



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

Verônica Soares de Matos

**Aspectos morfofuncionais da zona glomerulosa adrenal de ratos com hipertensão renovascular: efeito do alisquireno**

Rio de Janeiro

2020

Verônica Soares de Matos

**Aspectos morfofuncionais da zona glomerulosa adrenal de ratos com hipertensão renovascular: efeito do alisquireno**

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

M433 Matos, Verônica Soares de.  
Aspectos morfofuncionais da zona glomerulosa adrenal de ratos com hipertensão renovascular: efeito do alisquireno / Verônica Soares de Matos – 2020.  
83 f.

Orientador: Jorge José de Carvalho.  
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Clínica e Experimental.

1. Glândulas suprarrenais - Teses. 2. Zona glomerulosa - Teses. 3. Aldosterona - Teses. 4. Sistema Renina-Angiotensina - Teses. 5. Hipertensão renovascular - Teses. 6. Agentes hipotensores – Teses. I. Carvalho, Jorge José de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.45:616.61-008.6

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

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

---

Assinatura

---

Data

Verônica Soares de Matos

**Aspectos morfofuncionais da zona glomerulosa adrenal de ratos com hipertensão  
renovascular: efeito do alisquireno**

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de junho de 2020.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Alessandra Alves Thole

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cherley Borba Vieira de Andrade

Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Dr. Marciano Viana Paes

Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Aluana Santana Carlos

Universidade Iguazu

Rio de Janeiro

2020

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todos que me amam e me querem bem.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por me colocar de pé a cada dia, sem ele nada disso seria possível.

À minha amiga Ana Lúcia Nascimento toda a minha gratidão, por todo carinho, dedicação e ajuda durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador Professor Doutor Jorge José de Carvalho, que me acolheu em seu laboratório, pela oportunidade que me deu, e por acreditar em mim durante todo esse período.

À professora Doutora Jemima Fuentes, que sempre me ajudou quando precisava.

A Priscila, Kíssila e Bianca, que me ajudaram muito nesse trabalho, sempre muito gentis e solícitas! Obrigada por vocês terem me aturado nesses últimos anos.

Ao Victor, por sempre estar disponível para ajudar.

Às meninas de iniciação científica, Luciana, Letícia, Carol, Gabriela e Vicky, a nova geração do laboratório.

Aos meus amigos Alan Cesar Moraes e Cherley Borba Vieira de Andrade, por todo incentivo e ajuda para realização deste trabalho.

A todos os integrantes do Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual, por todo o companheirismo e espírito de equipe.

Ao Professor Doutor Mario Bernardo Filho, por ter me mostrado este incrível e maravilhoso mundo da pesquisa.

A todos os professores do Departamento de Histologia e Embriologia, que me acolheram com carinho e respeito, incentivando-me desde o início da minha trajetória profissional.

Ao meu amigo, companheiro, namorado, marido José Elder Valença Sena, pelo apoio e carinho durante toda essa jornada.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem durante essa jornada.

Aos meus irmãos Sávio, Suelen e Samir, por me incentivarem a ir atrás dos meus sonhos e vibrarem comigo a cada conquista realizada.

Ao meu avô, Manoel Paes de Matos, por todo amor e carinho ao longo desses anos e pelo cuidado que sempre teve comigo, pela ótima criação, por sempre me incentivar a ir atrás dos meus sonhos e vibrar comigo a cada conquista realizada.

À minha avó Maria Soares (*in memoriam*), por todo amor, carinho e cuidado.

À minha tia Sílvia, por ter sido minha alavanca.

A toda a minha família, pelo carinho que tem comigo, desde o momento de meu nascimento até os dias de hoje. Espero que vocês se orgulhem dessa minha nova conquista.

A todos os meus amigos, pelo carinho e compreensão. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Ao laboratório de microscopia eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense (UFF), pela oportunidade de utilizar o microscópio eletrônico de transmissão JEM 1011.

A todos os colegas e professores da pós-graduação de Fisiopatologia Clínica e Experimental, que participaram dessa minha jornada.

Às agências de fomento que de maneira direta ou indireta ajudaram com suporte financeiro para a realização desse trabalho: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

À banca examinadora, que disponibilizou seu tempo para agregar conhecimento e fazer parte desta conquista.

Todo caminho é resvaloso. Mas cair não prejudica demais...

A gente levanta, a gente sobe, a gente volta...

O correr da vida é assim: esquenta e esfria, aperta e aí afrouxa.

Sossega e depois desinquieta

O que ela quer da gente é a coragem

*Guimarães Rosa*

## RESUMO

MATOS, Verônica Soares. *Aspectos morfofuncionais da zona glomerulosa adrenal de ratos com hipertensão renovascular: efeito do alisquireno*. 2020. 83 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A hipertensão arterial (HA) é considerada um dos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Essa patologia não se manifesta apenas como uma elevação da pressão arterial, mas também implica alterações estruturais e funcionais de órgãos alvo, ocasionando, por exemplo, hipertrofia do ventrículo esquerdo e desenvolvimento de doença renal. A hipertensão pode ser classificada como primária (essencial), sem causa atribuível, ou secundária, que é consequência de uma causa identificável. A estenose da artéria renal é a causa mais comum desse tipo de hipertensão. O modelo definido como “dois rins um clip” (2R1C), assemelha-se à hipertensão renovascular em humanos, levando a hiperatividade do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). As glândulas adrenais constituem um dos principais órgãos homeostáticos dos mamíferos, pois regulam a volemia, equilíbrio eletrolítico e a pressão arterial, principalmente pela ação da aldosterona, um mineralocorticoide produzido pelas células da camada glomerulosa da região cortical da adrenal. Essa glândula é formada por duas regiões histológicas distintas: um córtex externo e uma medula disposta internamente. Ambas são envoltas por uma cápsula de tecido conjuntivo. A aldosterona é um mineralocorticoide secretado pelas glândulas adrenais, regulado pelo SRAA e atua em órgãos-alvo como coração, vasos e rins, a fim de manter o controle da volemia, equilíbrio eletrolítico e pressão arterial. Estudos recentes enaltecem a ação da aldosterona como hormônio chave no desenvolvimento da HA. O SRAA é uma cascata hormonal que através de suas múltiplas interações contribui para homeostase cardiovascular, adicionalmente regula ainda a resposta do endotélio à inflamação. A ativação excessiva ou desregulação deste tem sido reconhecida como elemento de importância na patogênese das doenças cardiovasculares, renais e na hipertensão arterial. O alisquireno é um fármaco bloqueador direto do SRAA, diminuindo a atividade da renina plasmática e a concentração de angiotensina I e II e inibição da aldosterona. Atualmente, estão em curso vários estudos para avaliação da eficácia do alisquireno na proteção de órgãos-alvo. Neste trabalho foram avaliados os efeitos estruturais e ultraestruturais do alisquireno na zona glomerulosa da glândula adrenal de ratos 2R1C. Foi avaliada a expressão do receptor AT<sub>1</sub> assim como PGC-1 $\alpha$ , Citocromo C, Bax / Bcl-2, EEA1 e Rab7 por imunoperoxidase. Foi observado que o alisquireno foi capaz de abrandar os efeitos deletérios causados pela hipertensão renovascular na zona glomerulosa, reduzindo a expressão do receptor AT<sub>1</sub>, Citocromo C, razão Bax/Bcl-2, EEA1 e Rab 7. Observou-se, ainda, que o alisquireno não foi capaz de atenuar a biogênese mitocondrial expressa pelo PGC-1 $\alpha$ . Por fim, foi constatado que o fármaco foi capaz de arrefecer danos ultraestruturais na zona glomerulosa.

Palavras-chave: Glândula adrenal. Zona glomerulosa. Aldosterona. Sistema renina angiotensina aldosterona. 2R1C. Alisquireno.

## ABSTRACTS

MATOS, Verônica Soares. *Morphofunctional aspects of the adrenal glomerulosa zone of rats with renovascular hypertension: aliskiren of effect*. 2020. 83 f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Hypertension is one of the risk factors for developing cardiovascular diseases. This pathology is manifested not only as an elevation of blood pressure, but also implies structural and functional changes of target organs, causing, for example, left ventricular hypertrophy and development of kidney disease. Can be classified as primary (essential), no cause attributable, or secondary, which is a result of an identifiable cause. Renal artery stenosis is the most common cause of this type of hypertension. The model “two kidneys one clip” (2K1C) resembles the renovascular hypertension in humans, showing hyperactivity of the Renin angiotensin aldosterone (RAAS). The adrenal glands are one of the major homeostatic organs of mammals, as they regulate blood volume, electrolyte balance and blood pressure mainly by the action of aldosterone, a mineralocorticoid produced by cell in the glomerulosa zone of the adrenal cortical region. They are formed by two distinct histological regions: an external cortex and a medulla arranged internally. Both are surrounded by a connective tissue capsule. The Mineralocorticoid aldosterone is secreted by adrenal glands, governed by the RAAS and acts in target organs such as heart, blood vessels and kidneys in order to keep track of blood volume, electrolyte balance and blood pressure (BP). Recent studies enhance the action of aldosterone as key hormone in the development of the hypertension. The RAAS is a hormonal cascade that through its multiple interactions contributes to cardiovascular homeostasis, additionally also regulates the endothelium response to inflammation. Excessive or activation of this deregulation has been recognized as an element of importance in the pathogenesis of cardiovascular, renal diseases and hypertension. The aliskiren is a direct blocker of RAAS, decreasing the activity of Renin and plasma concentration of angiotensin II and aldosterone inhibition. Several studies are underway to assess the effectiveness of aliskiren on protection of target organs. In this work, we evaluated the effects of structural and ultrastructural alisquireno of the zone glomerulosa of the adrenal gland of rats 2K1C. AT<sub>1</sub>R expression was evaluated, as well as PGC-1 $\alpha$ , Cytochrome C, Bax / Bcl-2, EEA1 e Rab7. It was observed that aliskiren was able to mitigate the deleterious effects caused by renovascular hypertension in the glomerulosa zone, reducing the expression of the AT<sub>1</sub> receptor, Cytochrome C, Bax/Bcl-2 ratio, EEA1 and Rab 7. It was also observed that the aliskiren was not able to attenuate the mitochondrial biogenesis expressed by PGC-1 $\alpha$ . Finally, was observed that the aliskiren was able to minimize ultrastructural damage in the glomerulosa zone.

Keyword: Adrenal gland. Glomerulosa zone. Aldosterone. Renin angiotensin aldosterone system. 2K1C. Aliskiren.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática do modelo de hipertensão renovascular de Goldblatt .....	22
Figura 2 -	Fotomicrografia das camadas da glândula adrenal .....	24
Figura 3 -	Fotomicrografia da localização da zona indiferenciada da glândula adrenal .....	27
Figura 4 –	Diagrama ilustrando alguns dos mecanismos de controle de secreção de aldosterona pela zona glomerulosa .....	30
Figura 5 -	Representação do SRAA e dos locais de ação de vários agentes farmacológicos .....	34
Gráfico 1 -	Evolução da PA sistólica .....	46
Figura 6 -	Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para AT <sub>1</sub> .....	47
Figura 7 –	Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para proteína PGC-1 $\alpha$ .....	48
Figura 8 –	Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para proteína citocromo C .....	49
Figura 9 –	Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para proteína Bax .....	51
Figura 10 -	Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para proteína Bcl-2 .....	52
Gráfico 2 -	Representatividade da razão da expressão das proteínas Bax / Bcl-2 .....	53
Figura 11 -	Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para proteína EEA1 .....	54
Figura 12 -	Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para proteína Rab7 .....	55
Figura 13 -	Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para PCNA ...	57
Figura 14 -	Eletromicrografia da zona glomerulosa do córtex da adrenal por microscopia eletrônica de transmissão .....	58
Figura 15 -	Eletromicrografia da zona glomerulosa do córtex da adrenal por microscopia eletrônica de transmissão .....	59

Gráfico 3 - Representatividade da quantificação de mitocôndrias das células da zona glomerulosa do córtex da adrenal, por microscopia eletrônica de transmissão .....	60
Figura 16 - Esquema de representação dos resultados obtidos com a hipertensão renovascular e com o tratamento com o fármaco alisquireno .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de Variância
ANP	Peptídeo natriurético atrial
ARA II	Antagonista do receptor de angiotensina II
AT <sub>1</sub>	Receptor 1 de angiotensina II
BRA	Bloqueadores dos receptores de angiotensina
BSA	Soro albumina bovina
CEUA	Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais experimentais
CYP11B1	11 - $\beta$ -hidroxilase
CYP11B2	Aldosterona sintase
CYP17	17 $\alpha$ – Hidroxilase
DCV	Doenças cardiovasculares
DDSA	Anidrido dodecenil succínico
DHE	Departamento de Histologia e Embriologia
DMP	2,4 tridimetilaminametilfenol
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EEA1	Antígeno 1 do Endossoma Inicial
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HE	Hematoxilina e eosina
HSD3Bs	3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase
IDR	inibidor direto de renina
IECA	Inibidor de enzima conversora de angiotensina
MNA	Anidrido metil nádic
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Tampão fosfato salino
PBS/BSA	Tampão fosfato-salino/albumina bovina

PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PGC - $1\alpha$	Receptor - $\gamma$ ativado por proliferador de peroxissomo coativador-1 $\alpha$
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
18-OH-B	18hidroxicorticosterona
1R1C	<i>One Rim one Clipe</i>
2K1C	<i>Two Kidney one Clip</i>
2R1C	Dois Rins um Clipe

## LISTA DE SÍMBOLOS

mg	Miligrama
$\beta$	Beta
$\alpha$	Alfa
$K^+$	Potássio
$Na^+$	Sódio
mmHg	Milímetros de mercúrio
%	Porcentagem
g/mol	Gramas/massa molar
Kg	Quilograma
°C	Graus Celsius
g	Grama
mg/kg/dia	Miligrama por quilograma ao dia
$\pm$	Mais ou menos
mm	Milímetros
min	Minuto
$\mu m$	Micrometro
$\gamma$	Gama
ml	Mililitro
pH	Potencial de Hidrogênio
nm	Nanômetro
kV	Quilovolt
$\leq$	Menor ou maior
+	Positivo
>	Maior
<	Menor

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
1.1	<b>Hipertensão arterial sistêmica</b> .....	19
1.2	<b>Hipertensão renovascular</b> .....	20
1.3	<b>Glândula adrenal</b> .....	23
1.4	<b>Aldosterona</b> .....	28
1.5	<b>Sistema renina-angiotensina-aldosterona</b> .....	30
1.6	<b>Terapêuticas farmacológicas</b> .....	33
1.7	<b>Inibidores diretos de renina</b> .....	36
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
2.1	<b>Objetivos gerais</b> .....	38
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	38
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
3.1	<b>Animais utilizados</b> .....	39
3.2	<b>Indução da hipertensão renovascular</b> .....	40
3.3	<b>Análise da pressão arterial sistólica</b> .....	41
3.4	<b>Eutanásia</b> .....	41
3.5	<b>Histoquímica e Imunohistoquímica por peroxidase</b> .....	41
3.6	<b>Microscopia eletrônica de transmissão</b> .....	43
3.7	<b>Análise quantitativa</b> .....	43
3.8	<b>Análise estatística</b> .....	44
4	<b>RESULTADOS</b> .....	45
4.1	<b>Pressão arterial sistólica</b> .....	45
4.2	<b>Imunomarcção para detecção do Receptor AT<sub>1</sub></b> .....	46
4.3	<b>Imunomarcção para detecção da proteína PGC-1<math>\alpha</math></b> .....	47
4.4	<b>Imunomarcção para detecção da proteína citocromo C</b> .....	48
4.5	<b>Imunomarcção para detecção da proteína Bax</b> .....	50
4.6	<b>Imunomarcção para detecção da proteína Bcl-2</b> .....	51
4.7	<b>Análise da expressão das proteínas Bax / Bcl-2</b> .....	52

4.8	<b>Imunomarcção para detecção de antígeno 1 do endossoma inicial (EEA1)</b> .....	53
4.9	<b>Imunomarcção para detecção da proteína Rab7</b> .....	54
4.10	<b>Imunomarcção para detecção de antígeno de proliferação celular (PCNA)</b> .....	56
4.11	<b>Avaliação da ultraestrutura por microscopia eletrônica de transmissão ..</b>	57
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	61
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	69
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
	<b>ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa</b> .....	82
	<b>ANEXO B – Submissão do Artigo</b> .....	83

## INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é um dos mais importantes fatores de risco para as doenças cardiovasculares e está associada com a alta prevalência de morbidade e mortalidade em todo mundo. Essa patologia não se manifesta apenas como uma elevação da pressão arterial (PA), mas também implica alterações estruturais e funcionais de órgãos alvo, ocasionando, por exemplo, hipertrofia do ventrículo esquerdo e desenvolvimento de doença renal (Bonanni e Vestra 2012, Calvier et al. 2015, Pechanova, et al. 2019, Tian et al. 2011, van Rhijn-Brouwer et al. 2018). Além disso, a hipertensão pode ser caracterizada como uma das causas de maior redução da qualidade e expectativa de vida dos indivíduos (Cortese et al. 2020, Riccioni et al. 2009).

A hipertensão renovascular, que atinge 5% da população hipertensa, é decorrente de uma isquemia renal causada, em geral, por uma lesão obstrutiva parcial ou completa de uma ou ambas as artérias renais (Geavlete et al. 2012, Martins-Oliveira et al. 2018). A aterosclerose é a causa de estenose da artéria renal, correspondendo a cerca de 90% dos casos, seguida pela displasia fibromuscular, a qual corresponde a aproximadamente 10% dos casos (Angeretti et al. 2013, Geavlete et al. 2012, Piecha et al. 2012). Causas menos comuns de estenose da artéria renal incluem vasculite, tromboembolismo, dissecação da aorta, aneurisma de artéria renal e fístula arteriovenosa (Piecha et al. 2012).

A hipertensão renovascular experimental é decorrente da obstrução parcial do fluxo sanguíneo para os rins, desenvolvida em várias espécies de animais, recebendo o nome de hipertensão de Goldblatt (Lerman et al. 2005). Esta obstrução pode ser produzida pela constrição de uma artéria renal e associada com a remoção do rim contralateral, conhecida como Goldblatt tipo 1, um - rim - um clipe (1R1C), ou produzida pela obstrução de uma artéria renal com o rim contralateral íntegro, hipertensão de Goldblatt tipo 2, dois rins - um - clipe (2R1C) (Campagnaro et al. 2012, Shimoura et al. 2017).

O Modelo 2R1C é um modelo de hipertensão renovascular que apresenta hiperatividade do Sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), que influencia o desenvolvimento e manutenção da pressão arterial elevada. Isso ocorre porque as concentrações de renina plasmática e angiotensina II permanecem aumentadas estimulando a produção de aldosterona na zona glomerulosa da adrenal (Carvalho-Galvão et al. 2018, Shimoura et al. 2017).

As glândulas adrenais são um par de corpos triangulares ou redondos localizados ao lado do pólo superior de cada rim. Elas possuem um peso combinado de cerca de 10-15 g em seres humanos, e 40-60 mg em ratos (Mitani 2014), compostas por uma cápsula de tecido conjuntivo que a envolve externamente. Histologicamente são divididas em duas regiões: medula e camada cortical, que é composta por zona glomerulosa, fasciculada e reticulada. A zona glomerulosa está situada logo abaixo da cápsula e apresenta células piramidais ou colunares dispostas em cordões arcados envolvidos por capilares sanguíneos.

A zona fasciculada, disposta abaixo da zona glomerulosa, possui de uma a duas células de espessura, retose retangulares e perpendiculares à cápsula. Suas células contêm muitos lipídios no citoplasma, que são extraídos durante o processamento histológico, dando um aspecto de vacúolos e, por isso, são denominadas espongiócitos. A zona reticulada apresenta cordões celulares com arranjo em forma de rede e ricamente vascularizadas. A medula, por sua vez, apresenta-se com células poliédricas arranjadas em redes entre algumas células ganglionares (Junqueira e Carneiro 2013, Mitani 2014, Nakamura et al. 2015).

As três zonas apresentam papéis distintos na produção de hormônios esteroides: zona glomerulosa produz mineralocorticoides, zona fasciculada produz glicocorticóides e zona reticulada produz androgênios (Boulkroun et al. 2010). No entanto, o zoneamento funcional do córtex adrenal ainda permanece controverso. As enzimas 11 -  $\beta$ -hidroxilase (CYP11B1) e aldosterona sintase (CYP11B2) são consideradas como enzimas esteroidogênicas específicas das zonas que estão envolvidas nas etapas finais da biossíntese de cortisol e aldosterona, respectivamente. Células adrenocorticais positivas para CYP11B2 e negativas para  $17\alpha$  - hidroxilase (CYP17) são classificadas funcionalmente como células produtoras de mineralocorticóides, enquanto as células positivas para CYP11B1 e negativas para CYP17 são consideradas como células produtoras de glicocorticoides (Nakamura et al. 2015).

Em condições especiais como envelhecimento, hiperaldosteronismo secundário, níveis elevados de  $\text{Na}^+$ , níveis baixos de  $\text{K}^+$  e estresse grave, a zona glomerulosa é substituída por células indiferenciadas, as quais expressam  $3\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (HSD3Bs) em vez de expressar CYP11B2. Portanto, ocorre remodelamento adrenocortical por localização subcapsular da zona progenitora, que tem o potencial para diferenciação bidirecional, em zona glomerulosa ou zona fasciculada (Nakamura et al. 2015).

A aldosterona é um mineralocorticóide secretado pelas células da zona glomerulosa das adrenais, regulado pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) a fim de manter o controle da volemia, equilíbrio eletrolítico e pressão arterial (Calvier et al. 2015, Taylor et al. 2020, Yao et al. 2018). A ativação excessiva do SRAA também está envolvida na

patogênese de várias doenças hipertensivas. Estudos recentes enaltecem a ação da aldosterona como hormônio chave no desenvolvimento da hipertensão arterial (Premer et al. 2013).

Em resposta a uma redução na pressão arterial ou à diminuição da perfusão renal, as células justaglomerulares presentes nas arteríolas aferentes e eferentes renais produzem e liberam uma protease chamada de renina. Essa enzima é responsável pela conversão do angiotensinogênio, que possui origem hepática e que está presente na corrente sanguínea, no decapeptídeo angiotensina I, que possui função vasoconstrictora moderada. A enzima conversora de angiotensina (ECA), presente em altas concentrações, principalmente nas células endoteliais da circulação pulmonar, transforma a angiotensina I no octapeptídeo angiotensina II, um potente vasoconstritor. A angiotensina II também age sobre o córtex da adrenal, induzindo a glândula a liberar aldosterona, um hormônio que age nas células dos túbulos contorcidos distais, fazendo com que ocorra maior reabsorção de água e sódio, acarretando um aumento do volume sanguíneo e conseqüentemente levando à elevação da pressão arterial (Siragy 2011).

A inibição farmacológica do sistema renina-angiotensina-aldosterona pode ser obtida através de três mecanismos diferentes: a) inibição da ECA, ocasionando bloqueio da síntese de angiotensina II; b) inibição da ação da angiotensina II através dos bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRA); c) inibição direta de renina, bloqueando a geração de angiotensina I a partir do angiotensinogênio (Escobar et al. 2012). O alisquireno (Rasilez®) é um novo representante da classe de inibidores diretos de renina (IDR) aprovado para comercialização (Bonanni e Vestra 2012, Escobar et al. 2012). Pelo fato do alisquireno inibir a atuação da renina, ele bloqueia o SRAA no seu ponto inicial de ativação, fazendo com que o estudo de seus efeitos seja de grande interesse (Bonanni e Vestra 2012, Fu et al. 2017, Pechanova et al. 2019, Von Lueder 2015).

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Hipertensão arterial sistêmica

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem atualmente a principal causa de mortalidade e morbidade a nível mundial. Dentre elas, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é a mais importante (van Rhijn-Brouwer et al. 2018).

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados da pressão arterial (PA), ou seja, quando a pressão sistólica é igual ou superior a 140 mmHg (milímetros de mercúrio) e/ou a pressão diastólica é igual ou superior a 90 mmHg (European Society of Cardiology 2019, Picon et al. 2012, Sociedade Brasileira de Cardiologia 2016). É uma doença crônica, altamente prevalente em humanos, de elevado custo econômico e social. Estima-se que essa doença afete 1/3 de adultos com mais de 25 anos, respondendo por cerca de bilhões de pessoas em todo mundo e acomete aproximadamente 50 milhões de indivíduos nos Estados Unidos (Bernstein et al. 2015, Ishak et al. 2017).

A hipertensão arterial é considerada um importante problema de saúde pública no mundo, representando um importante fator de risco para doenças cardiovasculares e doenças renais (Cortese et al. 2020, Omboni et al. 2015). Por ser muitas das vezes assintomática, há dificuldades para que os indivíduos procurem os serviços de saúde para o diagnóstico e adesão ao tratamento (Britto 2011).

