



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

Victor Hugo Vieira de Oliveira Araujo

Avaliação dos efeitos do citrato de sildenafila na morfologia e no estresse oxidativo do córtex da glândula adrenal em animais espontaneamente hipertensos

Rio de Janeiro
2019

Victor Hugo Vieira de Oliveira Araujo

Avaliação dos efeitos do citrato de sildenafila na morfologia e no estresse oxidativo do córtex da glândula adrenal em animais espontaneamente hipertensos

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

Orientador: Prof.º Dr. Jorge José de Carvalho

Rio de Janeiro

2019

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

A663 Araújo, Victor Hugo Vieira de Oliveira.

Avaliação dos efeitos do citrato de sildenafila na morfologia e no estresse oxidativo do córtex da glândula adrenal em animais espontaneamente hipertensos / Victor Hugo Vieira de Oliveira Araújo. – 2019.

67 f.

Orientador: Prof.º Dr. Jorge José de Carvalho

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

1. Hipertensão – Teses. 2. Glândulas Suprarrenais – Teses. 3. Estresse oxidativo – Teses. 4. Citrato de sildenafila. 5. Rato como animal de laboratório - Teses. I. Carvalho, Jorge José de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.13

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira – CRB7/5302

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

Assinatura

Data

Victor Hugo Vieira de Oliveira Araujo

Avaliação dos efeitos do citrato de sildenafil na morfologia e no estresse oxidativo do córtex da glândula adrenal em animais espontaneamente hipertensos

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

Apresentada em 28 de fevereiro de 2019.

Banca Examinadora:

Prof.º Dr. Jorge José de Carvalho (Orientador)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof.ª Dra. Cristiane Matsuura
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof.ª Dra. Suzana Côrte-Real Faria
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Todo o mérito seja de Deus,
que foi o grande mentor, meu combustível e permitiu cada evento.
Dedico também a minha família, pois eles são minha motivação dada por Deus.

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço ao meu Criador, Professor, ombro amigo que me enche de vida e me ergue a cada tropeço. Deus tem preenchido minha vida com pessoas maravilhosas e importantes que fazem a diferença em minha vida.

Agradeço pela vida e dedicação de meus pais, meus avós, tias e irmãs. Obrigado senhor pela vida, pela transformação e a força que meu filho e minha esposa me proporcionaram para que eu pudesse enfrentar os desafios dessa caminhada.

Agradecendo ao apoio dado a todos do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e em especial ao meu orientador o professor doutor Jorge José de Carvalho, professora Jemima Fuentes, professora Cristiane Matsuura, Sheila Nunes Graciano Araujo, André Pessoa, Ana Lucia, Kíssila Rabelo, Bianca Torres e Priscila Gomes. Agradeço também a Plataforma de Microscopia Eletrônica –Instituto de Biologia/UFF onde as eletromicrografias foram feitas.

Tenho muito a agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) que deram suporte a este trabalho com auxílio financeiro. Não poderia deixar de citar o esforço e a dedicação de todos que compõe a Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Porque quero que saibais quão grande combate tenho por vós, e pelos que estão em Laodicéia, e por quantos não viram o meu rosto em carne; Para que os seus corações sejam consolados, e estejam unidos em amor, e enriquecidos da plenitude da inteligência, para conhecimento do mistério de Deus e Pai, e de Cristo, Em quem estão escondidos todos os tesouros da sabedoria e da ciência.

Colossenses 2:1-3

RESUMO

ARAUJO, Victor Hugo Vieira de Oliveira. **Avaliação dos efeitos do citrato de sildenafil na morfologia e no estresse oxidativo do córtex da glândula adrenal em animais espontaneamente hipertensos**. 2019. 67 f. Dissertação (Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A hipertensão essencial é um grande problema de saúde pública no mundo. O modelo animal mais adequado para o estudo desta enfermidade é o Rato Espontaneamente Hipertenso (SHR). A hipertensão está associada ao aumento de espécies reativas de oxigênio, capazes de se combinar com componentes celulares provocando danos estruturais. O citrato de sildenafil é um inibidor da fosfodiesterase 5 que permite o prolongamento do estímulo dilatador pelo óxido nítrico, auxiliando na manutenção do tônus vascular. O objeto de estudo deste trabalho é a zona glomerulosa da glândula adrenal, pois ela é responsável pela produção dos hormônios que atuam na reabsorção do sódio. Todos os hormônios esteróides da adrenal são produzidos pela mitocôndria, que sofre diretamente com os danos causados pelo estresse oxidativo. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações morfológicas e o estresse oxidativo em animais hipertensos, comparados aos animais hipertensos tratados com citrato de sildenafil. Durante os 30 dias de experimento foram utilizados 32 ratos com vinte semanas de idade, 16 SHR e 16 Wistar kyoto que receberam gavagem orogastrica diariamente e foram submetidos a pletismografia da artéria caudal semanalmente. Inicialmente, avaliamos uma diminuição da espessura da zona glomerulosa no grupo SHR, que foi revertido através da proliferação celular no grupo tratado. A expressão da Superóxido dismutase (SOD) estava elevada durante a hipertensão e o tratamento reduziu sua expressão. Já a enzima catalase não apresentou altos níveis de expressão no grupo SHR, o que pode ter acontecido pela exaustão da proteína. A detecção de citocromo C, assim como da proteína pró-apoptótica Bax foram maiores no grupo hipertenso, indicando o processo apoptótico das células da zona glomerulosa neste grupo. O tratamento com citrato de sildenafil teve um efeito protetivo, reduzindo a expressão destas proteínas. Na análise da biogênese mitocondrial, foi observado que o citrato de sildenafil estimulou a síntese de PGC1 α nos animais tratados. Na avaliação ultraestrutural das células da zona glomerulosa, observamos mitocôndrias com poucas cristas no grupo SHR, enquanto nos tratados as cristas estavam tubulares e bem preservadas, além de terem um maior número de grânulos de secreção no citoplasma. Esses resultados indicam que o citrato de sildenafil pode atenuar os efeitos do estresse oxidativo na zona glomerulosa da adrenal na hipertensão.

