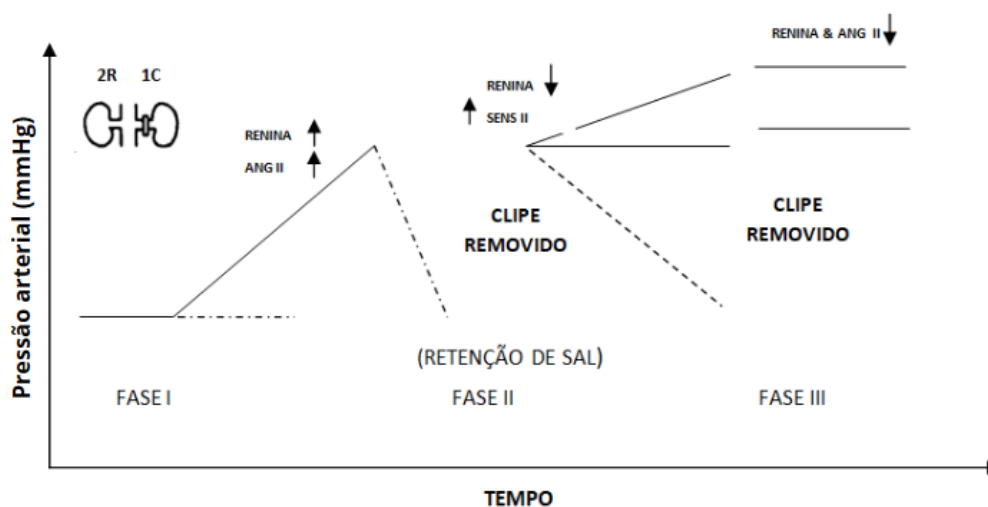
A fisiopatologia da HR está relacionada à hiperativação do sistema renina angiotensina. Goldblatt descobriu que o estreitamento da artéria renal provoca um aumento da PA devido a liberação de uma substância produzida pelos rins, que era desconhecida na época de 1934. Atualmente, essa substância é conhecida como renina, uma enzima produzida nos rins e liberada pelas células justaglomerulares que cliva o angiotensinogênio em ANG I, que será convertida pela ECA em ANG II atuando no receptor AT1R, levando a vasoconstrição e consequentemente a hipertensão arterial (Weber e Dieter, 2014). Por este motivo, os bloqueadores do SRAA são usados como primeira linha no tratamento da HR (Sarathy *et al.*, 2022).

1.2 Modelo experimental de hipertensão renovascular

O modelo desenvolvido por Goldblatt e colaboradores em 1934 mimetiza a HR humana. Através de um experimento realizado com cães, demonstram que a estenose provocada na artéria renal, com um clipe de prata, leva ao aumento da PA e doença renal crônica (Gaspar, 2019), contribuindo para o entendimento da patogênese da HR.

Usam-se ratos no experimento de Goldblatt, pois desenvolve HR facilmente. Os diferentes métodos de hipertensão: 2R1C, quando uma artéria renal é obstruída e o rim contralateral, não obstruído, permanece íntegro, já o 1 rim e 1 clipe (1R1C) um rim é clipado e o rim contralateral é removido. Como relatado acima, esse modelo permite compreender o desenvolvimento da gênese e sustentação da PA. O autor Martinez-Maldonado (Martinez-Maldonado, 1991) escreveu as três fases sobre a evolução da hipertensão presente nesse modelo (figura 1). A primeira fase (renina - angiotensina dependente) tem a duração de quatro semanas após a clipagem que resulta elevação da PA devido à liberação de renina e ANG II, e caso remova o clipe a PA volta a ter níveis pressóricos normais permitindo a diminuição de renina plasmática e ANG II. Já na segunda fase (retenção de sal) ocorre entre a quinta e há oitava semana após a colocação do clipe de prata, onde a PA não é alterada ou os níveis pressóricos estão altos. Se o clipe for retirado a PA volta ao nível pressório normal, embora os níveis vão baixando lentamente. A terceira fase ocorre nove semanas ou mais após a clipagem com níveis super elevados de PA, quando comparado com a primeira fase. No entanto, com a retirada do clipe os níveis pressóricos não chegam ao estado normal mesmo com a redução da renina plasmática e ANG II. Uma observação importante é que nessa fase a ANG II vascular tem a possibilidade de exercer uma ação que controla a neurotransmissão simpática e também promove a hiperplasia na musculatura lisa.

Figura 1: Fases da hipertensão renovascular 2R1C



Legenda: Desenho ilustrativo das três fases: fase I dura aproximadamente quatro semanas; fase II, cinco a oito semanas; fase III, nove semanas ou mais. A primeira linha horizontal (contínua e tracejada) indica PA normal.

Com o aumento da renina plasmática e ANG II provoca o aumento da PA. Com a remoção do clipe no período de 7 a 10 dias leva uma redução significativa da PA, caracterizada pela a fase I. Na fase II a PA é estável ou os níveis pressóricos estão elevados (linhas horizontais e inclinadas), apesar de uma redução de renina plasmática, mas com a remoção do clipe a uma queda da PA ao normal, embora essa redução ocorre lentamente. Já na fase III a PA está elevada (linhas contínuas paralelas) com redução de renina plasmática e ANG II, por outro lado, a remoção do clipe a PA não retorna ao normal.

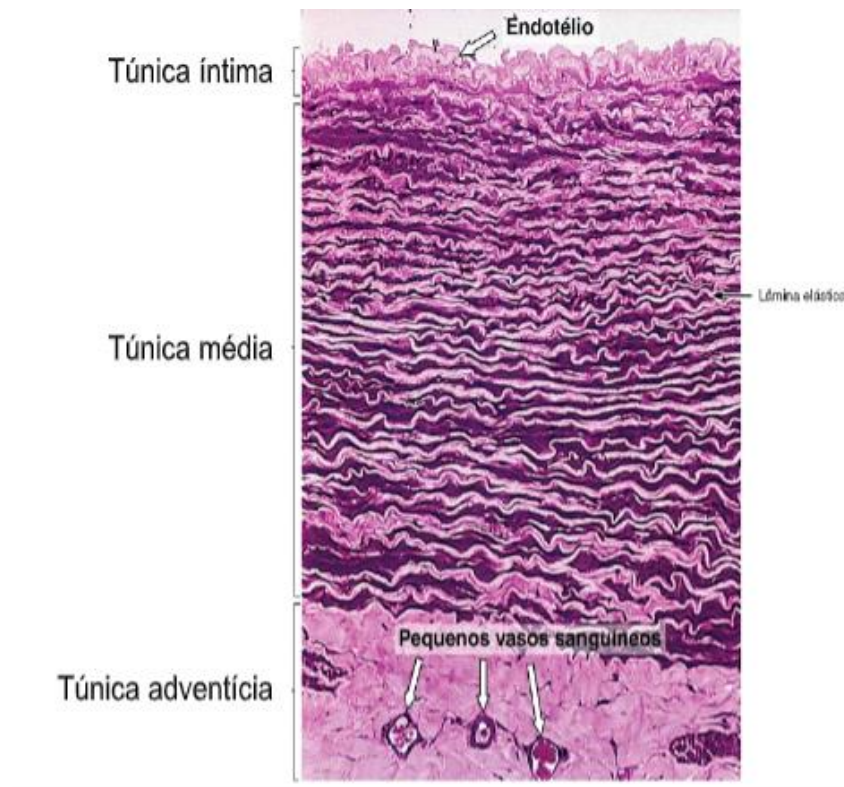
Fonte: adaptado et al, Martinez-Maldonado, 1991

1.3 Artéria Carótida

As artérias carótidas são vasos sanguíneos de grande calibre também chamadas de artéria elástica, são abundantes em elastina na túnica média, o que difere da artéria muscular de médio calibre que possui nessa região uma maior quantidade de músculo liso. A carótida transporta sangue oxigenado do coração (por meio do ventrículo esquerdo) para irrigar o cérebro. A parede dessa artéria é rígida e consegue suportar a variação de PA (Peace *et al.*, 2018). As fibras elásticas permitem que as artérias se dilatam durante a sístole para a entrada do volume sistólico e retorna ao seu diâmetro original na diástole promovendo um fluxo contínuo de sangue através dos vasos mais distais (Levick, 1991).

Os vasos são classificados conforme o seu diâmetro temos artéria elástica, artéria muscular e arteríolas além do mais, em sua parede é composta por três camadas teciduais ou túnicas. A aorta e os ramos da aorta estão inseridos em artéria elástica. Histologicamente, essas artérias apresentam três túnicas demonstrado na Figura 2 : I – túnica íntima é constituída por endotélio, tecido conjuntivo frouxo, células musculares lisas e fibras elásticas. II – túnica média é composta por células musculares lisas, lâminas elásticas, fibras de colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas. III – Túnica adventícia é formada por colágeno (tipo I) e fibras elásticas (Junqueira e Carneiro, 2013).

Figura 2: Corte transversal de uma artéria elástica com as suas respectivas túnicas

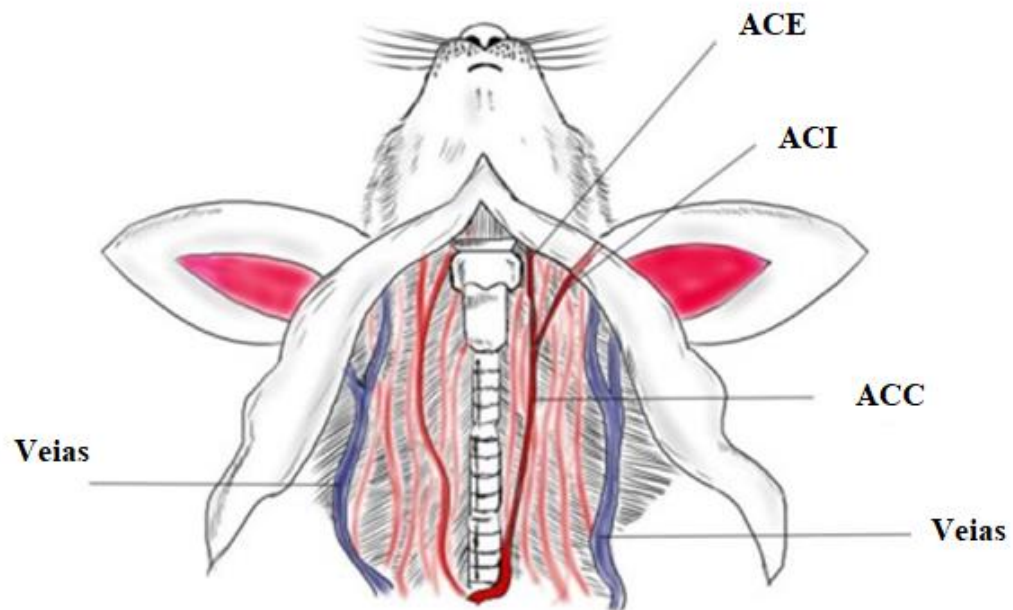


Legenda: Túnica íntima e a presença do endotélio, túnica média bem desenvolvida rica em lâminas elásticas (seta preta) e túnica adventícia com pequenos vasos sanguíneos (seta branca). Coloração: pararrosanilina-azul de toluidina. Médio aumento.

Fonte: adaptado, Junqueira e Carneiro, 2013

A artéria carótida comum (ACC) é localizada na região do pescoço, uma de cada lado (Figura 3). A ACC bifurca-se em dois ramos: artéria carótida interna (ACI) e artéria carótida externa (ACE) (Liu *et al.*, 2019). Na bifurcação carotídea encontram-se o corpo carotídeo considerado um órgão muito vascularizado (Eyzaguirre e Zapata, 1984) um quimiorreceptor arterial e periférico, como função em monitorar as tensões e o pH dos gases sanguíneos arteriais (Unur e Aycan, 1999). Estudos demonstram que a pressão alta provoca alterações morfológicas e funcionais na estrutura e função do corpo carotídeo (Honig *et al.*, 1981). As artérias do corpo carotídeo de ratos (ou artéria glômica) se originam a partir da ACE (97,5%) ou na artéria occipital (2,5%) (Unur e Aycan, 1999).

Figura 3: Bifurcação carotídea de um roedor.



Legenda: Esquema representativo de um pescoço de roedor. ACE: artéria carótida externa, ACI: artéria carótida interna, ACC: artéria carótida comum e Veias.

Fonte: adaptado Liu *et al*, 2019

Um estudo desenvolvido no laboratório (Alves, 2019) com artéria carótida comum de ratos *Wistar* machos, demonstrou no grupo SHAM, a partir da quantificação e distribuição das fibras colágenas da coloração de Tricrômico de Gomori e da imunohistoquímica para o colágeno tipo I e III, uma maior expressão de colágeno, fraca marcação para colágeno tipo I na túnica média e uma marcação intensa de colágeno tipo III na túnica íntima e média, quando comparado com o grupo 2R1C 60 dias. Com relação a imunohistoquímica para metaloproteinase 2 e 9 mostrou uma marcação menos intensa nos animais SHAM, quando comparado com o grupo 2R1C. No aspecto ultraestrutural, o grupo SHAM apresentou características esperadas na túnica íntima e média da carótida comum com células endoteliais achatadas aderidas a membrana basal e camadas de células musculares lisas (CMLs) em perfil contrátil intercaladas com lamínas elásticas.

Sabe-se que a espessura média-íntima é um marcador de aterosclerose e está aumentadas em indivíduos hipertensos. O tratamento com os inibidores do SRAA além de reduzir da PA, traz efeitos benéficos nas artérias (Carvalho-Romano *et al.*, 2022) anulando a

geração neoíntima (Yagi *et al.*, 2004), diminuindo a rigidez (Rehman *et al.*, 2007), e aumentando a produção de óxido nítrico (Yagi *et al.*, 2004).

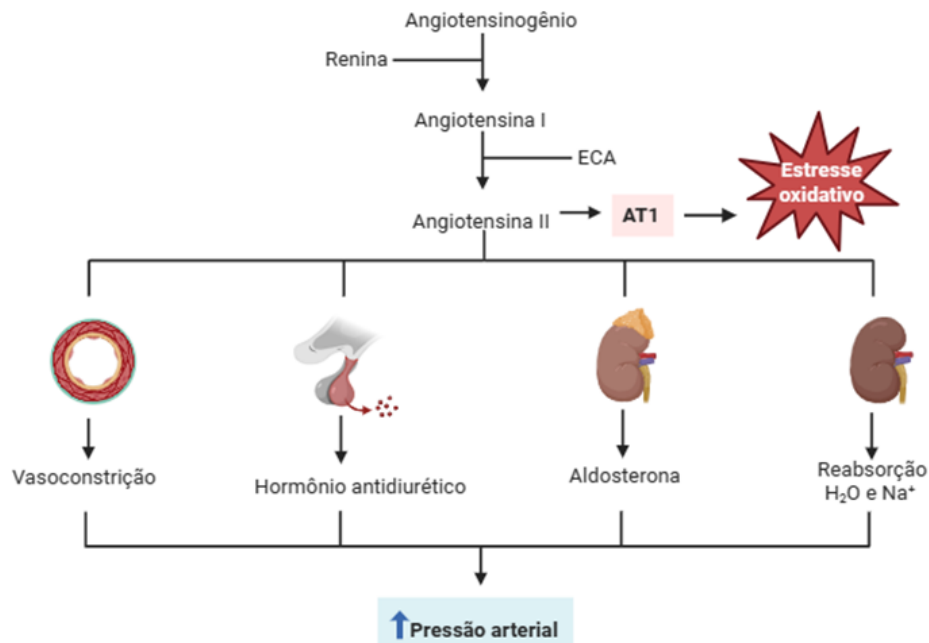
Diante desse exposto, as artérias de grande calibre tem uma função importante, de irrigar sangue oxigenado e nutrientes para o cérebro, com isso, estudar lesão vascular causadas pela hipertensão é fundamental para solucionar problemas que afetam a população mundial.

1.4 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

Os finlandeses Tigerstedt e Bergman no ano de 1898 descobriram a renina, substância capaz de aumentar a PA. Dois autores em diferentes grupos de pesquisa descobriram outra substância denominada mais adiante, precisamente em 1958, de angiotensina (Cherne e Young, 2014). O SRAA tem um papel importante na regulação da homeostase do volume do meio extracelular e da pressão (Yang e Xu, 2017).

A cascata do SRAA se inicia com o angiotensinogênio, proteína produzida pelo fígado e em outros tecidos, como o rim. Em destaque, diversos mecanismos acontecem para estimular a liberação de renina: redução da perfusão renal e de sódio na mácula densa, estimulação dos nervos simpáticos como o receptor adrenérgico β_1 e vasodilatadores como a prostaglandina E2 (Oparil *et al.*, 2018). A renina é sintetizada em prorenina (inativa), que será clivada e liberada na circulação como renina ativa. Essa enzima, liberada pelas células justaglomerulares, cliva essa proteína circulante (10 aminoácidos na porção do terminal N) para formar a ANG I (Vargas *et al.*, 2022). A ANG I será convertida pela ECA (produzida no endotélio e pulmão) em ANG II através da remoção de 2 aminoácidos situado no terminal C (Sparks *et al.*, 2014; Weber e Dieter, 2014). A ANG II em sua forma ativa pode atuar no receptor AT1R e AT2R e apresentam efeitos antagônicos. A atuação no AT1R provoca os seguintes efeitos: músculo liso contraído, contração dos vasos sanguíneos, aumento da resistência vascular, estimula secreção de aldosterona, reabsorção de sódio, redução significativa do fluxo sanguíneo e aumento da PA (Figura 4). Já o AT2R tem efeitos inversos o que leva a redução da PA (Oparil *et al.*, 2018).

Figura 4: Via clássica do Sistema renina angiotensina Aldosterona



Legenda: O angiotensinogênio, produzida e secretada pelo o fígado, será clivado pela renina produzindo a Angiotensina I (ANGI) uma forma inativa. A enzima conversora da angiotensina (ECA) será responsável por converter a ANG I para sua forma ativa, a angiotensina II (ANG II), que irá atuar no receptor AT1, promovendo os seguintes efeitos: vasoconstrição, secreção do hormônio antidiurético, liberação da aldosterona e reabsorção de sódio e água, que levam o aumento da PA. Sabe-se que o aumento do peptídeo ANG II, decorrente do estado hipertensivo, estimula a produção da NADPH oxidase formando ERO no vaso sanguíneo e, consequentemente, estresse oxidativo.

Fonte: Valentim, 2024

A hiperatividade do SRAA está envolvida na fisiopatologia de várias doenças, como doenças cardiovasculares, metabólica, respiratória, neurológica etc. (Vargas *et al.*, 2022) e estudos mais aprofundados detectaram SRAA em outros locais do corpo (músculo, sistema nervoso, ósseo, gônada, gastrointestinal, imunológico, tecido adiposo, pâncreas, fígado, e sistema circulatório (Lavoie e Sigmund, 2003).

Em adendo, o aumento da produção da ANG II estimula NADPH oxidase na formação de ERO no vaso; precisamente nas células endoteliais e no músculo liso, que desencadeia um estresse oxidativo (Masi *et al.*, 2019).