No Brasil, a hipertensão atinge 32,5% (36 milhões) de indivíduos adultos, contribuindo diretamente ou indiretamente para 50% das mortes por doença cardiovascular, suas complicações têm impacto elevado na perda da produtividade do trabalho e da renda familiar (Abegunde et al. 2007, Santos et al. 2016). Em 2013, ocorreram 1.138.670 óbitos dos quais 29,8% decorrentes de doenças cardiovasculares, demonstrando que esta tem sido a principal causa de morte no país (Sociedade Brasileira de Cardiologia 2016).

Em um estudo populacional, a pressão arterial apresenta uma distribuição com um desvio da curva para direita, existindo uma forte correlação entre hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, doenças renais e mortalidade, mesmo em indivíduos normotensos. Esta correlação é mais robusta com a pressão sistólica do que com a pressão diastólica. Não existe nível específico de pressão arterial no qual as complicações cardiovasculares e renais

comecem a ocorrer, então a definição de hipertensão é arbitrária (Cortese et al. 2020, Sociedade Brasileira de Cardiologia 2016). Mesmo assim esta definição precisa existir por razões práticas para avaliação e tratamento de pacientes (Mourad e Le Jeune 2009, Omboni et al. 2015).

A etiologia exata da hipertensão arterial permanece obscura, sabendo-se apenas que é heterogênea e multifatorial, o que dificulta o estudo dessa doença (Hall et al. 2012). A hipertensão pode ser classificada como primária ou secundária. A hipertensão primária ou hipertensão essencial é uma forma de hipertensão onde não há uma causa primária atribuível e identificável. Trata-se de uma doença multifatorial desencadeada pela associação de diversos fatores genéticos e ambientais (Cortese et al. 2020, Gupta et al. 2015, Santos et al. 2016). Estudos epidemiológicos indicam que variantes genéticas, inclusive variantes dos genes do angiotensinogênio, da renina e da aldosterona sintetase aumentam o risco de hipertensão essencial (Gouveia et al. 2018, Hassumi et al. 2003, Nalogowska-Glosnicka et al. 2000, Panahpour et al. 2019). Este tipo de hipertensão é o mais comum, correspondendo aproximadamente a 90% dos casos (Gouveia et al. 2018, Hall et al. 2012). Já a hipertensão arterial secundária é consequência de uma causa identificável. As doenças renais são a causa mais comum deste tipo de hipertensão, ocupando lugar de destaque a estenose da artéria renal (Hall et al. 2012, Pullalarevu et al. 2014).

A fim de conhecer melhor os mecanismos básicos da hipertensão arterial, modelos experimentais têm sido propostos. Além disso, esses modelos objetivam também, analisar os efeitos da elevação da pressão arterial em órgão alvo como coração, vasos sanguíneos e rim. Dentre os modelos experimentais de hipertensão para animais destaca-se o modelo renovascular, que decorre da oclusão parcial da artéria renal mantendo-se o rim contralateral íntegro, este modelo é conhecido como “Goldblatt II” (2R1C) (Goldblatt et al. 1934).

## **1.2 Hipertensão renovascular**

A hipertensão renovascular, que atinge 5% da população hipertensa, é decorrente de uma isquemia renal causada, em geral, por uma lesão obstrutiva parcial ou completa de uma ou ambas as artérias renais (Geavlete et al. 2012, Martins-Oliveira et al. 2018).

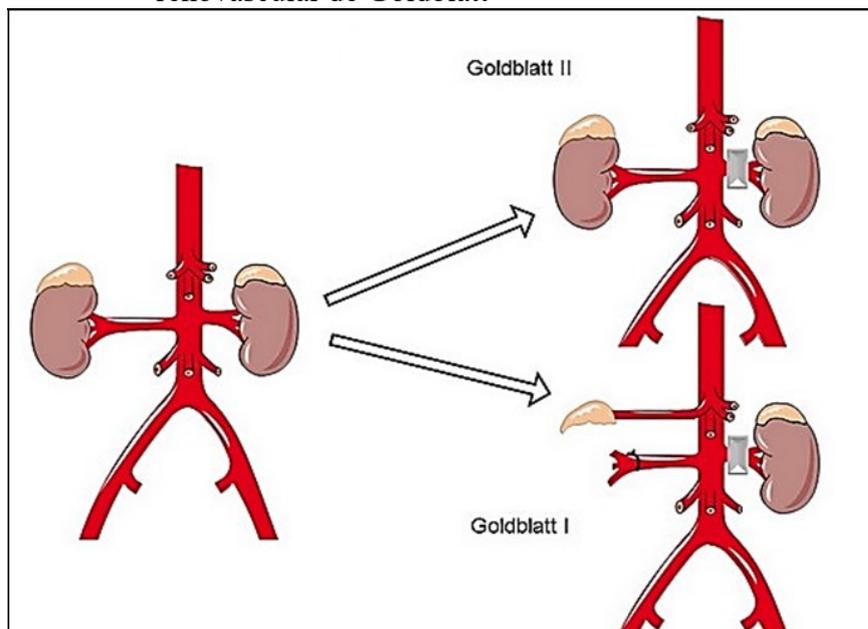
A aterosclerose é a causa de estenose da artéria renal correspondendo a cerca de 90% dos casos, seguida pela displasia fibromuscular a qual corresponde a aproximadamente 10%

dos casos (Angeretti et al. 2013, Geavlete et al. 2012, Piecha et al. 2012, Samadian et al. 2017). Causas menos comuns de estenose da artéria renal incluem vasculite, tromboembolismo, dissecação da aorta, aneurisma de artéria renal e fístula arteriovenosa (Piecha et al. 2012).

A Hipertensão renovascular possui fisiopatologia intimamente relacionada com o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), o qual é um mecanismo fisiológico bem conhecido de controle da pressão arterial, sendo um regulador da homeostase eletrolítica (Navar et al. 1998, Taylor et al. 2020). A redução substancial da pressão de perfusão renal, provocada pela estenose da artéria, resulta em um aumento da liberação de renina pelas células justaglomerulosas na arteríola aferente do rim afetado. Este aumento dos níveis de renina leva a ativação do SRAA e um aumento gradual da pressão sistêmica, dos níveis de angiotensina II circulante e de aldosterona, ocasionando lesões em órgãos alvos (Fu et al. 2017, Martins-Oliveira et al. 2018)

Goldblatt et al. (1934) observaram uma elevação substancial da pressão arterial de cães cujo suprimento de sangue dos rins foi reduzido por meios de “clipes de prata” colocados na artéria renal. Desde então modelos experimentais de hipertensão têm sido desenvolvidos em várias espécies de animais, como coelho, macaco e ratos, tendo por base a redução do fluxo sanguíneo renal, recebendo o nome de hipertensão de Goldblatt (Lerman et al. 2005). Esta obstrução pode ser produzida pela constrição de uma artéria renal e associada com a remoção do rim contralateral, conhecida como Goldblatt tipo 1, um - rim - um clipe (1R1C), ou produzida pela obstrução de uma artéria renal com o rim contralateral íntegro, hipertensão de Goldblatt tipo 2, dois rins - um - clipe (2R1C) (Figura 1) (Campagnaro et al. 2012, Segawa et al. 2020, Shimoura et al. 2017).

Figura 1 - Representação esquemática do modelo de hipertensão renovascular de Goldblatt



Fonte: adaptado de Campagnaro et al. (2012).

Na hipertensão produzida pela constrição de apenas uma artéria renal, com o rim contralateral íntegro, 2R1C, os níveis plasmáticos de renina e aldosterona estão aumentados (Koletsky 1971).

O aumento da pressão arterial em decorrência da constrição de uma das artérias renais ocorre de forma progressiva e, em geral, esse aumento começa um dia após a colocação do clipe. A reversão da hipertensão arterial neste modelo pode ser obtida pela remoção da constrição arterial ou pela retirada do rim com o clipe (Campagnaro et al. 2012).

A hipertensão renovascular 2R1C é um modelo clássico de hipertensão secundária, pois é um modelo experimental, que em muitos aspectos assemelha-se à hipertensão renovascular no humano. Em coelhos e ratos o modelo 2R1C induz um aumento crônico e gradual da pressão arterial, atingindo um pico após duas semanas da oclusão da artéria renal. Em geral, os ratos desenvolvem hipertensão mais facilmente comparado aos coelhos e se tornam a principal escolha para estabelecer um modelo hipertensivo renovascular 2R1C (Cervenka et al. 2003, Leenen e Jong 1971).

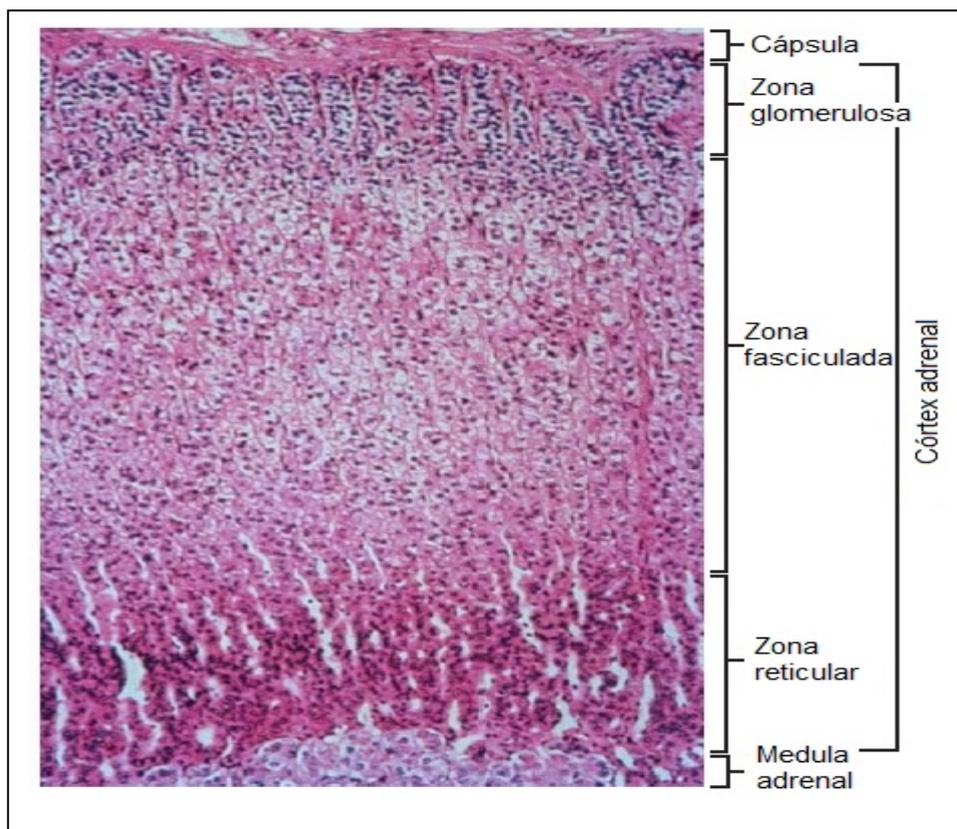
### 1.3 Glândula adrenal

As glândulas adrenais, denominadas suprarrenais no homem devido a sua posição superior, foram descritas em 1552 pelo anatomista Bartolomeo Eustachius, que foram denominadas de *Glandulae Renibus incumbentes*, em um livro chamado “Upuscular Anatomica”, que a descreveu, mas não obteve uma resposta concreta da sua funcionalidade. No decorrer dos séculos os estudos não cessaram, vários anatomistas tentavam descobrir qual era a funcionalidade das glândulas adrenais. Thomas Addison em 1855 foi quem chegou mais próximo de identificar suas funções, afirmando que a doença de Addison era originada da falência adrenal. Somente em 1894, Shapey-Schafer descreveu a ação fisiológica dessas glândulas (Ferazza e Ota 2016, Nishimoto et al. 2018).

As glândulas adrenais são um par de órgãos endócrinos localizadas no polo superior dos rins. As adrenais direita e esquerda não são imagens especulares uma da outra; a adrenal direita tem forma piramidal e está localizada diretamente sobre o topo do rim direito, enquanto a adrenal esquerda tem mais uma forma crescente e fica localizada ao longo da borda do rim esquerdo entre o hilo e o polo superior. As adrenais são retroperitoneais e estão envolvidas por uma cápsula de tecido conjuntivo espessa, que envia septos para o parênquima da glândula, acompanhado por vasos sanguíneos e nervos (Mitani 2014, Rosol et al. 2001).

Essas glândulas são constituídas por duas regiões histológica e funcionalmente distintas: uma porção externa, amarelada, que constitui 80 a 90 % do órgão, denominada córtex da adrenal, que produz um grupo de hormônios denominado esteroides, sintetizados a partir do colesterol; e uma porção interna, pequena e escura denominada de medula da adrenal, que é funcionalmente relacionada e é regulada pelo sistema nervoso simpático, produzindo os hormônios adrenalina e noradrenalina. Apesar de ambas as porções terem funções endócrinas, cada uma tem uma origem embrionária diferente e desempenham um papel diferente (Figura 2) (Boulkroun et al. 2010, Steenblock et al. 2017).

Figura 2 - Fotomicrografia das camadas da glândula adrenal



Fonte: adaptado de Loriaux (2009).

A medula da adrenal tem origem na crista neural, portanto sua origem é ectodérmica, composta por células cromafins que secretam substâncias hormonais do grupo adrenérgicos, denominadas adrenalina e noradrenalina (Steenblock et al. 2017).

O córtex da adrenal contém células parenquimatosas que sintetizam e secretam vários hormônios esteroides sem armazená-los. É de origem mesodérmica e está subdividido em três zonas concêntricas, a zona glomerulosa, zona fasciculada e zona reticulada (Bassett et al. 2004, Florea e Crăciun 2011, Mitani 2014, Pignatti et al. 2017, Rosol et al. 2001). Morfologicamente, as zonas corticais demonstram diferenças claras em sua estrutura e organização (Pignatti et al. 2017, Taylor et al. 2020).

A zona glomerulosa, imediatamente abaixo da cápsula, constituída por pequenas células piramidais ou colunares dispostas em agrupamentos arredondados denominados glomérulos, que estão rodeados por uma rede de capilar que se estende desde a cápsula (Otis et al. 2007). Tem relação de continuidade com os cordões celulares da zona fasciculada. As células em cada glomérulo são densamente compactadas, possuem pouco citoplasma e

apresentam aposição de grandes domínios de membrana. Núcleos esféricos, pequenos e escuros, contêm um ou dois nucléolos em seu citoplasma (Pignatti et al. 2017).

O citoplasma apresenta muitas membranas de retículo endoplasmático granular, a maior parte dos ribossomas está livre no citoplasma e muitos deles estão dispostos em espirais e rosetas. O complexo de Golgi, que costuma estar situado próximo ao núcleo, é formado de pilhas de cisternas delimitadas por membranas e associadas a numerosas vesículas pequenas. Existe um par de centríolos. As mitocôndrias são geralmente alongadas com cristas tubulares (Florea e Crăciun 2011, Weiss 1988). Algumas gotículas de lipídios também se encontram dispersas pelo citoplasma. Desmossomos e junções comunicantes ocasionais unem as células umas às outras, e algumas têm microvilosidades curtas (Rosol et al. 2001). As células desta zona podem ser identificadas pela expressão da enzima aldosterona sintase (CYP11b2) (Pignatti et al. 2017, Walczak et al. 2014).

As células do parênquima da zona glomerulosa sintetizam e secretam os hormônios minerocorticoides, principalmente aldosterona. A síntese destes hormônios é estimulada pela angiotensina II e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), sendo ambos necessários para manutenção das células da glomerulosa. Os hormônios mineralocorticoides controlam o equilíbrio dos fluídos eletrolíticos do corpo, principalmente o sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ), influenciando a função dos túbulos renais, especificamente dos túbulos contorcidos distais e controle da pressão sanguínea (Midzak e Papadopoulos 2016, Sremwe et al. 2015).

A Zona fasciculada, Camada intermediária, concêntrica, localizada abaixo da zona glomerulosa, é a maior das camadas do córtex, constituindo até 80% do volume total da glândula. As células fasciculadas são organizadas em feixes semelhantes a cordões, os fascículos, cercados por capilares fenestrados. São células maiores e menos compactadas que as células da zona glomerulosa e são levemente acidófilas. Por conterem muitas gotículas de lipídios em seu citoplasma, extraído durante o processamento histológico, estas células aparecem vacuolizadas e, por isso, são denominadas espongíócitos (Chien et al. 2017, Pignatti et al. 2017).

Ultraestruturalmente possuem um retículo endoplasmático liso bem desenvolvido, grandes junções comunicantes, muitas gotículas lipídicas e mitocôndrias caracterizadas por cristas tubulo-vesiculares. As células da zona fasciculada são comumente identificadas pela expressão de 11-beta hidroxilase, 11 $\beta$ -OH (CYP11b1) (Gomez-Sanchez et al. 2014).

As células da zona fasciculada sintetizam os hormônios glicocorticoides, principalmente o cortisol em humanos e corticosterona em roedores, compõe o eixo de sinalização endócrino hipotálamo-hipófise-adrenal, respondendo à sinalização do hormônio

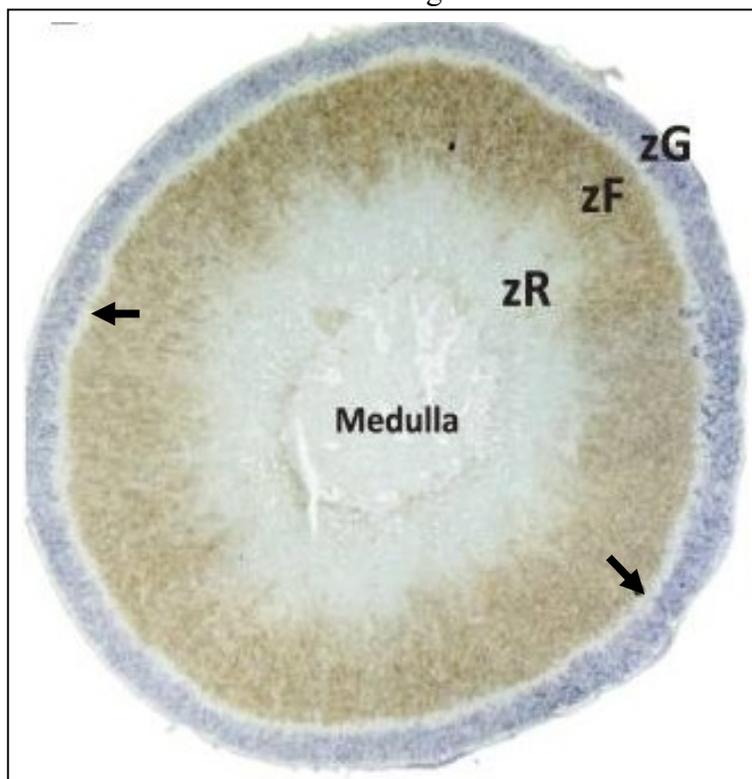
adrenocorticotrófico (ACTH), participando no controle do metabolismo de proteínas e carboidratos (Midzak e Papadopoulos 2016, Pignatti et al. 2017).

A zona reticulada, camada mais interna do cortex, constitui cerca de 7% do volume da glândula, sua espessura varia de acordo com condições fisiológicas (Cardoso e Palma 2009). Suas células são acidófilas e fortemente coradas, estão dispostas em cordões que se anastomosam. São semelhantes aos espongiócitos da zona fasciculada, porém, menores e com menos gotículas lipídicas, contêm grande quantidade de grânulo de pigmento de lipofuscina. Várias células próximas da medula da adrenal são escuras com citoplasma elétron-denso e núcleo picnótico, sugerindo que esta zona contém células parenquimatosas em degeneração (Gartner e Hiatt 2017, Midzak e Papadopoulos 2016, Pignatti et al. 2017).

As células da zona reticulada exibem características ultraestruturais semelhantes às células da zona fasciculada, no entanto, tendem a exibir menos gotículas lipídicas, mais lisossomos e grânulos de pigmentos de lipofuscina. As células da zona reticulada, quando estimulada por ACTH, sintetizam hormônios andrógenos principalmente desidroepiandrosterona e um pouco de glicocorticóide (Chien et al. 2017, Mitani 2014, Pignatti et al. 2017).

O córtex adrenal consiste em três zonas morfológicas e funcionalmente distintas, zona glomerulosa, zona fasciculada e zona reticulada, conforme descrito. Mitani et al. (1994), ao realizarem imuno-histoquímica com dupla coloração da glândula adrenal de ratos adultos com anticorpos anti-CYP11B1 e anti-CYP11B2, notaram a presença de uma camada contínua entre zona glomerulosa e zona fasciculada, que foi considerada uma quarta zona (Figura 3, a seguir) (Mitani 2014, Mitani et al. 1994). Como as glândulas adrenais de animais, como coelho, rato, camundongo e hamster, são desprovidas de CYP17, que catalisam a formação da síntese de andrógenos na zona reticulada de mamíferos, a zona recém-descoberta foi caracterizada como ausente na síntese de andrógenos adrenais. Assim, as células nesta zona pareciam não ter função endócrina específica para as zonas do córtex adrenal e, portanto, foram consideradas células indiferenciadas em relação à corticoesteroidogênese (Mitani et al. 1994), sendo denominada como zona celular indiferenciada e consideraram uma zona de célula tronco/progenitora no córtex adrenal (Mitani 2014). Já outros autores sugerem que este aglomerado celular também pode ser localizado sob a cápsula da glândula adrenal (Chien et al. 2017, Lerario et al. 2017).

Figura 3 - Fotomicrografia da localização da zona indiferenciada na glândula adrenal



Legenda: zona glomerulosa (zG); zona fasciculada (zF); zona reticular (zR). Setas indicando a zona indiferenciada.

Nota: Localização de CYP11B2 e CYP11B1 na glândula adrenal de rato por imuno-histoquímica com o anticorpo anti-CYP11B2 de rato e anti-CYP11B1 simultaneamente. As cores azul e marrom mostram a presença de CYP11B2 e CYP11B1, respectivamente.

Fonte: adaptado de Mitani (2014).

A natureza e a localização de células tronco / progenitoras adultas que mantêm o córtex adrenal adulto ainda precisam ser identificadas definitivamente (Mitani et al. 2014, Nakamura et al. 2014, Pignatti et al. 2017). No entanto, semelhante a outros tecidos, parece provável que as zonas adrenocorticais sejam mantidas por regulação coordenada da divisão celular, movimento e diferenciação em resposta a diferentes estímulos fisiológicos.

O zoneamento funcional do córtex adrenal ainda permanece controverso. As enzimas 11- $\beta$ -hidroxilase (CYP11B1) e aldosterona sintase (CYP11B2) são consideradas como enzimas esteroidogênicas específicas das zonas que estão envolvidas nas etapas finais da biossíntese de cortisol e aldosterona, respectivamente. Células adrenocorticais positivas para CYP11B2 e negativas para CYP17 são classificadas funcionalmente como células produtoras de mineralocorticóides, enquanto as células positivas para CYP11B1 e negativas para CYP17 são consideradas como células produtoras de glicocorticóides (Nakamura et al. 2015).

Em condições especiais como envelhecimento, hiperaldosteronismo secundário, níveis elevados de  $\text{Na}^+$ , níveis baixos de  $\text{K}^+$ , e estresse grave a zona glomerulosa é substituída por células conhecidas como zonas progenitoras, as quais expressam HSD3Bs em vez de expressar CYP11B2. Portanto, ocorre remodelamento adrenocortical por localização subcapsular da zona progenitora, que tem o potencial para diferenciação bidirecional, em zona glomerulosa ou zona fasciculada (Nakamura et al. 2015).

#### 1.4 Aldosterona

Aldosterona foi isolada pela primeira vez em 1953 como o último dos hormônios esteroides a ser reconhecido (Simpson et al. 1954). A descoberta da aldosterona há mais de cinco décadas, levou às pesquisas uma análise extensiva das ações biológicas mediadas por essa molécula. A história da descoberta dos mecanismos de ação e regulação da aldosterona, entre 1960 e 1970, ofereceu uma visão única do nascimento da biologia molecular e seu consequente impacto no campo de pesquisa genômica nas décadas de 1980 e 1990, e no século XXI (Williams J, Williams G 2003).

A aldosterona é um importante hormônio mineralocorticoide. Em mamíferos é sintetizado a partir do colesterol (Dooley et al. 2011), na zona glomerulosa do córtex da glândula adrenal e exerce papel essencial na homeostase de água e eletrólitos. Sua fórmula e peso molecular são  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_5$  e  $360.4[\text{g/mol}]$ , respectivamente. Esse hormônio exerce efeito nas paredes tubulares renais, no cérebro e no sistema cardiovascular (Dooley et al. 2011),

O precursor da aldosterona, o colesterol, é um lipídio que está presente no organismo animal, tanto nos tecidos, quanto nas lipoproteínas plasmáticas, seja sob a forma livre ou combinada (ácidos graxos) como o éster do colesterol. Sua importância fisiológica reside no amplo papel que desempenha no organismo animal como precursor de sais biliares, de hormônio glicocorticoide e mineralocorticoide, na síntese de hormônios sexuais, na formação de vitamina D e principalmente, como elemento estrutural nas membranas celulares (Brody 1993).