Palavras-chave: Hipertensão. Hipertensão essencial. SHR. Estresse oxidativo.
Citrato de sildenafil.

ABSTRACT

ARAUJO, Victor Hugo Vieira de Oliveira. **Evaluation of the effects of sildenafil on the morphology and oxidative stress on adrenal gland cortex in spontaneously hypertensive animals.** 2019. 67 f. Dissertação (Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Essential hypertension is a major public health problem in the world. The most appropriate animal model for the study of this disease is the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR). Hypertension is associated with the increase of reactive oxygen species, capable of combining with cellular components causing structural damage. Sildenafil citrate is an inhibitor of phosphodiesterase 5 that allows dilator stimulus prolongation by nitric oxide, helping to maintain vascular tone. The object of this study is the glomerular zone of the adrenal gland, because it is responsible for producing hormones that act on sodium reabsorption. All adrenal steroid hormones are produced by mitochondria, which suffers directly with the damage caused by oxidative stress. Therefore, the objective of this study was to evaluate the morphological changes and oxidative stress in hypertensive rats compared to hypertensive rats treated with sildenafil citrate. During the 30-day experiment 32 twenty-week-old rats, 16 SHR and 16 Wistar kyoto who received orogastric gavage daily were submitted to caudal artery plethysmography weekly. Initially, we evaluated a decrease in the thickness of the glomerular zone in the SHR group, which was reversed through cell proliferation in the treated group. Expression of SOD was elevated during hypertension and the treatment reduced its expression. However, the catalase enzyme did not present high levels of expression in the SHR group, which may have occurred due to the exhaustion of the protein. The detection of cytochrome C, as well as the pro-apoptotic protein Bax were higher in hypertensive patients, indicating the apoptotic process of the glomerular zone cells of this group. Treatment with sildenafil citrate had a protective effect, reducing the expression of these proteins. In the analysis of mitochondrial biogenesis, it was observed that sildenafil citrate stimulated the synthesis of PGC1 α in treated animals. In ultrastructural evaluation of glomerular zone, cells were observed mitochondria with few cristae in SHR, while the cristae were tubular and well preserved in treated groups, besides having a greater number of secretory granules in the cytoplasm. These results indicate that sildenafil citrate may attenuate the effects of oxidative stress in the glomerular zone of adrenal on hypertension.

Keywords: Hypertension. Essential hypertension. SHR. Oxidative stress. sildenafil citrate.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 – | Percentual de homens (≥ 18 anos) que referiram diagnóstico médico de hipertensão arterial..... | 15 |
| Figura 2 – | Principais vias da angiotensina..... | 16 |
| Figura 3 – | Relação esquemática dos principais receptores do sistema renina-angiotensina-aldosterona..... | 17 |
| Figura 4 – | Arquitetura geral e circulatória da glândula suprarrenal..... | 18 |
| Figura 5 – | Características histológicas da zona celular indiferenciada | 19 |
| Figura 6 – | Trafego do colesterol intracelular mediado por receptor..... | 20 |
| Figura 7 – | Localização de CYP11B2 e CYP11B1 na glândula adrenal de rato. | 21 |
| Figura 8 – | Via da produção dos hormônios esteroides e suas respectivas enzimas..... | 21 |
| Figura 9 – | Geração de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria..... | 23 |
| Figura 10 – | Ciclo vicioso da produção de espécies reativas de oxigênio..... | 25 |
| Figura 11 – | Produção de espécies reativas de oxigênio durante a esteroidogênese..... | 26 |
| Figura 12 – | Visão geral esquemática da sinalização de GMPc nas células..... | 28 |
| Figura 13 – | Regulação da esteroidogênese..... | 29 |
| Figura 14 – | Dados da aferição pressórica durante o período de gavagem orogástrica dos animais..... | 39 |
| Figura 15 – | Avaliação da morfologia da zona glomerulosa..... | 40 |
| Figura 16 – | Imunohistoquímica para antígeno nuclear de proliferação celular..... | 41 |
| Figura 17 – | Avaliação das fibras constituintes da cápsula da glândula adrenal por tricrômio de Gomori..... | 44 |
| Figura 18 – | Avaliação da Imuno-peroxidase para superóxido dismutase..... | 45 |
| Figura 19 – | Detecção e quantificação de catalase por imunohistoquímica | 47 |

| | |
|--|----|
| Figura 20 – Avaliação da expressão de Bax (vermelho) e Bcl2 (verde) por fluorescência de dupla marcação | 49 |
| Figura 21 – Avaliação da Imuno-peroxidase para citocromo c..... | 51 |
| Figura 22 – Avaliação da expressão de PGC1 α por imunofluorescência | 53 |
| Figura 23 – Avaliação ultraestrutural das células da zona glomerulosa, por microscopia eletrônica de transmissão | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|---|
| Ang I | Angiotensina I |
| Ang II | Angiotensina II |
| Ang 1-7 | Angiotensina 1-7 |
| Aldo | Aldosterona |
| ANOVA | Análise de Variância |
| ANP | Peptídeo natriorréico atrial |
| AT1 | Receptor Ang II tipo 1 |
| BSA | Soro albumina bovina |
| CAT | Catalase |
| CORT | Corticosterona |
| DAB | Diaminobenzidina |
| DDSA | Anidrido dodecenil succínico |
| DMP | 2,4 Tridimetilaminametilfenol |
| ECA | Enzima conversora de angiotensina |
| eNOS | Enzima NO-sintase endotelial |
| ETC | Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial |
| ER | Retículo endoplasmático |
| GC | Guanilil ciclase |
| GPx | Glutaciona peroxidase |
| GTP | Guanosina trifosfato |
| HCl | Ácido clorídrico |
| HAS | Hipertensão arterial sistêmica |
| HR | Hipertensão renovascular |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| IECA | Inibidores da enzima conversora de angiotensina |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IMM | Membrana mitocondrial interna |
| iNOS | Enzima NO-sintase induzida |