1.5 Estresse Oxidativo

As principais EROs são: ânion superóxidos e radicais hidroxilas, além de peróxido de hidrogênio e peroxinitrito (Griendling e FitzGerald, 2003). Essas espécies são produzidas pelo metabolismo celular, precisamente na: (1) parede dos vasos sanguíneos (2) células vasculares (3) células musculares lisas e (4) fibroblastos adventícios. A mitocôndria é considerada a fonte principal na geração de EROs. As espécies ativas de oxigênio atuam nas moléculas ligantes a jusantes, na regulação do crescimento celular e na contração e relaxamento do vaso (Van thiel *et al.*, 2015), além de na produção de citocinas e anulando partículas estranhas (Jie *et al.*, 2022). O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio redox entre EROs e defesa antioxidantes e oxidação das biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA, além da inibição da síntese de óxido nítrico contribuinte no processo de aterosclerose (Van thiel *et al.*, 2015).

As EROs foram descobertas há 60 anos (Roy *et al.*, 2017), sua ausência leva a doença hereditária e autoimune, já o excesso provoca doença cardíaca e degenerativas (Brieger *et al.*, 2012). A presença de radicais livres nas células vivas foi descoberto por Commoner e colaboradores em 1954, com o uso da técnica de espectroscopia de ressonância evidenciaram esses radicais no músculo esquelético. Na segunda guerra mundial as bombas lançadas apresentavam grande quantidade de radiação afetando a população causando envenenamento e mutações no material genético, com isso, grupos de pesquisas começaram desenvolver trabalhos para desvendar os efeitos da exposição a radiação no corpo humano (Powers *et al.*, 2016). Diante desse exposto, cientistas americanos tinham como teoria que os danos celulares provém dos radicais livres (Gerschman *et al.*, 1954). Esses pesquisadores deram o passo inicial para que outros pesquisadores desenvolvessem novos estudos para a compreensão dos radicais livres na biologia (Powers *et al.*, 2016).

Ânion superóxido (O_2^-) é o resultado da diminuição de um elétron de oxigênio onde permanece em um pequeno espaço de tempo na organela celular, a mitocôndria, e se direciona com a célula. O radical superóxido reage com superóxido dismutase (SOD) produzindo HO e O_2^- também pode reagir com NO e formar ONOO (Jie *et al.*, 2022). O excesso de O_2^- e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) **leva a dano celular podendo reagir com ferro ou cobre gerando radical hidroxila ($-OH$)** (Halliwell, 1992), esse radical é altamente reativo (Barreiros *et al.*, 2006), por outro lado, o H_2O_2 é menos ativo. O H_2O_2

transporta substâncias (elétrons) para formar $-OH$ e oxidar biomoléculas como a proteína pois apresenta resíduos de metionina e tióis como a glutathione (Barreiros *et al.*, 2006). O H_2O_2 é produzido pela dismutação de O_2^- , pois apresenta grande quantidade de SOD (Barreiros *et al.*, 2006) e é eliminado pela catalase e glutathione peroxidase (Halliwell *et al.*, 2000).

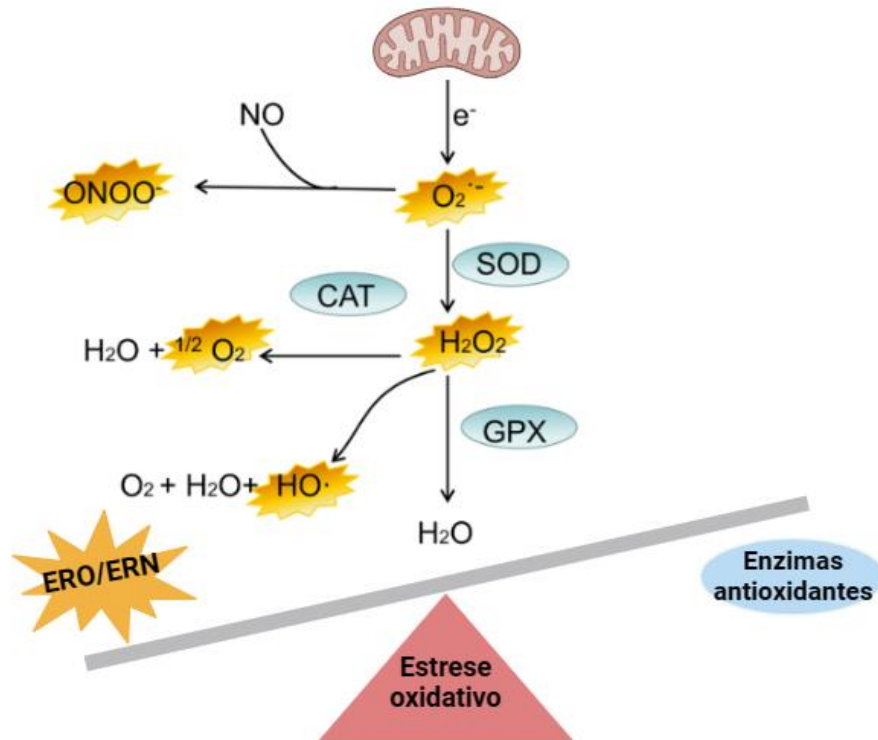
Como descrito no parágrafo acima, os radicais livres causam danos nas moléculas presentes no corpo humano. A lesão no ácido desoxirribonucleico, por exemplo, afeta as bases nitrogenadas possibilitando o surgimento de câncer. Quando os aminoácidos são modificados pode perder sua função ou até mesmo desempenhar uma função distinta (Barreiros *et al.*, 2006). A lipoperoxidação, dos ácidos graxos poli-insaturados (Gaschler e Stockwell, 2017), prejudica o transporte ativo e passivo ou até mesmo levar a uma ruptura da membrana, processo esse desencadeador de morte celular, além do mais, o lipídio oxidado no sangue acumula-se nas paredes dos vasos sanguíneos levando a aterosclerose. O peróxido lipídico é degradado e o seu produto (malondialdeído - degradação de aldeído) é medido através da reação com o ácido tiobarbitúrico, considerado um biomarcador que mede e quantifica esse peróxido (Barreiros *et al.*, 2006). Os radicais livres também originam as enzimas NADPH oxidases, responsáveis no transporte de elétrons das membranas plasmáticas (Barbosa *et al.*, 2010).

A NADPH oxidase, principal fonte de EROS, está envolvida na disfunção endotelial, mudanças da permeabilidade da camada endotelial, processo inflamatório, remodelamento do vaso, crescimento e migração celular, apoptose celular e envelhecimento, que em conjunto provoca hipertensão arterial, aterosclerose, diabetes mellitus e lesão pulmonar aguda/sepsis (Frey *et al.*, 2009). Essa enzima possui subunidades de membrana, gp91phox e p22phox, e citosólica p40phox, p47phox e p67phox (Frey *et al.*, 2009). Estudos relatam que a gp91phox possivelmente está presente no endotélio, túnica adventícia e nas células musculares lisas das arteríolas (Lassegue e Clempus, 2003).

O estresse oxidativo ocorre quando as enzimas antioxidantes do organismo são sobrecarregadas pela produção de ERO (Figura 5). Esse sistema de defesa impede ou diminui as lesões causadas pelos radicais livres ou aqueles radicais que não apresentam elétrons livres (Barbosa *et al.*, 2010). O mecanismo de ação dos antioxidantes é classificado como: prevenção; impossibilita a geração de radicais livres, varredores; impedem a entrada de

radicais na célula; e reparo, remoção das moléculas de DNA danificado e reconstitui membranas celulares lesadas (Koury e Donangelo, 2003)

Figura 5: Reações envolvidas no estresse oxidativo (EO)



Legenda: Formação dos oxidantes e antioxidantes. Em azul antioxidante: SOD, CAT e GPX. Em amarelo oxidante: O_2 , $ONOO^-$, H_2O_2 e $HO^\bullet$. O $O_2^{\bullet -}$ é formado, a partir de elétrons que escapam da cadeia transportadora das mitocôndrias. As setas indicam as reações metabólicas que formam as EROS e nitrogênio.

Fonte: Adaptado Liu *et al*, 2023

O sistema enzimático é constituído por: SOD (catalisa a dismutação do O_2 em H_2O_2), catalase (catalisa a conversão de H_2O_2 em O_2 e H_2O) e glutathiona peroxidase (catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O) (Barbosa *et al.*, 2010); (Vincent *et al.*, 2007). Por outro lado, o sistema não enzimático provém de alimentos como vitaminas, minerais e carotenóides (Barbosa *et al.*, 2010). A SOD é localizada no citoplasma contendo sódio e zinco SOD-Cu/Zn ou na mitocôndria na presença de manganês SOD-Mn (Barbosa *et al.*, 2010). Já a catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) evitam o acúmulo de H_2O_2 , pois esse composto químico pode reagir com Fenton e Haber-Weiss formando $OH^\bullet$ (Barbosa *et al.*, 2010).



A GPx apresenta 8 componentes (GPx1 - GPx8), atuando em regiões distintas (Pei et al, 2023). A GPx1, por exemplo, é uma selenoenzima que diminui peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos. Pode ser encontrada no citoplasma e nas mitocôndrias, além disso, essa enzima protege contra a progressão e desenvolvimento de doenças (Handy e Loscalzo, 2022). Com isso, EO participa na ativação da via intrínseca no interior das células responsável na morte celular (Ogura e Shimosawa, 2014).

1.6 Apoptose

A palavra apoptose foi batizada por três autores Kerr, Wyllie e Currie (Kerr *et al.*, 1972) que relatam em seu estudo os aspectos morfológicos e ultraestruturais. O entendimento dos mecanismos envolvidos da morte celular em humanos se deu a partir da busca de explicações no desenvolvimento do verme nematoide *Caenorhabditis elegans*, demonstrando que a morte celular envolve genes e proteínas específicas e que ambos atuam no interior das células mortas (Horvitz, 1999). Com isso, a apoptose é um processo essencial no desenvolvimento embrionário, na fase do envelhecimento e garante o equilíbrio homeostático (Elmore, 2007), também atua como defesa do hospedeiro descartando células infectadas ativando o sistema imuni (Rodriguez-Gonzalez e Gutierrez-Kobeh, 2023). Há diferença entre necrose e apoptose, vai depender do tipo ou o grau do estímulo provocado. A apoptose precisa de energia para estimular um conjunto de enzimas (caspases) e outros fatores determinantes na fase inicial desse sistema (Elmore, 2007).

Existem três fases da ativação da apoptose: 1) via extrínseca ou de receptor, 2) via intrínseca ou mitocondrial e 3) via da perforina/granzima. As vias principais se diferem na fase inicial de ativação da caspase, já a via perforina atua independentemente da caspase (Rodriguez-Gonzalez e Gutierrez-Kobeh, 2023). Neste trabalho iremos investigar os efeitos da via intrínseca.

A via intrínseca é ativada quando ocorre estímulos que formam sinais no interior das células das mitocôndrias, tais como: queda dos sinais de sobrevivência (Elmore, 2007), lesão do DNA, desequilíbrio redox, acúmulo de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático, radiação, ausência de oxigênio, e privação de nutrientes. Assim, aumenta a permeabilização da membrana externa mitocondrial fazendo que as proteínas pró-apoptóticas Bak e Bax levam

a abertura dos poros e, conseqüentemente, perda do potencial de membrana (Rodriguez-Gonzalez e Gutierrez-Kobeh, 2023).

Em seguida, há um extravazamento do citocromo c do meio interno da mitocôndria para o citosol, além de outras proteínas como o fator indutor de apoptose, endonuclease G, proteína de ligação-IAP direta com baixo pI DIABLO/SMAC e serinoprotease HtrA2/Omi. O citocromo c se liga ao fator ativador de protease apoptótica formando o complexo apoptossomo provomendo ativação da caspase 9 (iniciadora) e posteriormente, ativação da caspase 3 (efetora) ocorrendo mudanças celulares (Rodriguez-Gonzalez e Gutierrez-Kobeh, 2023), estágio esse iniciador da apoptose (Elmore, 2007). Já o fator indutor de apoptose e endonuclease G degradam o DNA em sessão de 50 -300 kb, assim a apoptose acontece com ausência de proteases aspárticas de cisteína. As proteínas SMAC/DIABLO e a enzima serina protease, dependente de caspase, inibem as funções antiapoptóticas. A caspase 3 ativa 1) endonuclease fragmentando o DNA, 2) reorganização citoesquelética e 3) desintegração da célula em corpos apoptóticos (Elmore, 2007).

A família de proteínas Bcl-2 apresenta uma funcionalidade essencial na permeabilidade mitocondrial com 25 genes. A expressão de proteínas anti-apoptóticas são: Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG. Já as proteínas pró apoptóticas são: Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik e Blk. A participação mais importante dessa proteína é a liberação do citocromo c para o citosol (Elmore, 2007).

Estudos evidenciam apoptose em animais hipertensos 2R1C (Matos *et al.*, 2020), e os medicamentos anti-hipertensivos, como a Losartana, tem demonstrado efeitos benéficos sobre apoptose em animais SHR (Yang *et al.*, 2010) e 2R1C (Poasakate *et al.*, 2022).

1.7 Losartana

Losartana é um anti-hipertensivo que bloqueia o receptor AT1 reduzindo a PA. É indicado para o tratamento de pacientes com hipertensão, insuficiência cardíaca (acima de 60 anos de idade) ou aqueles que possuem um quadro de tosse após o uso inibidor da ECA (Al-Majed *et al.*, 2015). Além disso, previne o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda e nefropatia diabética (Al-Majed *et al.*, 2015). O medicamento é ingerido via oral e a redução significativa da PA ocorre entre 3º a 6º semana após a ingestão do primeiro comprimido. A losartana potássica é de 50 mg (1x ao dia), mas dependendo do quadro a dose pode ser

aumentada 100 mg (1x ao dia - uma dose ou duas doses com intervalos) (Al-Majed *et al.*, 2015).

Também chamado de DUP 753, foi descoberto por Duncia e colaboradores (Duncia *et al.*, 1992), sendo o primeiro inibidor da classe dos antagonistas dos receptores da angiotensina, usado até hoje na prescrição médica e presente em muitos trabalhos científicos na compreensão desse medicamento no organismo (Xu *et al.*, 2009).

Apresenta a seguinte fórmula estrutural: 2-butil-4-cloro-1-[2'-(1H-etrazol-5il)(1,1'-bifenil-4il)metil]-1H-imidazol-5-metanol (Xu *et al.*, 2009).

Com relação a farmacocinética, é absorvida entre 1h - 2h e cerca de 14 % de uma única dose é metabolizado em forma ativa E 3174, com meia- vida de 6 a 9 horas (Sica *et al.*, 2005) e com biodisponibilidade de 33% (Al-Majed *et al.*, 2015). Considerado um controle positivo em estudos experimentais, um trabalho publicado recentemente demonstrou que Losartana apresenta efeito renoprotetor e antioxidante no modelo 2R1C (Poasakate *et al.*, 2022), além de impedir a expressão da proteína BAX e normalizar apoptose no ventrículo esquerdo de animais SHR na dose de 20 mg x kg (-1) x d(-1) (Fortuno *et al.*, 1998). Pacientes com cardiomiopatia hipertrófica não obstrutiva tratados com losartana por 1 ano, resultou na atenuação da progressão da hipertrofia miocárdica e fibrose (Shimada *et al.*, 2013). Muitos artigos científicos comparam Losartana com o Enalapril, outro medicamento indicado para o tratamento da PA.

1.8 Enalapril

Os fármacos denominados inibidores da ECA (captopril, enalapril, lisinopril e fosinopril), existem há 50 anos, considerado primeira linha para o tratamento de doenças que afetam coração, artérias e veias (Vargas *et al.*, 2022). Uma substância chamada de nonapeptídes, presente no composto tóxico das serpentes, *Bothrops jararaca*, bloqueia, por via intravenosa, a enzima conversora. Esse estudo abriu caminhos para elaboração de novas pesquisas que auxiliaram o surgimento da nova classe de inibidores da ECA (Ferreira, 1965).

Na fase IV de pesquisa clínica notou que esses inibidores levaram efeitos adversos como tosse e angioedema (Vargas *et al.*, 2022). O Enalapril bloqueia a formação da ANG II, diminui a resistência vascular periférica, e consequentemente, reduz a PA. Além do mais, somente uma dose oral ao dia, seja de 5 a 40 mg, provoca redução da pressão de pacientes

com hipertensão primária ou secundária em um período longo de tratamento. Um ponto positivo, é que caso tenha uma interrupção definitiva do medicamento, não adquire efeito rebote (Todd e Goa, 1992).

O Enalapril além de apresentar melhora nas doenças cardíacas também apresentou efeito benéfico na função renal (Todd e Goa, 1992). Após a sua administração, é metabolizado no fígado transformando em sua forma ativa, chamado de enalaprilat com concentração sérica de 3 a 4 horas, e apresenta biodisponibilidade de 40 % (Todd e Goa, 1992).

1.9 Espironolactona

O Espironolactona, antagonista do receptor mineralocorticoide com efeito diurético, foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para comercialização, em 1960, inserida como novo medicamento para tratar hipertensão arterial (Agrawal *et al.*, 2015). Esse medicamento bloqueia a ligação da aldosterona ao seu receptor no final do túbulo distal, o que resulta na redução de reabsorção de sódio e redução da excreção de potássio. Possui pico de ação de 2,6 - 4,3 horas e meia vida de 13,8 horas, com dose usualmente utilizada na redução da PA de 12,5 - 50mg (Mello *et al.*, 2020).

Essa droga reduziu internações de pacientes com insuficiência cardíaca e fração de ejeção do ventrículo esquerdo preservada. De acordo com o estudo de meta-análise, com base em três estudos clínicos randomizados, concluiu-se que o medicamento apresenta condições satisfatórias na estrutura e função cardíaca desses enfermos (Ferreira *et al.*, 2023).

O trabalho que usamos como referência sobre a dosagem de 25mg/kg/dia na hipertensão de Goldblatt, demonstrou redução da PA, reverteu a disfunção endotelial, remodelamento vascular, reduziu o EO e a expressão de metaloproteinases (Ceron *et al.*, 2010).

Também conhecido como efeito off label, pode apresentar efeitos anti-androgênicos, sendo indicado para o tratamento da acne, hidradenite supurativa, queda de cabelo e hirsutismo em mulheres (Searle *et al.*, 2020). Com relação a doença renal crônica, apresenta chances na melhora desses indivíduos, embora seja necessário ter atenção no risco de desenvolver níveis elevados de potássio no sangue (Yang *et al.*, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar as alterações morfofuncionais da carótida comum de ratos *Wistar* induzidos ao modelo de HR 2R1C após o tratamento com Losartana, Enalapril ou Espironolactona.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da administração de Losartana, Enalapril ou Espironolactona na (no):

- a) Variação da PAS;
- b) Expressão dos principais componentes do SRAA;
- c) Dano oxidativo através dos marcadores do estresse oxidativo e enzimas antioxidantes;
- d) Na apoptose através dos componentes da via intrínseca.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e grupos experimentais

O protocolo de manuseio e experimentação foi aprovado pela comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais (Aprovação CEUA nº 019/2017 e renovação CEUA nº 001/2023) na Universidade do Estado do Rio de Janeiro UERJ, no Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes IBRAG.