No organismo, a aldosterona é sintetizada a partir do colesterol por uma série de reações enzimáticas coordenadas e específicas. O colesterol atravessa a membrana mitocondrial onde a primeira enzima da via esteroidogênica está situada. Após a translocação para mitocôndria o colesterol é convertido em aldosterona por uma série de reações

enzimáticas catalisadas por desidrogenases e oxidases de função mista. Muitas dessas enzimas pertencem à superfamília do citocromo P450, requerem um sistema de coenzima acoplado (adrenodoxina / adrenodoxina redutase), que transferem elétrons para a enzima P450, atuando como redutores equivalentes para a reação de hidroxilação (Lambeth et al. 1982).

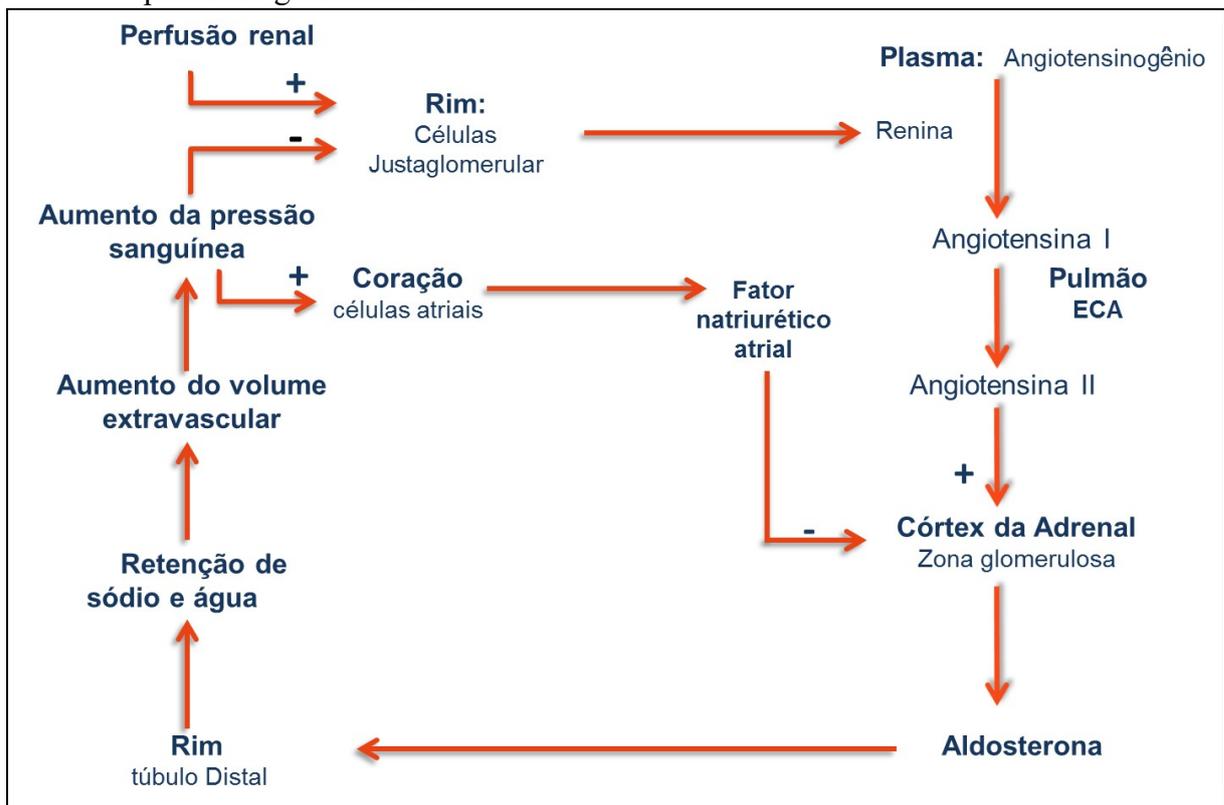
A primeira reação é a conversão do colesterol em pregnenolona, catalisada pela clivagem da cadeia lateral P 450 da enzima CYP11A1, codificada pelo gene CYP11A1 (Connell e Davies 2005). A pregnenolona é liberada no citosol e é convertida em progesterona por desidrogenação do grupo 3 $\beta$ -hidroxila e isomerização da ligação dupla em C5 para  $\Delta$ 4 pela 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD), que está localizada na membrana do retículo endoplasmático liso. A progesterona sofre 21-hidroxilação pela CYP21A, enzima localizada na superfície citoplasmática do retículo endoplasmático liso, produzindo 11-deoxicorticoesterona (Shinzawa et al. 1988). A conversão de 11-deoxicorticoesterona para aldosterona envolve três reações consecutivas: 11 $\beta$ -hidroxilação da 11-deoxicorticoesterona para formar corticosterona, 18-hidroxilação para produzir 18hidroxicorticoesterona (18-OH-B) e, finalmente, 18-metiloxidação à aldosterona. Estas reações são catalisadas pela aldosterona sintase, que se localiza no interior da membrana mitocondrial e é codificada pelo gene CYP11B2, gene expresso na zona glomerulosa (Connell e Davies 2005). Enquanto os detalhes moleculares da biossíntese dos esteróides mitocondriais das adrenais são bem entendidos, a evolução deste sistema continua sendo pouco compreendida, uma vez que a função mitocondrial poderia estar afetando diretamente as respostas metabólicas e transcricionais (Midzak e Papadopoulos 2016).

Há vários fatores que regulam a aldosterona, sejam estimuladores como acetilcolina e serotonina, ou inibidores como ouabaína, pepitídeo natriurético atrial (ANP) e dopamina. Recentemente, foi mostrado que os fatores secretados pelo tecido adiposo também pode estimular a síntese de aldosterona. No entanto os principais reguladores da síntese e secreção são o aumento da concentração de potássio extracelular, hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e principalmente a angiotensina II (Ang II) (Connell e Davies 2005; Seremwe et al. 2015).

O hormônio aldosterona está inserido em uma importante cascata de sinalização de proteção dos rins que se inicia com a queda de pressão arterial, conhecido por sistema renina angiotensina aldosterona (Figura 4, a seguir). O SRAA é um sistema neuroendócrino complexo responsável pela modulação do equilíbrio hidroeletrólítico e regulação da pressão arterial. Através das suas múltiplas interações esse sistema contribui para a proteção do tecido endotelial, cardíaco e renal. Adicionalmente, ele regula ainda a resposta do endotélio à

inflamação e lesão (Calvier et al. 2015, Gupta et al. 2020). A sua ativação excessiva induz hipertensão e perpetuação de uma cascata pró-inflamatória, pró-trombótica e aterogênica, e é a base da lesão de vários órgãos-alvo (coração, cérebro, rim e endotélio). Dessa forma, o estudo do SRAA constitui um alvo terapêutico importante nestas situações (Giestas et al. 2010, Gupta et al. 2020).

Figura 4 - Diagrama ilustrando alguns dos mecanismos de controle de secreção de aldosterona pela zona glomerulosa



Nota: Diminuição da perfusão renal, renina é liberada pelas células justaglomerulares na corrente sanguínea, atua no substrato angiotensinogênio, formando decapeptídeo angiotensina I, esta sofre ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), sendo convertida em angiotensina II que atua na liberação de aldosterona pelo córtex da adrenal.

Fonte: Adaptado de Martelli (2010).

### 1.5 Sistema renina-angiotensina-aldosterona

Em 1898, Robert Tigerstedt e Per Bergman publicaram o primeiro estudo da descoberta do sistema renina-angiotensina-aldosterona e trabalhos posteriores, mais precisamente entre os anos de 1940 e 1950, reconheceram e demonstraram a sua ação. Somente em 1954, Skeggs purificou a angiotensina e mostrou a existência de duas formas, a

angiotensina I (Ang I) e angiotensina II (Ang II). Dois diferentes tipos de sistema renina angiotensina foram identificados: o circulante, descrito desde a descoberta da renina, e o local, descrito mais recentemente e que parece desempenhar um papel importante na homeostase circulatória. Ainda hoje os conhecimentos de fisiologia e biologia molecular sobre este sistema continuam crescendo, todavia, muitos estudos são necessários para compreender suas funções (Fu et al. 2017).

O SRAA foi pensado como um sistema endócrino pelo qual o rim influencia a regulação cardiovascular sistêmica e o balanço eletrolítico (Giestas et al. 2010).

O conceito atual é que o SRAA desempenha um importante papel na regulação da pressão arterial, equilíbrio eletrolítico, estruturação e função cardiovascular (Bader e Ganten 2008, Gupta et al. 2020, Hu et al. 2019, Ishak et al. 2017). A maior parte de suas ações fisiológicas é exercida pela angiotensina II, um potente peptídeo biológico, que está relacionado com a etiologia da hipertensão arterial e outras formas de doenças cardiovasculares e renais.

A Angiotensina II também está associada à disfunção endotelial, apresentando efeitos pró-fibróticos e pró-inflamatórios, que ocorrem principalmente pelo aumento do estresse oxidativo, e resulta em lesão renal, cardíaca e vascular (Oparil et al. 2018). O efeito da Angiotensina II é mediado pela sua interação com os seus receptores tipo 1 (receptor 1 de angiotensina II - AT<sub>1</sub>) e tipo 2 (receptor 2 de angiotensina II - AT<sub>2</sub>), que tendem a gerar tipos de ação opostas. No entanto, a maioria dos efeitos da angiotensina II tende a ocorrer após a sua ligação com o receptor AT<sub>1</sub>, resultando em várias cascatas de sinalização, levando à vasoconstrição, proliferação, retenção de sódio e estresse oxidativo, processos amplamente ligados a doenças cardiovasculares (McKinney et al. 2014, Mehta e Griendling 2007).

Em resposta a uma redução na pressão arterial ou à diminuição da perfusão renal, as células justaglomerulares presentes nas arteríolas aferentes e eferentes dos glomérulos renais produzem e liberam uma protease chamada renina. Essa enzima é responsável pela conversão do angiotensinogênio, que possui origem hepática e que está presente na corrente sanguínea, no decapeptídeo angiotensina I, que possui função vasoconstrictora moderada. A enzima conversora de angiotensina (ECA), presente em altas concentrações, principalmente nas células endoteliais da circulação pulmonar, transforma a angiotensina I no octapeptídeo angiotensina II, um potente vasoconstritor. A angiotensina II, através de seu receptor AT<sub>1</sub> também age sobre o córtex da adrenal, induzindo a glândula liberar aldosterona, que é a molécula efetora final do SRAA (Giestas et al. 2010), um hormônio que age nas células dos túbulos contorcidos distais, fazendo com que ocorra maior reabsorção de água e sódio,

acarretando um aumento do volume sanguíneo e conseqüentemente levando a elevação da pressão arterial (Gupta et al. 2020, Sawhney 2010, Siragy 2011).

A ativação excessiva do SRAA tem sido reconhecida como elemento de importância na progressão de lesões de órgãos-alvo. A desregulação do SRAA também está envolvida na patogênese de várias doenças hipertensivas (Cai et al. 2018, Fu et al. 2017, Melo et al. 2020, Panahpour et al. 2019). A relação entre SRAA, hipertensão arterial e lesão de órgão-alvo também é explicada pelo papel do SRAA na homeostase hidroeletrólítica e na resposta vascular à lesão. O aumento da tensão de cisalhamento causado pela elevação da tensão arterial causa lesão no endotélio e ativação do SRAA. A ativação do SRAA contribui para aumento da tensão arterial e estimulação de uma resposta inflamatória local para reparar a lesão. A agressão mantida e repetida leva a disfunção endotelial e doença microvascular. As progressivas alterações fisiopatológicas resultam nas manifestações clínicas das lesões de órgãos-alvo, incluindo infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e doença renal (Fu et al. 2017, Giestas et al. 2010).

Evidências epidemiológicas mostram que pacientes com hipertensão cujo SRAA está ativado apresentam maior risco de sofrer infarto do miocárdio que pacientes que apresentam outros tipos de hipertensão (Alderman et al. 1991; Laragh 1995; Panahpour et al. 2019). Além disso, o tratamento de pacientes hipertensos com inibidores da ECA e com antagonistas de receptor AT<sub>1</sub>, reduz a mortalidade e a incidência de infarto do miocárdio (Panahpour et al. 2019, Pitt et al. 1994, Yusuf et al. 1992), indicando o papel central do SRAA na patogênese da hipertensão e suas complicações.

Diante disso, os bloqueadores do SRAA exercem um papel importante no tratamento de doenças cardiovasculares por ser um dos principais alvos para terapias anti-hipertensivas, as quais são capazes de bloquear este sistema (Fogari e Zoppi 2010, Weintraub et al. 2011).

O modelo 2R1C é um modelo de hipertensão renovascular que apresenta hiperatividade do SRAA, o que influencia o desenvolvimento e manutenção da pressão arterial elevada. Isso ocorre porque as concentrações de renina plasmática e de angiotensina II permanecem aumentadas estimulando a produção de aldosterona na zona glomerulosa da adrenal por várias semanas após a clipagem da artéria renal, que causa diminuição da perfusão do rim (Carvalho-Galvão et al. 2018, Shimoura et al. 2017, Silva-Junior 2011).

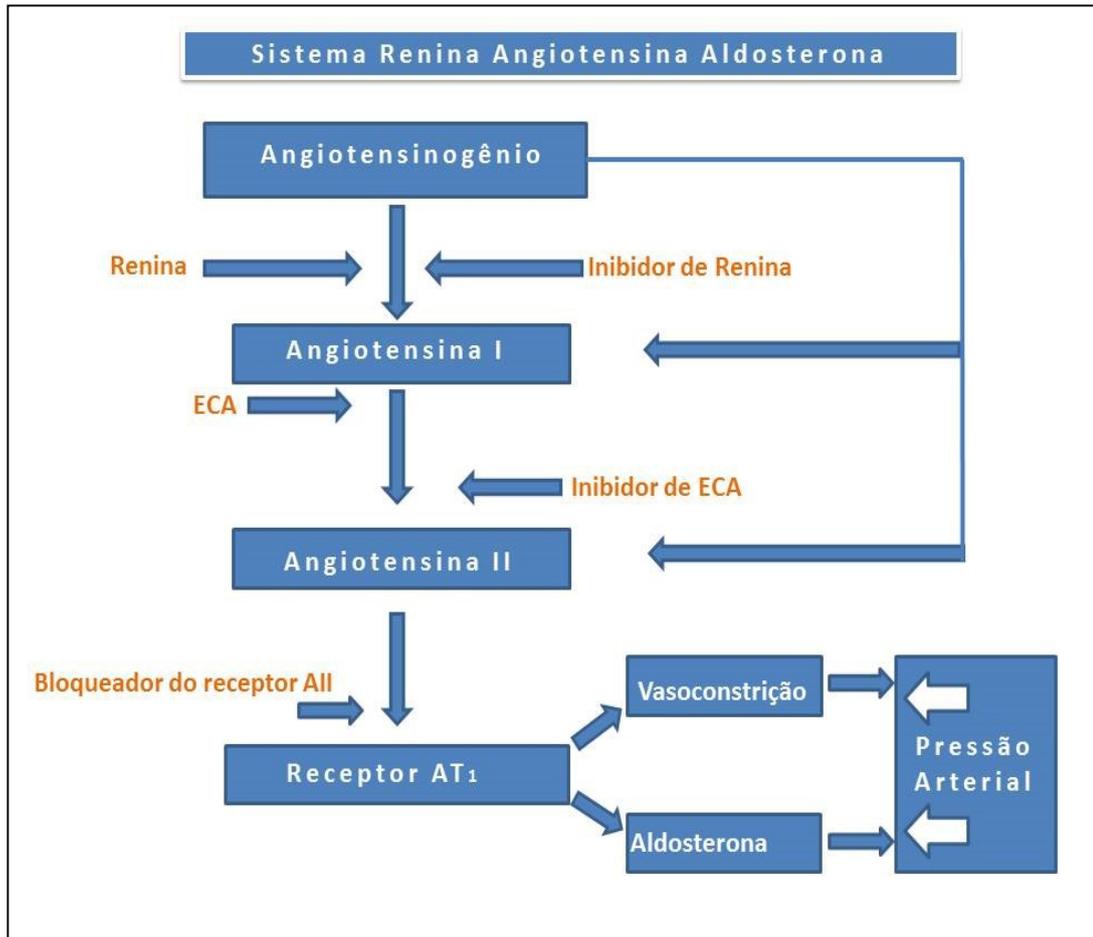
## 1.6 Terapêuticas farmacológicas

As doenças cardiovasculares e renais contribuem para disfunções do endotélio e aterosclerose, progredindo para danos persistentes, e conseqüentemente, para morte prematura (Cai et al. 2018, Werner et al. 2010). A hipertensão em si é um importante fator de risco para a progressão da doença renal (Bonanni e Vestra 2012, Cortese et al. 2020).

O principal objetivo da terapêutica farmacológica anti-hipertensiva é a redução do risco cardiovascular do indivíduo reduzindo a pressão arterial para valores normais, com o mínimo de reações adversas e conservando o melhor possível a qualidade de vida do hipertenso (Polónia et al. 2006).

Estão disponíveis diversos fármacos no mercado que visam ao bloqueio do SRAA em diversos níveis e podem ser classificados com base no principal mecanismo de ação. Consideram-se medicamentos anti-hipertensivos de primeira linha as tiazidas e análogos, os bloqueadores dos adrenoreceptores  $\beta$ , os bloqueadores dos canais de cálcio, os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) e os antagonistas dos receptores da angiotensina II (ARA II) (Figura 5, a seguir) (Omboni et al. 2015, Von Lueder e Krum 2015).

Figura 5 - Representação do SRAA e dos locais de ação de vários agentes farmacológicos



Legenda: Sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA); Enzima conversora de angiotensina (ECA).

Fonte: Adaptado de Pantzaris et al. (2017).

A fisiopatologia da hipertensão arterial contempla a participação do SRAA pelo que, atualmente, se encontram disponíveis diversos anti-hipertensivos, visando modificar a atividade desse mesmo sistema (Martins-Oliveira et al. 2018).

Em 1898, Tiegensledt e Bergman descobriram que os extratos renais salinos, não purificados, continham uma substância com características pressoras - a renina. Posteriormente, diversos desenvolvimentos na área da investigação comprovaram que a constrição das artérias renais desencadeava hipertensão persistente em cães e que a renina era uma enzima que atuava sobre um substrato proteico plasmático (o angiotensinogênio), com vista a catalisar a formação do verdadeiro material pressor (um peptídeo denominado angiotensina) (Brunton et al. 2011). Posteriormente, ficou comprovado que os rins eram importantes na regulação desse processo, que a angiotensina II estimulava poderosamente a

produção de aldosterona nos seres humanos e que uma ação exacerbada do sistema iria aumentar a pressão arterial (Brunton et al. 2011, Shafiq et al. 2008).

O SRAA é, portanto, essencial à regulação da pressão arterial, sendo referido por muitos autores como um eixo endócrino em que cada componente de uma “cascata” é produzido por diferentes órgãos, interagindo com vista à manutenção da estabilidade hemodinâmica (Burnier et al. 1994, Chaudhary et al. 2010, Gupta et al. 2020). A ativação crônica ou desregulação do sistema induz hipertensão arterial, constituindo um alvo terapêutico muito importante nesta patologia (Fu et al. 2017, Giestas et al. 2010).

Há evidências crescentes de que a inibição do SRAA pode fornecer proteção independentemente da diminuição da pressão sanguínea (Weir 2007). De fato, o SRAA desempenha importante função na regulação da pressão arterial, como já referido, e regula ainda o volume sanguíneo, composição eletrolítica dos fluidos corporais, secreção de aldosterona e indução do crescimento celular, tendo sido atribuído um papel relevante na fisiopatologia da hipertensão arterial (Panahpour et al. 2019, Seremwe et al. 2015).

Em meados de 1970, foram descobertos polipeptídeos com ação inibidora da formação de angiotensina II ou bloqueadora dos seus receptores, sendo que esses inibidores revelaram que o SRAA desempenha importantes funções fisiológicas e fisiopatológicas, inspirando o desenvolvimento de uma classe de fármacos anti-hipertensivos: os IECA, ativos por via oral (Brunton et al. 2011).

O passo seguinte no que diz respeito aos fármacos cuja ação incide no SRAA contempla os ARA II, que conduziram a uma otimização dos conhecimentos dos vários receptores da angiotensina II e seus efeitos intracelulares, bloqueando os efeitos vasoconstritores (Jadhav et al. 2012).

Referindo particularidades ao SRAA, sabe-se que existem diferenças teóricas entre os IECA e os ARA II relativamente às suas ações no SRAA. Contudo, a inibição do SRAA pelos IECA ou pelos ARA II, ou a sua combinação, tem revelado eficácia na proteção cardiovascular e renal (Azizi et al. 2011).

No entanto, e devido a mecanismos de compensação (*feedback*), ambas as classes de anti-hipertensivos aumentam a atividade da renina no plasma, ou seja, a elevação da renina não confere, por si só, a inibição completa do SRAA, podendo ser responsável por uma menor eficácia dos IECA e ARA II (Jadhav et al. 2012).

Um dos aspetos que explica o porquê da ineficácia, ainda que parcial, é que o aumento da atividade da renina plasmática pode conduzir a um aumento da formação de angiotensina

II por vias independentes da ECA, que são encontradas nos rins e em vários tecidos (Müller e Luft 2006).

Têm surgido sucessivos aperfeiçoamentos dos fármacos que atuam neste sistema, sendo alvo de investigação e interesse na procura de novas terapêuticas medicamentosas (Ramírez-Sánchez et al. 2013).

O que de mais novo se descobriu sobre o SRAA e já com aplicação clínica terapêutica comprovada, é que é possível inibir diretamente a renina plasmática (Taylor e Pool 2013).

Embora os IECA reduzam os níveis de angiotensina II, prevenindo a formação de angiotensina II a partir da angiotensina I, e embora os ARA II bloqueiem a ligação de angiotensina II para os receptores AT<sub>1</sub>, ambos estão associados ao aumento da concentração plasmática de renina e pró-renina. Sabe-se atualmente que os inibidores diretos de renina (IDR) diminuem a atividade da renina no plasma, diminuindo significativamente, Ang I, Ang II e aldosterona, o que parece contribuir para uma proteção cardiovascular e renal completa (Fu et al. 2017, Taylor e Pool 2013, van Esch et al. 2010, Von Lueder e Krum 2015).

### **1.7 Inibidores diretos de renina**

Os primeiros inibidores diretos de renina ativos via oral, foram desenvolvidos na década de 80 e incluíam o enalquireno, remiquireno e zanquireno. No entanto, estas drogas apresentavam fraca absorção pelo trato gastrointestinal, baixa biodisponibilidade, curta meia vida e baixa potência, o que acabou prejudicando a utilização clínica destes medicamentos (Gonçalves et al. 2009). O alisquireno (Rasilez®) é um novo representante dessa classe de drogas e foi aprovado para uso clínico pela Food Drug Administration (FDA) em março de 2007 no tratamento da hipertensão, sendo o primeiro inibidor de renina liberado para comercialização (van Esch et al. 2010).

O Alisquireno apresenta uma biodisponibilidade de 2,6% e sua concentração plasmática máxima é alcançada entre 1 e 3 horas após a administração oral. Apresenta meia vida de 23 a 40 horas, possibilitando que seja feita uma dosagem única por dia e, após 7-8 dias de administração diária, atinge sua concentração plasmática no estado de equilíbrio (Vaidyanathan et al. 2008). A maior parte desse medicamento tem eliminação via fecal ou biliar, já que ele não consegue ser metabolizado no fígado pela isoenzima CYP3A4

(citocromo P450 3A4), por isso pode causar pouca interação com outros medicamentos (Vaidyanathan et al. 2008).

Devido ao fato deste fármaco ter um mecanismo de ação diferente quando comparado aos IECA e aos ARA II, é possível que seja uma opção mais efetiva de tratamento para a hipertensão (Sanoski 2009). O alisquireno atua no bloqueio direto da renina, impedindo a formação de angiotensina. Esse bloqueio ocorre devido à alta afinidade do alisquireno com o sítio ativo da pró-renina e renina, impedindo a formação da angiotensina II e liberação de aldosterona o que proporciona um bloqueio mais completo do SRAA, pois é capaz de bloquear este sistema no início (Brunton et al. 2011, Sawhney 2010).

Ao contrário dos IECA e dos ARA II, os quais estimulam um aumento da atividade plasmática da renina por possuírem ação mais para o final da cascata do SRAA, o alisquireno, suprimindo o efeito da renina, é capaz de ocasionar uma redução da atividade plasmática dessa enzima, uma vez que não haverá altas concentrações circulantes da mesma (Marin et al. 2019, van Esch et al. 2010, Von Lueder e Krum 2015).

Alguns estudos sugerem que esse medicamento pode ser mais eficiente quando comparado a substâncias natriuréticas, por interromper o início da cascata do SRAA. Além disso, parece que essa nova proposta de tratamento pode reduzir a PA de pacientes com hipertensão grave (Gheorghide et al. 2013). Marchionne et al. (2012) demonstraram que a inibição da renina além de reduzir os valores da pressão arterial sistólica (PAS) de repouso, também reduziu significativamente as concentrações de ácidos graxos livres, em ratos obesos, sugerindo que esse tratamento possa ser importante em casos de obesidade.