| | |
|----------------|--|
| MBG | Membrana basal glomerular |
| MMP | Metaloproteinase de matriz |
| MNA | Anidrido metil náxico |
| MR | Receptor mineralocorticoide |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| nNOS | Enzima NO-sintase neuronal |
| OMM | Membrana mitocondrial externa |
| ON | Óxido nítrico |
| PA | Pressão arterial |
| PAM | Pressão arterial média |
| PAS | Pressão arterial sistólica |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| PGC-1 α | Co-ativador de receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama |
| PKA | AMP-Dependente Kinase |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| SDS | Dodecil-sulfato de sódio |
| SHRs | Ratos espontâneamente hipertensos |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SOD | Enzima superóxido dismutase |
| SRAA | Sistema renina angiotensina aldosterona |
| StAR | Proteína reguladora aguda esteroideogênica |
| TGF- β | Fator de transformação do crescimento beta |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa |
| TSPO | Complexo proteico multicomponente associado translocador |
| RTP | Resistência periférica total |
| 2R1C | 2 Rins 1 Clipe |
| Vigitel | Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico |
| zF | Zona fasciculada |
| zG | Zona glomerulosa |
| zU | Zona celular indiferenciada |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1 | OBJETIVOS | 31 |
| 1.1 | Objetivos gerais | 31 |
| 1.2 | Objetivos Específicos | 31 |
| 2 | MATERIAIS E MÉTODOS | 32 |
| 2.1 | Animais e grupos experimentais | 32 |
| 2.2 | Análise da pressão arterial sistólica | 33 |
| 2.3 | Eutanásia | 33 |
| 2.4 | Microscopia de luz | 34 |
| 2.4.1 | <u>Processamento histológico</u> | 34 |
| 2.4.2 | <u>Hematoxilina & Eosina (HE)</u> | 34 |
| 2.4.3 | <u>Tricrômico de Gomori</u> | 35 |
| 2.4.4 | <u>Imunohistoquímica</u> | 35 |
| 2.5 | Microscopia eletrônica de transmissão | 36 |
| 2.6 | Análise Estatística | 37 |
| 3 | RESULTADOS | 38 |
| 3.1 | Avaliação da pressão arterial sistólica | 38 |
| 3.2 | Avaliação histológica | 39 |
| 3.3 | Avaliação da proliferação celular pela detecção de PCNA | 40 |
| 3.4 | Análise das fibras da cápsula da adrenal | 42 |
| 3.5 | Análise do estresse oxidativo pela detecção de SOD | 44 |

| | | |
|------|--|-----------|
| 3.6 | Análise do estresse oxidativo pela detecção de Catalase | 46 |
| 3.7 | Imunofluorescência de dupla marcação para Bax e Bcl2 | 48 |
| 3.8 | Avaliação da apoptose no tecido pela detecção de citocromo c | 50 |
| 3.9 | Análise da biogênese mitocondrial pela detecção de PGC1 α | 52 |
| 3.10 | Avaliação ultraestrutural das células da zona glomerulosa | 54 |
| 4 | DISCUSSÃO | 56 |
| | CONCLUSÃO | 61 |
| | REFERÊNCIAS | 62 |
| | ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética | 66 |
| | ANEXO B - Comprovação de submissão do 1^o artigo científico | 67 |

INTRODUÇÃO

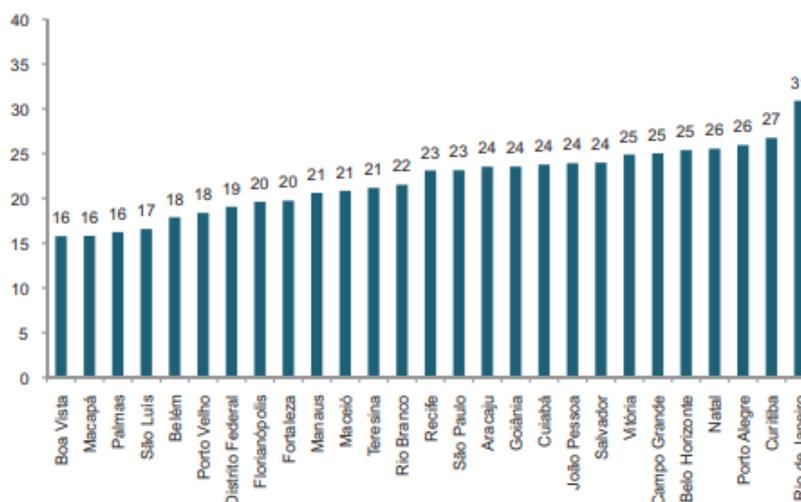
Hipertensão essencial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um importante problema de saúde pública em todo o mundo (JOINT-7). A hipertensão afeta 40% da população mundial com mais de 25 anos. (Ordunez P. et al,2015). Estudos estimam que até 2025 um terço da população mundial será hipertensa (Cavalcanti CO. *et al*, 2016). A hipertensão essencial, ou hipertensão de causa desconhecida, engloba mais de 90% dos casos de hipertensão. Ela tende a se agrupar em subtipos e representa uma coleção de doenças ou síndromes geneticamente baseadas, com várias anormalidades bioquímicas hereditárias resultantes. Os fenótipos resultantes podem ser modulados por vários fatores ambientais, alterando assim a gravidade da elevação da pressão arterial e o momento do início da hipertensão (M Beg. et al, 2010).

A última pesquisa divulgada do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), intitulada de Pesquisa Nacional de Saúde de 2013 relatou estimativas nacionais da pressão arterial PA medidas pela primeira vez. Com base nesses números, cerca de 23% da população brasileira apresentava pressão arterial (PA) 140/90 mmHg ou mais e, destes, 43% relataram ter sido previamente diagnosticados com hipertensão (Macinko J. et al, 2018).

O Programa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) publicou em 2016 que a frequência de adultos que referiram diagnóstico médico de hipertensão arterial variou entre 16,9% em Palmas e 31,7% no Rio de Janeiro. No sexo masculino, as maiores frequências foram observadas no Rio de Janeiro (30,9%), Curitiba (26,8%) e Porto Alegre (26,0%), e as menores em Boa Vista (16%), Macapá (15,8%) e Palmas (16,2%). Entre as mulheres, as maiores frequências foram observadas em Recife (32,6%), no Rio de Janeiro (32,5%) e em Salvador (30,2%), e as menores em Palmas (17,6%), Manaus (17,9%) e Macapá (19,2%) (Vigitel, 2016) (Figura 1).