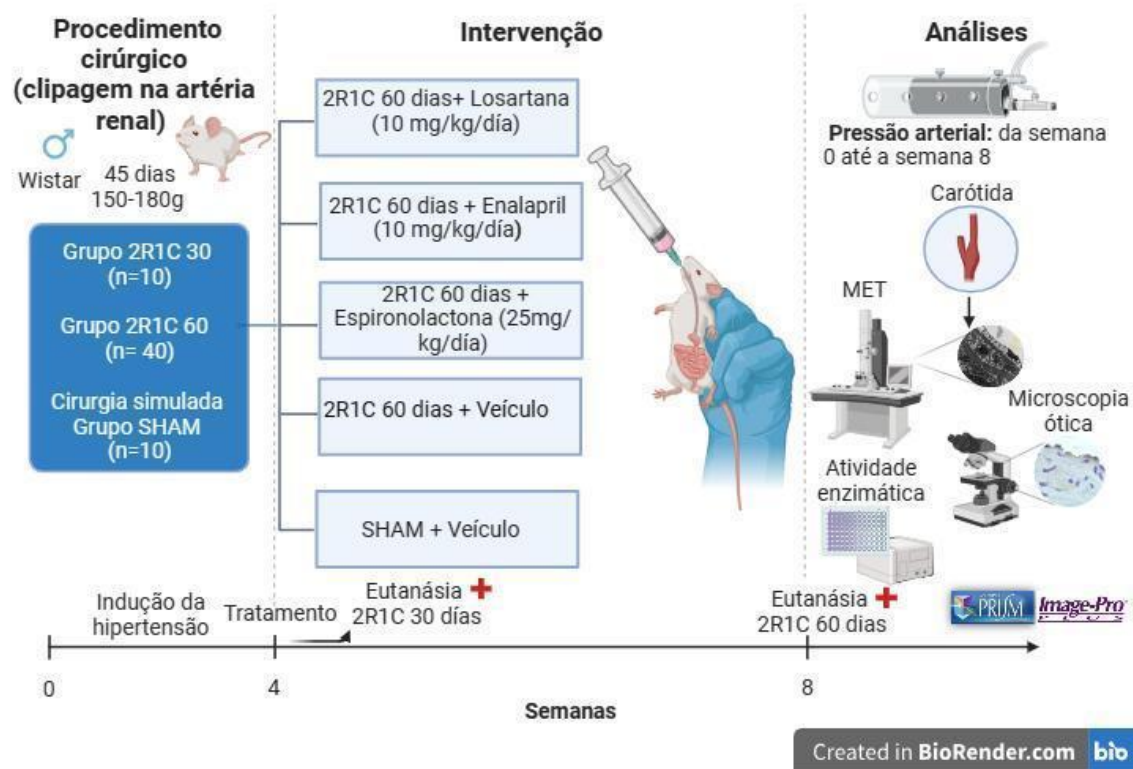
Nesse estudo foram utilizados 60 ratos *Wistar* machos com 45 dias de idade pesando entre 150-180g, mantidos no biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ em ambiente com temperatura e umidade controladas (21 ± 20 C, $60 \pm 10\%$, respectivamente), submetidos a ciclo de luz invertido de 12 horas (claro/escuro) (luzes artificiais, 19:00-07:00h) e exaustão 15min/h. Os animais tiveram livre acesso a ração balanceada padrão própria para rato, e água *ad libitum*.

O desenho experimental teve a duração total de 8 semanas. Ao marco inicial, todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico, de modo que em 50 animais foi realizada a estenose da artéria renal esquerda através da colocação de um clipe de prata em formato de U com espessura de 0,2 mm, conforme o modelo de Goldblatt 2 rins e 1 clipe (Goldblatt *et al.*, 1934). Os outros 10 animais sofreram uma cirurgia simulada, onde realizaram o mesmo procedimento cirúrgico, porém sem receberem o clipe de prata, sendo assim denominados de grupo SHAM. Nas primeiras 4 semanas ocorreu a indução da hipertensão e, a partir da 5ª semana os dois grupos (SHAM e 2R1C) foram subdivididos em 6 subgrupos de acordo com o tratamento recebido:

- Grupo SHAM: receberam administração de água via gavagem orogástrica nas últimas 4 semanas (N=10);
- Grupo 2R1C 30 dias: não receberam administração de água ou tratamento (N=10);
- Grupo 2R1C 60 dias: receberam administração de água via gavagem orogástrica nas últimas 4 semanas (N=10);
- Grupo 2R1C 60 dias + Losartana: receberam administração de Losartana na dose de 10mg/kg/dia via gavagem orogástrica nas últimas 4 semanas (N=10);
- Grupo 2R1C 60 dias + Enalapril: receberam administração de Enalapril na dose de 10mg/kg/dia via gavagem orogástrica nas últimas 4 semanas (N=10);
- Grupo 2R1C 60 dias + Espironolactona: receberam administração de Espironolactona na dose de 25mg/kg/dia via gavagem orogástrica nas últimas 4 semanas (N=10).

Além disso, na 4ª semana os animais do grupo 2R1C 30 dias foram eutanasiados e não foram submetidos a intervenção (Figura 6).

Figura 6: Desenho experimental



Legenda: O experimento teve duração de 8 semanas. A partir da 1ª semana os ratos *wistar* machos com 45 dias foram submetidos a um procedimento cirúrgico onde os animais denominados 2R1C receberam um clipe de prata na artéria renal esquerda e os animais SHAM foram submetidos a cirurgia sem o implante do clipe. A partir da 4ª semana até a 8ª semana, os 5 subgrupos foram tratados com losartana, enalapril, espironolactona ou placebo (água), via gavagem. Na quarta e na oitava semana ocorreu a eutanásia e a artéria carótida dos animais foram retirada para posteriores análises. Além disso, ocorreu a aferição da PAS de todos animais (semana 0 até semana 8).

Fonte: Valentim, 2024

3.2 Indução da Hipertensão Renovascular (HR)

O método de Goldblatt, conhecido como modelo 2 rins e 1 clipe, foi realizado com o intuito de induzir a HR a partir da estenose parcial (> 60%) da artéria renal do rim esquerdo, mantendo o rim direito (contralateral) preservado. Inicialmente, os animais foram anestesiados na região intraperitoneal com ketamina (0,8 mg/kg) e xilazina (0,2 mg/kg) e após

certificado que o animal estava devidamente anestesiado, foi realizada a tricotomia, seguida pela assepsia do abdome com álcool 70% e laparotomia, com uma incisão na região da linha alba para exposição do conteúdo da cavidade retroperitoneal a localização e o isolamento da artéria renal esquerda. Em seguida um clipe de prata, pré calibrado com o diâmetro de 0,2 mm, foi implantado na artéria renal esquerda do animal. Os animais do grupo SHAM também foram submetidos ao procedimento cirúrgico, mas o rim esquerdo não foi clipado.

Após o procedimento cirúrgico, a incisão foi suturada com a utilização de fios absorvíveis Vicryl 4.0, realizada a assepsia local com polvidine e analgesia com novalgina 0,3ml por administração retal e também misturada na água de beber por 3 dias consecutivos. No pós operatório os animais foram acompanhados durante 7 dias.

3.3 Análise da pressão arterial sistólica (PAS)

A análise da PAS foi realizada através do método não invasivo de pletismografia da artéria caudal (Figura 7) Kent Scientific, CODA™ Noninvasive Blood Pressure System, EUA. Nas duas semanas que antecederam o experimento, os animais foram aclimatados ao aparelho para minimizar o estresse durante as aferições da PAS. As aferições da PAS foram feitas semanalmente da semana 0 até a semana 8, em todos grupos experimentais, com os animais conscientes. Para obter uma medição precisa, os animais foram previamente aquecidos com a luz infravermelha até atingir uma temperatura caudal superior a 32° graus, em seguida, foi inserido um *cuff* e um sensor de pulso que registra a pressão de volume -VPR- ao redor da cauda de cada animal. Estes foram conectados ao registrador, o qual insufla e exsufla automaticamente o *cuff*, e detecta o desaparecimento e o aparecimento da onda de pulso na artéria caudal determinando, assim, a PAS. A média de três aferições de cada animal foi utilizada.

Figura 7: Medidor de pressão arterial - método não invasivo.



Legenda: Figura ilustrativa do medidor de pressão. A medição da PAS dos animais, nesse experimento, foram realizadas separadamente, um animal por vez. Foi inserido na cauda do animal um *cuff* e um VPR determinando a PAS.

Fonte: Kent Scientific, CODA™ Noninvasive Blood Pressure System, EUA.

3.4 Eutanásia, obtenção do sangue e amostras teciduais

Na 4ª ou na 8ª semana de experimentação, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com ketamina (0,8 mg/kg) e xilazina (0,2 mg/kg). Em seguida, as amostras de sangue foram extraídas por punção cardíaca e colocadas em tubos previamente heparinizados (0,1 ml), sendo imediatamente centrifugado a 819 x g por 10 min, à temperatura ambiente, recolhido o plasma e armazenado no freezer a -20°C para posteriores análises bioquímicas.

Em seguida, as artérias carótidas direita e esquerda foram cuidadosamente dissecadas, retiradas e clivadas sendo armazenadas em paraformaldeído 4%, ou glutaraldeído 2,5% ou congeladas em refrigeração a -80°C com ou sem crioprotetor.

3.5 Microscopia ótica

As amostras da artéria carótida foram preservadas em paraformaldeído 4% por 48hs, em seguida o tecido foi clivado e colocado em cassete histológicos com identificação. Inicialmente, as amostras foram lavadas por 30 minutos em água corrente. Após a lavagem, as amostras foram desidratadas em banhos de 20 minutos cada em concentrações crescentes de álcool (70%, 90%, 100%, 100%). Posteriormente, as amostras foram clarificadas com dois banhos de xilol por 15 minutos cada, e impregnadas com dois banhos de 30 minutos em parafina líquida (Paraplast Plus Sigma-Aldrich, Estados Unidos) na estufa a 60°C. Em seguida, esses fragmentos foram incluídos no plano transversal no inclusor de parafina (Leica - HistoCore Arcadia) para produção do bloco. Os blocos foram cortados na espessura de 3 µm no micrótomo (American Optical, modelo Spencer, Estados Unidos) e inseridos em lâminas

revestidas com polyisina (Sigma-Aldrich -Alemanha) para os procedimentos imunohistoquímicos.

Para realização da técnica de imunohistoquímica, as lâminas foram colocadas na estufa a 60° graus por 24 horas. Os cortes foram desparafinados com xilol (2x por 2 minuto cada) e hidratados em série decrescente de álcool/água (100%, 100%, 90% e 70%, água destilada) por 2 minutos. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6 ou Tris EDTA pH 9 (dependendo do anticorpo primário) por 20 minutos a 90°C. Para neutralizar a peroxidase endógena utilizou o peroxidase block (Novocastra, Leica, EUA) por 5 minutos, seguido por 2 lavagens com tampão tris (TBS) por 5 minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados com PBS/BSA a 3% por 20 minutos a temperatura ambiente para não ocorrer marcações inespecíficas dos anticorpos e então foram incubados com anticorpos primários diluídos em TBS em câmara úmida *overnight* a 4°C (ver tabela 1). Após as lavagens com TBS, os cortes foram incubados com os reagentes do kit Novolink polymer (Leica, EUA) por 30 minutos. Após lavagens com PBS, os produtos da imunorreação foram visualizados usando o reagente diaminobenzidina (DAB) (Dako, Estados Unidos) e contracolorados com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram então desidratadas em concentrações crescentes de álcool, 70%, 90%, 100% e clarificadas em xilol e montadas com Entellan (Sigma-Aldrich -Alemanha) e lamínulas e observadas ao microscópio óptico (Olympus BX53 com câmera Olympus DP72 acoplada, Japão). O controle negativo da reação foi obtido omitindo a etapa de incubação do anticorpo primário.

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados na Imunohistoquímica.

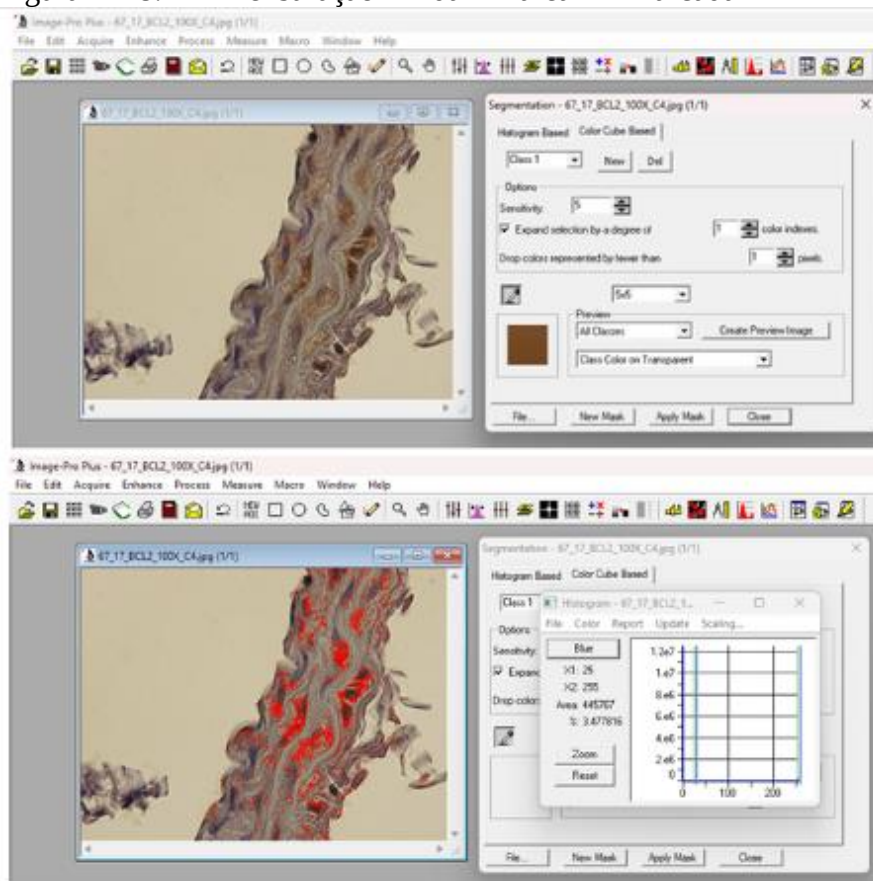
Anticorpo Primário	Código	Diluição	Recuperação Antigênica
Anti-Bax	sc-20067	1:500	Tampão citrato pH 6
Anti-Bcl-2	sc-7382	1:500	Tampão citrato pH 6
Anti-citocromo c	sc-13156	1:100	Tampão citrato pH 6
Anti-Caspase clivada	3 D175	1:100	Tris EDTA pH 9
Anti-CYBB	PA1667	1:1500	Tampão citrato pH 6
Anti-GPX1	PB9203	1:1500	Tampão citrato pH 6

Legenda: Anticorpos primários, código, diluição e tipo de recuperação antigênica utilizados nas imunohistoquímicas de lâminas com cortes histológicos de carótida.

Fonte: Valentim, 2024

Para a quantificação das marcações imunohistoquímicas foram realizados cortes histológicos não seriados de cada animal e obtidas vinte e cinco imagens aleatórias de cada grupo (N=5 animais/grupo) na objetiva de 100x. Todas as imagens foram obtidas no formato JPEG, cor 36-bit, 1360x1024 pixels a partir do microscópio de luz Olympus BX40 (Olympus, Tokyo, Japão) acoplado com câmera Olympus DP71. As mensurações foram efetuadas com o programa Image-Pro Plus versão 7.0 da Media Cybenetics sendo considerado marcado as regiões acastanhadas presente na túnica íntima e média (região de interesse) em comparação às regiões não marcadas do vaso, obtendo-se assim a porcentagem da área de interesse sobre a totalidade do vaso (figura 8). Os valores de ambas as regiões foram colocadas em uma planilha, somados e inseridos na seguinte fórmula: $\text{área marcada} \times 100 \div \text{área total}$.

Figura 8: Mensuração da área marcada - Região de interesse



Legenda: Figura ilustrativa da mensuração nas regiões de interesse acastanhadas (túnica íntima e média), usando o ícone conta gotas na aba segmentation (color cube Based). Em seguida, a porcentagem da área de interesse foi coletada no histograma.

Fonte: Valentim et al, 2023

Para realização da técnica de rotina hematoxilina e eosina, foram inseridas as lâminas na estufa de 60° por 24 horas. Os cortes foram desparafinados e hidratados por 2 minutos em cada banho. Em seguida, foram lavadas na água destilada. Logo após, as lâminas são imersas no corante hematoxilina por 2 minutos, depois o excesso do corante nas lâminas foram retiradas com água corrente. As lâminas são coradas com eosina por 2 minutos e o excesso do corante nas lâminas foram retiradas na água destilada. Desidratar e clarificar e, posteriormente, foi realizada a montagem das lâminas. As lâminas coradas foram observadas no microscópio óptico (Olympus BX53 com câmera Olympus DP72 acoplada, Japão) na objetiva de 40x.

3.6 Microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliação dos aspectos ultraestruturais, as carótidas (N=3/grupo) foram fixadas em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, a 4°C por 24hs. O material foi clivado e lavado com tampão cacodilato de sódio 0,1M por 3 vezes durante 30 minutos. Em seguida, foi realizado a pós fixação em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1,6% e CaCl₂ 10mM por 1 hora. Após as lavagens com o tampão cacodilato de sódio 0,1M por 2 vezes com 5 minutos cada, o material foi desidratado por uma série crescente de acetona, 30, 50, 70, 90, 100% e 100% por 15 minutos em cada fase. Posteriormente, o material foi infiltrado com acetona e resina EPON-812 (TedPella, Estados Unidos) 25mL de Epon 812, 17 mL de anidrido metil náutico (MNA), 8 mL de anidrido dodecenil succínico (DDSA), 32 gotas de 2,4, tridimetilaminametilfenol (DMP) nas proporções de 2:1 por 2h, 1:1 por 2h e 1:2 por 2h. Após essa etapa, as artérias carótidas foram colocadas na resina EPON-812 pura *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram inseridas em nova resina EPON e deixadas por 4 horas em frascos abertos dentro da capela, e finalmente, foram alocadas em moldes de silicone com nova resina EPON pura na qual foi polimerizada em estufa a 60°C por 72hs para obtenção dos blocos. Cortes seminfinos (1 micrômetro) foram obtidos e corados com azul de toluidina para a seleção da área de interesse, posteriormente, cortes ultrafinos (70 nm) das áreas selecionadas foram obtidos no ultramicrotomo (Leica Ultracut-UCT, Leica Aktiengesellschaft, Áustria), contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo e visualizados no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM 1011, em 80 kV (JEOL, São Paulo, Brasil) da Plataforma de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal Fluminense.