Segundo Oigman e Neves (2000), existe um consenso na literatura de que os componentes do SRAA estão presentes nos tecidos, na circulação, no meio intracelular e apresentam funções no rim, cérebro, coração e adrenais.

Por se tratar de uma terapia anti-hipertensiva recente, estudos têm objetivado avaliar a relação aos efeitos do alisquireno, em terapia isolada ou combinada com outros anti-hipertensivos, nas variáveis hemodinâmicas no sistema cardiovascular (Gheorghide et al. 2013). Já foi demonstrado que o alisquireno não só possui efeitos favoráveis na redução da PA, como também atua benéficamente sobre os danos causados em órgãos alvo da hipertensão, prevenindo, por exemplo, remodelamento vascular adverso, tratando a disfunção renal e DCV (Jadhav et al. 2012, Panahpour et al. 2019, Pechanova et al. 2019, Reit et al. 2014, Von Lueder e Krum 2015).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

O objetivo do presente trabalho é estudar o efeito da hipertensão renovascular experimental e do alisquireno nos aspectos morfofisiológicos do córtex da glândula adrenal.

### **2.2 Objetivos específicos**

Verificar o efeito da hipertensão renovascular 2R1C e do fármaco alisquireno na:

- a) pressão arterial sanguínea;
- b) apoptose, autofagia e proliferação celular da zona glomerulosa da glândula adrenal;
- c) ultraestrutura da zona glomerulosa da glândula adrenal.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais utilizados

Os procedimentos foram realizados de acordo com as guias convencionais de experimentação em animais. O protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA nº 019/2017) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Neste trabalho foram utilizados 40 ratos *Wistar* machos, com 45 dias de idade, pesando em média 160g. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia (DHE) na UERJ sob condições controladas (temperatura  $21 \pm 2$  °C, umidade  $60 \pm 10\%$ , ciclo de luz invertido de 12 h – claro/ escuro e ciclo de reposição de ar 15 min/h) e receberam ração balanceada padrão (ração Nuvilab, Brasil) e água *ad libitum* durante todo o experimento.

O desenho experimental teve a duração de oito semanas. Ao marco inicial, todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico, de modo que em 20 desses animais tiveram estenose induzida por implante de um clipe de prata na artéria renal esquerda e, constituíram o grupo denominado de hipertenso. Os outros 20 animais realizaram o mesmo procedimento cirúrgico, porém não receberam o clipe de prata, sendo assim denominados como grupo SHAM.

Após quatro semanas da cirurgia, foram formados quatro grupos conforme descrito adiante. As primeiras quatro semanas do experimento foram estipuladas para que a cirurgia induzisse a hipertensão renovascular nos ratos do grupo Hipertenso. A partir da quinta semana, esses grupos passaram a receber a administração de Alisquireno ou placebo (água filtrada).

O tratamento com o Alisquireno (na dose de 10 mg/kg/dia) ou placebo (água filtrada) foi realizado da quarta até a oitava semana, por via oral (gavagem orogástrica), administrado diariamente no mesmo horário, em dose única, sendo todos os animais manipulados. Os animais foram divididos em quatro grupos, com dez animais em cada, conforme descrito a seguir:

- a) Grupo SHAM: animais normotensos, submetidos à cirurgia sem o implante do clipe de prata e que receberam a administração de água via gavagem orogástrica durante as quatro últimas semanas de experimento;
- b) Grupo SHAM + A: animais normotensos, submetidos à cirurgia sem o implante do clipe e que receberam administração de alisquireno na dose de 10mg/kg/dia via gavagem orogástrica durante as quatro últimas semanas de experimento;
- c) Grupo 2R1C: animais submetidos à cirurgia com implante do clipe de prata, e que receberam administração de água via gavagem orogástrica durante as quatro últimas semanas de experimento;
- d) Grupo 2R1C + A: animais submetidos à cirurgia com implante do clipe de prata, e que receberam alisquireno na dose de 10 mg/kg/dia via gavagem orogástrica durante as últimas quatro semanas de experimento.

### **3.2 Indução da hipertensão renovascular**

A hipertensão foi induzida pelo modelo desenvolvido por Goldblatt et al. (1934), o método de 2 Rins-1 Clipe (2R1C). Os animais foram anestesiados na região intraperitoneal com Xilazina e Ketamina (40mg/kg), foram tricotomizados com posterior assepsia com álcool 70% na região mediana (linha alba) do animal. Na região da linha alba foi realizada uma incisão para a localização e o isolamento da artéria renal e posteriormente foi colocado um clipe de prata previamente calibrado (com um grau de constrição similar ao de 0,2mm de diâmetro interno) na artéria renal esquerda do animal para que houvesse uma obstrução parcial da mesma (estenose parcial), induzindo assim à hipertensão renovascular. O rim direito (contralateral) permaneceu íntegro.

Após o procedimento, a incisão foi suturada e os animais foram acondicionados em gaiolas individuais e mantidos no biotério sob observação durante sete dias, recebendo doses de analgésico por administração anal e por via oral, diluído em água. O grupo SHAM passou pelo mesmo procedimento cirúrgico, com a manipulação da artéria renal esquerda, porém não foi implantado o clipe de prata.

### **3.3 Análise da pressão arterial sistólica**

Com o objetivo de analisar a evolução temporal da variável cardiovascular, a PAS foi aferida semanalmente pelo método não invasivo de pletismografia da artéria caudal (Letica LE 5100; Panlab, Espanha) em todos os grupos experimentais com os animais conscientes a partir da semana zero (semana anterior ao procedimento cirúrgico para a indução da hipertensão renovascular) até a semana oito. Todos os animais foram aclimatados por um período de duas semanas antes do período experimental para minimizar o estresse durante as aferições da PAS. Os animais foram aquecidos previamente com uma lâmpada de infravermelho e as aferições foram realizadas com o auxílio de um garrote e de um sensor de pulso colocados em torno da cauda de cada animal. Estes foram conectados ao registrador, o qual insuflar e exsufalar automaticamente o garrote, detectando 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.

### **3.4 Eutanásia**

No dia da realização da eutanásia, os animais foram profundamente anestesiados com Xilazina e Ketamina (80mg/kg) na região intraperitoneal. Foi realizada uma incisão na linha alba, expondo assim abdômen e tórax. Em seguida, as glândulas adrenais direita e esquerda foram dissecadas e retiradas, sendo fixadas em paraformaldeído 4% ou acrescido com glutaraldeído 2,5%, ou congelados em refrigeração a -80°C com ou sem crioprotetor.

### **3.5 Histoquímica e Imunohistoquímica por peroxidase**

As amostras de adrenal fixadas em solução de paraformaldeído 4% foram clivadas longitudinalmente e lavadas por 1 hora em água corrente. Após lavagem, as amostras teciduais foram desidratadas em séries crescentes de etanol, 70%, 90% e 100%, por 1h em cada etapa. Posteriormente, o material foi clarificado em 2 banhos de xilol por 20 minutos

cada. Em seguida, foram inseridos 2 vezes em banhos paraplast plus (sigma-Aldrich, Estados Unidos) a 60°C por 30 minutos cada. Todos os fragmentos incluídos em Paraplast Plus foram seccionados em 4 µm de espessura em micrótomo (Americam Optical, modelo Spencer, Estados Unidos). As secções foram desparafinadas em estufa de 60° C por 5min e os cortes foram hidratados, como a seguir: 2 banhos de xilol, álcool 100%, 90%, 70% e água destilada por 2 minutos cada etapa. Posteriormente, corados com hematoxilina e eosina (HE), lavados em água destilada e diafanizados em concentrações crescentes de álcool 70%, 90% 100% e xilol. As lâminas foram montadas com Entellan (Merk, Alemanha) e lamínulas para observação em microscópio óptico das características gerais do tecido.

Para o procedimento de imunohistoquímica, as lâminas com cortes histológicos foram submetidas à técnica de imunoperoxidase, onde foi empregado o uso de anticorpo específico para a detecção de receptor AT<sub>1</sub> (sc-515884), assim como para detectar receptor - γ ativado por proliferador de peroxissomo coativador-1α (PGC-1α) (sc-518025), citocromo C (sc-13156), proteína pró-apoptótica Bax (sc-20067), proteína anti-apoptótica Bcl-2 (sc-7382), antígeno 1 do endossoma inicial (EEA1) (sc-137130), endossoma tardio (Rab 7) (sc-81922) e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (sc-71858).

As lâminas com cortes histológicos foram desparafinadas, reidratadas, tratadas com peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos, lavadas em tampão fosfato salino (PBS) e posteriormente com tampão citrato a 96°C para recuperação antigênica. Foram então bloqueadas com tampão fosfato-salino/ albumina bovina (PBS/BSA) a 3% e então incubadas com anticorpo primário diluído em PBS/BSA a 1% em câmara úmida *overnight*. O material foi incubado com anticorpo secundário biotilado e posteriormente com o complexo estreptavidina-peroxidase. Após a aplicação do cromógeno as lâminas foram lavadas em água, e foi realizada a coloração de fundo com hematoxilina. Em seguida as lâminas foram montadas e observadas ao microscópio óptico. Para controle negativo os anticorpos primários foram omitidos.

Para quantificação da expressão das proteínas citadas acima, foi utilizado o software Image-Pro Plus versão 7.0. Para tal, foram analisados campos aleatórios de cada lâmina, ao microscópio óptico (Olympus Bx53 com câmera Olympus DP72 acoplada, Japão).

### 3.6 Microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliação dos aspectos ultraestruturais fragmentos da glândula adrenal foram e fixados em glutaraldeído a 2,5%, com tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, a 4°C por 24h. O material foi clivado e lavado 3 vezes por 10 min em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M e pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio a 0,8% por 1 h. Após as lavagens, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por 30 min em cada fase. Em seguida, o material foi infiltrado com acetona e resina epon (TedPella, Estados Unidos) [25mL de Epon 812, 17 mL de anidrido metil nádic (MNA), 8 mL de anidrido dodecenil succínico (DDSA), 32 gotas de 2,4, tridimetilaminametilfenol (DMP) nas proporções de 2:1 por 2 h, 1:1 por 2 h e 1:2 por 2 h]. No dia seguinte as amostras foram inseridas em resina epon pura, em tubos abertos por 4 h, e posteriormente incluídas em nova resina epon pura na qual foi polimerizada em estufa, a 60°C, por 3 dias.

Em seguida, foram realizados cortes ultrafinos (60-70 nm) de áreas selecionadas com ultramicrótomo (Leica Ultracut-UCT, Leica Aktiengesellschaft, Áustria) e foram contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo para observação no microscópio eletrônico de transmissão JEM1011(JEOL, Brasil) a 80 kV.

### 3.7 Análise quantitativa

Para realização da quantificação foram utilizados cinco animais por grupo, cinco cortes escalonados por animal, onde cinco imagens digitais aleatórias por corte da zona glomerulosa foram capturadas e analisadas em objetiva de 100x através do software Image-Pro Plus 7.0 (MediaCybernetics, Bethesda, MD, EUA). A zona glomerulosa foi definida pela região entre a cápsula e a zona fasciculada. Para análise da densidade de núcleos, células de PCNA<sup>+</sup> foram contadas e relacionadas com o número total de núcleos por campo. Já a análise de AT<sub>1</sub>, PGC-1 $\alpha$ , citocromo C, Bax, Bcl-2, EEA1 e Rab7 foi realizada pelo método de máscara, a partir da segmentação de cores baseada em histograma HSI após equalização da imagem no mesmo programa. Na quantificação de mitocôndrias/  $\mu\text{m}^2$  foram utilizadas seis

imagens capturadas randomicamente em células da zona glomerulosa, por grupo, no aumento de 25.000x (Reis-Barbosa et al. 2020).

### 3.8 Análise estatística

Para análise estatística, os dados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão da média. Todos os dados biométricos foram testados pela análise de variância (ANOVA) one-way e pós-teste de Holm-Sidak, exceto os dados da pressão arterial sistólica, que foram analisados por meio de two-way com pos-teste de Holm-Sidak. Em todos os casos  $P \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Foi utilizado para realizar as análises estatísticas o Software *GraphPad Prism* versão 6.0 para *Windows* (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## 4 RESULTADOS

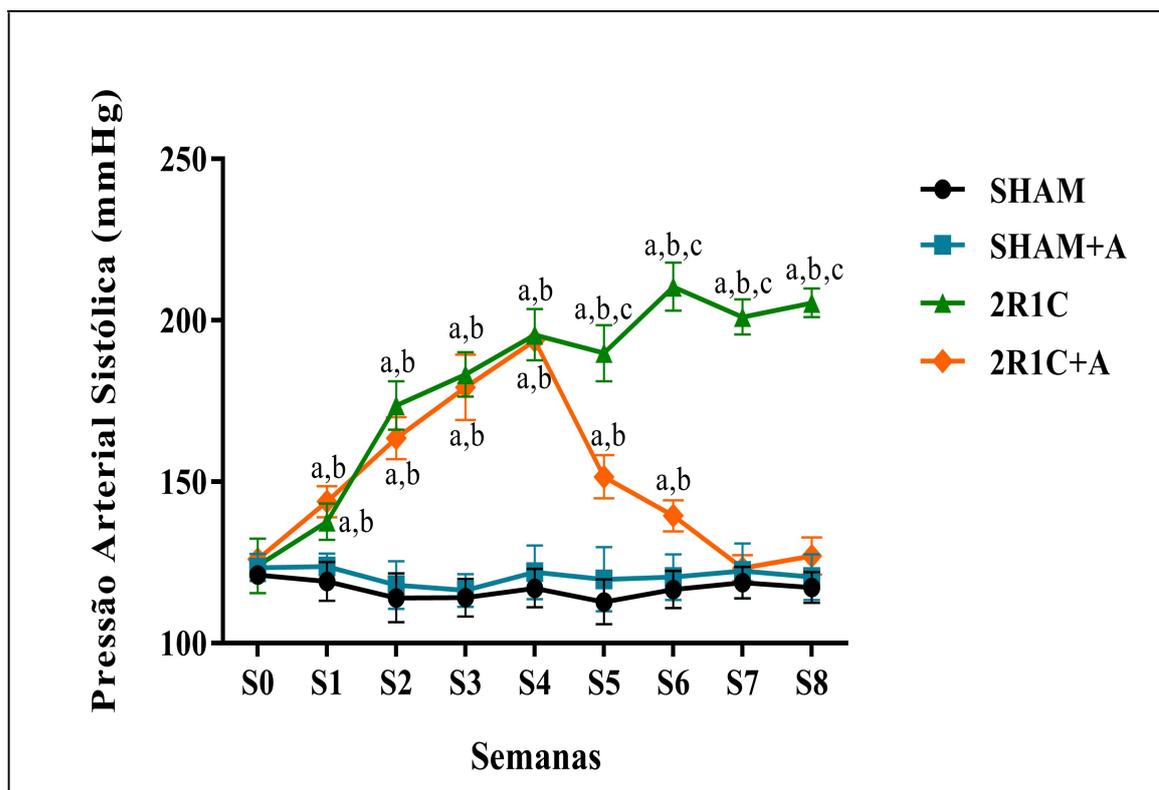
### 4.1 Pressão arterial sistólica

A PAS dos animais foi aferida semanalmente pelo método de pletismografia caudal durante todo o período experimental, ou seja, desde a semana 0 (S0, antes de realizar a inserção do clipe na artéria renal) até a eutanásia dos animais na semana 8 (S8) como apresentado no Gráfico 1, a seguir.

Os animais iniciaram o experimento com PAS similares (SHAM:  $117,3 \pm 5$  mmHg; SHAM + A:  $120 \pm 5$  mmHg). Não houve diferença significativa entre os grupos Sham e Sham + A durante todo período experimental ( $p > 0,05$ ). No entanto, a PAS do grupo 2R1C aumentou gradativamente significativamente ( $p > 0,05$ ) a partir da primeira semana até a oitava semana experimental (de  $136,8 \pm 5$  mmHg para  $205,5 \pm 4$  mmHg), mostrando que a cirurgia realizada para indução da hipertensão renovascular 2R1C foi bem sucedida.

Da primeira até a quarta semana experimental, os animais do grupo 2R1C + A apresentaram aumento gradativo dos níveis pressóricos (de  $142,5 \pm 3$  mmHg para  $193,2 \pm 2$  mmHg). Na quinta semana experimental, momento em que foi iniciada a administração do fármaco alisquireno, os animais do grupo 2R1C + A apresentaram uma redução da PAS (de  $193,2 \pm 2$  mmHg para  $150,4 \pm 5$  mmHg). A partir da sétima semana experimental os níveis pressóricos desses animais se equipararam aos animais do grupo Sham e Sham + A ( $123,2 \pm 3$  mmHg) conforme mostrado no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Evolução da PA sistólica



Legenda: Pressão arterial (PA); semana (s).

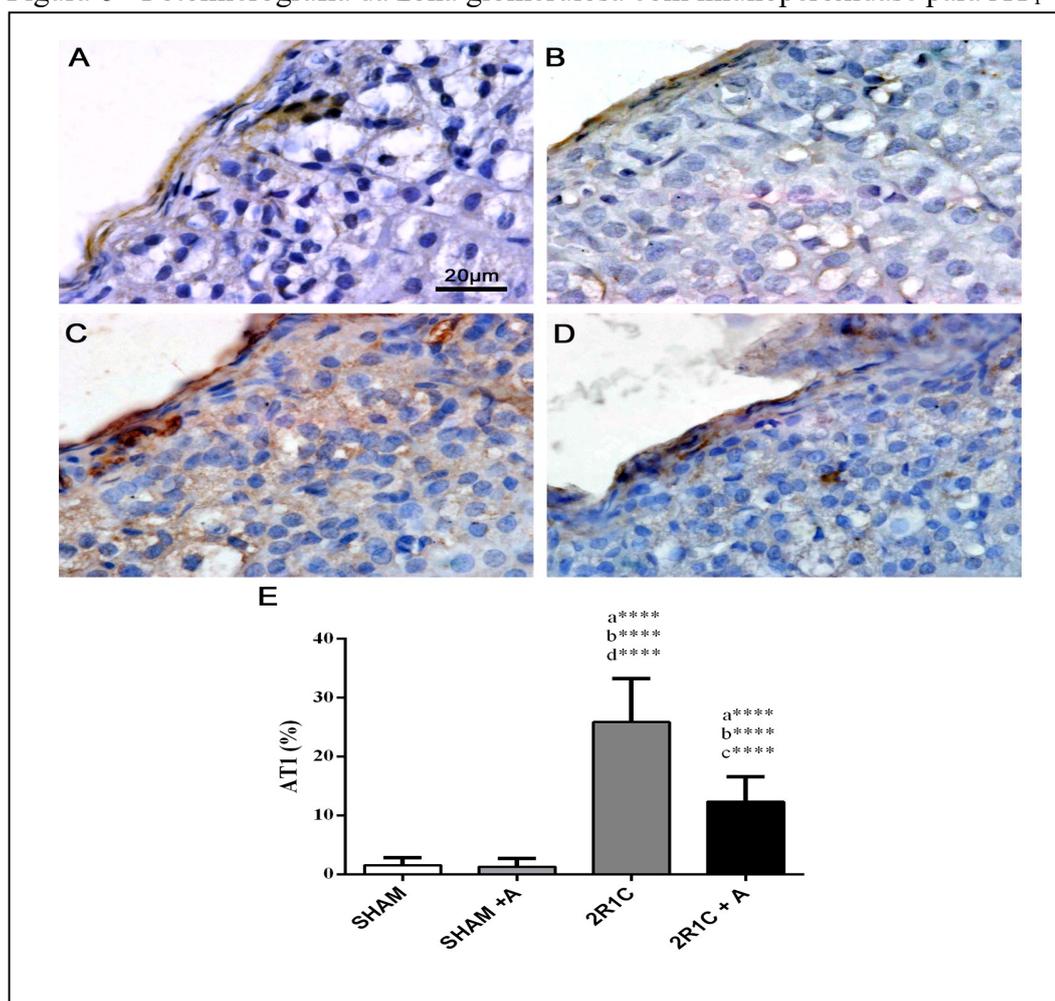
Nota: Gráfico da evolução da PA sistólica em milímetros de mercúrio (mmHg) nos seguintes grupos: (a) representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo SHAM; (b) representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo SHAM + A; (c) representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C; (d) representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C + A. ANOVA two-way e pós teste de Holm-sidak;  $p < 0,05$ . Resultados expressos com média  $\pm$  desvio padrão da média.

Fonte: A autora, 2020.

#### 4.2 Imunomarcção para detecção do receptor $AT_1$

A imunomarcção para o receptor de membrana  $AT_1$  foi claramente presente nas células da zona glomerulosa de todos os grupos. Os resultados mostram que o grupo 2R1C apresentou um aumento significativo ( $p \leq 0,0001$ ) na expressão do receptor  $AT_1$  em relação ao grupo SHAM e SHAM+ A (Figura 6, legenda C). O grupo 2R1C+ A apresentou uma redução significativa ( $p \leq 0,01$ ) na marcação em relação ao grupo 2R1C e um aumento significativo ( $p \leq 0,0001$ ) quando comparado com os grupos SHAM e SHAM + A (Figura 6, legenda D). Não houve diferença significativa na expressão de  $AT_1$  entre os grupos SHAM e SHAM+A (Figura 6, legendas A e B).

Figura 6 - Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para AT<sub>1</sub>



Legenda: (A) grupo SHAM; (B) grupo SHAM + A; (C) grupo 2R1C; (D) grupo 2R1C + A. Barra de calibração: 20 $\mu$ m; (E) Gráfico de quantificação da expressão de AT<sub>1</sub> nos seguintes grupos: Grupo SHAM, SHAM + A, grupo 2R1C e 2R1C + A.

Nota: Fotomicrografias da zona glomerulosa do córtex da adrenal após imunoperoxidase para AT<sub>1</sub>. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*\*) =  $p \leq 0,01$  e (\*\*\*\*) =  $p \leq 0,0001$ .

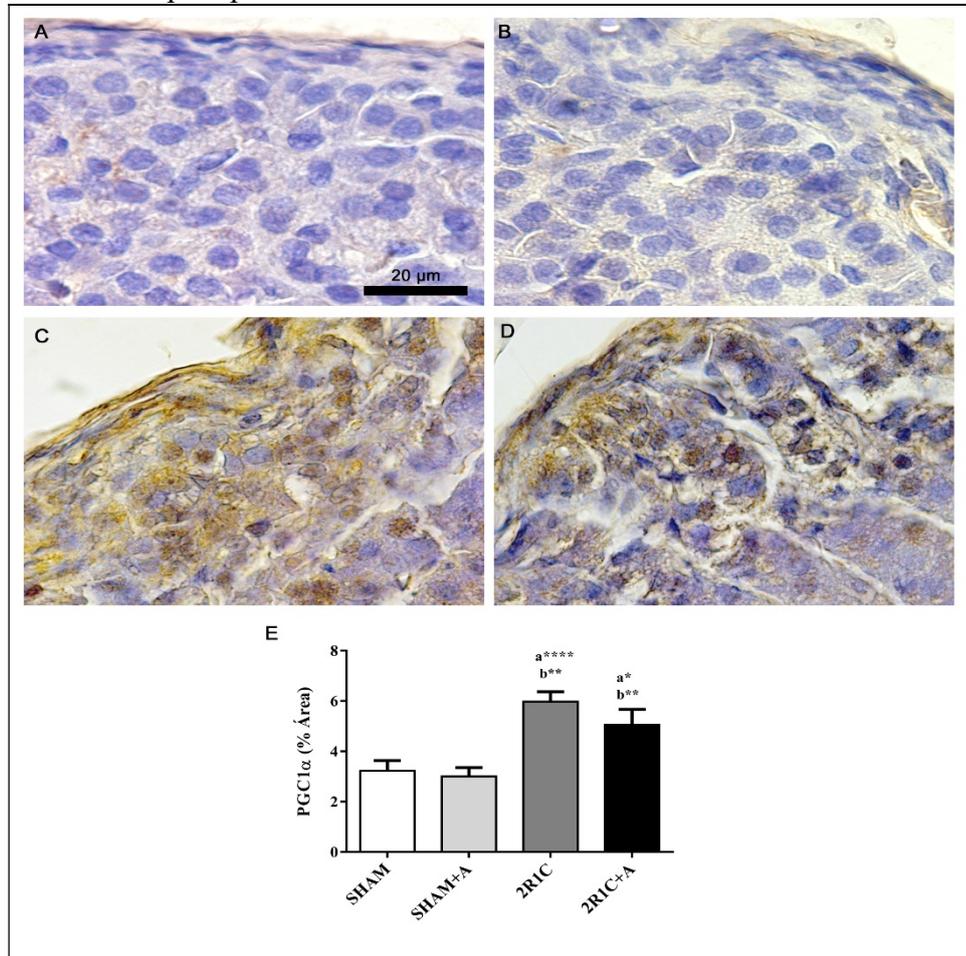
Fonte: A autora, 2020.