Figura1: Percentual de homens (≥ 18 anos) que referiram diagnóstico médico de hipertensão arterial.



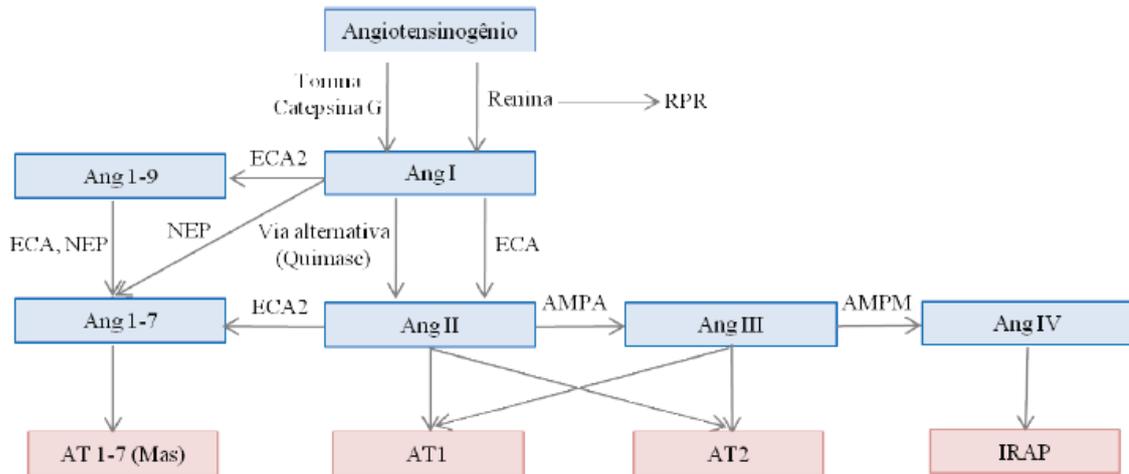
Legenda: Percentual de homens (≥ 18 anos) com diagnóstico médico de hipertensão arterial confirmado por inquérito telefônico de acordo com as capitais dos estados brasileiros e o Distrito Federal

Fonte: Vigitel, 2016.

Sistema renina-angiotensina-aldosterona

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), é o principal responsável pela homeostase pressórica e pela concentração plasmática de sódio em curto e longo prazo. Durante uma baixa perfusão sanguínea no glomérulo renal, as células justaglomerulares secretam renina na corrente sanguínea que por sua vez convertem o angiotensinogênio plasmático em angiotensina I (Ang I). A angiotensina I é um leve vasoconstritor que por ação enzimática pode ser convertida em outros tipos de angiotensina. A enzima conversora da angiotensina (ECA) é capaz de converter a Ang I em angiotensina II (Ang II), que é um potente vasoconstritor a curto prazo. A enzima conversora da angiotensina 2 é a forma da ECA 2 capaz de converter a angiotensina 1 (Ang I) em angiotensina 1-7 (Ang 1-7) que contrapõe os efeitos da Ang II. A ECA também é responsável pela degradação da Ang 1-7, em Ang 1-5 para depois ser excretada pelo rim (SANJULIANI, A. F. et al, 2011) (Figura 2).

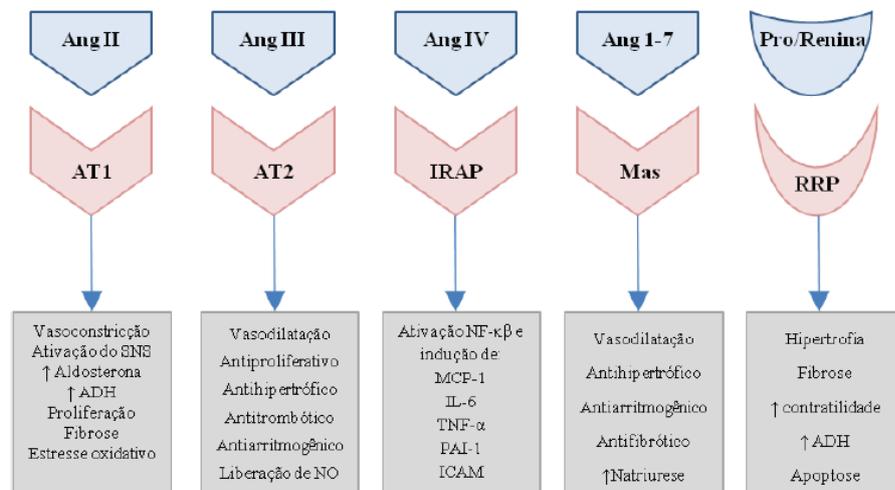
Figura 2: Principais vias da angiotensina



Legenda: Principais vias da angiotensina, seus respectivos receptores e interações.
 Fonte: SANJULIANI, A. F. et al, 2011

A Ang II atua sobre os receptores de angiotensina AT1 e AT2 enquanto a Ang1-7 atua sobre os receptores MAS. De modo geral, a ativação dos receptores AT1 desencadeia uma resposta vasoconstritora nos vasos sanguíneos, estimula a síntese de colágeno do tipo 1, assim como de metaloproteinases, a proliferação celular endotelial e de fibroblastos cardíacos, ao aumento de espécies reativas de oxigênio, a reabsorção de água e sódio pelos túbulos renais, além de elevar a síntese de aldosterona pela zona glomerulosa adrenocortical (SANJULIANI, A. F. et al, 2011). O efeito da Ang II dura de 30 minutos a uma hora, deste modo realizando a modulação aguda da homeostase da pressão arterial sistêmica. A aldosterona realiza de maneira crônica essa mesma modulação (Hattangady. et al, 2012).