3.7 Atividade Enzimática

Para a quantificação da atividade das enzimas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo, as artérias carótidas direitas obtidas (N=5/grupo) foram maceradas no socador com o tampão KPE, centrifugadas 2500rpm (ou 661 xg) por 10 minutos à 4°C com posterior coleta do sobrenadante. A quantificação de proteínas foi realizada pelo o método de BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit - Thermo Scientific™) onde a solução foi diluída na proporção 1:60 25µl da amostra diluídas foram inseridas na placa de 96 poços. A placa foi colocada na estufa de 60°C por 15 minutos protegida da luz. Após esse período, ocorreu a leitura no espectrofotômetro (LTK INNO) a 562 nm.

Para dosagem da CAT, foi adicionado na placa UV a amostra e o reagente oxidante [H₂O₂] = 4,8x10⁻⁵ mg/ml (Sigma-Aldrich Catalase from bovine liver-C9322-5G). Posteriormente, a leitura foi feita por fileira a 240nm no espectrofotômetro por 1 minuto com intervalo de 30 segundos (com a execução de 3 leituras T₀, T₃₀ e T₆₀ – T: 1' ; ΔT 30").

Para dosagem da SOD, utilizamos uma placa de 96 poços de fundo chato e colocamos os regentes na seguinte ordem: tampão glicina (1M pH 10), amostra triplicada, CAT (2,4mg/ml) e epinefrina (20mg/ml). Em seguida, a leitura foi realizada por fileiras no espectrofotômetro à 480nm durante 3 minutos com intervalo de 10 segundos para cada leitura (T: 3' ΔT 10").

Para a realização do ensaio do *Thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS), foi adicionado em um microtubo 100µl da amostra acrescido de ácido tricloroacético TCA (Sigma-Aldrich -T6399) e em seguida, foi centrifugado em temperatura ambiente por 15 minutos, sendo então recolhido o sobrenadante. O sobrenadante e o TBA (Sigma-Aldrich – T5500) foram aquecidos no banho-maria a 95°C por 10 minutos e posteriormente, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 532nm.

Para GPx, o tampão KPE foi colocado no primeiro poço na placa designado como o branco para verificar a taxa de decaimento não enzimático. As amostras foram adicionadas nos poços restantes (Tampão KPE + amostra + GSH + GR) e pré incubada por 10 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Após essa etapa o NADPH foi inserido para agitação e leitura por 3 minutos (ΔT = 10s) para monitorar o decaimento. Em seguida, houve a leitura por 5 minutos do H₂O₂. Espectrofotômetro: λ = 340 nm; t:300 s; ΔT = 10 s). GSH (Sigma-Aldrich-G1404), GR (Sigma-Aldrich-G3664) e NADPH (Sigma-Aldrich-N5130).

3.8 ELISA

Foi realizada a quantificação de Aldosterona (ELISA competição), kit Abcam - Aldosterone ELISA (Kit #ab136933). No primeiro momento foi realizado o preparo dos reagentes: a) 5µl Aldosterone alkaline phosphatase conjugate + 20µl do assay buffer, b) 5µl de wash buffer + 95 mL de água deionizada. Em seguida foi feito o preparo da curva padrão e da amostra (para 1 poço 50µl da amostra + 150 µl do Assay buffer, para 2 poços 75µl da amostra + 225 µl do assay buffer) com análise em duplicata. Após isso, a placa foi selada e incubada a 4°C *overnight* sem homogenização. No dia seguinte, os poços foram esvaziados e foi realizado 3 lavagens com 300µl de Wash buffer 1x. O Wash buffer 1x foi descartado e a placa foi secada com auxílio de papel toalha. Depois foi adicionado 5µl de Aldosterone alkaline phosphatase conjugate diluído 1:5 nos poços que contêm atividade total. Em seguida, foi adicionado 200µl de pNpp Substrate em todos os poços e incubados por 1h sem agitação. Também foi adicionado 50µl da Stop solution em cada poço e realizado imediatamente a leitura a 405 nm, 570 nm e 590 nm.

Cálculo da concentração de aldosterona (pg/mL). 1) Subtrair a média da D.O. de branco de toda placa, 2) Calcular a média da D.O. do padrão e das amostras, 3) Calcular a ligação de cada par de poços do padrão como a % de ligação máxima do poço, 4) Plotar a % de ligação e Average Net STD OD versus a concentração da curva padrão de aldosterona e 5) Interplotar as D.OS das amostras com a curva padrão da aldosterona.

3.9 Análise Estatística

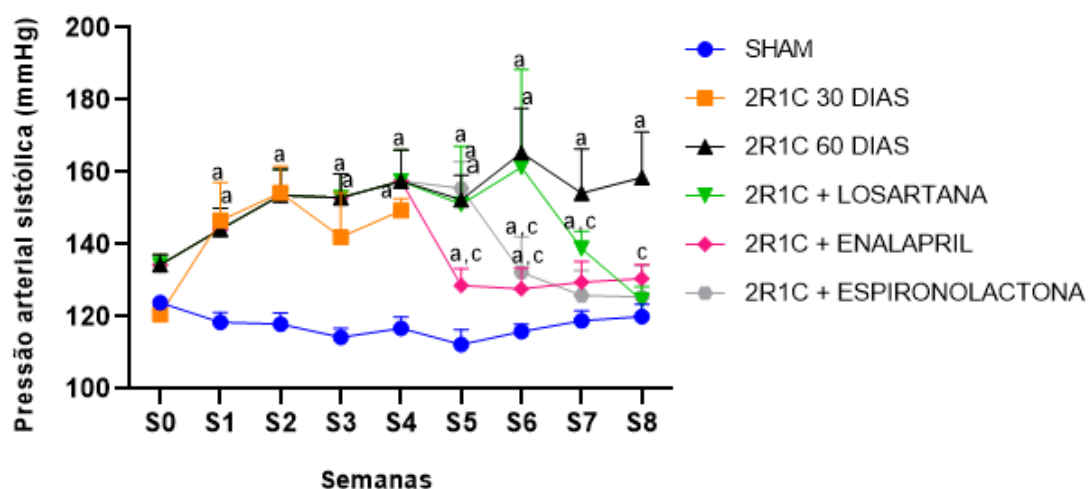
Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pela comparação entre os grupos, e as diferenças entre eles foram testadas. Todos os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) one-way com pós-teste de Tukey. Os dados foram considerados significativos com o $P < 0,05$. O software *Graphpad Prism* versão 8.0 para *Windows* (GraphPad Software, Estados Unidos) foi utilizado para realização das análises estatísticas e para a confecção dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS)

A PAS dos animais foi verificada semanalmente durante todo o período do experimento, da semana zero até a 8ª semana e pode ser observada na figura 8. No início do experimento (semana 0) não se observou nenhuma diferença significativa na PAS entre os diferentes grupos estudados. Os animais do grupo SHAM permaneceram com a PAS constante da semana zero até a oitava semana (de $123,9 \pm 1,9$ mmHg para $120,1 \pm 7,6$ mmHg). Os animais do grupo hipertenso trinta dias apresentaram um aumento da PAS significativo em relação ao grupo SHAM a partir da primeira semana e se manteve elevada até a quarta semana (de $146,7 \pm 23,4$ mmHg para $149,3$ mmHg $\pm 7,6$). Os animais hipertensos 60 dias apresentaram aumento gradativo e significativo da PAS, quando comparado ao grupo SHAM da primeira semana até a oitava semana (de $144,2 \pm 26,0$ mmHg para $158,5 \pm 28,1$ mmHg). A partir da quinta semana houve administração dos medicamentos, e o grupo hipertenso tratado com Losartana apresentou uma redução da PAS a partir da sétima semana ($138,9 \pm 10,7$ mmHg) quando comparado ao grupo hipertenso sem tratamento. Já os animais tratados com Enalapril apresentaram uma queda da PAS a partir da quinta semana ($128,6 \pm 10,4$ mmHg), e os animais tratados com Espironolactona apresentaram uma queda da pressão a partir da sexta semana ($132,3 \pm 21,9$ mmHg) quando comparados ao grupo hipertenso. Na oitava semana os grupos tratados apresentaram níveis da PAS próximo ao grupo SHAM (Losartana $124,5 \pm 8,5$ mmHg, Enalapril $130,5 \pm 7,9$ mmHg e Espironolactona $125,4 \pm 19,4$ mmHg) (Figura 9).

Figura 9: Evolução da pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg) dos animais estudados.



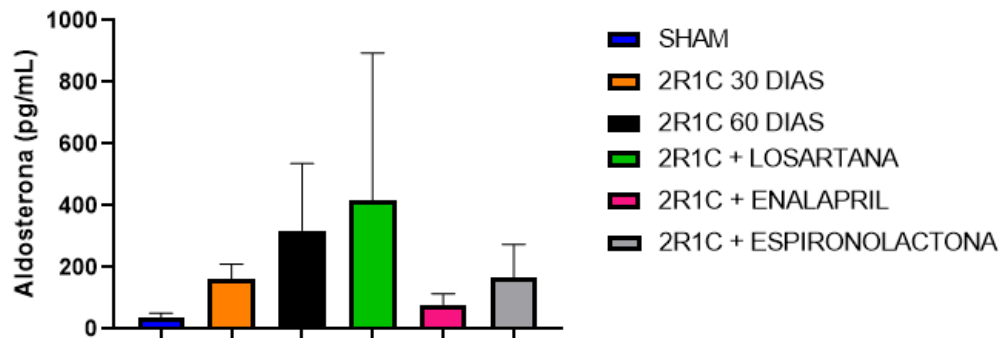
Legenda: (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM. (c) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo 2R1C 60 dias. Abreviatura: S= semanas. N=5 para todos os grupos experimentais.

Fonte: Valentim, 2024

4.2 ELISA - Aldosterona

Foi realizada a técnica de ELISA para avaliar níveis plasmáticos de Aldosterona. Não houve diferença significativa entre os grupos, porém observamos tendência de aumento no grupo 2R1C 60 dias. (Figura 10).

Figura 10: Dosagem de Aldosterona (pg/mL) dos animais estudados.



Legenda: Conteúdo plasmático de Aldosterona. N=5.

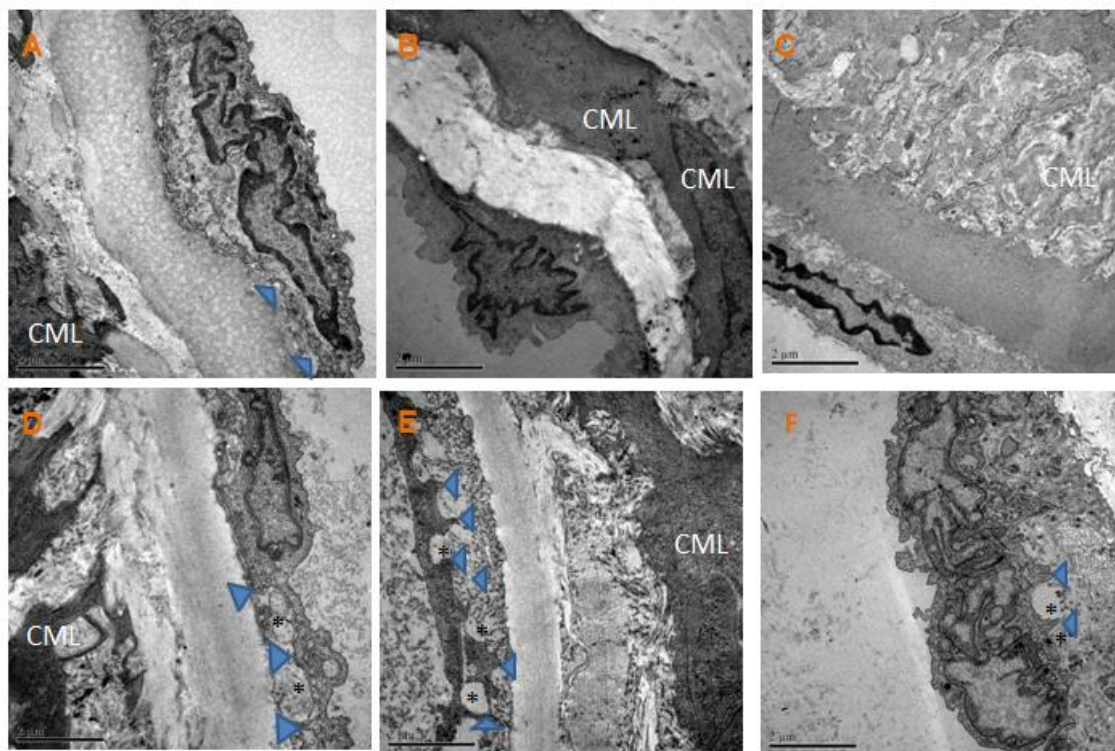
Fonte: Valentim, 2024

4.3 Avaliação ultraestrutural da artéria carótida

Na figura 11 observamos a análise ultraestrutural da parede da artéria carótida dos grupos experimentais no grupo SHAM (A), o endotélio demonstra arquitetura regular apoiado em membrana basal contínua, apresentando células endoteliais de aspecto achatado com núcleo (N) lobulado e heterocromatina periférica. No citoplasma são visualizadas poucas mitocôndrias e moderadas vesículas, com algumas vesículas se fusionando à membrana celular (cabeças de setas). A lâmina elástica limitante interna (LELI) se mostrou preservada e as CML dispostas entre as fibras elásticas e exibindo projeções citoplasmáticas e predomínio de proteínas contráteis no citoplasma e poucos ribossomos (perfil contrátil). No grupo 2R1C 30 dias (B) o endotélio exibe características semelhantes ao grupo SHAM, no entanto, a LELI demonstra aspecto mais eletrólúcido que pode sugerir menor conteúdo elástico. As CML demonstram aspecto mais arredondado, menor número de projeções e aumento de vesículas e polirribossomos, sugerindo um perfil mais secretório. No grupo 2R1C 60 dias (C), as células endoteliais achatadas apresentam núcleo lobulado com heterocromatina periférica mais eletrondensa. O endotélio exibe pouca adesão a membrana basal e LELI (cabeças de seta), sendo esta última de aspecto ramificado. A camada muscular exibe células com muitas

projeções citoplasmáticas e possível aumento de polirribossomos estando dispostas transversalmente às lâminas elásticas, sugerindo, alteração de perfil contrátil para um perfil secretório. Ainda foram observadas algumas células musculares com características morfológicas de apoptose (dados não mostrados). Nos grupos tratados, 2R1C+L (D), 2R1C+E (E) e 2R1C+ESPI (F), o endotélio apresentou células endoteliais exibindo aspecto achatado com núcleo lobulado e fina heterocromatina periférica. No citoplasma são visualizadas poucas mitocôndrias e aumento de vesículas, muitas se fusionando com a membrana celular (cabeças de setas). A LELI se mostrou preservada e as CML dispostas entre as fibras elásticas e exibindo projeções citoplasmáticas e predomínio de proteínas contráteis no citoplasma e poucos ribossomos (perfil contrátil), sugerindo que os tratamentos previnem as alterações induzidas pela hipertensão observada nos aspectos ultraestruturais do grupo 2R1C 60 dias.

Figura 11: Análise ultraestrutural da artéria carótida dos animais dos grupos experimentais



Legenda: Micrografias eletrônicas da artéria carótida comum mostrando a túnica íntima e média. A: SHAM, B: 2R1C 30 dias, C: 2R1C+60 dias, D: 2R1C+L, E: 2R1C+E e F: 2R1C+EspI. Ampliação: 10.000x. Barra de calibração 2μm. Membrana basal: ponta de seta. Vesículas: asteriscos. Célula muscular lisa: CML.

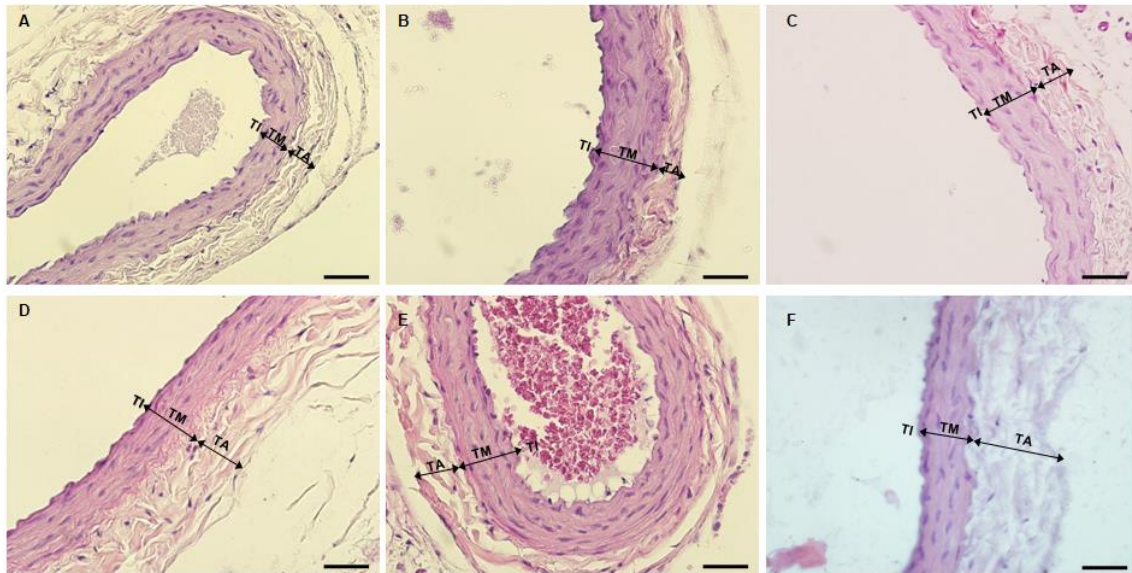
Fonte: Valentim, 2024

4.4 Coloração de Hematoxilina e Eosina

Para observar os componentes da carótida foi realizado a coloração de rotina com hematoxilina e eosina. A hematoxilina possui afinidade com substâncias ácidas como os núcleos e cora em roxo. A eosina cora substâncias básicas como o citoplasma, apresentando

uma coloração em róseo ou avermelhado. Como mostra a figura 12, temos o núcleo e o citoplasma corado conforme relatado acima, além disso os traços estão indicando as três túnicas.

Figura 12: Coloração de hematoxilina e eosina na artéria carótida dos grupos experimentais.



Legenda: Fotomicrografias da coloração hematoxilina e eosina na artéria carótida dos grupos experimentais: A: SHAM, B: 2R1C 30 dias, C: 2R1C 60 dias, D: 2R1C+Losartana e E: 2R1C+Enalapril e F: 2R1C+ESPI. Objetiva 40X. Barra de calibração: 50µm. TI: túnica íntima, TM: túnica média e TA: túnica adventícia. O traço indica o local de cada túnica.