### 4.3 Imunomarcção para detecção da proteína PGC-1 $\alpha$

A imunomarcção para proteína PGC-1 $\alpha$  foi presente nas células da zona glomerulosa de todos os grupos como apresentado na Figura 7. A partir da análise dos resultados, o grupo 2R1C mostrou um aumento significativo ( $p \leq 0,0001$ ) na expressão da imunomarcção comparado com grupo SHAM e SHAM + A (Figura 7, legenda C). O grupo 2R1C+ A também mostrou um aumento significativo ( $p \leq 0,0001$ ) comparado aos grupos SHAM e

SHAM +A, já comparado ao grupo 2R1C não houve uma diminuição significativa (Figura 7, legenda D). Não houve diferença significativa entre os grupos SHAM e SHAM+A.

Figura 7 - Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para proteína PGC-1 $\alpha$



Legenda: (A) grupo SHAM; (B) grupo SHAM + A; (C) grupo 2R1C; (D) grupo 2R1C + A. Barra de calibração: 20 $\mu$ m. (E) Gráfico de quantificação da expressão de PGC-1 $\alpha$  nos seguintes grupos: Grupo SHAM, SHAM + A, grupo 2R1C e 2R1C + A.

Nota: Fotomicrografias da zona glomerulosa do córtex da adrenal após imunoperoxidase para PGC-1 $\alpha$ . As barras de erro representam o desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*) =  $p \leq 0,05$ , (\*\*) =  $p \leq 0,01$  e (\*\*\*\*) =  $p \leq 0,0001$ .

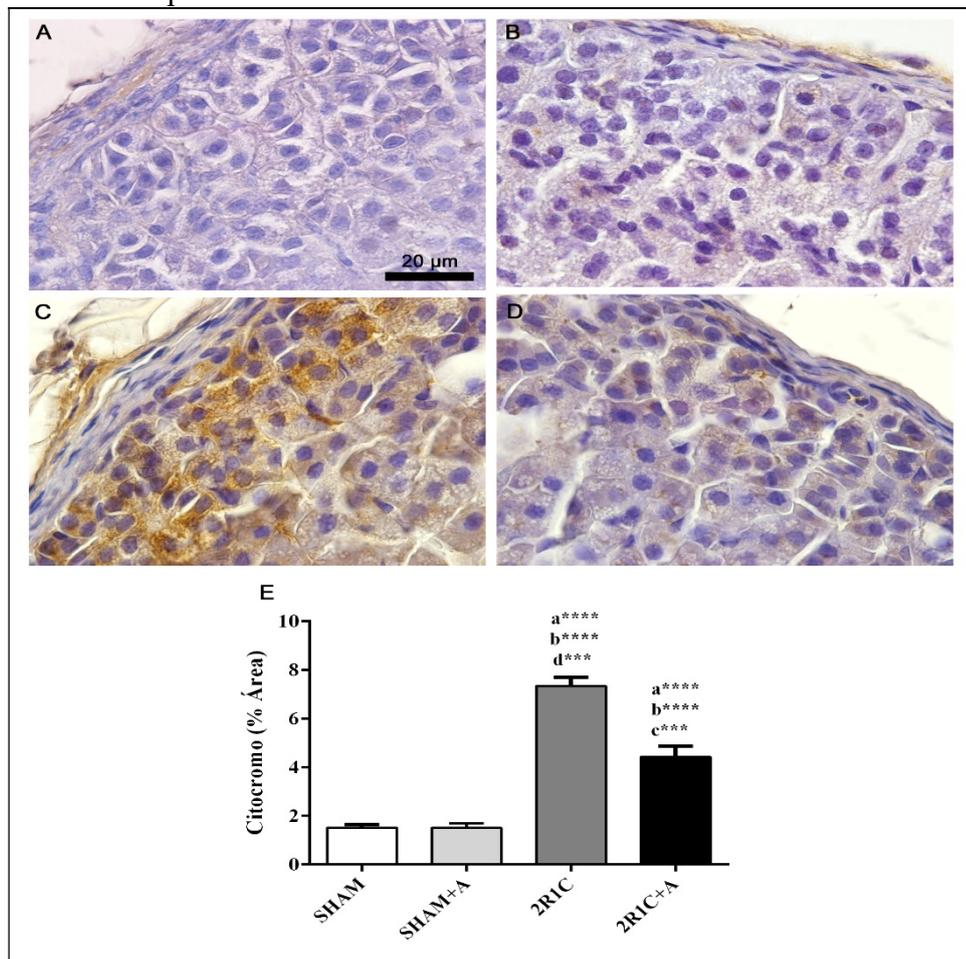
Fonte: A autora, 2020.

#### 4.4 Imunomarcção para detecção da proteína citocromo C

A imunomarcção da proteína citocromo C foi presente nas células da zona glomerulosa de todos os grupos. A partir da análise dos resultados, o grupo 2R1C mostrou

um aumento significativo ( $p \leq 0,0001$ ) na expressão da imunomarcação comparado com grupo SHAM e SHAM + A (Figura 8, legenda C). O grupo 2R1C+ A mostrou uma diminuição significativa ( $p \leq 0,001$ ) na intensidade da imunomarcação comparado com o grupo 2R1C e um aumento significativo ( $p \leq 0,0001$ ) quando comparado com os grupos SHAM e SHAM + A (Figura 8, legendas D e E). O grupo SHAM e SHAM + A não apresentaram diferença significativa na marcação das células da zona glomerulosa (Figura 8, legendas A, B e E).

Figura 8 - Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para citocromo C



Legenda: (A) grupo SHAM; (B) grupo SHAM + A; (C) grupo 2R1C; (D) grupo 2R1C + A. Barra de calibração: 20 $\mu$ m; (E) Gráfico de quantificação da expressão de Citocromo C nos seguintes grupos: Grupo SHAM, SHAM + A, grupo 2R1C e 2R1C + A.

Nota: Fotomicrografias da zona glomerulosa do córtex da adrenal após imunoperoxidase para Citocromo C. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*\*) =  $p \leq 0,001$  e (\*\*\*\*) =  $p \leq 0,0001$ .

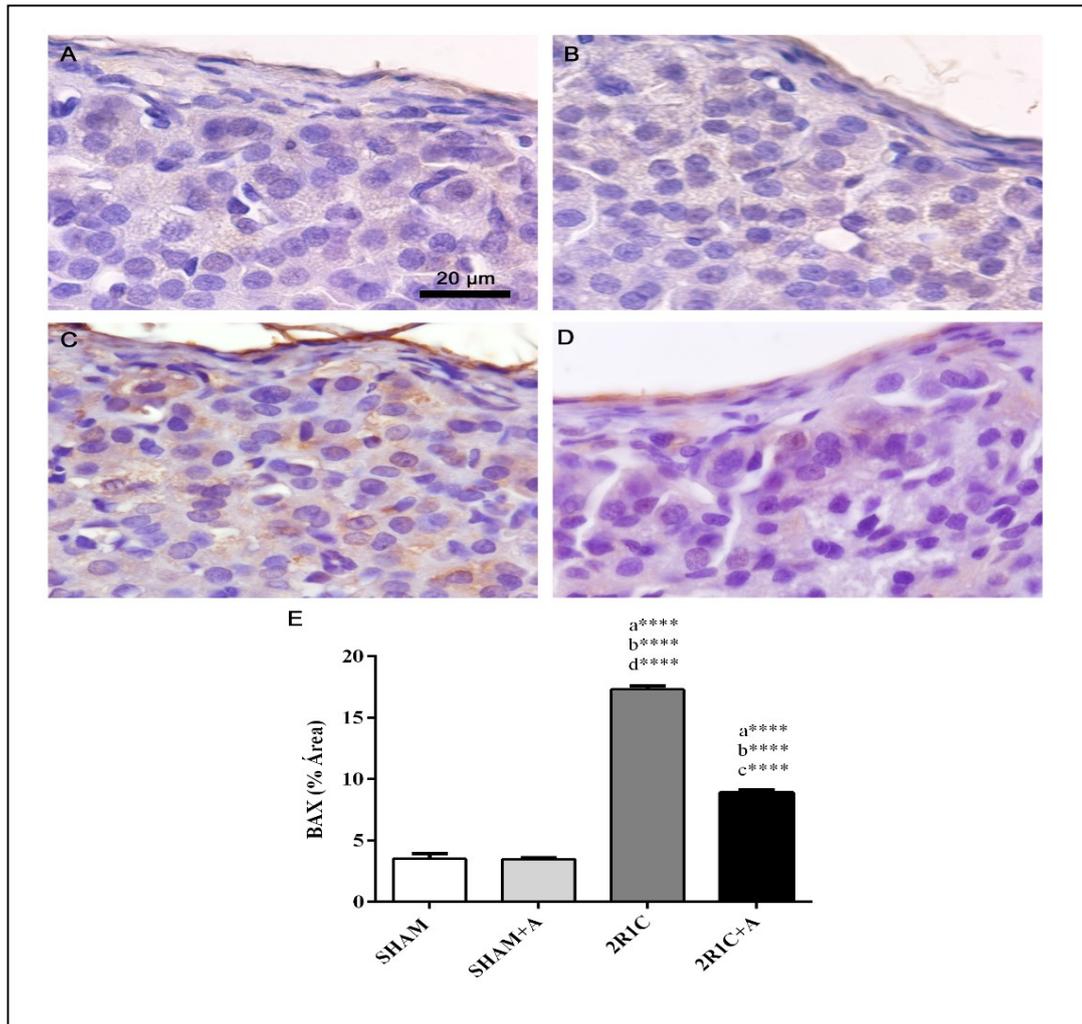
Fonte: A autora, 2020.

#### 4.5 Imunomarcção para detecção da proteína Bax

Na avaliação da imunomarcção da proteína Bax (Figura 9, a seguir), o grupo 2R1C mostrou um aumento significativo ( $p \leq 0,0001$ ) na expressão da imunomarcção comparado com grupo SHAM e SHAM + A (Figura 9, legendas C e E). Em contrapartida, o grupo 2R1C tratado com Alisquireno (Figura 9, legendas D e E) mostrou uma diminuição significativa ( $p \leq 0,0001$ ) na expressão da imunomarcção comparado com o grupo 2R1C e um aumento significativo ( $p \leq 0,0001$ ) quando comparado com os grupos SHAM e SHAM + A.

O grupo SHAM e SHAM + A não apresentaram diferença significativa marcação nas células da zona glomerulosa (Figura 9, legendas A, B e E).

Figura 9 - Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para proteína Bax



Legenda: (A) grupo SHAM; (B) grupo SHAM + A; (C) grupo 2R1C; (D) grupo 2R1C + A. Barra de calibração: 20µm. (E).

Nota: Gráfico de quantificação da expressão de Bax nos seguintes grupos: Grupo SHAM, SHAM + A, grupo 2R1C e 2R1C + A. Fotomicrografias da zona glomerulosa do córtex da adrenal após imunoperoxidase para Bax. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*\*\*\*) =  $p \leq 0,0001$ .

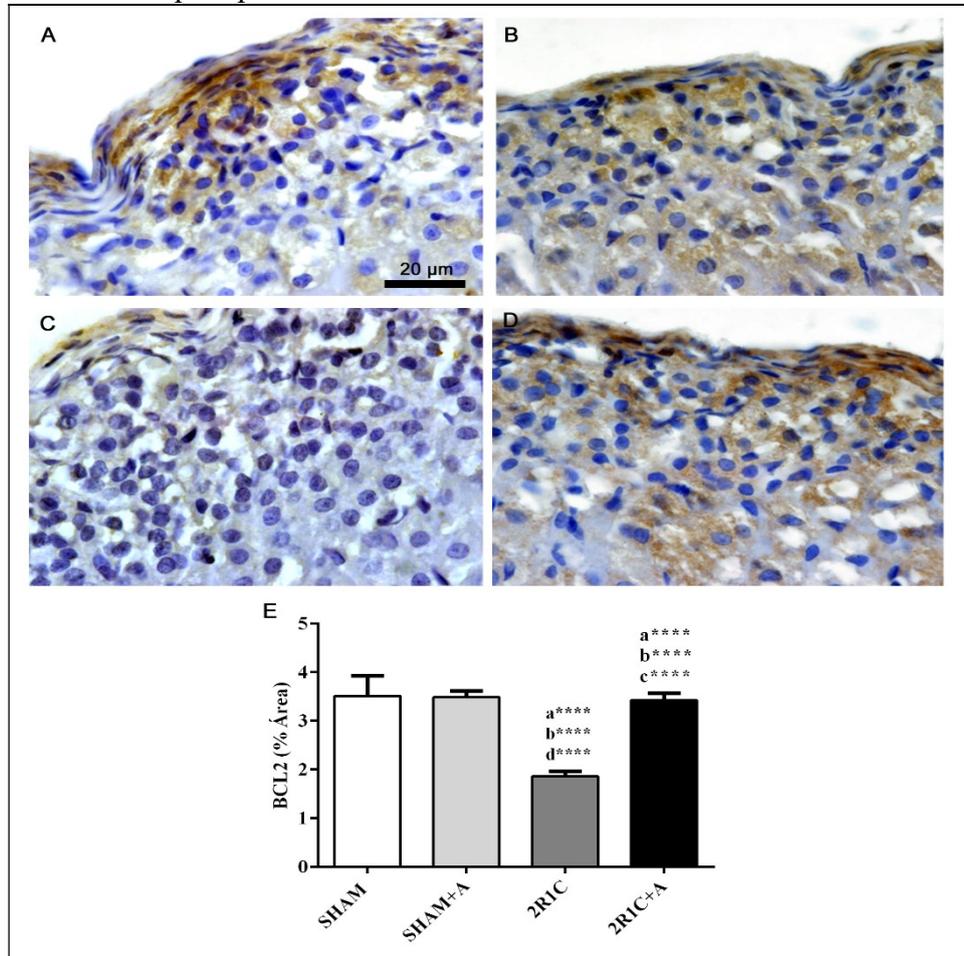
Fonte: A autora, 2020.

#### 4.6 Imunomarcção para detecção da proteína Bcl-2

A imunomarcção da proteína Bcl-2 foi presente nas células da zona glomerulosa de todos os grupos como apresentado na Figura 10. A imunomarcção e quantificação mostraram que no grupo 2R1C houve uma diminuição na expressão da proteína BCL-2 nas células da zona glomerulosa, comparado com o grupo SHAM e grupo SHAM + A.

O grupo 2R1C+ A mostrou um aumento significativo ( $p \leq 0,0001$ ) na intensidade da imunomarcção de Bcl-2 comparado com os grupos 2R1C, grupo SHAM e SHAM + A.

Figura 10 - Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para proteína Bcl-2



Legenda: (A) grupo SHAM; (B) grupo SHAM + A; (C) grupo 2R1C; (D) grupo 2R1C + A. Barra de calibração: 20µm; (E) Gráfico de quantificação da expressão de Bcl-2 nos seguintes grupos: Grupo SHAM, SHAM + A, grupo 2R1C e 2R1C + A.

Nota: Fotomicrografias da zona glomerulosa do córtex da adrenal após imunoperoxidase para Bcl-2. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*\*\*\*) =  $p \leq 0,0001$ .

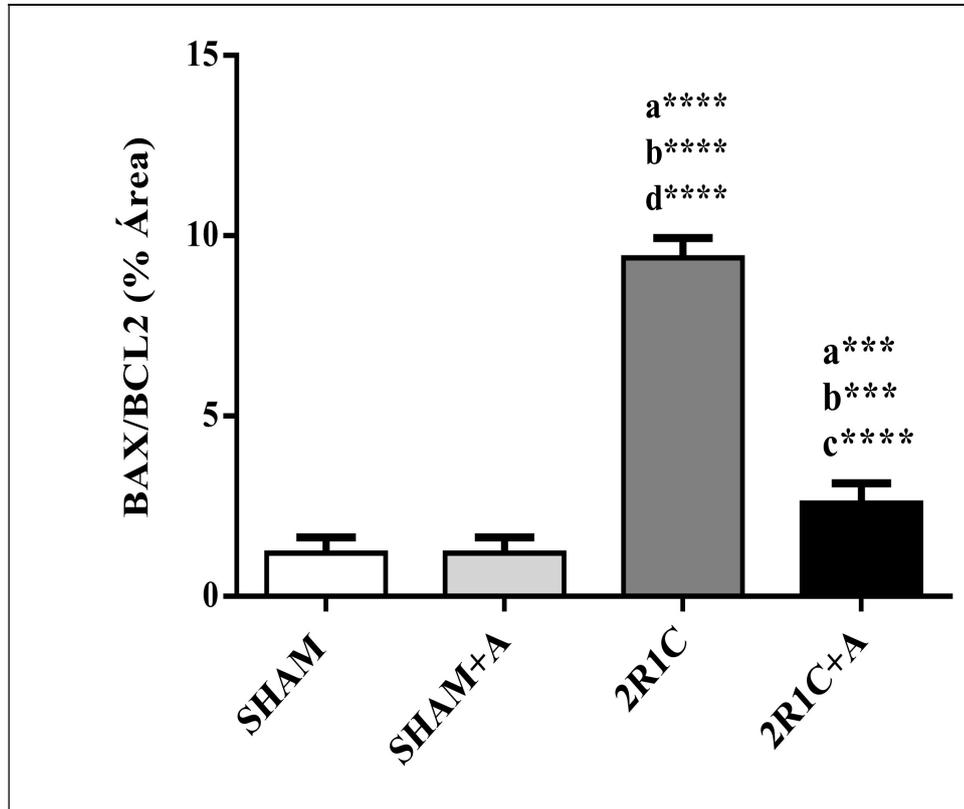
Fonte: A autora, 2020.

#### 4.7 Análise da expressão das proteínas Bax / BCL-2

A razão Bax / BCL-2 mostrou um aumento significativo ( $p \leq 0,0001$ ) no grupo 2R1C comparado aos demais grupos. Em contrapartida o grupo 2R1C+A mostrou uma diminuição

significativa ( $p \leq 0,0001$ ) quando comparado ao 2R1C e aumentado em relação ao SHAM e SHAM+A (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Representatividade da razão da expressão das proteínas Bax / Bcl-2



Nota: Razão da expressão da proteína Bax / BCL-2 nos seguintes grupos: Grupo SHAM, SHAM + A, grupo 2R1C e 2R1C + A. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$  e (\*\*\*\*) =  $p \leq 0,0001$ .

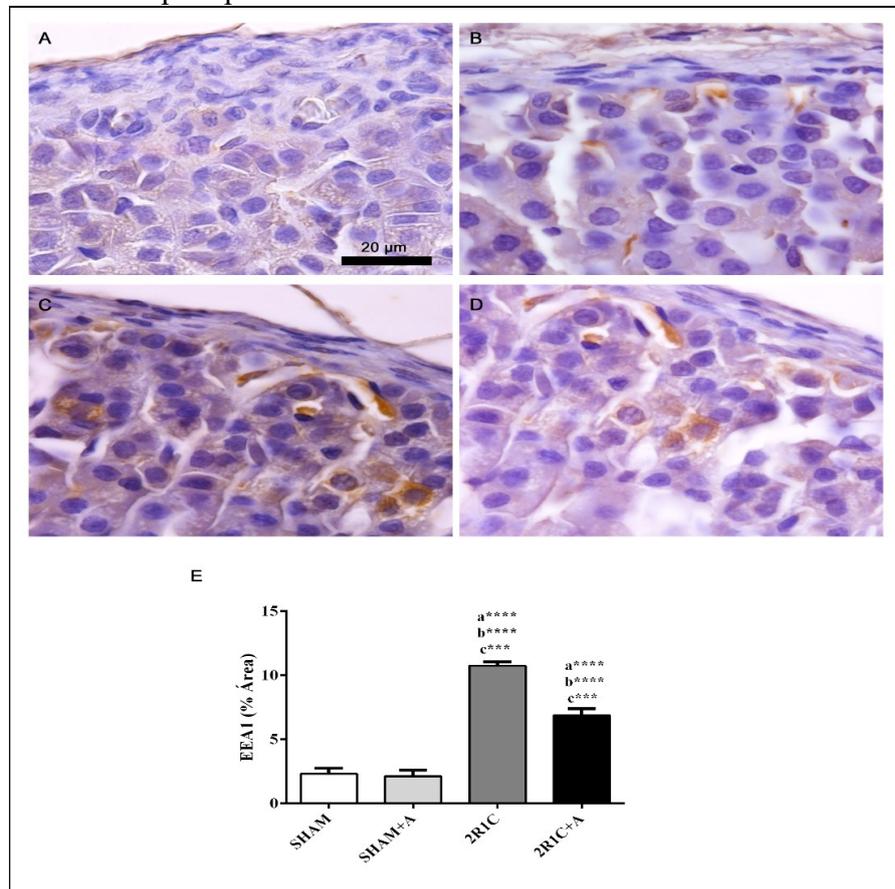
Fonte: A autora, 2020.

#### 4.8 Imunomarcção para detecção de antígeno 1 do endossoma inicial (EEA1)

A imunomarcção para EEA1 foi presente nas células da zona glomerulosa de todos os grupos conforme apresentado na Figura 11. O grupo 2R1C mostrou um aumento significativo ( $p \leq 0,0001$ ) na expressão da imunomarcção quando comparado aos grupos Sham e Sham + A. Já no grupo 2R1C+ A observou-se uma diminuição significativa ( $p \leq 0,001$ ) na expressão da imunomarcção de EEA1 comparado com o grupo 2R1C e aumentado

significativamente ( $p \leq 0,0001$ ) quando comparado com os grupos SHAM e SHAM tratado com alisquireno (Figura 11, legendas D e E).

Figura 11 - Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para proteína EEA1



Legenda: (A) grupo SHAM; (B) grupo SHAM + A; (C) grupo 2R1C; (D) grupo 2R1C + A. Barra de calibração: 20 $\mu$ m; (E) Gráfico de quantificação da expressão de EEA1 nos seguintes grupos: Grupo SHAM, SHAM + A, grupo 2R1C e 2R1C + A.

Nota: Fotomicrografias da zona glomerulosa do córtex da adrenal após imunoperoxidase para EEA1. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$  (\*\*\*\*) =  $p \leq 0,0001$ .

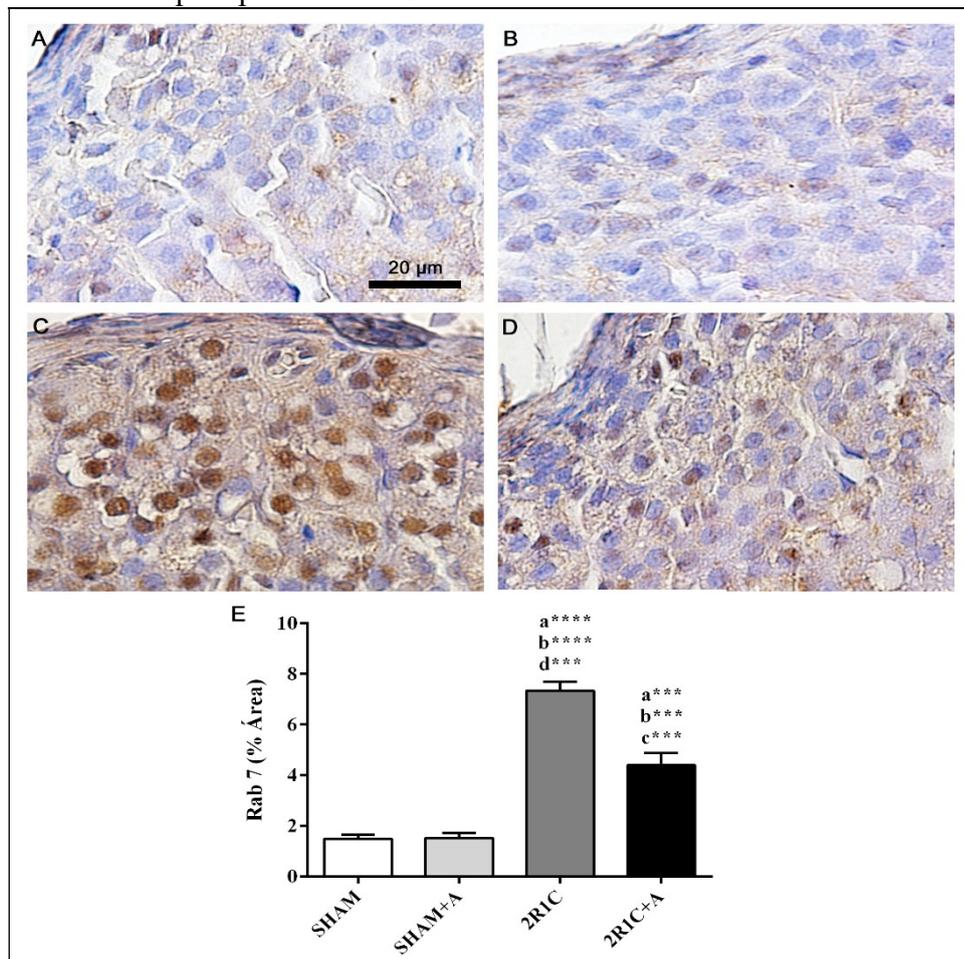
Fonte: A autora, 2020.