Figura 3: Relação esquemática dos principais receptores do sistema renina-angiotensina-aldosterona



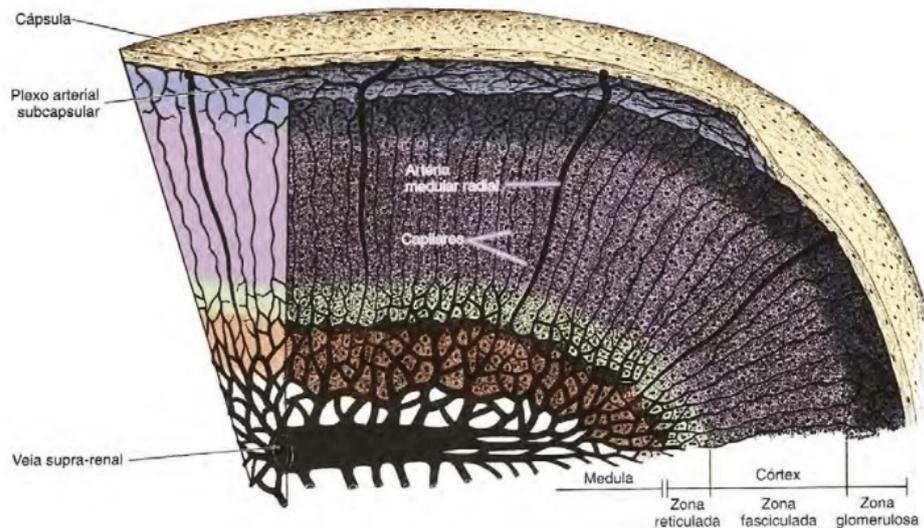
Legenda: Relação esquemática dos principais receptores do sistema renina-angiotensina-aldosterona com respectivos desdobramentos de sua ativação.

Fonte: SANJULIANI, A. F. et al, 2011.

Adrenal e Esteroidogênese

A glândula adrenal está localizada no pólo superior de cada rim sendo segmentada em córtex e medula, devido a origem embrionária das camadas (Drelon C. et al, 2015). O córtex pode ser dividido em três zonas (Figura 4). Na zona glomerulosa destaca-se a produção de mineralocorticóides, como a aldosterona. A aldosterona está diretamente ligada ao balanço de sódio no organismo e desempenha um papel fundamental na homeostase da pressão arterial. A principal enzima relacionada a produção da aldosterona é a CYP11B2, que se encontra apenas na zona glomerulosa. Na zona fasciculada ocorre a produção de glicocorticóides, como o cortisol, que interfere no metabolismo glicídico. Devido ao grande número de vacúolos as células da zona fasciculada recebem o nome de espongiócitos. A principal enzima e exclusivamente na zona fasciculada é a CYP11B1 (Mitani F, 2014). E na zona reticulada há a produção de hormônios esteróides que atuam como hormônios sexuais de características secundárias (Nikerson, 1976). Nos ratos, o principal adrenocorticóide mediador do stress é a corticosterona, já em humanos esse papel é desempenhado pelo glicocorticóide cortisol (Tsai LC. et al, 2011).

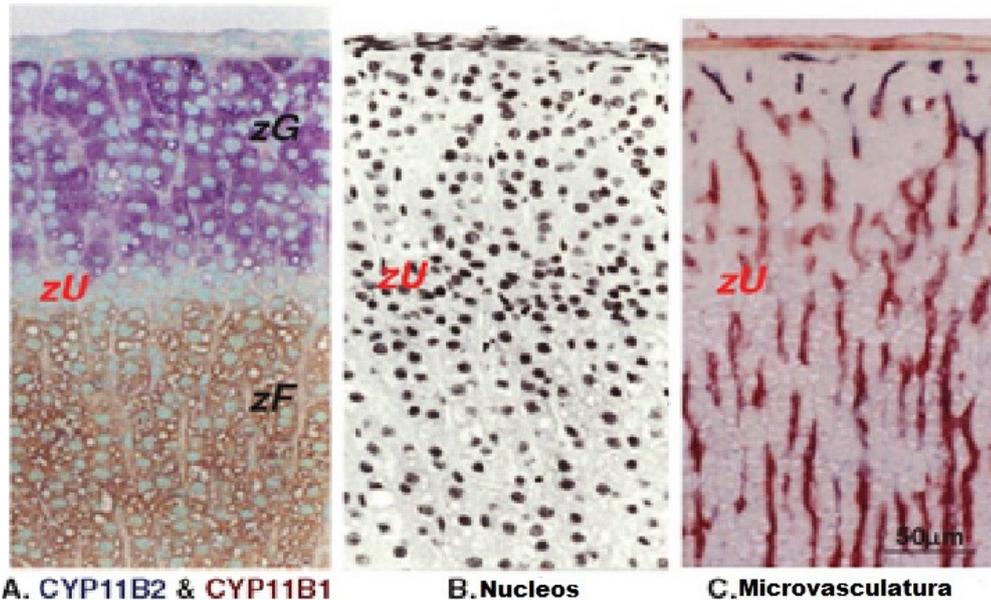
Figura 4: Arquitetura geral e circulatória da glândula suprarrenal



Legenda: ilustração da glândula suprarrenal com suas divisões e vascularização.
Fonte: Junqueira & Carneiro, Histologia básica 11ªed.

Existe uma faixa de células indiferenciadas entre a zona glomerulosa e a zona fasciculada, nomeada por alguns pesquisadores como zona Sudanfóbica, indiferenciada (ZU) ou de transição (Figura 5). Esta região recebeu esta nomenclatura devido ao destaque na coloração Sudan onde esta faixa de células indiferenciadas se apresenta pouco corada ou sem nenhuma coloração. Esta zona está caracterizada pela intensa proliferação celular. Esta zona indiferenciada está intimamente ligada com o hormônio corticotrófico, porém sua relação com a hipertensão ainda não está muito bem descrita (Mitani F, 2014).