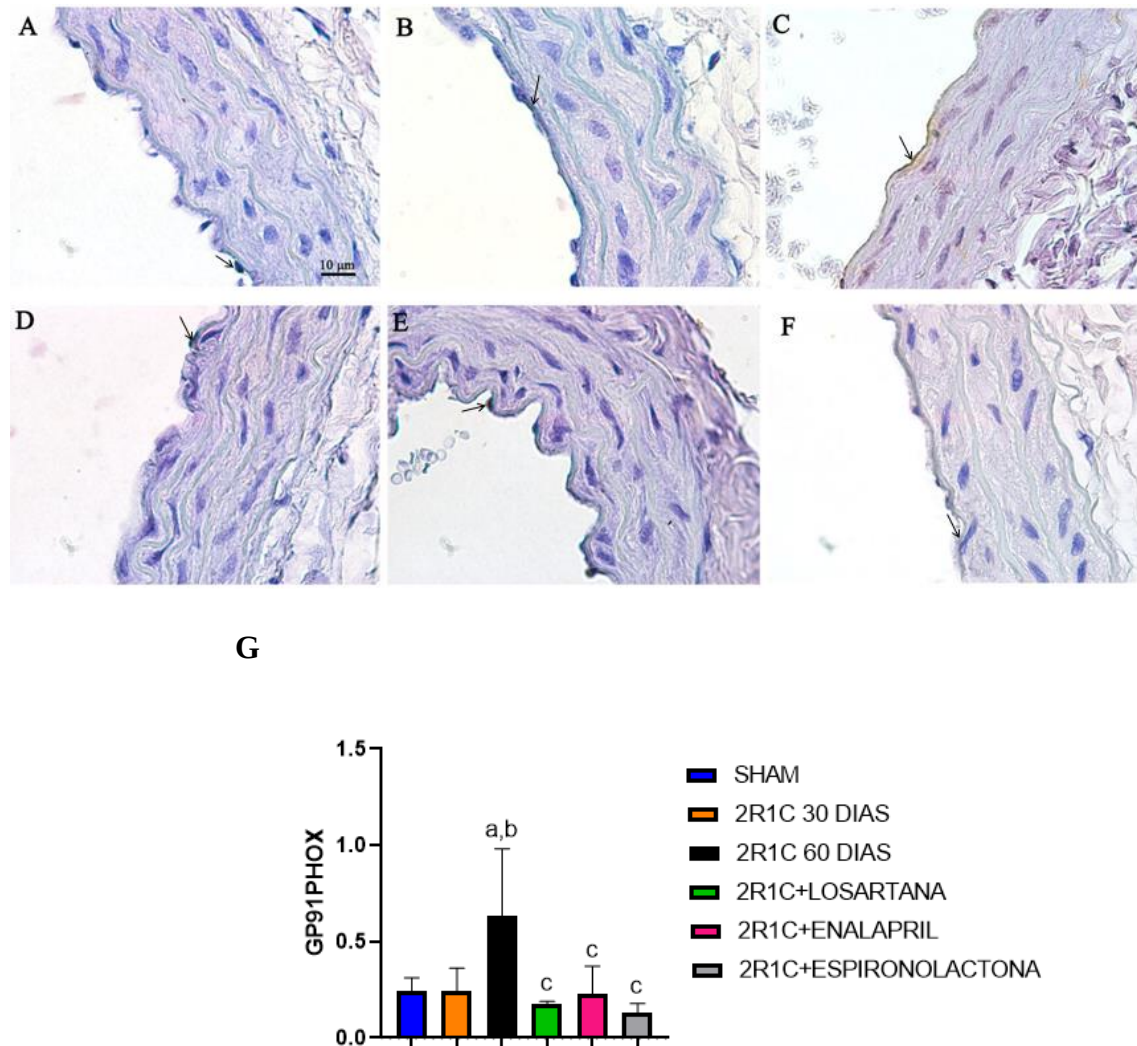
Fonte: Valentim, 2024.

4.5 Avaliação e quantificação da expressão de GP91phox e GPX1 por imunohistoquímica

Na figura 13 observamos a imunohistoquímica para a subunidade GP91phox da NADPH oxidase 2, uma das principais enzimas envolvidas no aumento do dano oxidativo. Houve marcação na túnica íntima e em parte da túnica média um pouco mais evidente no grupo 2R1C 60 (C) quando comparado a todos os outros grupos. Os grupos SHAM (A), 2R1C 30 (B), 2R1C+L (D), 2R1C+E (E) e 2R1C+ESPI (F) demonstraram marcação para a GP91phox de intensidade semelhante restrita às células endoteliais na túnica íntima, conforme indicado pelas setas finas. A quantificação da imunohistoquímica para a subunidade GP91phox da NADPH oxidase 2, demonstrou aumento significativo da expressão de GP91phox no grupo 2R1C 60 ($P<0,05$) quando comparado com os demais grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos SHAM, 2R1C 30, 2R1C+L, 2R1C+E e 2R1C+ESPI. O

tratamento com os inibidores do SRAA parece ser capaz de prevenir o aumento da expressão da subunidade GP91phox da NADPH oxidase 2.

Figura 13: Imunomarcção e quantificação do anticorpo anti-CYBB para a subunidade GP91phox da NADPH oxidase 2 na artéria carótida dos grupos experimentais.



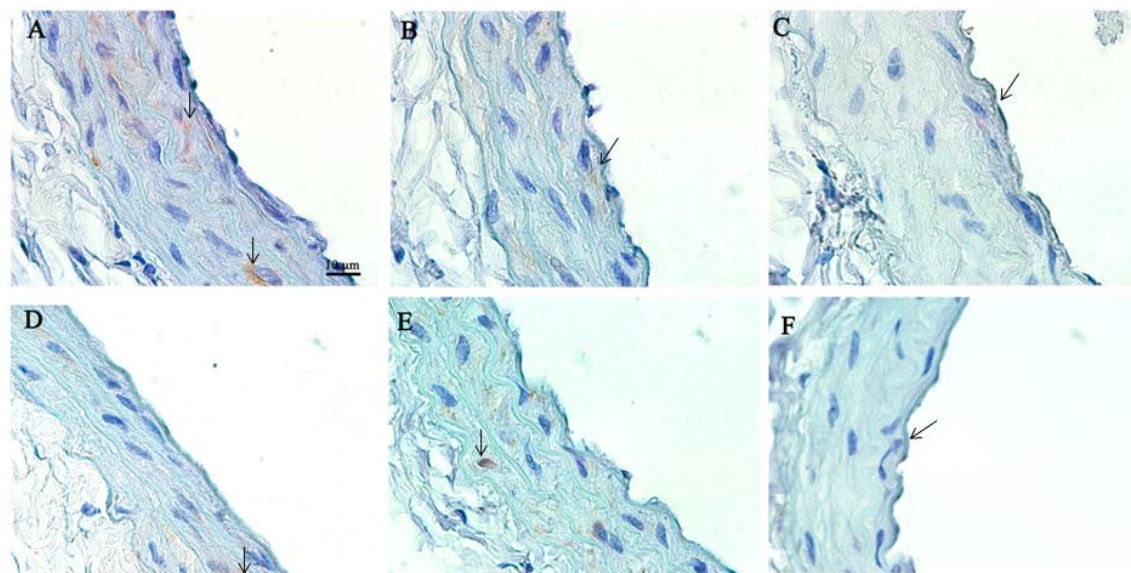
Legenda: Fotomicrografias da imunomarcção para o anticorpo anti-CYBB que detecta a subunidade GP91phox da NADPH oxidase 2 na artéria carótida dos grupos experimentais: A: SHAM, B: 2R1C 30 dias, C: 2R1C 60 dias, D: 2R1C+Losartana e E: 2R1C+Enalapril e F: 2R1C+ESPI. As setas indicam a imunomarcção. Objetiva 100X. Barra de calibração: 10µm. G: Quantificação da imunomarcção (pixel/µm²) para o anticorpo anti-CYBB para a subunidade GP91phox da NADPH oxidase 2. (a) em comparação com SHAM. (b) comparado com 2R1C 30 dias, (c) comparado com grupo 2R1C 60 dias. N=5.

Fonte: Valentim, 2024.

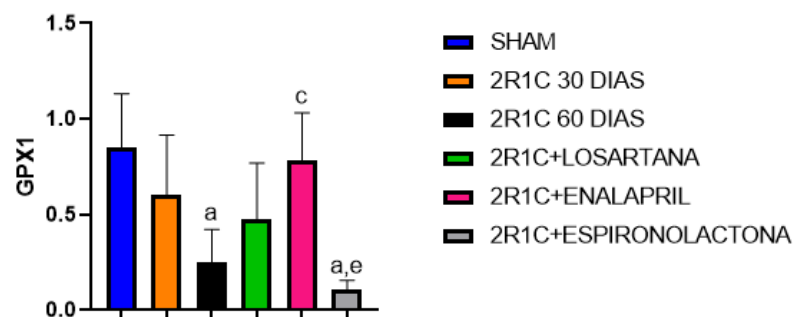
A enzima glutathiona peroxidase reduz os hidroperóxidos lipídicos a álcoois e também atuam reduzindo o peróxido de hidrogênio à água, ajudando a prevenir a peroxidação lipídica geralmente observada como um dos produtos do estresse oxidativo. Na figura 14 observamos

a imunomarcção com o anticorpo anti-GPX1. Observa-se áreas marcadas em castanho (setas finas) distribuídas entre as túnicas íntima e média no grupo SHAM (A). Nos grupos hipertensos sem tratamento, 2R1C 30 dias (B) e 2R1C 60 dias (C), poucas áreas imunomarcadas são visualizadas nas túnicas íntima e média, sendo um pouco mais intensa a marcação no grupo 2R1C 30 dias (B) quando comparado ao grupo 2R1C 60 dias (C). Nos grupos hipertensos tratados, 2R1C+Losartana (D), 2R1C+Enalapril (E) e 2R1C+ESPI (F), áreas na túnica íntima e média com maior intensidade de marcação são observadas somente no grupo 2R1C+Enalapril, quando comparado aos grupos hipertensos sem tratamento. A quantificação da imunomarcção para GPX1 (G) demonstra redução significativa de marcação nos grupos 2R1C 60 dias e 2R1C+ESPI quando comparado ao grupo SHAM e um aumento no grupo 2R1C+Enalapril.

Figura 14: Imunomarcção e quantificação do anticorpo anti-GPX1 na artéria carótida dos grupos experimentais.



G



Legenda: Fotomicrográfas da imunomarcção para anticorpo anti-GPX-1 na artéria carótida dos grupos experimentais: A: SHAM, B: 2R1C 30 dias, C: 2R1C 60 dias, D: 2R1C+Losartana e E: 2R1C+Enalapril e F: 2R1C+ESPI. As setas indicam a imunomarcção. Objetiva 100X. Barra de calibração:10µm. G: Quantificação

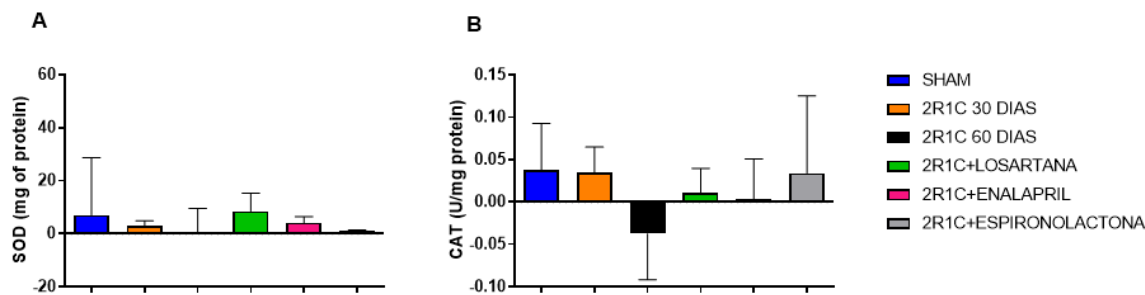
da imunomarcção (pixel/ μm^2) para o anticorpo anti-GPX-1. (a) em comparação com SHAM. (c) comparado com 2R1C+ 60 dias e (e) comparado com o grupo 2R1C+ Enalapril. N=5.

Fonte: Valentim, 2024.

4.6 Avaliação dos tratamentos sobre o dano oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes na artéria carótida

O estresse oxidativo foi avaliado quantitativamente através da análise do produto da peroxidação lipídica (MDA) e da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx). Com relação a atividade de SOD e CAT não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 15-A e B).

Figura 15: Análise das enzimas antioxidantes



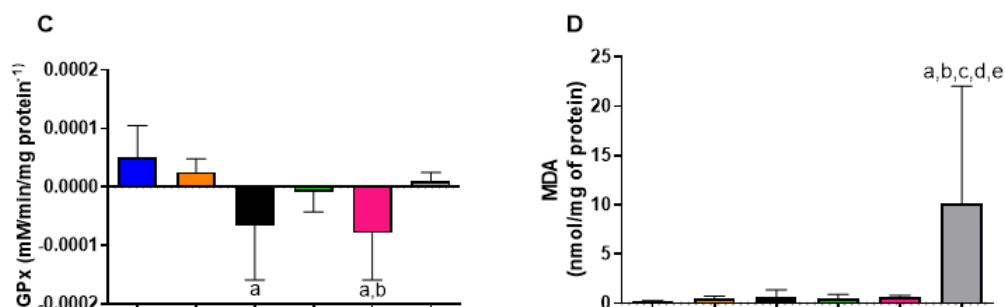
Legenda: Efeito do tratamento sobre as enzimas SOD e CAT na artéria carótida. N=5.

Fonte: Valentim, 2024

Na figura 16-A atividade da enzima GPX foi significativamente menor no grupo hipertenso 60 dias quando comparado com o grupo SHAM. Já o grupo tratado com Enalapril apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo SHAM e 2R1C 30 dias.

Através da técnica de TBRAS podemos analisar os níveis de MDA, o produto final da peroxidação lipídica. Nossos resultados demonstram que houve diferença significativa no grupo 2R1C+ESPI quando comparado com os demais grupos.

Figura 16: Análise de enzima anti oxidante e pró oxidante



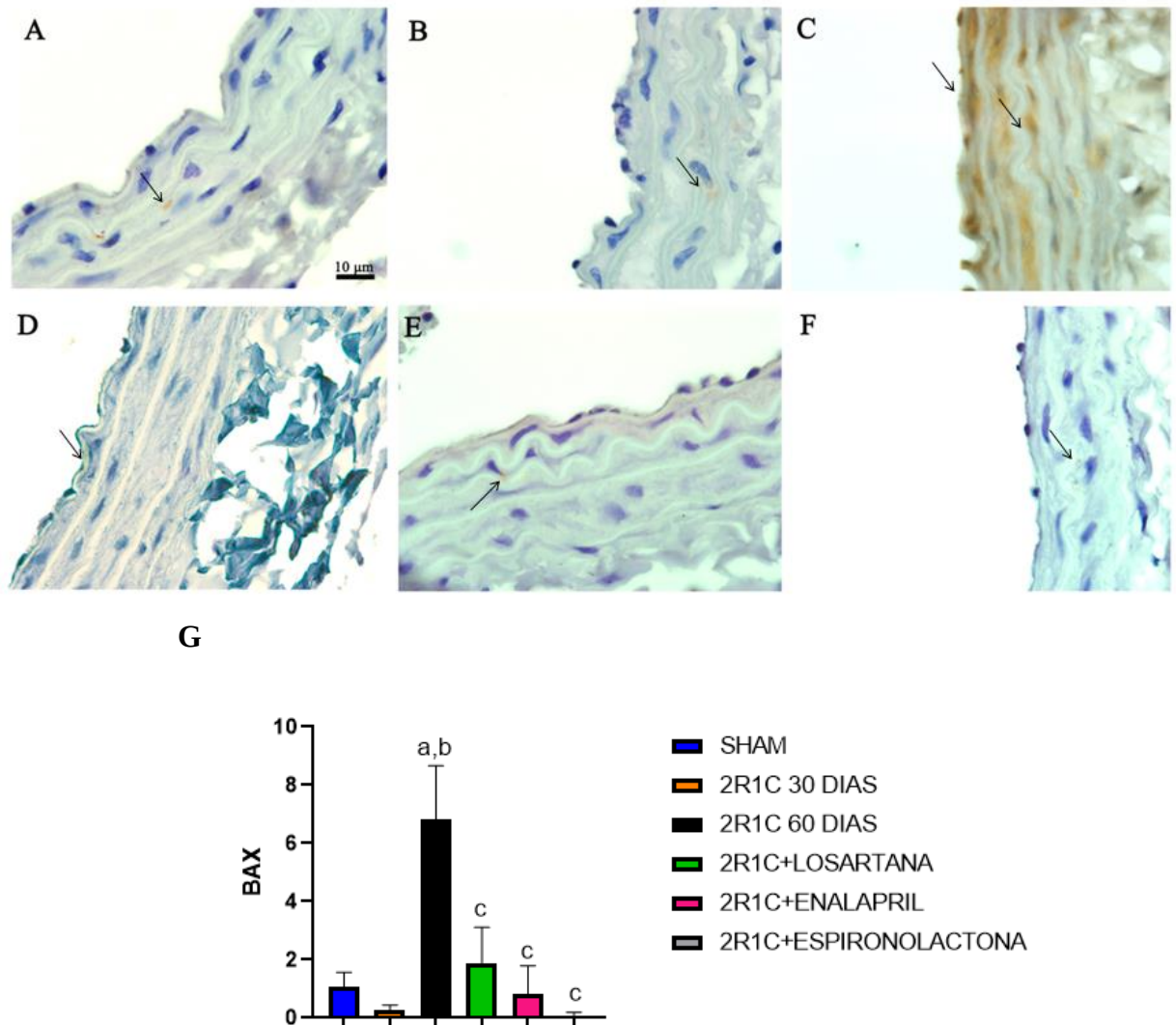
Legenda: Efeito do tratamento sobre a enzima GPx e os níveis de MDA na artéria carótida. (a) comparado com o grupo SHAM. (b) comparado com o grupo 2R1C 30 dias. (c) comparado com o grupo 2R1C 60 dias. (d) comprado com o grupo Losartana. (e) comparado com o grupo Enalapril. N=5.

Fonte: Valentim, 2024

4.7 Análises dos tratamentos sobre as proteínas envolvidas na apoptose

A partir dos resultados obtidos neste trabalho com a alteração dos marcadores do estresse oxidativo e das enzimas antioxidantes nos diferentes grupos experimentais, analisamos a via intrínseca da apoptose, uma vez que o estresse oxidativo é um dos principais estímulos que desencadeiam esta via. Na figura 17 observamos a marcação de Bax, membro próapoptótico da família BCL-2, houve uma intensa e difusa imunomarcacão distribuída pelas túnicas íntima e média no grupo hipertenso 60 dias (C) quando comparado com os grupos SHAM (A) e hipertenso 30 dias (B). Nos grupos tratados 2R1C+Losartana (D), 2R1C+Enalapril (E) e 2R1C+ESPI (F) há uma discreta e pontual imunomarcacão na túnica íntima ou na túnica média, quando comparado com o 2R1C 60 dias. A mesma imunomarcacão pontual pode ser observada nos grupos SHAM e 2R1C 30. A quantificação da imunomarcacão para BAX (G) demonstra aumento significativo na imunomarcacão no grupo 2R1C 60 dias em relação aos demais grupos experimentais. Não houve diferença significativa entre os demais grupos experimentais.

Figura 17: Imunomarcção e quantificação do anticorpo anti-BAX na artéria carótida dos grupos experimentais.