#### 4.9 Imunomarcção para detecção da proteína Rab7

A imunomarcção para proteína endossoma tardio, Rab7, foi presente nas células da zona glomerulosa de todos os grupos (Figura 12). O grupo 2R1C (Figura 12, legenda C) mostrou um aumento significativo ( $p \leq 0,0001$ ) na intensidade da imunomarcção comparado

com grupo SHAM e SHAM + A. No entanto, o grupo 2R1C+ A foi observado uma diminuição significativa ( $p \leq 0,001$ ) na intensidade da imunomarcção de Rab7 comparado com o grupo 2R1C e um aumento significativo ( $p \leq 0,001$ ) quando comparado com os grupos SHAM e SHAM + A (Figura 12, Legenda D). Não houve diferença significativa na imunomarcção de Rab7 nas células da zona glomerulosa entre os grupos SHAM e SHAM+A.

Figura 12 - Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para proteína Rab7



Legenda: (A) grupo SHAM; (B) grupo SHAM + A; (C) grupo 2R1C; (D) grupo 2R1C + A. Barra de calibração: 20 $\mu$ m. (E) Gráfico de quantificação da expressão de Rab 7 nos seguintes grupos: Grupo SHAM, SHAM + A, grupo 2R1C e 2R1C + A.

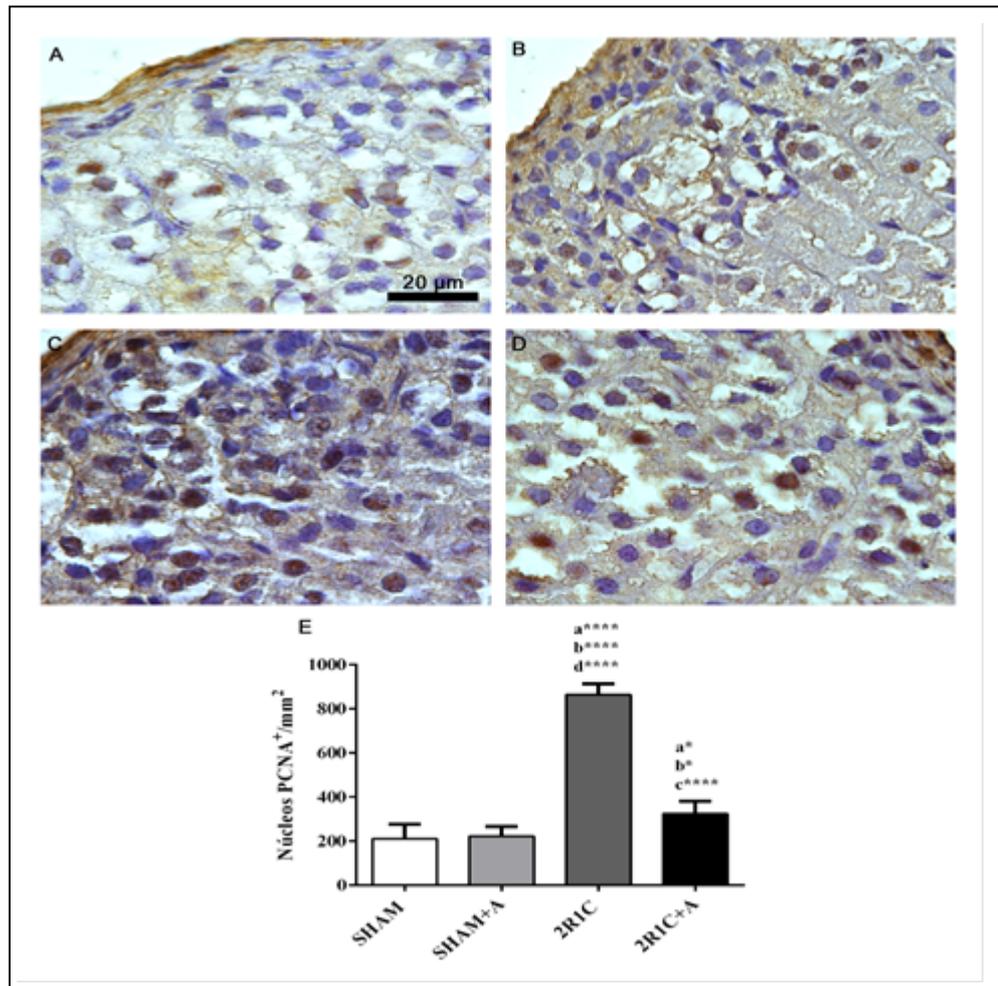
Nota: Fotomicrografias da zona glomerulosa do córtex da adrenal após imunoperoxidase para Rab7. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$  (\*\*\*\*) =  $p \leq 0,0001$ .

Fonte: A autora, 2020.

#### 4.10 Imunomarcação para detecção de antígeno de proliferação celular (PCNA)

Na avaliação da imunomarcação e quantificação para PCNA<sup>+</sup> observou-se que o grupo 2R1C mostrou um aumento significativo ( $p \leq 0,0001$ ) em núcleos de PCNA<sup>+</sup> comparado com grupo SHAM e SHAM + A. O grupo 2R1C+ A mostrou uma diminuição significativa ( $p \leq 0,0001$ ) em núcleos de PCNA<sup>+</sup> comparado com o grupo 2R1C e um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao grupo SHAM e SHAM + A. O grupo SHAM e SHAM + A não apresentaram diferença significativa marcação nas células da zona glomerulosa (Figura 13, legendas A, B e E, a seguir).

Figura 13 - Fotomicrografia da zona glomerulosa com imunoperoxidase para PCNA



Legenda: (A) grupo SHAM; (B) grupo SHAM + A; (C) grupo 2R1C; (D) grupo 2R1C + A. Barra de calibração: 20µm; (E) Gráfico de quantificação da expressão de PCNA nos seguintes grupos: Grupo SHAM, SHAM + A, grupo 2R1C e 2R1C + A.

Nota: Fotomicrografias da zona glomerulosa do córtex da adrenal após imunoperoxidase para Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). As barras de erro representam o desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*) =  $p \leq 0,05$  e (\*\*\*\*) =  $p \leq 0,0001$ .

Fonte: A autora, 2020.

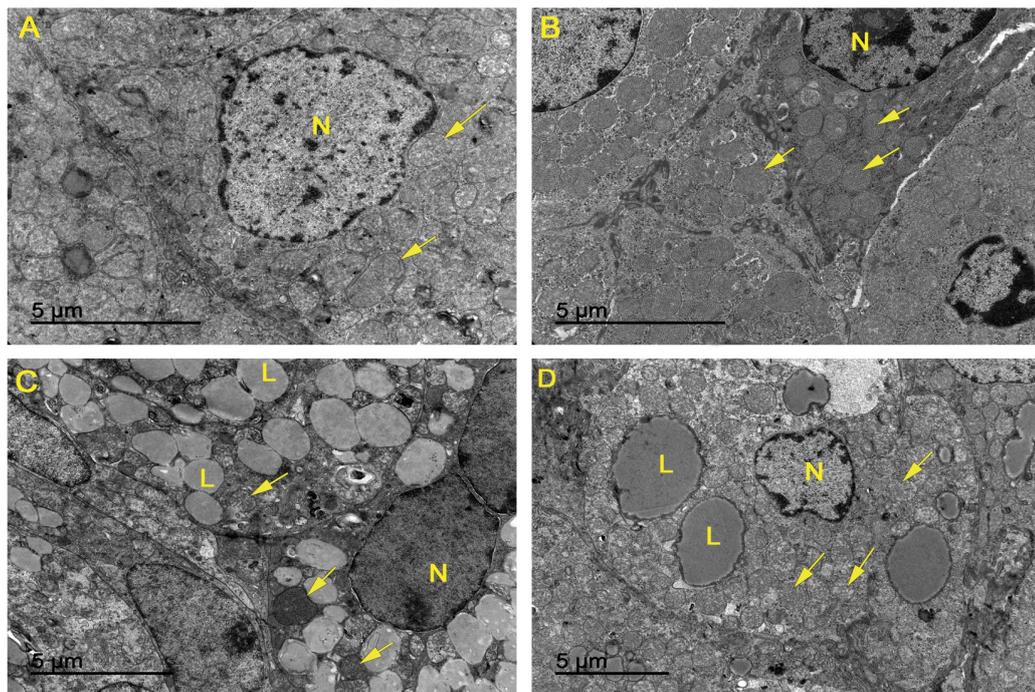
#### 4.11 Avaliação da ultraestrutura por microscopia eletrônica de transmissão

Ultraestruturalmente, as células da zona glomerulosa da glândula adrenal no grupo SHAM apresentam-se com aspecto de estrutura normal, sendo observado núcleo com morfologia normal, retículo endoplasmático, mitocôndrias arredondadas ou ovais exibindo cristas tubulares com aspecto e densidade normal, assim como no grupo SHAM + A (Figuras

14 e 15, legendas A e B). Foi observado no Grupo 2R1C mitocôndrias com ausências de cristas ou reduzidas, matriz mitocondrial densa e com membrana rompida (Figura 14, legenda C e Figura 15, legenda C). Além disso, observamos a presença de corpos lipídicos (Figura 14, legenda C e Figura 15, legenda C) e lisossomos lamelares (Figura 15, legenda D). Foi observado no grupo 2R1C + A núcleo disforme e eletrôn-denso (Figura 15, legenda D), presença de mitocôndria com membrana intacta, porém desprovida de cristas ou com cristas lamelares ou circulares (Figura 14, legenda D e Figura 15, legenda D).

Através da análise quantitativa (Gráfico 3) de mitocôndrias, foi observado um aumento significativo ( $p \leq 0,001$ ) do número de mitocôndrias nas células dos animais do grupo 2R1C e 2R1C + A.

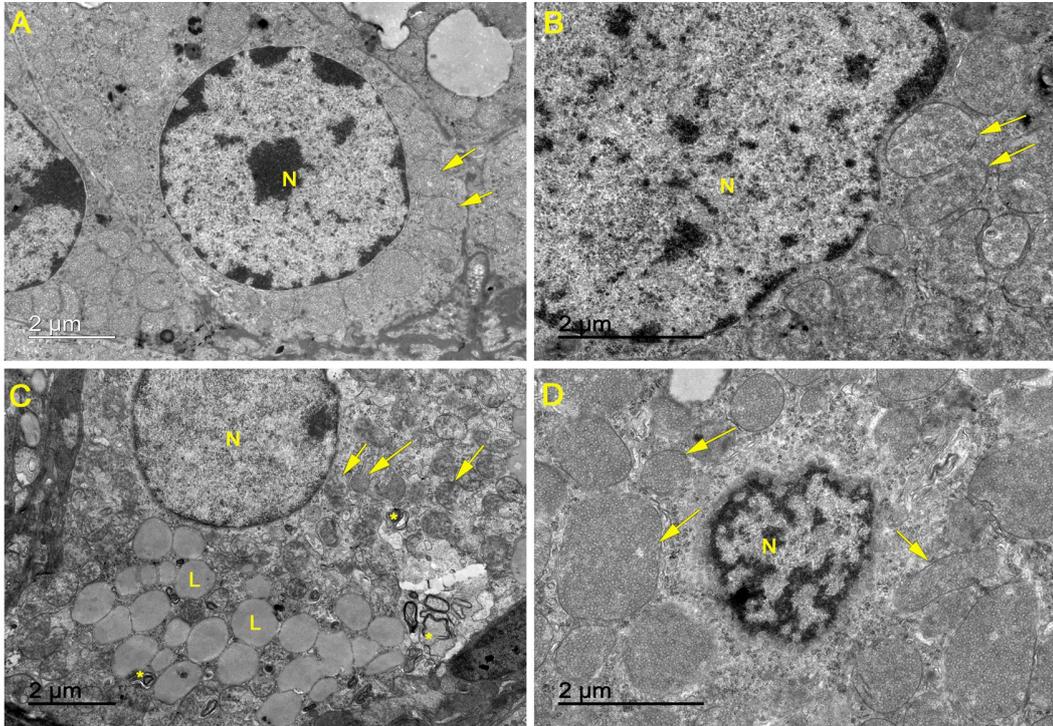
Figura 14 - Eletromicrografia da zona glomerulosa do córtex da adrenal por microscopia eletrônica de transmissão



Legenda: Eletromicrografia da zona glomerulosa do córtex da adrenal por microscopia eletrônica de transmissão (A) grupo SHAM; (B) grupo SHAM + A; (C) grupo 2R1C; (D) grupo 2R1C + A. Setas indicando mitocôndrias; (N) núcleo; (L) lisossomos. Barra de calibração: 5µm.

Fonte: A autora, 2020.

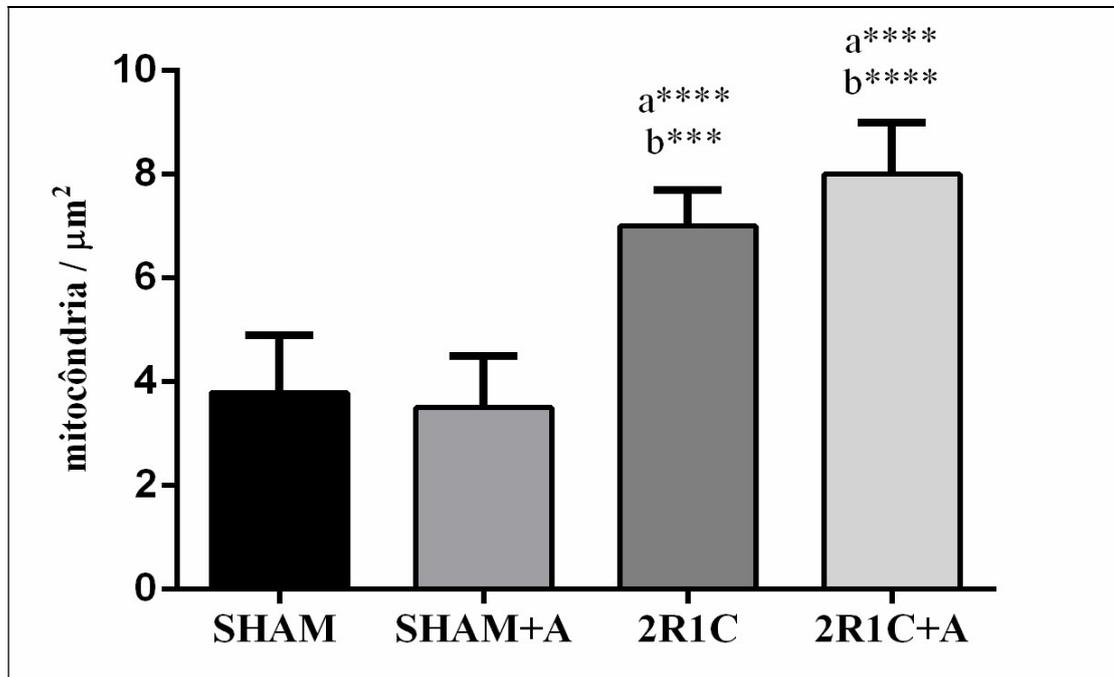
Figura 15 - Eletromicrografia da zona glomerulosa do córtex da adrenal por microscopia eletrônica de transmissão



Legenda: Eletromicrografia da zona glomerulosa do córtex da adrenal por microscopia eletrônica de transmissão (A) grupo SHAM; (B) grupo SHAM + A; (C) grupo 2R1C, (D) grupo 2R1C + A. Setas indicando mitocôndrias; (N) núcleo; (L) lisosomas; (\*) endossomas. Barra de calibração: 2µm.

Fonte: A autora, 2020.

Gráfico 3 - Representatividade da quantificação de mitocôndrias das células da zona glomerulosa do córtex da adrenal, por microscopia eletrônica de transmissão



Nota: gráfico de quantificação de mitocôndrias das células da zona glomerulosa por microscopia eletrônica de transmissão nos seguintes grupos: Grupo SHAM, SHAM + A, grupo 2R1C e 2R1C + A. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$  e (\*\*\*\*) =  $p \leq 0,0001$ .

Fonte: A autora, 2020.

## 5 DISCUSSÃO

A hipertensão renovascular, que representa 5% da população hipertensa, possui fisiopatologia intimamente relacionada com o SRAA, mecanismo fisiológico bem conhecido de controle da pressão arterial. Alterações nesse sistema parecem ser a principal causa da hipertensão renovascular, uma condição clínica que ainda leva ao aumento da morbimortalidade (Scortegana et al. 2017, Taylor et al. 2020).

O modelo de hipertensão renovascular experimental 2R1C, desenvolvido por Goldblatt et al. (1934), é um modelo clássico de hipertensão secundária, pois é um modelo experimental que em muitos aspectos assemelha-se ao humano. É amplamente utilizado para o estudo experimental da fisiopatologia da hipertensão renovascular e do efeito de drogas anti-hipertensivas (Amat et al. 2014), pois aumenta atividade do SRAA, um aumento gradual da pressão sistêmica, dos níveis de angiotensina II circulante e de aldosterona, ocasionando lesões em órgãos alvos (Fu et al. 2017, Gupta et al. 2020, Martins-Oliveira et al. 2018).

Portanto, uma estratégia terapêutica que possa melhorar o bloqueio do SRAA é necessária. Uma alternativa é o alisquireno, que atua suprimindo o sistema no seu ponto de ativação, apresentando potencial na redução da atividade plasmática da renina e, conseqüentemente, nos níveis plasmáticos de angiotensina I, angiotensina II e aldosterona, influenciando na diminuição da pressão arterial (Bader 2010, Hu et al. 2019, Reit et al. 2014, Von Lueder e Krum 2015).

No presente estudo a cirurgia para colocação do clipe de prata ao redor da artéria renal esquerda de ratos mostrou resultados positivos, ocasionando um aumento da PA sistólica, em decorrência da estenose parcial formada, caracterizando a hipertensão renovascular (Dias et al. 2014, Lima et al. 2018, Long-Biao et al. 2016, Melo et al. 2020, Segawa et al. 2020).

Observou-se que o efeito da administração do anti-hipertensivo alisquireno foi eficaz, fazendo com que houvesse uma redução significativa da PA sistólica como já visto em estudos anteriores (Dias et al. 2014, Marin et al. 2019, Martins-Oliveira et al. 2012, Pimenta 2009).

Já o receptor  $AT_1$  é uma proteína integral de membrana. Por intermédio deste receptor ocorre a maioria dos efeitos fisiológicos e patológicos atribuídos à angiotensina II. A ligação a estes receptores, amplamente distribuídos pelo organismo, resulta em vasoconstrição, inflamação, stress oxidativo, transcrição de fatores de crescimento responsáveis pela proliferação celular, efeitos cardiovasculares, renais e efeito no córtex da adrenal, com

liberação de aldosterona pelas células da zona glomerulosa, levando à retenção de sódio e água, elevando a pressão arterial (Carey e Siragy 2003, Ferrario 2006, Giestas et al. 2010, Gupta et al. 2020, Kawai et al. 2017).

No trabalho ora desenvolvido foi verificada a expressão do receptor AT<sub>1</sub> por imunohistoquímica nas células da zona glomerulosa da adrenal em ratos com hipertensão renovascular e tratados com alisquireno, no qual o grupo 2R1C mostrou um aumento significativo na marcação do receptor AT<sub>1</sub> comparado ao grupo SHAM e SHAM + A.

Mansour et al. (2013) mostraram que ratos com nefropatias diabéticas apresentaram aumento da expressão de AT<sub>1</sub> no rim e zona glomerulosa de adrenal, sugerindo uma possível desregulação ou hiper-ativação do SRAA.

Já Wong et al. (1990) mostraram que injeção de antagonista do receptor AT<sub>1</sub> reduz o nível de aldosterona plasmática em ratos hipertensos, sugerindo que o receptor AT<sub>1</sub> é responsável pela secreção de aldosterona na zona glomerulosa da adrenal.

Dabul et al. (2015) também observaram a diminuição da síntese e secreção de aldosterona ao utilizar fármacos antagonistas do receptor AT<sub>1</sub> em células da zona glomerulosa, sugerindo que o bloqueio do receptor AT<sub>1</sub> poderia ser um caminho para o tratamento de doenças como hiperaldosteronismo.

A partir disso, a hiperativação do receptor AT<sub>1</sub> tem sido considerada como um importante mediador no desenvolvimento de hipertensão arterial em humanos assim como em modelos experimentais (Carey e Siragy 2003, Kawai et al. 2017, Mansour et al. 2013, Saavedra e Armando 2018).

Em nosso estudo o grupo 2R1C + A mostrou uma diminuição significativa na marcação do receptor AT<sub>1</sub> comparado com o grupo 2R1C, mostrando a eficácia do fármaco alisquireno na redução dos receptores AT<sub>1</sub> e como consequência a redução de aldosterona pela zona glomerulosa e diminuição da pressão arterial.

Mitocôndrias são organelas responsáveis por várias funções metabólicas incluindo produção de energia por via de fosforilação oxidativa. São também uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO), e a sua superprodução danifica o DNA mitocondrial e a cadeia respiratória de oxidação, levando a uma disfunção mitocondrial (Yuan et al. 2018, Zhao et al 2016).

Já se sabe que a aldosterona é sintetizada a partir do colesterol por uma série de reações enzimáticas específicas que são catalisadas pela aldosterona sintase, localizada no interior da membrana mitocondrial, pertencente à superfamília do citocromo P450 (Midzak e Papadopoulos 2016, Reddish e Guengerich 2019).

O PGC - 1 $\alpha$  (receptor -  $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissomo coativador-1 $\alpha$ ) está expresso em diversos tecidos, especialmente aqueles com alto metabolismo oxidativo. Exerce uma função crucial no controle da biogênese mitocondrial e sua expressão está ligada a uma adequada homeostase do metabolismo energético celular (Zhao et al 2016, Yuan et al. 2018). Não é de se estranhar, que distúrbios de sua função e / ou expressão possam estar relacionados à gênese de diversas doenças (Scarpulla 2011).

Em nosso estudo também foi investigado a expressão de PGC-1 $\alpha$  por imunomarcção nas células da zona glomerulosa. O grupo 2R1C e 2R1C+ A mostrou um aumento significativo na intensidade da imunomarcção comparado com grupo SHAM e SHAM + A, no entanto, o grupo 2R1C+ A não mostrou uma diminuição significativa comparada ao grupo 2R1C.

Zhao et al. (2016) mostraram em estudo feito em camundongos com glomeruloesclerose uma superexpressão de PGC-1 $\alpha$  comparado aos animais controle e isso ocorria devido a um possível efeito protetor de PGC-1 $\alpha$ .

Já Jiang et al. (2013) observaram em células-tronco derivadas de tecido adiposo, sob condições altas de glicose e hipóxia, uma superexpressão de PGC-1 $\alpha$ . Também foi observada uma diminuição de apoptose e ERO que levou ao aumento da sobrevivência destas células. No mesmo estudo também foi observado que a morfologia mitocondrial permaneceu relativamente preservada comparada ao grupo em que não houve aumento na expressão de PGC-1 $\alpha$ , sugerindo que o PGC-1 $\alpha$  poderia estar apresentando um papel protetor no tratamento do diabetes mellitus e suas complicações.

Estudos mostram que embora a alta expressão de PGC-1 $\alpha$  seja benéfica para certos tecidos, também pode ser deletéria em outros (Besseiche et al. 2015, Bost e Kaminski 2019, Sahin et al. 2011).

Um outro estudo realizado por Yoon et al. (2003) em pâncreas de roedores obesos e diabéticos mostrou que a expressão de PGC-1 $\alpha$  estava em níveis altos, sugerindo que a desregulação de PGC-1 $\alpha$  pode estar envolvida nesses distúrbios.

Modificações e adaptações no metabolismo celular são características das células cancerígenas. Vários artigos mostraram que a expressão de PGC-1 $\alpha$  é alterada em tumores e metástases devido às modificações no metabolismo celular (Bost e Kaminski 2019, Cruz-Bernardez et al. 2017, Sancho et al. 2015, Shiota et al. 2010, Vellinga et al. 2015). Estudos feitos em células de tumores prostáticos mostraram que a inibição da PGC-1 $\alpha$  induz a interrupção do ciclo celular na fase G1 e, assim, suprimiu seu crescimento. Esta regulação

sustenta que a expressão de PGC-1 $\alpha$  aumenta sua influência no metabolismo tumoral (Shiota et al. 2010).

Outro estudo realizado em ratos tratados com aldosterona sugeriu que a aldosterona pode estar contribuindo para a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo no tecido cardíaco, já que a expressão de PGC-1 $\alpha$  e DNA mitocondrial apresentaram-se diminuídos comparados ao grupo controle, favorecendo o aumento do estresse oxidativo e o desenvolvimento de disfunção mitocondrial (Ibarrola et al. 2018).

Ainda, estudos sugerem que a disfunção mitocondrial participa do processo de diversos tipos de doenças como insuficiência cardíaca, neurodegeneração, doenças renais e doenças em adrenais (Rone et al. 2014, Xiao et al. 2020).