Figura 5: Características histológicas da zona celular indiferenciada

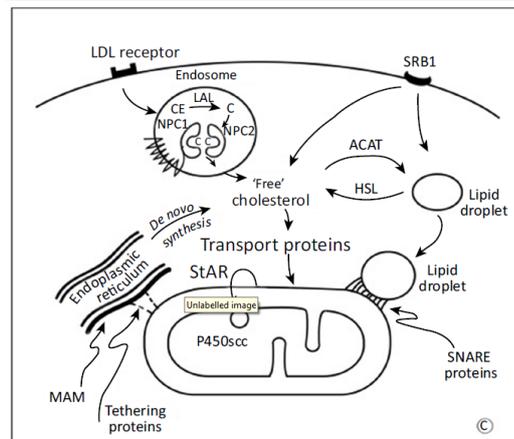


Legenda: Características histológicas da zona celular indiferenciada (zU). A: Uma secção adrenal marcada com anticorpos anti CYP11B2 (em azul) e anti CYP11B1 (em marrom) simultaneamente. Núcleos foram pós-corados com verde de metila. B: Núcleos em células adrenocorticais coradas com hematoxilina (em preto). C: As atividades da fosfatase alcalina no córtex adrenal visualizaram enzima-histoquimicamente para mostrar a localização das microvasculaturas (em vermelho escuro). zG: zona glomerulosa, zF: zona fasciculada, zU: zona celular indiferenciada.

Fonte: Adaptado de Mitani, 2014

A produção hormonal ocorre através da transformação do colesterol em outras substâncias até a formação dos hormônios maduros. Como pode ser visto na Figura 6, Após o colesterol sofrer o transporte do citoplasma para a membrana interna da mitocôndria mediado pela Proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR) onde a enzima de clivagem da cadeia lateral (CYP11A1 ou P450_{scc}) catalisa a primeira e limitante etapa da esteroidogênese: a conversão do colesterol em pregnenolona (Deng B. et al, 2018 ; Turcu AF. et al, 2015; Gu C. et al, 2017).

Figura 6: Tráfego do colesterol intracelular mediado por receptor

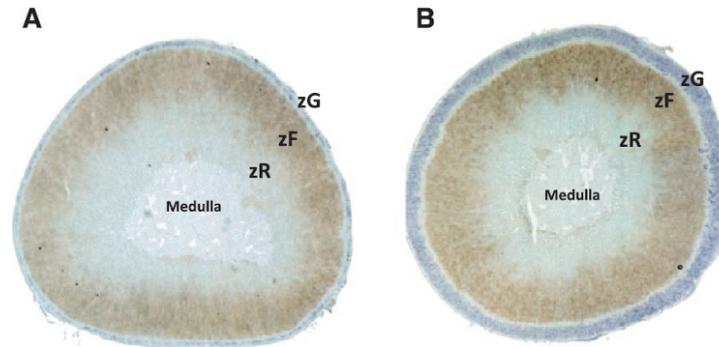


Nota: Tráfego do colesterol intracelular mediado por receptor e transportado por vesículas do retículo endoplasmático para a mitocôndria e translocado pela proteína STaR pelas membranas externa e interna mitocondrial, para em seguida ser convertido em pregnenolona.

Fonte: Miller WL, 2017.

A zona glomerulosa adrenal não expressa P450c17, permitindo que a pregnesterona seja 21-hidroxilada pelo P450c21 microsomal (CYP21A2). A P450c11AS mitocondrial (aldosterona sintase, CYP11B2) catalisa as atividades de 11-hidroxilase, 18-hidroxilase e 18-metiloxidase para produzir aldosterona (Aldo) (Miller WL,2017). A figura 7 exemplifica a localização enzimática pelo método da imunohistoquímica para a enzima CYP11B1 e CYP11B2. E figura 8 exemplifica as etapas correlacionando as enzimas e seus produtos finais.

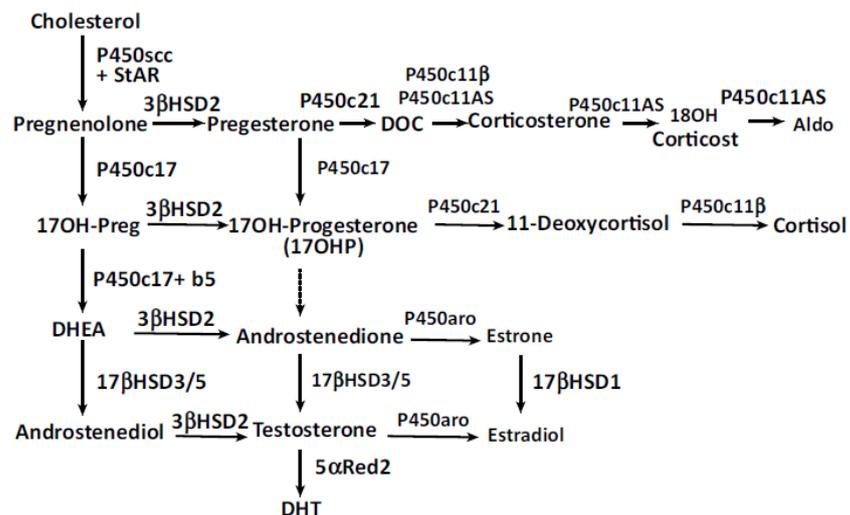
Figura 7: Localização de CYP11B2 e CYP11B1 na glândula adrenal de rato.



Legenda: Localização de CYP11B2 e CYP11B1 na glândula adrenal de rato por Imunohistoquímica. A: Uma secção adrenal de um rato marcada com o anticorpo anti CYP11B2 e o anticorpo anti CYP11B1, respectivamente. B: Uma secção adrenal de um rato alimentado com uma dieta deficiente em Na durante 20 dias marcado por anticorpo anti CYP11B2 e o anticorpo anti CYP11B1 simultaneamente. Em ambas as figuras, as cores azul e marrom mostram a presença de CYP11B2 e CYP11B1, respectivamente. Núcleos foram pós-corados com verde de metila. zG: zona glomerulosa, zF: zona fasciculada, zR: zona reticular

Fonte: Mitani F. et al, 2014.

Figura 8: Via da produção dos hormônios esteroides e suas respectivas enzimas



Legenda: Via da produção dos hormônios esteroides e suas respectivas enzimas. A cima das setas ou em paralelo está o nome de cada enzima correspondente a reação representada.