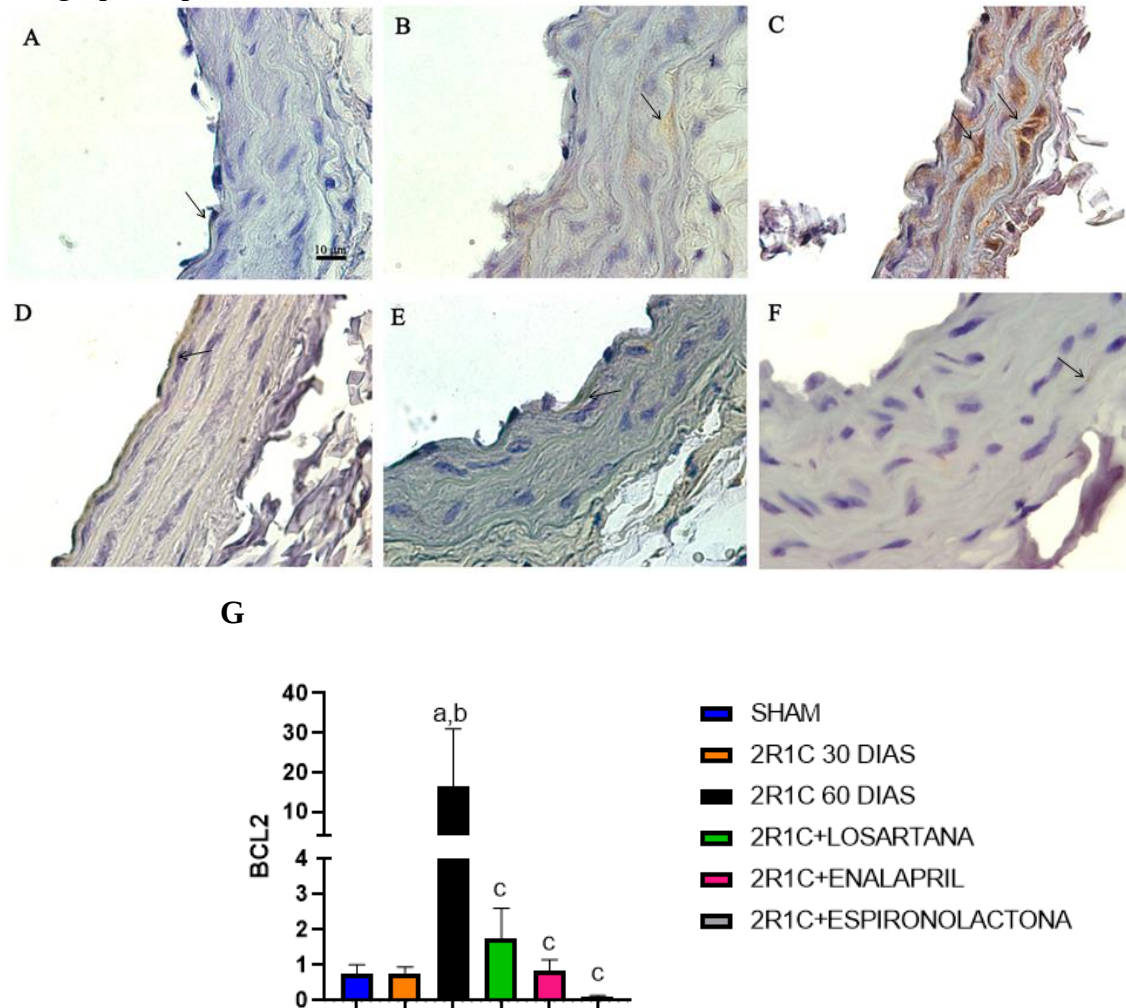
Legenda: Fotomicrografias da imunomarcção para anticorpo anti-BAX na artéria carótida dos grupos experimentais: A: SHAM, B: 2R1C 30 dias, C: 2R1C 60 dias, D: 2R1C+Losartana e E: 2R1C+Enalapril e F: 2R1C+ESPI. As setas indicam a imunomarcção. Objetiva 100X. Barra de calibração: 10μm. G: Quantificação da imunomarcção (pixel/ μm²) para o anticorpo anti-BAX. (a) em comparação com SHAM. (b) comparado com 2R1C 30 dias. (c) comparado com o grupo 2R1C 60 dias N=5

Fonte: Valentim, 2024.

Na figura 18 observamos a imunomarcção para a proteína anti-apoptótica BCL-2. Uma intensa marcação é visualizada no grupo 2R1C 60 dias distribuída por toda túnica íntima e média (C) quando comparado com os grupos SHAM (A) e 2R1C 30 dias (B). Por outro lado, os grupos tratados 2R1C+Losartana (D), 2R1C+Enalapril (E) e 2R1C+ESPI (F) apresentam uma discreta e pontual marcação na túnica íntima ou média, quando comparado com o grupo 2R1C 60 dias. Conforme mostra o gráfico da quantificação para imunomarcção para BCL-2

(G), há um aumento significativo no grupo 2R1C 60 dias quando comparado com os demais grupos.

Figura 18: Imunomarcção e quantificação para o anticorpo anti-BCL-2 na artéria carótida dos grupos experimentais.



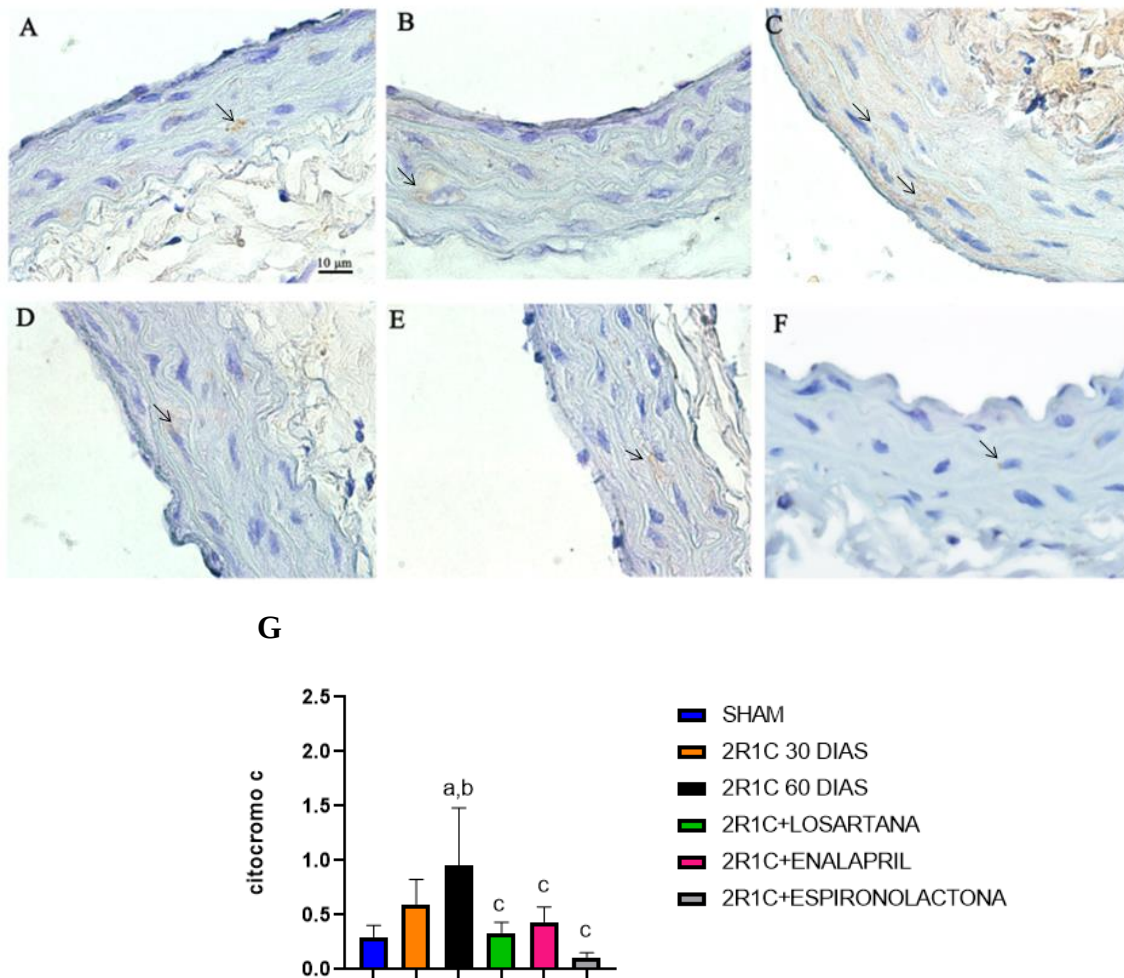
Legenda: Fotomicrografias da imunomarcção para anticorpo anti-BCL-2 na artéria carótida dos grupos experimentais: A: SHAM, B: 2R1C 30 dias, C: 2R1C 60 dias, D: 2R1C+Losartana e E: 2R1C+Enalapril e F: 2R1C+ESPI. As setas indicam a imunomarcção. Objetiva 100X. Barra de calibração: 10µm. G: Quantificação da imunomarcção (pixel/ µm²) para o anticorpo anti-BCL-2. (a) em comparação com SHAM. (b) comparado com 2R1C 30 dias, (c) comparado com 2R1C 60 dias. N=5

Fonte: Valentim, 2024.

A Figura 19 evidencia a imunomarcção para o Citocromo C. No grupo 2R1C 60 dias (C) foi observado uma marcação um pouco mais intensa desse anticorpo na túnica íntima e média da artéria, quando comparado com o grupo SHAM (A) e 2R1C 30 dias (B). Entretanto, essas marcações foram menos frequentes nos animais tratados 2R1C+Losartana (D), 2R1C+Enalapril (E) e 2R1C+ESPI (F) bem como nos animais dos grupos SHAM e 2R1C 30 dias. A quantificação da imunohistoquímica para esta proteína pode ser observada na figura G

mostrando aumento significativo de Citocromo C no grupo 2R1C 60 dias quando comparado com os animais tratados.

Figura 19: Imunomarcção e quantificação do anticorpo anti-citocromo c na artéria carótida dos grupos experimentais.



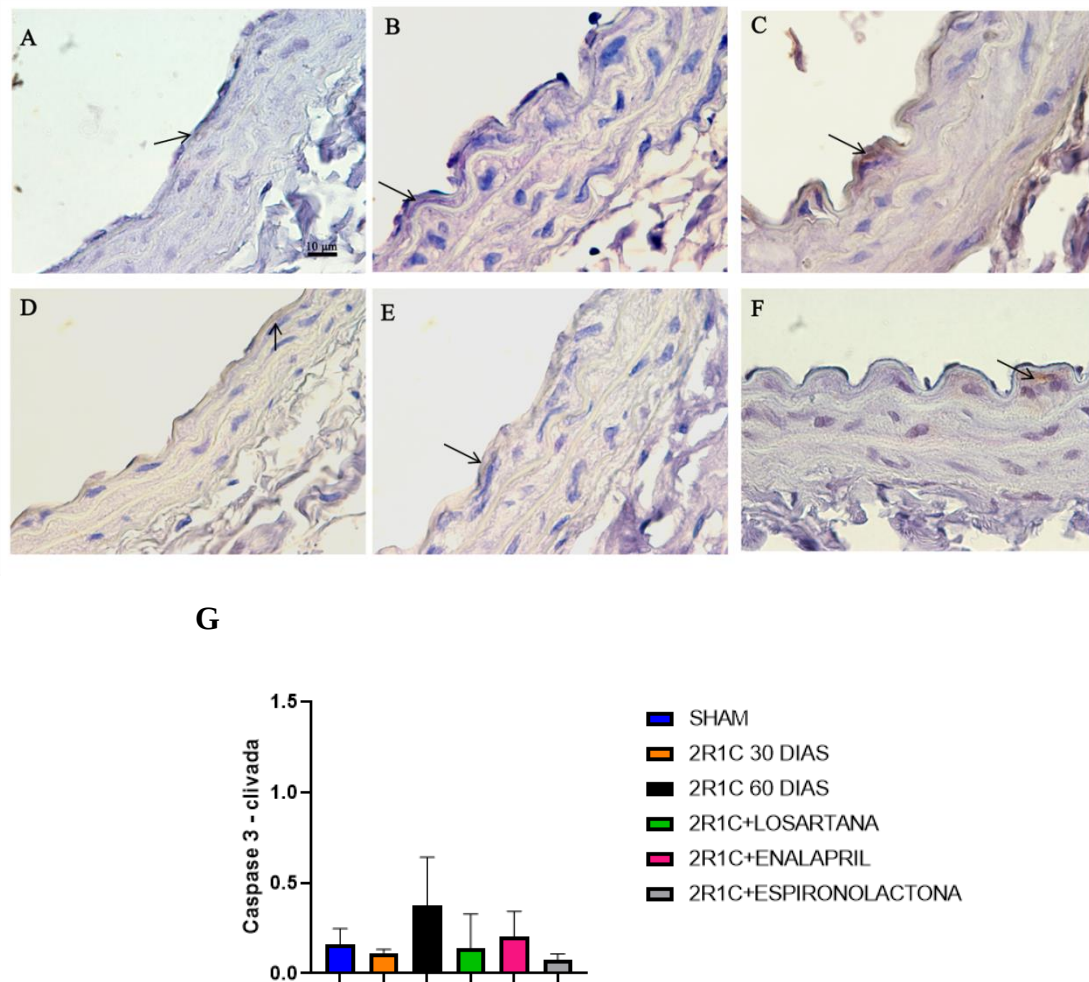
Legenda: Fotomicrografias da imunomarcção para anticorpo anti-citocromo c na artéria carótida dos grupos experimentais: A: SHAM, B: 2R1C 30 dias, C: 2R1C 60 dias, D: 2R1C+Losartana e E: 2R1C+Enalapril e F: 2R1C+ESPI. As setas indicam a imunomarcção. Objetiva 100X. Barra de calibração: 10µm. G: Quantificação da imunomarcção (pixel/ µm²) para o anticorpo anti-citocromo c. (a) em comparação com SHAM. (b) comparado com 2R1C 30 dias, (c) comparado com 2R1C 60 dias. N=5

Fonte: Valentim, 2024.

Com relação a expressão da proteína caspase 3 (Figura 20) uma discreta marcação é observada na túnica íntima de todos os grupos experimentais. No grupo 2R1C 60 dias pode-se observar uma marcação um pouco mais intensa nas células musculares lisas próximas à túnica média. No entanto, as células musculares lisas da túnica média dos demais grupos não exibiram imunomarcção. A quantificação da imunomarcção para Caspase 3 clivada (G)

não mostrou diferença significativa na imunomarcção entre os grupos, porém observamos tendência de aumento na imunomarcção no grupo 2R1C 60 dias.

Figura 20: Imunomarcção e quantificação para o anticorpo anti-caspase 3 clivada na artéria carótida dos grupos experimentais.



Legenda: Fotomicrografias da imunomarcção para anticorpo anti-Caspase 3 clivada na artéria carótida dos grupos experimentais: A: SHAM, B: 2R1C 30 dias, C: 2R1C 60 dias, D: 2R1C+Losartana e E: 2R1C+Enalapril e F: 2R1C+ESPI. As setas indicam a imunomarcção. Objetiva 100X. Barra de calibração:10µm. G: Quantificação da imunomarcção (pixel/ µm²) para o anticorpo anti-Caspase 3 clivada. N=5

Fonte: Valentim, 2024.

5 DISCUSSÃO

No modelo experimental utilizamos dois controles hipertensos. Hipertenso 30 dias, onde a eutanásia ocorreu na 4ª semana de experimentação, período em que foi iniciado o tratamento, e o hipertenso 60 dias onde os animais foram eutanasiados no final do experimento, 8ª semana. De acordo com o nosso resultado, o grupo hipertenso de 8 semanas é considerado uma referência para compreender os danos causados da hipertensão associadas ao EO e o processo apoptótico.

A hipertensão é uma das doenças não transmissíveis mais comuns que ameaçam a saúde e a vida humana (Unger *et al.*, 2020) e que apresenta alto potencial de reversibilidade. Em nosso estudo, usamos ratos induzidos a HR a partir da estenose da artéria renal (modelo 2R1C) que foram tratados com três classes de inibidores do SRAA. Até o momento, esse é o primeiro trabalho que analisa os possíveis danos causados pela hipertensão no desenvolvimento de EO e apoptose na artéria carótida no modelo 2R1C. Nossos resultados demonstraram que: 1. Os animais dos grupos hipertensos (2R1C 30 dias e 2R1C 60 dias) desenvolveram hipertensão sustentada a partir da estenose da artéria renal compatível com o modelo de Goldblatt (2R1C) e que todos os tratamentos administrados (Losartana 10mg/kg/dia, Enalapril 10mg/kg/dia e Espironolactona 25mg/kg/dia) foram eficazes na redução da PA após 4 semanas de tratamento; 2. A indução da HR por um período de 60 dias apresentou um aumento da expressão de gp91Phox e um possível papel protetor dos tratamentos, sendo que o tratamento com Enalapril atua na diminuição na NADPH oxidase e na enzima GPX1; 3. A indução da HR por um período de 60 dias aumentou a expressão de marcadores apoptóticos e os tratamentos com Losartana, Enalapril e Espironolactona reduziram esses marcadores. O modelo de Goldblatt (Goldblatt *et al.*, 1934) mimetiza a HR humana, pois a oclusão renal leva a diminuição do fluxo sanguíneo para o rim e a ativação contínua do SRAA seguida pela elevação persistente da PAS. Por essa razão, esse modelo também é conhecido por hipertensão dependente de angiotensina II e vem sendo utilizado em estudos experimentais na investigação dos efeitos anti-hipertensivos e na elucidação da fisiopatologia da hipertensão (Amat *et al.*, 2014). Evidências científicas que corroboram nossos resultados demonstram que após um período de 4 semanas de indução da HR pelo modelo 2R1C já se observa um quadro sustentado hipertensivo com elevação da PAS a partir da segunda semana de indução (Martins-Oliveira *et al.*, 2013; Santuzzi *et al.*, 2015;

Tiradentes *et al.*, 2015; Mengal *et al.*, 2016; Martins-Oliveira *et al.*, 2018; Matos *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2020).

O SRAA tem um papel importante na regulação da PA, balanço hídrico e na homeostase de sódio. Nos últimos 40 anos, diferentes componentes deste sistema se tornaram alvo para o desenvolvimento de drogas para hipertensão, insuficiência cardíaca e diabetes (Sparks *et al.*, 2014; Colafella *et al.*, 2019). Os tratamentos escolhidos para este estudo, Enalapril (inibidor da ECA), Losartana (inibidor do receptor AT1) e Espironolactona (antagonista do receptor da aldosterona), tiveram como base seu reconhecido efeito hipotensor e o fato de seus alvos serem atualmente os principais componentes que induzem todas as ações clássicas do SRAA (Colafella *et al.*, 2019). Conforme esperado, os tratamentos reduziram a PAS nos animais hipertensos a partir da primeira semana de tratamento, estando os dados de acordo com estudos anteriores utilizando animais 2R1C e diferentes concentrações dos medicamentos utilizados: enalapril 30mg/kg/dia (Vilhena *et al.*, 2021); Losartana 10mg/kg/dia (Martins-Oliveira *et al.*, 2018) e 25 a 50mg/kg/dia (Nekooeian *et al.*, 2021); e Espironolactona 25mg/kg/dia (Ceron *et al.*, 2010) e 200mg/kg/dia (Lincevicius *et al.*, 2015). Cabe ressaltar que a dose de 10 mg/kg/dia de enalapril ainda não foi utilizada em nenhum estudo com o modelo 2R1C sendo este o primeiro a demonstrar a redução da PAS nesta dosagem.