Em nosso trabalho, através de análise quantitativa, foi observado um aumento do número de mitocôndrias no grupo 2R1C e 2R1C+A. Porém, tais organelas se apresentavam com membrana mitocondrial rompida e com diminuição ou ausência de cristas, sugestivo de disfunção mitocondrial. De acordo com estes achados, podemos inferir que o PGC-1 $\alpha$  apresentou um efeito protetor nas células da zona glomerulosa, aumentando a biogênese mitocondrial para compensar os efeitos deletérios causados pela hipertensão renovascular.

O citocromo C é uma proteína presente entre a membrana mitocondrial externa e interna. É um componente essencial no complexo da cadeia respiratória mitocondrial, facilitando a transferência de elétrons (Borutaite 2010). Na disfunção mitocondrial, a permeabilização da membrana mitocondrial pode atrapalhar a cadeia de transporte de elétrons e afetar função do citocromo C. Em resposta, ocorre a liberação do citocromo C ao citosol que leva à apoptose. Esta liberação pode ser mediada por proteínas pró-apoptóticas como o Bax e anti-apoptóticas como Bcl-2 (Borutaite 2010, Huang et al. 2019).

Neste trabalho, verificamos a expressão da proteína citocromo C, Bax e Bcl-2 nas células da zona glomerulosa. Observamos que no grupo 2R1C houve um aumento significativo na intensidade da expressão de citocromo C e Bax comparado com os demais grupos. O grupo 2R1C+A mostrou uma diminuição significativa na intensidade da imunomarcção de citocromo C e Bax comparado com o grupo 2R1C e um aumento significativo quando comparado com os grupos SHAM e SHAM + A.

Já na imunomarcção para Bcl-2 houve uma diminuição da expressão no grupo 2R1C e o grupo 2R1C+A mostrou um aumento significativo comparado com os grupos 2R1C, SHAM e SHAM + A.

Na razão entre Bax e Bcl-2 foi observado um aumento significativo no grupo 2R1C, indicando aumento na taxa de apoptose das células da zona glomerulosa. Foi observado que

no grupo hipertenso tratado com alisquireno (2R1C+A) a razão entre Bax e Bcl-2 diminuiu comparada ao grupo 2R1C, sugerindo uma diminuição na taxa de apoptose.

Pesquisas mostraram que a apoptose é um dos principais fatores contribuintes para na patogênese de diversas doenças (Kaya et al. 2013, Liu et al. 2019).

Em estudos realizados com miócitos cardíacos de pacientes com insuficiência cardíaca a expressão da proteína da proteína Bax foi aumentada, enquanto a expressão Bcl-2 foi diminuída, resultando em uma diminuição da razão Bax/ Bcl-2, indicando que a apoptose celular foi aumentada (Liu et al. 2019).

Khalil (2015) mostrou em seus estudos realizados no córtex adrenal de ratos tratados com o fármaco cetoconazol uma diminuição significativa da aldosterona e corticosterona plasmática, com diminuição da área da zona glomerulosa e o aumento da área da zona fasciculada. Também observou um aumento significativo na razão entre Bax e Bcl-2 das células da zona glomerulosa, sugerindo aumento na taxa de apoptose e uma alteração na morfologia do córtex da adrenal.

Analisando as alterações na ultraestrutura de células da zona glomerulosa, foram observadas, no grupo 2R1C, alterações importantes, como mitocôndrias com diminuição ou ausência de cristas, matriz mitocondrial densa e com membrana rompida, sugerindo disfunção mitocondrial. Algumas dessas alterações também foram observadas no grupo 2R1C, tratados com alisquireno, como mitocôndrias com a membrana mitocondrial preservada, desprovida de cristas ou cristas lamelares ou circulares, sugerindo indicativo de apoptose. Alterações semelhantes foram relatadas em células da zona glomerulosa e fasciculada de ratos após indução de estresse em adrenal causado por isquemia hepática (El-Tahawy et al. 2019).

Florea e Crânciun (2011) relataram semelhantes alterações ultraestruturais nas células da zona glomerulosa de ratos após tratamento com toxina que inibia a atividade mitocondrial.

De acordo com nossos resultados, podemos sugerir que as células da zona glomerulosa do grupo 2R1C estavam desenvolvendo um processo de apoptose e o fármaco alisquireno foi capaz de arrefecer esse processo.

A autofagia é um processo de reciclagem catabólica celular em que componentes, especialmente em organelas e agregados de proteínas envelhecidas ou com mau funcionamento, são degradados. É importante para manutenção da homeostase celular e pode ser induzida durante várias condições de estresse (Ghavami et al. 2014, He et al. 2019, Noguchi et al. 2015, Stroupe 2018).

Os componentes degradados são englobados ou engolidos por um saco membranoso chamado de fagóforo ou membrana de isolamento. Uma vez que este fagóforo é selado, torna-

se uma organela de dupla membrana denominada de autofagossomo ou vesícula autofágica. Os autofagossomos são formados com o auxílio de várias proteínas GTP, tornando-se amadurecidos e, finalmente, fundidos com lisossomas (Hytinen et al. 2013, Langemeyer et al. 2018).

A autofagia é um processo crucial na morte celular programada. A desregulação da sinalização deste sistema pode causar um estresse autofágico, levando à indução da morte celular (Noguchi et al. 2020). O mecanismo pelo qual a autofagia induz à morte celular ainda é discutido e algumas hipóteses sugerem que deva ocorrer por digestão seletiva de fatores citoprotetores, digestão excessiva de proteínas citoplasmática ou ativação de vias apoptóticas. Portanto, a autofagia é um processo dual, podendo garantir tanto a sobrevivência quanto induzir à morte celular (Noguchi et al. 2015, Stroupe 2018).

As Rabs pertencem a superfamília Ras de pequenas GTPases. São consideradas marcadores da identidade da membrana e funcionam como organizadores centrais do transporte mediado por vesículas entre organelas, incluindo a formação e controle de autofagossoma. Entre eles temos Rab5 e Rab7.

O antígeno 1 do endossoma inicial (EEA1) é uma proteína de ligação necessária para fusão de vesículas endocíticas com endossoma primário, Rab5. Não é encontrado em outros compartimentos endossômicos, tornando-se um marcador de endossoma inicial (Langemeyer et al. 2018).

O endossoma tardio, Rab7, desempenha um papel central na via endocítica, pois é responsável pelo tráfego, amadurecimento, fusão da vesícula ao lisossomo e promove a manutenção da função lisossômica. As expressões anormais ou alterações na atividade da Rab7 podem estar associadas a doenças neurodegenerativas, distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares (He et al. 2019).

Em nosso trabalho verificamos a expressão de EEA1 e Rab7 por imunoperoxidase. Observamos um aumento significativo na intensidade da expressão no grupo 2R1C comparado com os demais grupos. Estudos realizados por He et al. (2019) mostraram uma superexpressão de Rab7 em dissecação aórtica, sugerindo que a autofagia possa promover a conversão fenotípica de células de músculo liso vascular.

Outro estudo mostrou um aumento da expressão de EEA1 e Rab7 em camundongos selvagens submetidos à pancreatite aguda. Já em camundongos nocaute para Rab7 foi observado um aumento da expressão de EEA1 e da inflamação pancreática, quando comparado aos animais selvagens, demonstrando que o tráfego alterado de endossomas

precoces e tardios pode levar ao aparecimento de pancreatite. Sugerindo que o Rab7 poderia desempenhar um papel citoprotetor (Takahashi et al. 2017).

Em nossa análise ultraestrutural, além das alterações mitocondriais, observamos que o grupo hipertenso apresentou grande acúmulo de corpúsculos lipídicos. Esse acúmulo de lipídios pode ser devido a uma superexpressão de aldosterona em animais hipertensos, que foi revertida pelo tratamento. Da mesma forma, um estudo mostrou aumento de lipídios em animais hipertensos, que diminuiu nos grupos tratados para hipertensão com zinco (Taneja e Mandal 2010).

Observamos, também no grupo hipertenso, vários lisossomas, responsáveis pela digestão de organelas no citoplasma. Essa é uma das respostas ao excesso de aldosterona que ativa o sistema de autofagia para remediar o estresse oxidativo causado pela hipertensão (Wang et al. 2015). Em nosso estudo, esses lisossomas não foram observados no grupo tratado com alisquireno.

Considerando a escassez de estudos sobre o assunto na glândula adrenal, investigamos a expressão da proteína PCNA, que atua como um andaime para recrutar proteínas envolvidas na replicação ou reparo do DNA, a fim de observar a proliferação celular na zona glomerulosa.

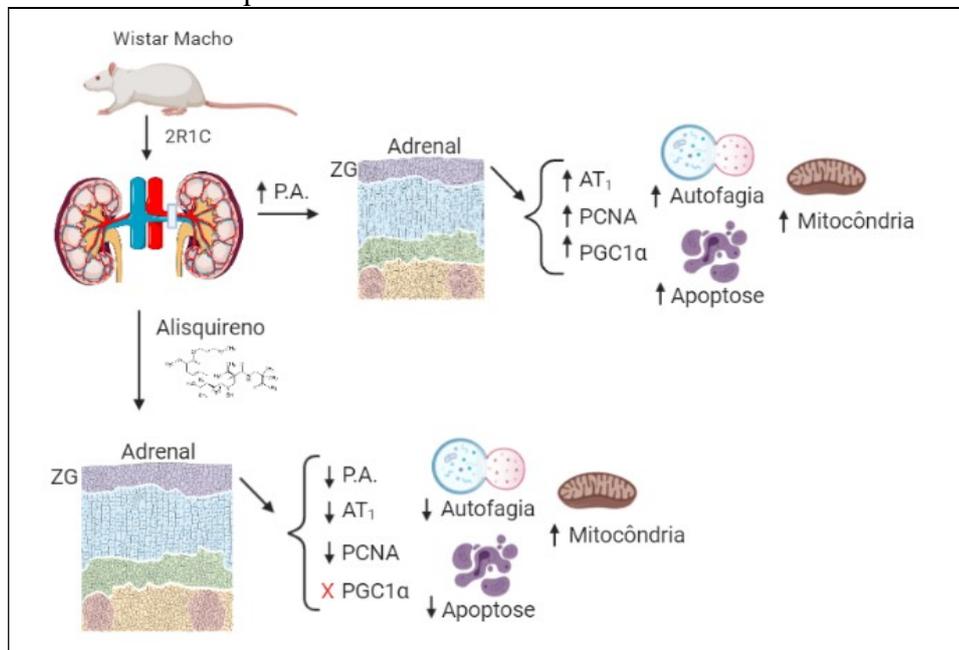
Observamos um aumento significativo na expressão de PCNA nos animais do grupo 2R1C em comparação ao SHAM e SHAM+A, indicando que as células da zona glomerulosa foram estimuladas a proliferar na hipertensão, o que pode ocorrer como resultado do estresse, a fim de recuperar o tecido que pode ter sido danificado (Petrovic-Kosanovi et al. 2013, Wolkersdorfer e Bornstein 1998). Outra hipótese é que a zona glomerulosa seria regenerada por células progenitoras-tronco residentes que poderiam se diferenciar (Mitani 2014, Mitani et al. 2003, Nakamura et al. 2015). Em nosso estudo, o tratamento com alisquireno foi capaz de reduzir a expressão dessa proteína, o que significa que os danos causados pela hipertensão na zona glomerulosa podem ter sido atenuados.

Petrovic-Kosanovic et al. (2013) observaram que ratos submetidos ao estresse térmico desenvolvem além da proliferação celular, um aumento significativo de apoptose na zona glomerulosa e fasciculada da glândula adrenal. Wolkersdorfer e Bornstein (1998) também propuseram que o córtex da glândula adrenal sofre mitose e apoptose quando submetido a esse tipo de estresse. Da mesma forma, autores sugerem que proteínas reguladoras de apoptose Bax e Bcl-2, estejam envolvidas nos efeitos do estresse na glândula adrenal (Wang et al. 2015, Yu et al. 2012).

Portanto, de acordo com dados obtidos, esse estudo indica que a hipertensão renovascular 2R1C foi capaz de promover um estresse na zona glomerulosa da glândula adrenal, causando além do aumento na proliferação celular, um processo de disfunção mitocondrial e autofagia, sugerindo um possível estado de mitofagia.

Outrossim, o tratamento com fármaco alisquireno, por via oral, foi capaz de promover a redução da pressão arterial sistêmica e atenuar o dano tecidual na zona glomerulosa causado pela hipertensão renovascular (Figura 16).

Figura 16 - Esquema de representação dos resultados obtidos com a hipertensão renovascular e com o tratamento do fármaco alisquireno



Legenda: 2 Rins 1 Clipe (2R1C); Pressão arterial (PA); Zona glomerulosa (ZG); Receptor 1 de angiotensina II (AT<sub>1</sub>); Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA); receptor -  $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissomo coativador-1  $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ).

Nota: Indução da hipertensão renovascular promoveu a elevação da PA, aumento na expressão de AT<sub>1</sub>, PCNA, PGC1 $\alpha$ , assim como autofagia e apoptose. O tratamento com o fármaco alisquireno foi capaz de promover redução da PA, diminuir a expressão de AT<sub>1</sub>, PCNA, autofagia e apoptose. O fármaco não foi capaz de atenuar a biogênese mitocondrial expressada pelo PGC1 $\alpha$ .

Fonte: A autora, 2020.

## CONCLUSÕES

Neste estudo, conclui-se que a hipertensão renovascular 2R1C foi capaz de promover um estresse na zona glomerulosa da glândula adrenal, causando aumento na expressão do receptor AT<sub>1</sub>, proliferação celular e biogênese mitocondrial. Também foi capaz de promover um processo de disfunção mitocondrial e autofagia.

Observou-se que a administração do fármaco alisquireno por quatro semanas nos ratos com hipertensão renovascular 2R1C foi eficaz na redução da pressão arterial sistêmica. Também foi capaz de abrandar os efeitos deletérios da hipertensão renovascular na zona glomerulosa do córtex da adrenal, reduzindo a expressão do receptor AT<sub>1</sub>, Citocromo C, Bax, EEA1 e Rab 7. Constatou-se, ainda, que o alisquireno não foi capaz de atenuar a biogênese mitocondrial expressa pelo PGC-1 $\alpha$ . Por fim, o fármaco também foi capaz de manter a preservação da ultraestrutura das células da zona glomerulosa.

Poucos são os estudos relacionados ao efeito da hipertensão arterial na glândula adrenal. Nesse contexto, maiores investigações são necessárias em relação às suas possíveis alterações morfofuncionais relacionadas com fármacos.

## REFERÊNCIAS

- Abegunde DO, Mathers CD, Adam T, Ortegón M, Strong K. The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. *Lancet*. 2007; 370(9603):1929-38.
- Alderman H. Food subsidies and the poor in psacharopolous. *Essays onpoverty, equity and growth*, Pergamon Press. 1991; 172-202.
- Amat N, Amat R, Abdureyim S, Hoxur P, Osman Z, Mamut D, et al. Aqueous extract of *dioscorea opposita thunb* normalizes the hypertension in 2K1C hypertensive rats. *BMC Complement Altern Med*. 2014. 14:36.
- Angeretti M, Lumia D, Cani A, Barresi M, Cardim LN, Piacentino F, et al. Non-enhanced MR angiography of renal arteries: comparison with contrast-enhanced MR angiography. *Acta Radiol*. 2013;52(3):49-56.
- Azizi M, Frank M, Steichen O, Blanchard A. Advantages and limitations of renin inhibition with aliskiren. *Ann Pharm Fr*. 2011; 69(3):142-50.
- Bader M. Tissue renin-Angiotensin-Aldosterone Systems: targets for pharmacological therapy. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:439-65.
- Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med*. 2008; 86(6):615-21.
- Bassett MH, White PC, Rainey WE. The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol Cell Endocrinol*. 2004; 2117:67-74.
- Bernstein RS, Meurer LN, Plumb EJ, Jackson JL. Diabetes and hypertension prevalence in homeless adults in the United States: a systematic review and meta-analysis. *Am J Public health*. 2015; 105(2):46-60.
- Besseiche A, Rivelinea JP, Gautiera JF, Bréanta E, Blondeaua B. Metabolic roles of and its implications for type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2015; 41(5):347-57.
- Bonanni L, Vestra MD. Oral renin inhibitors in clinical practice: a perspective review. *Ther Adv Chronic Dis*. 2012; 3(4):173-81.
- Borutaite V. Mitochondria as decision-makers in cell death, *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2010; 51(5): 406-16.
- Bost F, Kaminski L. The metabolic modulador PGC-1 $\alpha$  in câncer. *Am J Cancer*. 2019; 9(2): 198-211.
- Boulkroun S, Samson-Couterie B, Dzib JFG , Lefebvre H, Louiset E , Amar L, et al. Adrenal cortex remodeling and functional zona glomerulosa hyperplasia in primary aldosteronism. *Hypertension*. 2010; 56(5):885-92.

Brito JC. Exercício físico como fator de prevenção aos processos inflamatórios decorrentes do envelhecimento. *Motriz*. 2011; 17(3):544-55.

Brody T. *Nutricional Biochemistry*. Londres: Academic Press; 1993.

Brunton L, Knollman B, Hilal-Dandan R. *Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. 12<sup>a</sup> ed. New York: The McGraw Hill Companies, Inc.; 2011.

Burnier M, Waeber B, Brunner HR. The advantage of the angiotensin II antagonism. *Hypertension*. 1994; 12(2):7-15.

Cai W, Zhang Z, Huang Y, Sun H, Qiu L. Vaccarin hypertension and nephropathy in renovascular hypertensive rats. *Experim Therapeut Med*. 2018; 15:924-32.

Calvier L, Martinez-Martinez E, Miana M, Cachofeiro V, Rousseau E, Sádaba R, et al. The Impact of Galectin-3 Inhibition on Aldosterone-Induced Cardiac and Renal Injuries. *JACC. Heart Failure*. 2015; 3(1):59-67.

Campagnaro BP, Gava AL, Meyrelles SS, Vasquez EC. Cardiac-autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular Angiotensin-dependent hypertensive mouse. *Int J Hypertens*. 2012; 2012:968123.

Cardoso RT, Palma IM. Cortex supra-renal: Anatomia, embriologia e fisiologia. *RPEDM*. 2009; 01:71-6.

Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr. Rev*. 2003; 24:261-71.

Carvalho-Calvão A, Gadelha DDA, Alves JLB, Barkat AK, Castro-Gomez RJH, Cruz JC, et al. A Newly Isolated Carboxymethyl-Glucan (CM-G) Restores Depressed Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats. *Front Physiol*. 2018; 9:607.

Cervenka L, Vaneckova I, Maly J, Horacek V, El-Cahr SS. Genetic inactivation of the B2 receptor in mice worsens two-kidney, one-clip hypertensin: role of OS and the AT2 receptor. *J Hypertens*. 2003; 21:1531-8.

Chaudhary K, Nistala R, Whaley-Connell A. Is there a future for direct renin inhibitors? *Expert Opin Investig Drugs*. 2010; 19(5):653-61.

Chien Y, Rosal K, Bon-Chu C. Function of CYP11A1 in the mitochondria. *Mol Cell Endocrinol*. 2017; 441:55-61.

Connell JMC, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol*. 2005; 186:1-20.

Cortese F, Cecere A, Cortese AM, Andriani A, Truncellito L, Valente F, et al. Vascular, cardiac and renal target organ damage associated to arterial hypertension: which noninvasive tools for detection? *J Hum Hypertens*. 2020; 34(6):420-31.

- Cruz-Bermudez A, Vicente-Blanco RJ, Laza-Briviesca R, Garcia-Grande A, Laine-Menendez S, Gutierrez L, et al. PGC-1 $\alpha$  levels correlate with survival in patients with stage III NSCLC and may define a new biomarker to metabolism-targeted therapy. *Sci Rep*. 2017; 7(1):16661.
- Dabul S, Bathgate-Siryk A, Valero TR, Jafferjee M, Sturchler E, McDonald P, et al. Suppression of adrenal  $\beta$ arrestin1- dependent aldosterone production by ARBs: head-to-head comparison. *Sci Rep*. 2015; 5:8116.
- Dias A, Cintra A, Frossard J, Palomino Z, Casarini D, Gomes IBS, et al. Inhibition of phosphodiesterase 5 restores endothelial function in renovascular hypertension. *J Transl Med*. 2014; 12:250.
- Dooley R, Harvey BJ, Thomas W. The regulation of cell growth and survival by aldosterone. *Front Biosci*. 2011; 16:440-57.
- El-Tahawy N, Mohammed S, Abozaid M. The possible structural changes in the adrenal gland cortex after induction of hepatic ischemia-reperfusion injury in male albino rats: Light and electron microscopic study. *J Cell Physiol*. 2019;1-9.
- Escobar C, Echarri R, Barrios V. Emerging drug combination to optimize renovascular protection and blood pressure goals. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2012; 5:69-80.
- European Society of Cardiology. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2019; 72(2):160; 3030-5.
- Ferazza JM, Ota CC. Fadiga adrenal corpo e mente em desequilíbrio. *Cad Artigos Cient*. 2016; 2(2):1-15.
- Ferrario CM. Role angiotensin II in cardiovascular disease: therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin angiotensin Aldosterone Syst*. 2006; 7:314.
- Florea A, Crăciun C. Abnormal mitochondrial cristae were experimentally generated by high doses of *Apis mellifera* venom in the rat adrenal cortex. *Micon*. 2011; 42(5):434-42.
- Fogari R, Zoppi A. New class of agents for treatment of hypertension; focus on direct renin inhibition. *Vasc Health and Risk Manag*. 2010; 6:869-82.
- Fu S, Wen X, Han F, Long Y, Xu G. Aliskiren therapy in hypertension and cardiovascular disease: a systematic review and a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8(51):89364-74.
- Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia*. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2017.
- Geavlete O, Calin C, Croitoru M, Lupescu I, Gingham C. Fibromuscular dysplasia – a rare cause of renovascular hypertension. Case study and overview of the literature data. *J Med Life*. 2012; 5(3):316-20.
- Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*. 2014; 112:24-49.

- Gheorghiadu M, Böhm M, Greene SJ, Fonarow GC, Lewis EF, Zannad F, et al. Effect of aliskiren on postdischarge mortality and heart failure readmissions among patients hospitalized for heart failure: the ASTRONAUT randomized trial. *J Am Med Assoc.* 2013; 309(11):1125-35.
- Giestas A, Palma I, Ramos M. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona e sua modulação farmacológica. *Acta Med Port.* 2010; 23(4): 677-88.
- 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. 28;59(3):347-79.
- Gomez-Sanchez CE, Qi X, Velarde-Miranda C, Plonczynski MW, Parker CR, Rainey W, et al. Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2. *Mol Cell Endocrinol.* 2014; 383:111-7.
- Gonçalves RL, Machado AC, Paiva-Silva GO, Sorgine MHF, Momoli MM, Oliveira JHM. Blood-feeding induces reversible functional changes in flight muscle mitochondria of *Aedes aegypti* mosquito. *Plos One.* 2009; 4(11):7854.
- Gouveia MMA, Feitosa CLD, Magalhães AD. Genesis and risk factors for hypertension. *Rev Bras Hipertens.* 2018; 25(1):13-7.
- Gupta G, Dahiya R, Yogendra Singh Y, Mishra A, Verma A, Gothwal SK, et al. Monotherapy of RAAS blockers and mobilization of aldosterone: a mechanistic perspective study in kidney disease. *Chem Biol Interact.* 2020; 4:317.
- Gupta S, Chattopadhyaya I, Agrawal BK, Sehajpal PK, Goel RK. Correlation of renin angiotensin system (RAS) candidate gene polymorphisms with response to Ramipril in patients with essential hypertension. *J Postgrad Med.* 2015; 61(1):21-6.
- Hall JE, Granger JP, do Carmo JM, Silva AA, Dubinina J, George E, et al. Hypertension: physiology and pathophysiology. *Compr Physiol.* 2012; 2(4):2393-442.
- Hassumi B, Nakayama T, Mizutani Y, Izumi Y, Asai S, Soma M, et al. Haplotype analysis of the human renin gene and essential hypertension. *Hypertension.* 2003; 41(2):308-12.
- He K, Sun H, Zhang J, Zheng R, Gu J, Lou M, et al. Rab7 mediated autophagy regulates phenotypic transformation and behavior of smooth muscle cells via the Ras/Raf/MERK/ERK signaling pathway in human aortic dissection. *Mol Med Rep.* 2019; 19:3105-13.
- Hu S, Xie H, Lou R, Feng P, Liu Q, Han M, et al. Inhibition of IL-1 $\beta$  by aliskiren improved renal AQP2 expression and urinary concentration and release. *Front Physiol.* 2019; 10:1157.
- Huang MLH, Chian S, Kalinowski DS, Bae DH. The role of the antioxidant response in mitochondrial dysfunction in degenerative diseases: cross-talk between antioxidant defense, autophagy, and apoptosis. *Oxidative Med Cell Longev.* 2019. doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01157>.