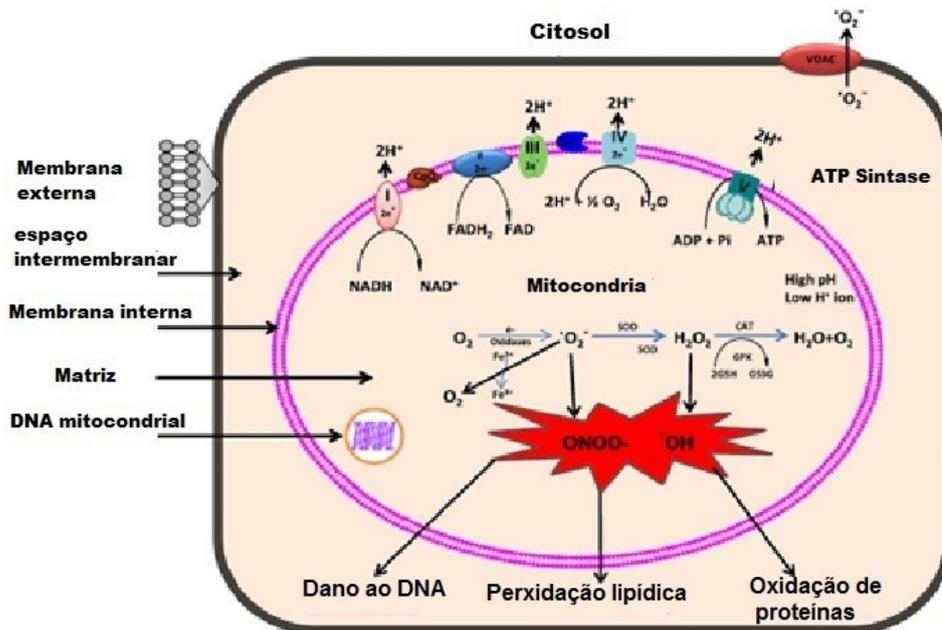
Fonte: Miller WL, 2017

A angiotensina 2 e o potássio extracelular elevado são os principais estimuladores da síntese de aldosterona, pelo aumento do cálcio intracelular. A síntese de aldosterona ocorre na zona glomerulosa (ZG) através de três enzimas a 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (HSD3B2), 21- hidroxilase (CYP21A2) e a aldosterona sintase (CYP11B2) (Turcu AF. et al,2015).

A hipertensão e o estresse oxidativo

O próprio metabolismo celular gera moléculas compostas pelo oxigênio resultante da etapa respiratória (Figura 9) e são denominadas de Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) (Prasad R. et al, 2014). As ROS são uma família de radicais livres que inclui ânions superóxido, hidroxila, radicais peroxila e outros não- radicais capazes de gerar radicais livres (Bhatti JS. et al, 2017). Essas moléculas são por muitas vezes instáveis e criam associações prejudiciais ao organismo. A manutenção do equilíbrio redox é essencial para as funções celulares normais. Qualquer perturbação neste equilíbrio devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio leva ao estresse oxidativo e pode levar à disfunção / dano / morte celular (Prasad R. et al, 2014).

Figura 9: Geração de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria



Nota: Geração de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria. A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (ETC) é composta de cinco complexos enzimáticos de múltiplas subunidades localizados na membrana mitocondrial interna. Essa transferência de elétrons ao longo da cadeia de transporte de elétrons é acoplada ao transporte de prótons através da membrana interna, estabelecendo o gradiente eletroquímico que gerou o ATP

Fonte: Adaptado de Bhatti JS. et al, 2017.

A NAD(P)H oxidase é uma molécula carreadora de elétrons responsável pela geração de metabólitos oxidativos durante o estresse oxidativo. Durante o processo hipertensivo esse estresse e a produção de ROS se elevam podendo gerar disfunção endotelial e outros efeitos deletérios ao organismo. Achados sugerem que o estresse oxidativo na hipertensão genética envolve aumento da atividade da NAD(P)H oxidase e síntese do óxido nítrico endotelial disfuncional (NOS desacoplada) e é regulado, em parte, pelos receptores AT1 (M Beg. et al, 2010).

Em uma célula normal, as mitocôndrias funcionam continuamente para metabolizar o oxigênio o que pode gerar ROS, como o ânion superóxido (O_2^-) designado como ROS "primários". A transferência de elétrons para o O_2 gera superóxido (O_2^-) que é então convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD) na mitocôndria. O H_2O_2 é então convertido em água pela glutatona peroxidase (GPx) ou catalase (CAT). A geração excessiva de ROS pode oxidar proteínas, lipídios ou DNA mitocondrial (mtDNA) (Bhatti JS. et al, 2017).

Solak *et al.*(2016) apresenta estudos que demonstram a associação do processo inflamatório com o aumento de ROS através da expressão do sistema NADPH oxidase como um mecanismo para o aumento do estresse oxidativo em ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) e revelaram a importância da inflamação intersticial renal e aumento do estresse oxidativo no desenvolvimento da hipertensão (Solak Y. et al, 2016; Hage FG. et al, 2014).

SHR e o Estresse Oxidativo

O modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) é relatado como um modelo homogêneo de hipertensão poligênica seletiva por reprodução, a partir de uma cepa normotensa de Wistar e possui mais de cem locus genéticos envolvidos. A linhagem SHR teve origem em animais na Filadélfia do Instituto Wistar de Anatomia e Biologia, em 1909, transferidos para o Laboratório de Fisiologia Veterinária no Departamento de Agricultura da Universidade de Tóquio, 1938, e posteriormente para Faculdade de Medicina da Universidade de Kyoto em 1951 (Doris PA. et al,2017).