Existem três fases para compreensão do desenvolvimento da hipertensão 2R1C. O autor Martinez-Maldonado (1991) relatou que na fase intermediária a PA permanece estável ou continua elevada, embora caso ocorra à remoção do clipe na artéria renal esquerda ou o tratamento com inibidores da ECA reduz a PA. Essa seria uma possível explicação da redução do medicamento Enalapril, componente inicial do SRAA, a partir da semana 5 quando comparado com os demais fármacos que reduziram tardiamente a PAS.

Na HR, numerosos estudos já demonstraram no grupo hipertenso o aumento nos níveis plasmáticos ou teciduais de renina (Kaur e Muthuraman, 2016; Pereira *et al.*, 2020), angiotensina I (Martins-Oliveira *et al.*, 2018), angiotensina II (Martins-Oliveira *et al.*, 2018) e receptor AT1 (Santuzzi *et al.*, 2015) e que o tratamento com os inibidores do SRAA (Losartana, Enalapril e Espironolactona) reduzem as concentrações plasmáticas ou teciduais de alguns componentes deste sistema, no entanto, poucos são os estudos que avaliam a ação desses inibidores nos níveis plasmáticos de aldosterona.

A aldosterona, a partir de sua ligação ao receptor mineralocorticoide, desempenha um papel fundamental na homeostase do sal e da água, na regulação da pressão arterial e na remodelação cardiovascular (Xanthakis e Vasan, 2013). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos com relação aos níveis de aldosterona plasmática. Segundo (Herrmann e Textor, 2019) a HR é dependente de angiotensina e que as respostas hormonais são, na maioria das vezes, transitórias.

O EO e a hipertensão estão diretamente associados porque o EO contribui na manutenção de uma PA elevada a partir da diminuição da biodisponibilidade de componentes vasodilatadores e aumento de componentes vasoconstritores (Oliveira-Sales *et al.*, 2008). De igual forma, a superativação do SRAA aumenta os níveis de ANG II que ao se ligar no receptor AT1, ativa a enzima NADPH oxidase, uma das principais enzimas geradoras de EROs. Essa enzima possui uma diversidade de subunidades como a gp91phox, também conhecida por NOX2, que são expressas nos vasos sanguíneos, especificamente, nas células endoteliais e adventícias (Wang *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2004) e estão envolvidas na evolução de doenças vasculares, como aterosclerose (Sorescu *et al.*, 2002). A produção de ânions superóxido (O_2^-) se dá pela ligação da proteína citosólica p47phox, a proteínas transmembrana gp91phox e p22phox (Nishi *et al.*, 2010). Assim, a gp91phox endotelial provoca uma redução da biodisponibilidade do óxido nítrico que desencadeia uma disfunção endotelial (Jung *et al.*, 2004) e alterações hemodinâmicas (Boonla *et al.*, 2015) em animais 2R1C. Em nosso modelo de hipertensão 2R1C, o grupo Hipertenso 60 dias apresentou um aumento da expressão de gp91Phox, enquanto os animais hipertensos tratados e hipertenso 30 dias apresentaram uma baixa expressão desta subunidade indicando aumento do estresse oxidativo no grupo hipertenso e um possível papel protetor dos tratamentos. Uma pesquisa sobre o modelo SHR com dieta rica em sal, demonstrou que o Losartana (40 mg/kg/dia) além de reduzir a PA, apresenta efeitos benéficos contra o estresse oxidativo vascular (Cavanagh *et al.*, 2010).

A superprodução de moléculas oxidantes causa danos à célula, uma vez que pode oxidar DNA, lipídios e proteínas, alterando sua composição e consequentemente, levando a alterações estrutural, metabólica e funcional da célula. Os lipídios das membranas celulares quando oxidados alteram sua composição e podem levar a alterações na dinâmica celular. Uma das formas de se avaliar esse processo chamado peroxidação lipídica é através da mensuração do MDA, um dos produtos finais da peroxidação.

Através da técnica de substâncias reativas ao TBARS podemos analisar os níveis de MDA. Não foram observadas alterações de MDA na artéria carótida dos animais 2R1C, mas outros estudos apresentam concentrações de MDA aumentada em diferentes órgãos, como o miocárdio, aorta, artéria mesentérica (Zhu *et al.*, 2018), plasma, coração e rins (Kaur e Muthuraman, 2016; Jahan *et al.*, 2023), porém nenhum estudo ainda avaliou esse marcador na artéria carótida nesse modelo. Altos níveis de MDA são encontrados em animais tratados com Espironolactona quando comparado com o grupo hipertenso 60 dias. Segundo um estudo sobre a eficácia e tolerância desse medicamento na hipertensão essencial demonstrou níveis elevados de triglicérides (0,1 mmol/litro) (Jeunemaitre *et al.*, 1987), assim acreditamos que a super elevação do grupo espironolactona se deve a presença de lipídios proveniente do fármaco. Com relação ao grupo hipertenso tratado com Losartana e Enalapril não apresentaram diferença com relação ao grupo hipertenso não tratado. A SOD e CAT são enzimas envolvidas na proteção e prevenção da lipoperoxidação (Gupta *et al.*, 2009; Lubrano e Balzan, 2015).

O desequilíbrio redox é caracterizado pelo aumento das ERO e uma redução das enzimas antioxidantes, fundamentais no controle da homeostase (Griendling *et al.*, 2021). Nossos resultados mostraram uma redução significativa de GPX em animais hipertensos 60 dias quando comparado com o grupo SHAM, o que corrobora com o resultado de Jahan *et al.* (Jahan *et al.*, 2023) em ratos 2R1C. O sistema antioxidante protege contra o desenvolvimento de placas gordurosas da parede da artéria através da eliminação de espécie reativa de oxigênio favorecendo a vasodilatação (Pignatelli *et al.*, 2018), mas os medicamentos não apresentaram efeitos benéficos.

A GPx possui oito proteínas distintas, cada uma apresenta uma funcionalidade diferente atuando em regiões específicas, a fim de manter uma estabilidade redox celular. A GPX1 está presente tanto no citoplasma como nas mitocôndrias. Muitos trabalhos *in vivo* ou modelo experimental que induz o estresse, evidencia ausência de GPX1, o que resulta em lesão e morte celular (Pei *et al.*, 2023). A redução dessa enzima é observada pelo método da imunohistoquímica em animais hipertensos 60 dias em relação ao grupo SHAM, embora no animal hipertenso tratado com Enalapril estão elevados quando comparado com o grupo hipertenso 60 dias sugerindo que o inibidor da ECA protege o tecido de danos oxidativos através do aumento das enzimas antioxidantes.

A superprodução de ERO estimula a ativação da via intrínseca da apoptose. A regulação da estabilidade entre as proteínas Bcl-2 (pró e antiapoptóticas) é responsável na

determinação do destino celular (sobrevivência ou apoptose) (Redza-Dutordoir e Averill-Bates, 2016). As proteínas envolvidas no processo apoptótico analisadas em nosso estudo demonstram um aumento significativo da expressão de Bax e citocromo c em animais hipertensos 60 dias, quando comparado com os demais grupos experimentais, sugerindo que a via da apoptose está ativada nestes animais. Um trabalho desenvolvido em nosso laboratório demonstrou o aumento da expressão de Bax na zona glomerulosa em animais 2R1C (Matos *et al.*, 2020). Resultados semelhantes também foram observados em rins de animais 2R1C (Poasakate *et al.*, 2022). Por outro lado, todos os tratamentos foram capazes de reduzir a expressão dessa proteína, possivelmente, devido a ação destes medicamentos na redução da expressão de Gp91phox, a principal subunidade da NADPH oxidase vascular, uma das enzimas responsáveis pela produção de EROs. Esses dados podem sugerir que os tratamentos atuam na diminuição do dano e morte celular, induzidos pela hipertensão.

Com relação ao Bcl-2 houve um aumento dessa proteína em animais hipertensos 60 dias comparado com os demais grupos. Outros estudos corroboram esse resultado, no modelo SHR foi observado um aumento de Bcl-2 nas células musculares lisas, quando comparado com ratos Wistar-Kyoto (Diez *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2016). Já no modelo 2R1C há aumento significativo de Bcl-2 no citoplasma das células cardíacas, quando comparado com o grupo SHAM, sugerindo uma tentativa de proteger os efeitos causados pela apoptose (Buzello *et al.*, 2003). Processo semelhante pode ter ocorrido também nos grupos tratados. Entretanto, para a confirmação deste resultado, seria importante acrescentar uma análise quantitativa do Bcl-2, por Western Blotting e PCR-RT para a melhor compreensão deste processo no presente estudo.

Como nossos resultados mostraram um aumento na expressão de Bax e este induz a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma ativando as caspases iniciadoras e caspases efetoras (Elmore, 2007), quantificamos a imunomarcagem para citocromo c na artéria carótida. Assim, a expressão protéica de Bax e citocromo c no nosso estudo aumentou nos animais hipertensos 60 dias o que corrobora trabalhos anteriores (Matos *et al.*, 2020). Da mesma forma, os tratamentos com os inibidores do SRAA diminuíram a expressão de Bax e de citocromo c no citoplasma em relação ao grupo hipertenso 60 dias. Em nosso estudo, os tratamentos (Losartana, Enalapril e Espironolactona) foram capazes de reduzir a expressão das proteínas Bax e citocromo c, sugerindo diminuição do dano e morte celular causados pela hipertensão de Goldblatt.

A parede arterial é constituída por células endoteliais, CML e matriz extracelular. Nas artérias de grande calibre, como a carótida, observa-se na túnica média uma grande quantidade de lâminas elásticas entre as CML, que constantemente se adaptam a pequenas variações na PA. No entanto, em indivíduos hipertensos, os altos níveis de pressão sanguínea promovem alterações na parede vascular que levam a hipertrofia da túnica média (Brown *et al.*, 2018), e acúmulo de colágeno (Jordao *et al.*, 2011). A análise ultraestrutural da parede carotídea mostrou que no grupo hipertenso 60 dias, as células endoteliais achatadas apresentam núcleo lobulado com heterocromatina periférica mais eletrondensa, indicativo de células com baixa síntese de proteínas, e o endotélio exibindo pouca adesão à membrana basal, que pode indicar dano estrutural a esta camada. No entanto, essas características não foram observadas nos grupos tratados, que apresentaram como o grupo SHAM, numerosas vesículas indicativas de alta dinâmica celular e adesão à membrana basal. Os animais dos grupos hipertensos 30 e 60 dias exibem CML com aumento de vesículas e polirribossomos, sugerindo um perfil mais secretório quando comparado com o grupo controle, que apresenta CML ricas em filamentos contráteis, demonstrando um perfil contrátil. Essas alterações podem ser justificadas devido à elevada PA nos grupos hipertensos, que estimula as CML a produzirem matriz extracelular em resposta às mudanças hemodinâmicas, modificando o perfil destas células para o secretório (Todd e Goa, 1992). Nos grupos tratados, não foi observado o perfil secretório, sugerindo que o efeito antihipertensivo destes medicamentos contribuiu na prevenção das alterações induzidas pela hipertensão. Além disso, o grupo hipertenso 60 dias apresentou LELI fragmentada, característica do processo hipertensivo, o que sugere remodelamento da parede vascular (Arribas *et al.*, 2006).

Diante do exposto, o modelo de Goldblatt foi reproduzível e eficiente em nosso trabalho resultando na elevação da PAS em animais 2R1C 30 e 60 dias. Para o grupo 2R1C 60 dias provocou níveis elevados do componente EO e apoptose. Por outro lado, os inibidores do SRAA reduziram a PAS na 8ª semana e os marcadores apoptóticos, além de apresentar um perfil contrátil através da análise ultraestrutural. Em adendo, nos animais hipertensos tratados com Enalapril houve aumento na enzima antioxidante GPX1. As respostas encontradas nesse experimento, com o uso das terapias medicamentosas, proporciona a compreensão do mecanismo de atuação no organismo a fim de disponibilizar a sociedade uma intervenção eficaz e segura. Nesse estudo apresenta muitas limitações. A artéria carótida é pequena, assim impossibilitou a realização de outras técnicas como Western blotting e PCR, para análise dos componentes do SRAA e dos marcadores de apoptose e EO.

CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a administração de Losartana, Enalapril e Espironolactona em ratos com HR promove:

- Redução da PAS;
- Diminuição dos marcadores apoptóticos do início da cascata;
- Reversão do perfil secretório para o perfil contrátil das CML.

REFERÊNCIAS

- Agrawal S, Agrawal N, Garg J, Mohandas R, Gupta T, Segal M. Heart failure and chronic kidney disease: should we use spironolactone? *Am J Med Sci* 2015; 350: 147-151 (doi: 10.1097/MAJ.0000000000000514)
- Al-Majed AR, Assiri E, Khalil NY, Abdel-Aziz HA. Losartan: Comprehensive Profile. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol* 2015; 40: 159-194 (doi: 10.1016/bs.podrm.2015.02.003)
- Alves L. Efeitos da hipertensão renovascular (2R1C) e do tratamento com alisquireno na artéria carótida: aspectos morfofisiológicos e moleculares. 2019. 69. Trabalho de conclusão de curso em Ciências Biológicas Bacharelado- Instituto de Biologia. 16-12.
- Amat N, Amat R, Abdureyim S, Hoxur P, Osman Z, Mamut D, Kijjoa A. Aqueous extract of *dioscorea opposita thunb.* normalizes the hypertension in 2K1C hypertensive rats. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14: 36 (doi: 10.1186/1472-6882-14-36)
- Arribas SM, Hinek A, Gonzalez MC. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther* 2006; 111: 771-791 (doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.12.003)
- Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RdCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição* 2010; 23: 629-643
- Barreiros AL, David JM, David JP. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Química Nova* 2006; 29: 113-123
- Barroso WKS, Rodrigues CIS, Bortolotto LA, Mota-Gomes MA, Brandão AA, Feitosa ADdM et al. Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial–2020. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 2021; 116: 516-658
- Boonla O, Kukongviriyapan U, Pakdeechote P, Kukongviriyapan V, Pannangpetch P, Thawornchinsombut S. Peptides-Derived from Thai Rice Bran Improves Endothelial Function in 2K-1C Renovascular Hypertensive Rats. *Nutrients* 2015; 7: 5783-5799 (doi: 10.3390/nu7075252)
- Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Jr., Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* 2012; 142: w13659 (doi: 10.4414/sm.w.2012.13659)
- Botros FT, Schwartzman ML, Stier CT, Jr., Goodman AI, Abraham NG. Increase in heme oxygenase-1 levels ameliorates renovascular hypertension. *Kidney Int* 2005; 68: 2745-2755 (doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00745.x)
- Brown IAM, Diederich L, Good ME, DeLalio LJ, Murphy SA, Cortese-Krott MM et al. Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; 38: 1969-1985 (doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311229)
- Buzello M, Boehm C, Orth S, Fischer B, Ehmke H, Ritz E et al. Myocyte loss in early left ventricular hypertrophy of experimental renovascular hypertension. *Virchows Arch* 2003; 442: 364-371 (doi: 10.1007/s00428-003-0775-5)

Carone L, Oxberry SG, Twycross R, Charlesworth S, Mihalyo M, Wilcock A. Spironolactone. *J Pain Symptom Manage* 2017; 53: 288-292 (doi: 10.1016/j.jpainsymman.2016.12.320)

Carvalho-Romano L, Bonafe RP, Paim LR, Marques ER, Vegian CFL, Pio-Magalhaes JA et al. Association of carotid wall layers with atherosclerotic plaques and cardiac hypertrophy in hypertensive subjects. *J Hum Hypertens* 2022; 36: 732-737 (doi: 10.1038/s41371-021-00565-w)

Cavanagh EM, Ferder LF, Ferder MD, Stella IY, Toblli JE, Inserra F. Vascular structure and oxidative stress in salt-loaded spontaneously hypertensive rats: effects of losartan and atenolol. *Am J Hypertens* 2010; 23: 1318-1325 (doi: 10.1038/ajh.2010.167)

Ceron CS, Castro MM, Rizzi E, Montenegro MF, Fontana V, Salgado MC et al. Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. *Br J Pharmacol* 2010; 160: 77-87 (doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00678.x)

Chandran G, Sirajudeen KN, Yusoff NS, Swamy M, Samarendra MS. Effect of the antihypertensive drug enalapril on oxidative stress markers and antioxidant enzymes in kidney of spontaneously hypertensive rat. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 608512 (doi: 10.1155/2014/608512)

Cherne PN, Young P. [History of the renin-angiotensin system: great men, a great finding]. *Rev Med Chil* 2014; 142: 1210-1216 (doi: 10.4067/S0034-98872014000900017)

Claassen K, Willmann S, Eissing T, Preusser T, Block M. A detailed physiologically based model to simulate the pharmacokinetics and hormonal pharmacodynamics of enalapril on the circulating endocrine Renin-Angiotensin-aldosterone system. *Front Physiol* 2013; 4: 4 (doi: 10.3389/fphys.2013.00004)

Colafella KM, Bovee DM, Danser AHJ. The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets. *Exp Eye Res* 2019; 186: 107680 (doi: 10.1016/j.exer.2019.05.020)

Corrêa J, Prado CM, Riul ME, Araújo AV, Rossi MA, Bendhack LM. Reversion of cardiovascular remodelling in renovascular hypertensive 2K-1C rats by renin-angiotensin system inhibitors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2020; 47: 1965-1977 (doi: 10.1111/1440-1681.13384)

Diez J, Panizo A, Hernandez M, Pardo J. Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats? *Hypertension* 1997; 29: 776-780 (doi: 10.1161/01.hyp.29.3.776)

Duncia JV, Carini DJ, Chiu AT, Johnson AL, Price WA, Wong PC et al. The discovery of DuP 753, a potent, orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. *Med Res Rev* 1992; 12: 149-191 (doi: 10.1002/med.2610120203)

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516 (doi: 10.1080/01926230701320337)

Elliott WJ. Renovascular hypertension: an update. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2008; 10: 522-533 (doi: 10.1111/j.1751-7176.2008.07788.x)