- Hyttinen JMT, Niittykoski M, Salminen A, Kaarniranta K. Maturation of autophagosomes and endosome: a key role for Rab 7. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833:503-10.
- Ibarrola J, Sadaba R, Martizez ME, Garcia-Pena A, Arrieta V, Alvarez V, et al. Aldosterone impairs mitochondrial function in human cardiac fibroblast via A-kinase anchor protein 12. *Sci rep (Nat Publ Group)*. 2018; 8:6801.
- Ishak J, Rael M, Punzi H, Gradman A, Anderson LM, Pharm MP, et al. Additivity of nebivolol/valsartan single-pill combinations versus other single-pill combinations for hypertension. *J Clin Hypertens*. 2017; 20:143-9.
- Jadhav M, Yeola C, Zope G, Nabar A. Aliskiren, the first direct renin inhibitor for treatment of hypertension: the path of its development. *J Postgrad Med*. 2012; 58(1):32-8.
- Jiang XY, Lu DB, Jiang YZ, Zhou LN, Cheng LQ, Chen B. PGC-1alpha prevents apoptosis in adipose-derived stem cells by reducing reactive oxygen species production in a diabetic microenvironment. *Diabetes Res Clin Pract*. 2013; 100(3):368-75.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
- Kawai T, Forrester SJ, O'Brien S, Baggett A, Rizzo V, Eguchi S. AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharmacol Res*. 2017; 11:4-13.
- Kaya MG, Ozkan M, Gunebakmaz O. Protective effects of nebivolol against anthracycline-induced cardiomyopathy: A randomized control study. *Int J Cardiol*. 2013; 167(5):2306-10.
- Khalil MS. Vitamin D3 May Ameliorate the ketoconazole induced adrenal injury: histological and immunohistochemical studies on albino rats. *Acta Histochem Cytochem*. 2015; 48(4):103-13.
- Koletsy S, Pavlicko KM, Rivera-Velez JM. Renin-angiotensin activity in hypertensive rats with a single ischemic kidney. *Lab Invest*. 1971; 24:41-4.
- Lambeth JD, Seybert DW, Lancaster JR Jr, Saleno JC, Kamin H. Steroidogenic electron transport in adrenal cortex mitochondria. *Mol Cell Biochem*. 1982; 45:13-31.
- Langemeyer L, Frohlich F, Ungermann. Rab GTPase function in endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol*. 2018; 28 (11):957-70.
- Laragh JH. Renin system blockade as a therapy strategy past present and future. *Am J Hypertens*. 1995; 4:273S-4S.
- Leenen FH, Jong W. A solid silver clip for induction of predictable levels of renal hypertension in rat. *J Appl Physiol*. 1971; 31:142-4.
- Lerario AM, Finco I, La Pensee C, Hammer GD. Molecular Mechanisms of Stem/Progenitor Cell Maintenance in the Adrenal Cortex. *Front Endocrinol*. 2017; 8:52.
- Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med*. 2005; 146(3):160-73.

Lima EBS, Oliveira LCS, Cardoso GS, Telles PVN, Lima LC, Sousa JFR, et al. Moderate-intensity exercise and renin angiotensin system blockade improve the renovascular hypertension 2K1C induce gastric dysmotility in rats. *Life Sci.* 2018; 210:55-64.

Liu W, Ru L, Su C, Qi S, Qi X. Serum level of inflammatory cytokines and expression of Bcl-2 and Bax mRNA in peripheral blood mononuclear cell and in patients with chronic heart failure. *Med Sci Monit.* 2019; 25:2633-9.

Long-Biao C, Bo-Wei L, Chen L, Zheng D, Peng C, Chun-Rong Z, et al. Morphological Identification of TRPC7 in Cardiomyocytes From Normal and Renovascular Hypertensive Rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2016; 67(2):121-8.

Loriaux DL, Fleseriu M. Relative adrenal insufficiency. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009 Oct; 16(5):392-400.

Mansour MH, Al-Qattan K, Thonpson M, Ali M. Garlic (*Allium sativum*) down-regulates the expression of angiotensin II AT1 receptor in adrenal and renal tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Inflamammopharmacol.* 2013; 21(2):147-59.

Marchionne M, Maggie K, Prasonnarong N, Henriksen J. Chronic renin inhibition with aliskiren improves glucose tolerance, insulin sensitivity, and skeletal muscle glucose transport activity in obese Zucker rats. *Am J of Physiology.* 2012. 302(1):137-42.

Marin TA, Bertassoli BM, Carvalho AAS, Feder D. The use of aliskiren as an antifibrotic drug in experimental models: a systematic review. *Drug Dev Res.* 2019. doi: <https://doi.org/10.1002/ddr.21610>.

Martelli A. Renin Angiotensin Aldosterone System and Cardiovascular Homeostasis. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde.* 2010; 12(4):51-5.

Martin-Oliveira A, Castro MM, Oliveira DM, Rizzi E, Ceron CS, Guimarães D, et al. Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling. *Int J Cardiol.* 2013; 167(4):1199-205.

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; 15(821):97-104.

McKinney CA, Fattah C, Loughrey CM, Milligan G, Nicklin SA. Angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9): function in cardiac and vascular remodeling. *Clin Sci (Lond).* 2014; 126(12):815-27.

Mehta P K, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(1):C82-97.

Melo MR, Gasparini S, Silva FE, Karlen-Amarante M, Speretta GF, Lauar MR, et al. Renovascular hypertension elevates pulmonary ventilation in rats by carotid body-dependent Mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2020; 318(4):R730-42.

- Midzak A, Papadopoulos V. Adrenal mitochondria na steroidogenesis: from individual protein to functional protein assemblies. *Front Endocrinol.* 2016; 7(106):1-14.
- Mitani F. Functional zonation of the rat adrenal cortex: the development and maintenance. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2014; 90(5):163-83.
- Mitani F, Mukai K, Miyamoto H, Suematsu M, Ishimura Y. The undifferentiated cell zone is a stem in adult rat adrenal cortex. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1619(3):317-24.
- Mitani F, Suzuki H, Hata J, Ogishima T, Shimada H, Ishimura Y. Novel cell layer without corticosteroid synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role. *Endocrinology.* 1994; 135:431-8.
- Mourad JJ, Le Jeune S. Evaluation of high dose of perindopril/ indapamide fixed combination in reducing blood pressure and improving end-organ protection in hypertension patients. *Curr Med Res Opin.* 2009; 25(9):2271-80.
- Müller D, Luft F. Direct renin inhibitor with Aliskiren in hypertension and target organ damage. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006; 1(2):221-8.
- Nakamura Y, Maekawa T, Felizola SJ, Satoh F, Qi X, Velarde-Miranda C, et al. Adrenal CYP11B1/2 expression in primary aldosteronism: immunohistochemical analysis using novel monoclonal antibodies. *Mol Cell Endocrinol.* 2014; 5:392(1-2):73-9.
- Nakamura Y, Yamazaki Y, Konosu-Fukayaa S, Isea K, Satohb F, Sasanoa H. Aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex and associated disorders. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015; 57(62):57-62.
- Nalogowska-Glosnicka K, Lacka BI, Zychma MJ, Grzeszczak W, Zukowska-Szzechowska E, Poreba R, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism is associated with the increased risk of pregnancy-induced hypertension. *Med Sci Monit.* 2000; 6(3):523-9.
- Navar LG, Zou L, Thun AV, Wang CT, Imig JD, Mitchell KD. Unraveling the Mystery of Goldblatt hypertension. *Amer Physiol Soc.* 1998; 13(4):170-6.
- Nishimoto K, Kogaf M, Sekig T, Okih K, Gomez-Sanchezi EP, Gomez-Sanchezj CE, et al. Immunohistochemistry of aldosterone synthase leads the way to the pathogenesis of primary aldosteronism. *Mol Cell Endocrinol.* 2018; 441:124-33.
- Noguchi M, Hirata N, Edamura T, Ishigaki S, Suizu F. Intersection of apoptosis and autophagy cell death pathways. *Austin J Mol Cell Biol.* 2015; 2(1):1004.
- Noguchi M, Hirata N, Tanaka T, Suizu F, Nakajima H, Chiorini JA. Autophagy as a modulator of cell death machinery. *Cell Death and Disease.* 2020; 11:517.
- Oigman W, Neves M. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. *Rev Bras Hipertens.* 2000; 7(3):261-7.

Omboni S, Malacco E, Mallion JM, Volpe M. Olmesartan vs ramipril in the treatment of hypertension and associated clinical conditions in the elderly: a reanalysis of two large double-blind, randomized studies at the light of the most recent blood pressure targets recommended by guidelines. *Clin Interv Aging*. 2015; 10:1575-86.

Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cífková R, Dominiczak AF, et al. Hypertension. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Mar; 4:18014.

Otis M, Cambell S, Payet MD, Gallo-Payet N. Expression of extracellular matrix proteins and integrins in rat adrenal gland: importance for ACTH-associated functions. *J Endocrinol*. 2007; 193(3):102-16.

Panahpour H, Terpolilli NA, Schaffert D, Culmsee C, Plesnila N. Central application of aliskiren a renin inhibitor, improves outcome after experimental stroke independent of its blood pressure lowering effect. *Front Neurol*. 2019; 10:942.

Pantzaris ND, Karanikolas E, Tsiotsios K, Velissaris D. Renin inhibition with aliskiren: a decade of clinical experience. *J Clin Med*. 2017; 6(6):61.

Pechanova O, Barta A, Koneracka M, Zavisova V, Kubovcikova M, Klimentova J, et al. Protective effects of nanoparticle-loaded aliskiren on cardiovascular system in spontaneously hypertensive rats. *Molecules*. 2019; 24(15):2710.

Petrovic-Kosanovi D, Ajdzanovic V, Ckic-Milosevic M. The Effects of Acute Heat Stress on Proliferative and Apoptotic Processes in the Rat Adrenal Cortex. *Arch Biol Sci*. 2013; 65(3): 905-9.

Picon RV, Fuchs FD, Moreira LB, Riegel G, Fuchs SC. Trends in prevalence of hypertension in Brazil: a systematic review with meta-analysis. *PLoS One*. 2012; 7(10):132-9.

Piecha G, Wiecek A, Januszewicz A. Epidemiology and optimal management in patients with renal stenosis. *J Nephrol*. 2012; 25(6):872-8.

Pignatti E, Leng S, Carlone DL, Breult DT. Regulation of zonation and homeostasis in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol*. 2017; 441:146-55.

Pitt B, Lonn EM, Yusuf S, Jha P, Montague T, Teo KK, et al. Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation*. 1994; 90:2056-69.

Polónia J, Ramalhinho V, Martins L, Saavedra J. Normas sobre Detecção, Avaliação e Tratamento da Hipertensão Arterial da Sociedade Portuguesa de Hipertensão. *Rev Port Cardiol*. 2006; 25(6):649-60.

Premer C, Lamondin C, Mitzey A, Speth RC, Brownfield M. Immunohistochemical localization of AT1a, AT1b and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat adrenal, pituitary and brain with a perspective commentary. *Int J hypertens*. 2013; 2013:175428.

Pullalarevu R, Akbar G, Teehan G. Secondary hypertension, issues in diagnosis and tratamento. *Prim Care*. 2014; 41(4):749-64.

Ramírez-Sánchez M, Prieto I, Wangensteen R, Banegas I, Segarra AB, Villarejo AB, et al. The renin-angiotensina system: new insight into old therapies. *Curr Med Chem*. 2013; 20(10): 1313-22.

Reddish JM, Guengerich FP. Human Cytochrome P450 11B2 Produces aldosterona by a processive mechanism due to lactol formo f the intermediate 18-hydroxycorticosterone. *J Biol Chem*. 2019; 294(35):12975-91.

Reis-Barbosa P, De Carvalho JJ, Del Sol M, Mandarim-de-Lacerda CA. Commentary on mitochondrial Stereology in transmission electron microscopy. *Int J Morphol*. 2020; 38(1):26-9.

Reit LT, Heuvel MV, Peutz-kootstra CJ, van Esch JHM, van Veghel R, Garrelds IM, et al. Deterioration of kidney function by the (pro)renin receptor blocker handle region peptide in aliskiren-treated diabetic transgenic (mRen2)<sup>27</sup> rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014; 306(10):1179-89.

Riccioni G, Vitulano N, D'Orazio N, Bellocchi F. Aliskiren, the first approved renin inhibitor: Clinical application and safety in the treatment of hypertension. *Adv Ther*. 2009 Jul; 26(7): 700-10.

Rone BM, Midzak AS, Matinez-Arguelles DB, Fan J, Ye X, Blonder J, et al. Steroidogenesis in MA-10 mouse leyding cells is altered via fatty acid impor tinto the mitochondria. *Biol Reprod*. 2014; 91(4):96.

Rosol TJ, Yarrington JT, Latendresse J, Capen CC. Adrenal gand: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicol Patol*. 2001; 29(1):4-48.

Saavedra JM, Armando L. Angiotensin II AT2 Receptors Contribute to Regulate the Sympathoadrenal and Hormonal Reaction to Stress Stimuli. *Cell Mol Neurobiol*. 2018; 38(1):85–108.

Sahin E, Colla S, Liesa M, Moslehi J, Muller FL, Guo M, et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*. 2011; 470:359-65.

Samadian F, Dalili N, Jamalian A. New Insights Into Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment of Renovascular Hypertension. *Iran J Kidney Dis*. 2017; 11(2):79-89.

Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, Bou Kheir T, Jagust P, Schoenhals M, et al. MYC/PGC-1alpha balance determines the metabolic phenotype and plasticity of pancreatic cancer stem cells. *Cell Metab*. 2015; 22:590-605.

Sanoski CA. Aliskiren: an oral direct renin inhibitor for the treatment of hypertension. *Pharmacotherapy*. 2009; 29(2):193-212.

Santos AB, Gupta DK, Bello NA, Gori M, Claggett B, Fuchs FD, et al. Prehypertension is associated with abnormalities of cardiac structure and function in the atherosclerosis risk in communities' study. *Am J Hypertens*. 2016; 29(5):568-74.

- Sawhney JP. First orally active DRI Aliskiren - a new prospect in management of hypertension and beyond. *Indian Heart J.* 2010; 62(1):49-56.
- Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondria biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim biophys Acta.* 2011; 1813:1269-78.
- Scortegagna M, Berthon A, Settas N, Giannakou A, Garcia G, Li J, et al. The E3 ubiquitin ligase Siah1 regulates adrenal gland organization and aldosterone secretion. *JCI Insight.* 2017; 2(23):97128.
- Segawa Y, Hashimoto H, Maruyama S, Shintania M, Ohno H, Nakaia Y, et al. Dietary capsaicin-mediated attenuation of hypertension in a rat model of renovascular hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 2020; 42(4):352-9.
- Seremwe M, Schnellmann R G, Bollag W B. Calpain-10 Activity Underlies Angiotensin II-Induced Aldosterone Production in an Adrenal Glomerulosa Cell Model. *Endocrinology.* 2015; 156(6):2138–49.
- Shafiq MM, Menon DV, Victor RG. Oral Direct Renin Inhibition: premise, promise, and potential limitations of a new class of antihypertensive drug. *Am J Med.* 2008; 121(4):265-71.
- Shimoura CG, Lincevicius GS, Nishi EE, Girardi ACC, Simon KA, Bergamaschi CT, et al. Increased Dietary Salt Changes Baroreceptor Sensitivity and Intrarenal Renin–Angiotensin System in Goldblatt Hypertension. *Am J Hypertens.* 2017; 30(1):28-36.
- Shinzawa K, Ishibashi S, Murakoshi M, Watanabe K, Kominami S, Kawahara A, et al. Relationship between zonal distribution of microsomal cytochrome P450 and steroidogenic activities in guinea pig adrenal cortex. *J Endocrinol.* 1988; 19:191-200.
- Shiota M, Yokomizo A, Tada Y, Inokuchi J, Tatsugami K, Kuroiwa K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha interacts with the androgen receptor (AR) and promotes prostate cancer cell growth by activating the AR. *Mol Endocrinol.* 2010; 24(1):114-27.
- Silva-Junior G, Torres TS, Mendonca LS, Mandarin-de-Lacerda CA. Rosiglitazone (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) counters hypertension and adverse cardiac and vascular remodeling in 2K1C hypertensive rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2011; 63(1-2):1-7.
- Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, Neher R, Von Euw J, Schindler O, et al. Constitution of aldosterone, a new mineralocorticoid. *Experientia.* 1954; 10(3):132-3.
- Siragy HM. A current evaluation of the safety of angiotensin receptor blockers and pharmacologic inhibitor. *Vasc Health Risk Manag.* 2011; 7:297-313.
- Sociedade Brasileira de Cardiologia. VII Diretrizes de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol.* 2016; 107(3 supl.3):1-83.

Steenblock C, Celis MFR, Androutsellis-Theotokis A, Sue M, Silva LFD, Eisenhofer G, et al. Adrenal cortical and chromaffin stem cells: Is there a common progeny related to stress adaptation. *Mol Cell Endocrinol*. 2017; 441:156-63.

Stroupe C. This is the end: regulation of Rab 7 nucleotide binding in endolysosomal trafficking and autophagy. *Front Cell Dev Biol*. 2018; 6:129.

Takahashi K, Mashima H, Miura K, Maeda D, Goto A, Goto T, et al. Disruption of small GTPase Rab7 Exacerbates the severity of acute pancreatitis in experimental mouse model. *Sci Rep*. 2017; 7:2817.

Taneja SK, Mandal R. Antihypertensive Effect of Cu and Mg Enriched Modified Poultry Egg C on Zn-Induced Hypertension in Wistar Rats. *J Trace Elem Med Biol*. 2010; 24(3):185-92.

Taylor A, Pool J. Clinical role of direct renin inhibition in hypertension. *Am J Ther*. 2013; 19(3):204-10.

Taylor MJ, Ullenbruch MR, Frucci EC, Rege J, Ansorge MS, Gomez-Sanchez CE, et al. Chemogenetic activation of adrenocortical Gq signaling causes hyperaldosteronism and disrupts functional zonation. *J Clin Invest*. 2020; 130(1):83-93.

Tian D, Ling S, Chen G, Li Y, Liu J, Ferid M, et al. Hypertensive nephropathy treatment by heart-protecting musk pill: a study of anti-inflammatory therapy for target organ damage of hypertension. *Int J Gen Med*. 2011; 4:131-9.

Vaidyanathan S, Jarugula V, Dieterich HA, Howard D, Dole WP. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of aliskiren. *Clin Pharmacokinet*. 2008; 47(8):515–31.

van Esch JH, Noltzer E, van Veghel R, Garrelds IM, Leijten F, Bouhuizen AM, et al. *J hypertens*. 2010; 28:2145-55.

van Rhijn-Brouwer FCC, Gremmels H, Fledderus JO, Verhaar MC. Mesenchymal stromal cell characteristics and regenerative potential in cardiovascular disease: implications for cellular therapy. *Cell Transplant*. 2018; 27(5):765-85.

Vellinga TT, Borovski T, de Boer VC, Fatrai S, van Schelven S, Trumpi K, et al. SIRT1/PGC1 $\alpha$ -dependent increase in oxidative phosphorylation supports chemotherapy resistance of colon cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21(12):2870-9.

Von Lueder TG, Krum H. New medical therapies for heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2015; 12:730-40.

Walczak ME, Kuick R, Finco I, Bohin N, Hrycaj SM, Wellik DM, et al. Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Mol Endocrinol*. 2014; 28(9):1471-86.

Wang LI, Mao N, Tan R, Wang HL, Wen JI, Liu YH, et al. Ginsenoside Rg1 Reduces Aldosterone-Induced Autophagy via the AMPK / MTOR Pathway in NRK-52E Cells. *Int J Mol Med*. 2015; 36(17):518-26.

Weintraub S, Tran H, Schwartzbard A. Potential benefits of aliskiren beyond pressure reduction. *Cardiol Rev.* 2011; 19(20):90-4.

Weir, M. Effects of renin-angiotensin system inhibition on end-organ protection: can we do better? *Clin Therapeut.* 2007; 29(9):1803-24.

Weiss, L. *Cell and tissue Biology: a textbook of histology.* 6<sup>a</sup> ed. Baltimore: Urban & Schwarzenberg; 1988.

Werner C, Pöss J, Böhm M. Optimal antagonism of the Renin-Angiotensin-aldosterone system: do we need dual or triple therapy? *Drugs.* 2010; 70(10):1215-30.

Williams JS, Williams GH. 50<sup>th</sup> anniversary of aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003. 88(6):2364-72.

Wolkersdorfer GW, Bornstein S. Tissue Remodelling in the Adrenal Gland. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56(98):163-71.

Wong PC, Price Jr WA, Chiu AT, Carini DJ, Duncia JV, Johnson AL, et al. Nonpeptide Angiotensin II Receptor Antagonists Studies With EXP9270 and DuP 753. *Hypertension.* 1990; 15(6):823-34.

Xiao Q, Che X, Cai B, Tao Z, Zhang H. Macrophage autophagy regulates mitochondria-mediated apoptosis and inhibits necrotic core formation in vulnerable plaques. *J Cell Mol Med.* 2020; 24(1):260–75.

Yao J, Mchedlishvili D, McIntire WE, Guagliardo NA, Erisir A, Coburn CA, et al. Function task-3-like channels in mitochondria of aldosterone producing zona glomerulosa cells. *Hypertension.* 2018; 70(2):347-56.

Yoon JC, Xu G, Deeney JT, Yang SN, Rhee J, Puigserver P, et al. Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. *Dev Cell.* 2003; 5(1):73–83.

Yu J, Xu S, Wang WX, Deng WH, Jin H, Chen XY, et al. Changes of Inflammation and Apoptosis in Adrenal Gland After Experimental Injury in Rats with Acute Necrotizing Pancreatitis. *Inflammation.* 2012; 35(1):11-22.

Yuan Y, Zhang A, Qi J, Wang H, Liu X, Zhao M, et al. p53/Drp1-dependent mitochondrial fission mediates aldosterone-induced podocytes injury and mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2018; 314:798-808.

Yusuf S, Pepine CJ, Garces C, Pouleur H, Salem D, Kostis J, et al. effect of enalapril on myocardial infarction and unstable angina in patients with low ejection fractions. *Lancet.* 1992; 340(8829):1173-8.

Zhao M, Yuan Y, Bai M, Ding G, Jia Z, Huang S, et al. PGC1a overexpression protects against aldosterone-induced podocyte depletion: role of mitochondria. *Oncotarget.* 2016; 7(11):12150-61.

## ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO  
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

**ibrag** Instituto  
de Biologia  
Roberto  
Alcantara  
Gomes

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Alterações morfofuncionais, bioquímicas e moleculares em ratos wistar submetidos a hipertensão renovascular e ao tratamento com inibidores do sistema renina-angiotensina e da enzima HMG-COA redutase (3-hidroxi-3-methyl-glutaril-coa-redutase)", registrada com o nº 019/2017, 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 28/03/2017.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	28/03/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	100
Peso/Idade	150-180 g / 45 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 28 de Março de 2017.

Prof. Dr. Alex C. Manhães  
Coordenador  
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa  
Vice-Coordenadora  
CEUA/IBRAG/UERJ

<http://www.biologiauerj.com.br/comite-de-etica>  
[ceua.ibrag@yahoo.com.br](mailto:ceua.ibrag@yahoo.com.br)

## ANEXO B – Submissão do Artigo

### 7684849: Acknowledging Receipt

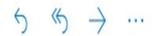


International Journal of Hypertension <patrick.caguia@hindawi.com>

Seg, 15/06/2020 19:59

Para: Você

Cc: patrick.caguia@hindawi.com; alosa22@hotmail.com; priscila.gp@hotmail.com; kissilarabelo91@gmail.com; cherley@biof.ufr.br; alanmoraes80@gmail.com **+4 pessoas**



Dear Dr. Matos,

The Research Article titled "Aliskiren reduces the adrenal zona glomerulosa apoptosis and autophagy in Wistar rats with 2K1C hypertension," by Veronica Matos, Ana Lúcia Nascimento, Priscila Pereira, Kíssila Rabelo, Cherley Andrade, Alan de Moraes, Camila Salata, Victor Hugo Vieira de Oliveira Araújo, Jemima Silva and Jorge José de Carvalho has been received and assigned the number 7684849.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript.

Thank you for submitting your work to International Journal of Hypertension.

Best regards,

--

\*\*\*\*\*

Patrick Caguia

Editorial Office

Hindawi

[https://nam05.safelinks.protection.outlook.com/?](https://nam05.safelinks.protection.outlook.com/?url=http%3A%2F%2Fwww.hindawi.com%2F&data=02%7C01%7C%7C0739a2594255442f06d508d81177710f%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637278551973042446&data=VMbQG6NL8StIkMvodZ6U9rrPjBrrQXcgD0cFLcD%2BVE%3D&reserved=0)

[url=http%3A%2F%2Fwww.hindawi.com%2F&data=02%7C01%7C%7C0739a2594255442f06d508d81177710f%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637278551973042446&data=VMbQG6NL8StIkMvodZ6U9rrPjBrrQXcgD0cFLcD%2BVE%3D&reserved=0](http%3A%2F%2Fwww.hindawi.com%2F&data=02%7C01%7C%7C0739a2594255442f06d508d81177710f%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637278551973042446&data=VMbQG6NL8StIkMvodZ6U9rrPjBrrQXcgD0cFLcD%2BVE%3D&reserved=0)

\*\*\*\*\*