- Eyzaguirre C, Zapata P. Perspectives in carotid body research. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1984; 57: 931-957 (doi: 10.1152/jappl.1984.57.4.931)
- Fazan Jr R, Silva Vd, Salgado HC. Modelos de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens* 2001; 8: 19-29 (doi: 10.1590/s1519-37592001000100008)
- Ferreira JP, Cleland JG, Girerd N, Bozec E, Rossignol P, Pellicori P et al. Spironolactone effect on cardiac structure and function of patients with heart failure and preserved ejection fraction: a pooled analysis of three randomized trials. *Eur J Heart Fail* 2023; 25: 108-113 (doi: 10.1002/ehf.2726)
- Ferreira SH. A Bradykinin-Potentiating Factor (Bpf) Present in the Venom of Bothrops Jararaca. *Br J Pharmacol Chemother* 1965; 24: 163-169 (doi: 10.1111/j.1476-5381.1965.tb02091.x)
- Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC, Diez J. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT1 blockade with losartan. *Hypertension* 1998; 32: 280-286 (doi: 10.1161/01.hyp.32.2.280)
- Frey RS, Ushio-Fukai M, Malik AB. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 791-810 (doi: 10.1089/ars.2008.2220)
- Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 482: 419-425 (doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086)
- Gaspar MA. Renovascular hypertension: The current approach. *Rev Port Cardiol (Engl Ed)* 2019; 38: 869-871 (doi: 10.1016/j.repc.2020.02.002)
- Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 1954; 119: 623-626 (doi: 10.1126/science.119.3097.623)
- Goldberg MR, Bradstreet TE, McWilliams EJ, Tanaka WK, Lipert S, Bjornsson TD et al. Biochemical effects of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive patients. *Hypertension* 1995; 25: 37-46 (doi: 10.1161/01.hyp.25.1.37)
- Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on Experimental Hypertension : I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia. *J Exp Med* 1934; 59: 347-379 (doi: 10.1084/jem.59.3.347)
- Griendling KK, Camargo LL, Rios FJ, Alves-Lopes R, Montezano AC, Touyz RM. Oxidative Stress and Hypertension. *Circ Res* 2021; 128: 993-1020 (doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318063)
- Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003; 108: 1912-1916 (doi: 10.1161/01.CIR.0000093660.86242.BB)
- Gupta S, Sodhi S, Mahajan V. Correlation of antioxidants with lipid peroxidation and lipid profile in patients suffering from coronary artery disease. *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13: 889-894 (doi: 10.1517/14728220903099668)
- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992; 59: 1609-1623 (doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x)

Halliwell B, Clement MV, Ramalingam J, Long LH. Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo? *IUBMB Life* 2000; 50: 251-257 (doi: 10.1080/713803727)

Handy DE, Loscalzo J. The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2022; 188: 146-161 (doi:

Herrmann SM, Textor SC. Current Concepts in the Treatment of Renovascular Hypertension. *Am J Hypertens* 2018; 31: 139-149 (doi: 10.1093/ajh/hpx154)

Herrmann SM, Textor SC. Renovascular Hypertension. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2019; 48: 765-778 (doi: 10.1016/j.ecl.2019.08.007)

Honig A, Habeck JO, Pfeiffer C, Schmidt M, Huckstorf C, Rotter H, Eckermann P. The carotid bodies of spontaneously hypertensive rats (SHR): a functional and morphologic study. *Acta Biol Med Ger* 1981; 40: 1021-1030 (doi:

Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer research* 1999; 59: 1701s-1706s (doi:

Jahan I, Saha P, Eysha Chisty TT, Mitu KF, Chowdhury FI, Ahmed KS et al. Crataeva nurvala Bark (Capparidaceae) Extract Modulates Oxidative Stress-Related Gene Expression, Restores Antioxidant Enzymes, and Prevents Oxidative Stress in the Kidney and Heart of 2K1C Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2023; 2023: 4720727 (doi: 10.1155/2023/4720727)

Jeunemaitre X, Chatellier G, Kreft-Jais C, Charru A, DeVries C, Plouin PF et al. Efficacy and tolerance of spironolactone in essential hypertension. *Am J Cardiol* 1987; 60: 820-825 (doi: 10.1016/0002-9149(87)91030-7)

Jie Z, Liu J, Shu M, Ying Y, Yang H. Detection strategies for superoxide anion: A review. *Talanta* 2022; 236: 122892 (doi: 10.1016/j.talanta.2021.122892)

Jordao MT, Ladd FV, Coppi AA, Chopard RP, Michelini LC. Exercise training restores hypertension-induced changes in the elastic tissue of the thoracic aorta. *J Vasc Res* 2011; 48: 513-524 (doi: 10.1159/000329590)

Jung O, Schreiber JG, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation* 2004; 109: 1795-1801 (doi: 10.1161/01.CIR.0000124223.00113.A4)

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. ed. Rio de Janeiro: Guanabara 2013

Kaur S, Muthuraman A. Therapeutic evaluation of rutin in two-kidney one-clip model of renovascular hypertension in rat. *Life Sci* 2016; 150: 89-94 (doi: 10.1016/j.lfs.2016.02.080)

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257 (doi: 10.1038/bjc.1972.33)

Khoury MH, Gornik HL. Fibromuscular dysplasia (FMD). *Vasc Med* 2017; 22: 248-252 (doi: 10.1177/1358863X17700716)

Koury JC, Donangelo CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Revista de Nutrição* 2003; 16: 433-441 (doi:

Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: R277-297 (doi: 10.1152/ajpregu.00758.2002)

Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 2003; 144: 2179-2183 (doi: 10.1210/en.2003-0150)

Lakkis J, Lu WX, Weir MR. RAAS escape: a real clinical entity that may be important in the progression of cardiovascular and renal disease. *Curr Hypertens Rep* 2003; 5: 408-417 (doi: 10.1007/s11906-003-0087-9)

Levick J. Cardiac excitation and contraction. *An Introduction to Cardiovascular Physiology* 1991; (em impressão, doi: 23-44 (doi:

Lincevicius GS, Shimoura CG, Nishi EE, Perry JC, Casarini DE, Gomes GN et al. Aldosterone Contributes to Sympathoexcitation in Renovascular Hypertension. *Am J Hypertens* 2015; 28: 1083-1090 (doi: 10.1093/ajh/hpu300)

Liu Y, Shi Y, Han R, Liu C, Qin X, Li P, Gu R. Signaling pathways of oxidative stress response: the potential therapeutic targets in gastric cancer. *Front Immunol* 2023; 14: 1139589 (doi: 10.3389/fimmu.2023.1139589)

Liu Z, Wang Y, Kabraji S, Xie S, Pan P, Liu Z et al. Improving orthotopic mouse models of patient-derived breast cancer brain metastases by a modified intracarotid injection method. *Sci Rep* 2019; 9: 622 (doi: 10.1038/s41598-018-36874-3)

Lubrano V, Balzan S. Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World J Exp Med* 2015; 5: 218-224 (doi: 10.5493/wjem.v5.i4.218)

Malachias MV. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Presentation. *Arq Bras Cardiol* 2016; 107: 0 (doi: 10.5935/abc.20160140)

Mancia G, Kreutz R, Brunstrom M, Burnier M, Grassi G, Januszewicz A et al. 2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension: Endorsed by the International Society of Hypertension (ISH) and the European Renal Association (ERA). *J Hypertens* 2023; 41: 1874-2071 (doi: 10.1097/HJH.0000000000003480)

Mannemuddhu SS, Ojeda JC, Yadav A. Renovascular hypertension. *Primary Care: Clinics in Office Practice* 2020; 47: 631-644

Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension* 1991; 17: 707-719 (doi: 10.1161/01.hyp.17.5.707)

Martins-Oliveira A, Castro MM, Oliveira DM, Rizzi E, Ceron CS, Guimaraes D et al. Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling. *Int J Cardiol* 2013; 167: 1199-1205 (doi: 10.1016/j.ijcard.2012.03.137)

Martins-Oliveira A, Guimaraes DA, Ceron CS, Rizzi E, Oliveira DMM, Tirapelli CR et al. Direct renin inhibition is not enough to prevent reactive oxygen species generation and vascular dysfunction in renovascular hypertension. *Eur J Pharmacol* 2018; 821: 97-104 (doi: 10.1016/j.ejphar.2018.01.004)

- Masi S, Uliana M, Viridis A. Angiotensin II and vascular damage in hypertension: Role of oxidative stress and sympathetic activation. *Vascul Pharmacol* 2019; 115: 13-17 (doi: 10.1016/j.vph.2019.01.004)
- Matos VS, do Nascimento ALR, Pereira PG, Rabelo K, Andrade CBV, Moraes ACN et al. Aliskiren Reduces the Adrenal Zona Glomerulosa Apoptosis and Autophagy in Wistar Rats with 2K1C Hypertension. *Int J Hypertens* 2020; 2020: 7684849 (doi: 10.1155/2020/7684849)
- Mello D, Gomes JS, Feitosa AD, Matos-Souza JR, Nadruz W. Espironolactona ou clonidina como quarto fármaco na hipertensão resistente? *Rev. Bras. Hipertens* 2020; (em impressão, doi: 30-33)
- Mengal V, Silva PH, Tiradentes RV, Santuzzi CH, de Almeida SA, Sena GC et al. Aliskiren and l-arginine treatments restore depressed baroreflex sensitivity and decrease oxidative stress in renovascular hypertension rats. *Hypertens Res* 2016; 39: 769-776 (doi: 10.1038/hr.2016.61)
- Nekooeian AA, Rasti Pour A, Dehghani F, Mashghoolozekr E, Esmailpour T. Effects of Captopril and Losartan on Cardiac Stereology in Rats with Renovascular Hypertension. *Iran J Med Sci* 2021; 46: 169-179 (doi: 10.30476/ijms.2020.81948.0)
- Nishi EE, Oliveira-Sales EB, Bergamaschi CT, Oliveira TG, Boim MA, Campos RR. Chronic antioxidant treatment improves arterial renovascular hypertension and oxidative stress markers in the kidney in Wistar rats. *Am J Hypertens* 2010; 23: 473-480 (doi: 10.1038/ajh.2010.11)
- Ogura S, Shimosawa T. Oxidative stress and organ damages. *Curr Hypertens Rep* 2014; 16: 452 (doi: 10.1007/s11906-014-0452-x)
- Oliveira-Sales EB, Dugaich AP, Carillo BA, Abreu NP, Boim MA, Martins PJ et al. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. *Am J Hypertens* 2008; 21: 98-104 (doi: 10.1038/ajh.2007.12)
- Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cifkova R, Dominiczak AF et al. Hypertension. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 18014 (doi: 10.1038/nrdp.2018.14)
- Peace A, Van Mil A, Jones H, Thijssen DHJ. Similarities and Differences Between Carotid Artery and Coronary Artery Function. *Curr Cardiol Rev* 2018; 14: 254-263 (doi: 10.2174/1573403X14666180910125638)
- Pei J, Pan X, Wei G, Hua Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxidation. *Front Pharmacol* 2023; 14: 1147414 (doi: 10.3389/fphar.2023.1147414)
- Pereira PG, Rabelo K, da Silva JFR, Ciambarella BT, Argento JGC, Nascimento ALR et al. Aliskiren improves renal morphophysiology and inflammation in Wistar rats with 2K1C renovascular hypertension. *Histol Histopathol* 2020; 35: 609-621 (doi: 10.14670/HH-18-173)
- Pignatelli P, Menichelli D, Pastori D, Violi F. Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights. *Kardiol Pol* 2018; 76: 713-722 (doi: 10.5603/KP.a2018.0071)
- Poasakate A, Maneesai P, Potue P, Bunbupha S, Tong-Un T, Settheetham-Ishida W et al. Genistein alleviates renin-angiotensin system mediated vascular and kidney alterations in renovascular hypertensive rats. *Biomed Pharmacother* 2022; 146: 112601 (doi: 10.1016/j.biopha.2021.112601)
- Póvoa RMdS. HIPERTENSÃO ARTERIAL SECUNDÁRIA. *Rev Bras Hipertens* 2019; (em impressão, doi: 52-62)

Powers SK, Radak Z, Ji LL. Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. *J Physiol* 2016; 594: 5081-5092 (doi: 10.1113/JP270646)

Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863: 2977-2992 (doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012)

Rehman A, Ismail SB, Naing L, Roshan TM, Rahman AR. Reduction in arterial stiffness with angiotensin II antagonism and converting enzyme inhibition. A comparative study among malay hypertensive subjects with a known genetic profile. *Am J Hypertens* 2007; 20: 184-189 (doi: 10.1016/j.amjhyper.2006.07.015)

Rodriguez-Gonzalez J, Gutierrez-Kobeh L. Apoptosis and its pathways as targets for intracellular pathogens to persist in cells. *Parasitol Res* 2023; 123: 60 (doi: 10.1007/s00436-023-08031-x)

Roy J, Galano JM, Durand T, Le Guennec JY, Lee JC. Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. *FASEB J* 2017; 31: 3729-3745 (doi: 10.1096/fj.201700170R)

Schölkens BA, Linz W, Martorana PA. Experimental cardiovascular benefits of angiotensin-converting enzyme inhibitors: beyond blood pressure reduction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 18 Suppl 2: S26-30

Santuzzi CH, Tiradentes RV, Mengal V, Claudio ER, Mauad H, Gouvea SA, Abreu GR. Combined aliskiren and L-arginine treatment has antihypertensive effects and prevents vascular endothelial dysfunction in a model of renovascular hypertension. *Braz J Med Biol Res* 2015; 48: 65-76 (doi: 10.1590/1414-431x20144191)

Sarathy H, Salman LA, Lee C, Cohen JB. Evaluation and Management of Secondary Hypertension. *Med Clin North Am* 2022; 106: 269-283 (doi: 10.1016/j.mcna.2021.11.004)

Searle TN, Al-Niaimi F, Ali FR. Spironolactone in dermatology: uses in acne and beyond. *Clin Exp Dermatol* 2020; 45: 986-993 (doi: 10.1111/ced.14340)

Siragy HM. Evidence for benefits of angiotensin receptor blockade beyond blood pressure control. *Current hypertension reports* 2008; 10: 261-267

Shimada YJ, Passeri JJ, Baggish AL, O'Callaghan C, Lowry PA, Yannekis G et al. Effects of losartan on left ventricular hypertrophy and fibrosis in patients with nonobstructive hypertrophic cardiomyopathy. *JACC Heart Fail* 2013; 1: 480-487 (doi: 10.1016/j.jchf.2013.09.001)

Sica DA, Gehr TW, Ghosh S. Clinical pharmacokinetics of losartan. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44: 797-814 (doi: 10.2165/00003088-200544080-00003)

Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1429-1435 (doi: 10.1161/01.cir.0000012917.74432.66)

Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotso M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol* 2014; 4: 1201-1228 (doi: 10.1002/cphy.c130040)

- Tiradentes RV, Santuzzi CH, Claudio ER, Mengal V, Silva NF, Neto HA et al. Combined Aliskiren and L-arginine treatment reverses renovascular hypertension in an animal model. *Hypertens Res* 2015; 38: 471-477 (doi: 10.1038/hr.2015.16)
- Todd PA, Goa KL. Enalapril. A reappraisal of its pharmacology and therapeutic use in hypertension. *Drugs* 1992; 43: 346-381 (doi: 10.2165/00003495-199243030-00005)
- Tsunoda K, Abe K, Hagino T, Omata K, Misawa S, Imai Y, Yoshinaga K. Hypotensive effect of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1993; 6: 28-32 (doi: 10.1093/ajh/6.1.28)
- Unger T, Borghi C, Charchar F, Khan NA, Poulter NR, Prabhakaran D et al. 2020 International Society of Hypertension global hypertension practice guidelines. *J Hypertens* 2020; 38: 982-1004 (doi: 10.1097/HJH.0000000000002453)
- Unur E, Aycan K. Arteries of the carotid body in rats. *Anat Histol Embryol* 1999; 28: 167-169 (doi: 10.1046/j.1439-0264.1999.00182.x)
- Van thiel BS, van der Pluijm I, te Riet L, Essers J, Danser AH. The renin-angiotensin system and its involvement in vascular disease. *Eur J Pharmacol* 2015; 763: 3-14 (doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.090)
- Vargas RA, Varela Millan JM, Fajardo Bonilla E. Renin-angiotensin system: Basic and clinical aspects-A general perspective. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)* 2022; 69: 52-62 (doi: 10.1016/j.endien.2022.01.005)
- Vilhena JC, Lopes de Melo Cunha L, Jorge TM, de Lucena Machado M, de Andrade Soares R, Santos IB et al. Acai Reverses Adverse Cardiovascular Remodeling in Renovascular Hypertension: A Comparative Effect With Enalapril. *J Cardiovasc Pharmacol* 2021; 77: 673-684 (doi: 10.1097/FJC.0000000000001003)
- Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes, obesity and metabolism* 2007; 9: 813-839 (doi: 10.1007/s11906-013-0330-y)
- Wang HD, Xu S, Johns DG, Du Y, Quinn MT, Cayatte AJ, Cohen RA. Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice. *Circ Res* 2001; 88: 947-953 (doi: 10.1161/hh0901.089987)
- Weber BR, Dieter RS. Renal artery stenosis: epidemiology and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2014; 7: 169-181 (doi: 10.2147/IJNRD.S40175)
- Xanthakis V, Vasan RS. Aldosterone and the risk of hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2013; 15: 102-107 (doi: 10.1007/s11906-013-0330-y)
- Xiao F, He F, Chen H, Lin S, Shen A, Chen Y et al. Qingxuan Jiangya Decoction Reverses Vascular Remodeling by Inducing Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis in Spontaneously Hypertensive Rats. *Molecules* 2016; 21: (doi: 10.3390/molecules21070956)
- Xu F, Mao C, Liu Y, Wu L, Xu Z, Zhang L. Losartan chemistry and its effects via AT1 mechanisms in the kidney. *Curr Med Chem* 2009; 16: 3701-3715 (doi: 10.2174/092986709789105000)
- Yagi S, Morita T, Katayama S. Combined treatment with an AT1 receptor blocker and angiotensin converting enzyme inhibitor has an additive effect on inhibiting neointima

formation via improvement of nitric oxide production and suppression of oxidative stress. *Hypertens Res* 2004; 27: 129-135 (doi: 10.1291/hypres.27.129)

Yang CT, Kor CT, Hsieh YP. Long-Term Effects of Spironolactone on Kidney Function and Hyperkalemia-Associated Hospitalization in Patients with Chronic Kidney Disease. *J Clin Med* 2018; 7: (doi: 10.3390/jcm7110459)

Yang D, Zhang M, Huang X, Fang F, Chen B, Wang S et al. Protection of retinal vasculature by losartan against apoptosis and vasculopathy in rats with spontaneous hypertension. *J Hypertens* 2010; 28: 510-519 (doi: 10.1097/HJH.0b013e328333663f)

Yang T, Xu C. Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28: 1040-1049 (doi: 10.1681/ASN.2016070734)

Zhu X, Zhou Z, Zhang Q, Cai W, Zhou Y, Sun H, Qiu L. Vaccarin administration ameliorates hypertension and cardiovascular remodeling in renovascular hypertensive rats. *J Cell Biochem* 2018; 119: 926-937 (doi: 10.1002/jcb.26258)

ANEXO – Comitê de ética em pesquisa

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

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado **"ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS INDUZIDAS PELA HIPERTENSÃO ARTERIAL EM RATOS E EFEITO DO TRATAMENTO COM BLOQUEADORES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E ANTIOXIDANTE."** registrado com o nº 001/2023, sob a responsabilidade de **Jorge José de Carvalho** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) / IBRAG / UERJ, em reunião de 08/02/2023.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	08/02/2027
Espécie / linhagem / raça	Wistar, SHR e WK
Nº de animais	170 machos (100 wistar, 70 SHR e WK)
Peso / Idade	150/180g e 250g
Sexo	Machos
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 08 de fevereiro de 2023.

Dr. Claudio C. Filgueiras
Professor Associado
Matr. 33080-3
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Dra. Yael A. Villaza
Professora Associada
Matr. 35066-0
Vice Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