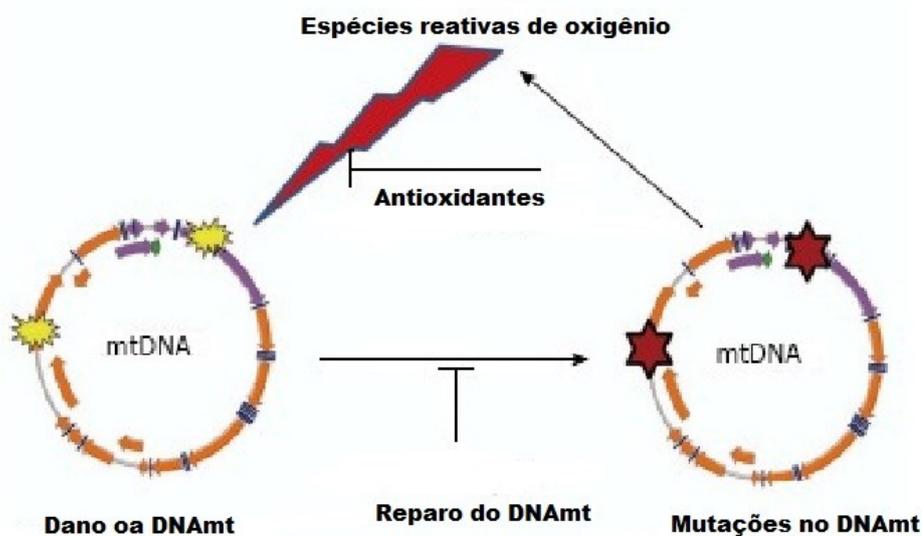
Ratos espontaneamente hipertensos exibem um aumento na produção de O_2^- impulsionada por NAD(P)H em vasos de resistência (como o mesentérico) e condutores (como o aórtico). Isso está associado à superexpressão da subunidade NAD(P)H oxidase e à atividade oxidase aumentada. Vários polimorfismos na região promotora do gene p22phox foram identificados em ratos SHR. Expressão aumentada de p47phox foi relatada na vasculatura renal, mácula densa e no néfron distal de ratos SHR jovens, sugerindo que a supra-regulação renal de NAD(P)H oxidase precede o desenvolvimento de hipertensão (M Beg. et al, 2010).

Nikerson e colaboradores, 1976, descreveram as diferenças ultraestruturais de três linhagens de ratos. Em seu trabalho demonstrou o quão próximo e mais confiável são os animais Wistar Kyoto em relação ao SHR do que uma outra cepa de Wistar normotensa. Caracterizando assim que o Wistar Kyoto seria o animal controle mais adequado aos animais SHR (Nikerson, 1976).

Mitocôndrias, estresse oxidativo e Apoptose

As mitocôndrias desempenham funções bioquímicas essenciais para a homeostase metabólica e são os principais mediadores em relação a morte e sobrevivência celular. As mitocôndrias exercem funções essenciais na célula, incluindo produção de ATP, regulação de Ca^{2+} intracelular, produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio, regulação da morte celular apoptótica e ativação da família de caspases (Bhatti JS. et al, 2017). As ROS geram um ciclo vicioso de ROS causando dano e gerando mais ROS (Figura 10).

Figura 10: Ciclo vicioso da produção de espécies reativas de oxigênio



Nota: Neste ciclo há produção de espécies reativas de oxigênio e por sua vez causando dano ao DNA mitocondrial, mutagênese do DNA mitocondrial e, conseqüentemente, posterior produção de espécies reativas de oxigênio. O ciclo implica um crescimento exponencial da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da mutagênese do DNA mitocondrial (mtDNA).

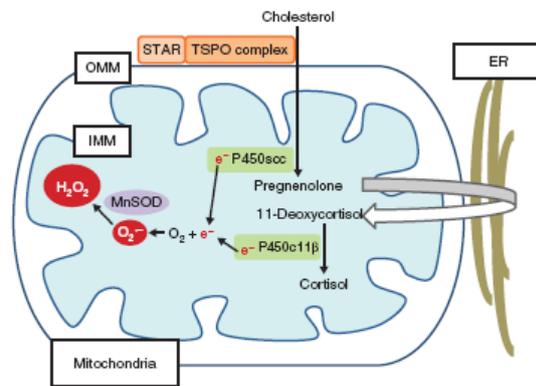
Fonte: Shokolenko IN. et al, 2014

Adrenal e o estresse oxidativo

As ROS estão presentes na esteroidogênese (Figura 11). Em excesso, podem ter efeitos deletérios sobre a função adrenal. A esteroidogênese em si aumenta a

geração de ROS, tornando a glândula adrenal suscetível a danos oxidativos. O córtex supra-renal, em particular, é bem suprido com antioxidantes enzimáticos (glutathiona peroxidases e peroxirredoxinas) e não enzimáticos (vitaminas A, C e E) para lidar com o aumento de ROS devido à esteroidogênese. O achado de mutações em genes de defesa antioxidante na adrenoleucodistrofia, síndrome tripla A e deficiência familiar de glicocorticoides, destacam como as perturbações na homeostase redox podem ter um efeito sobre a esteroidogênese adrenal (Prasad R. et al, 2014).

Figura 11: Produção de espécies reativas de oxigênio durante a esteroidogênese.



Nota: Durante a esteroidogênese ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A importação de colesterol da membrana mitocondrial externa (OMM) para a membrana mitocondrial interna (IMM) ativada por STAR e mediada pelo complexo proteico translocador associado (TSP0). Isto é seguido pela clivagem da cadeia lateral do colesterol à pregnenolona pelo P450scc (CYP11A1). As outras etapas da via esteroidogênica são catalisadas pelas isoformas do citocromo P450 no retículo endoplasmático (ER). O vazamento de elétrons durante este processo resulta na produção de ROS.

Fonte: Prasad R. et al,2014.

A biogênese mitocondrial pode ser definida como o crescimento e divisão de mitocôndrias pré-existentes e pode ser desencadeada por estresses ambientais, como exercício, exposição ao frio, restrição calórica, estresse oxidativo, divisão e renovação celular, e diferenciação (Ventura-Clapier R. et al, 2008).

Disfunção mitocondrial é definida como diminuição da biogênese mitocondrial, potencial de membrana alterado e diminuição do número mitocondrial, além de atividades alteradas das proteínas oxidativas devido ao acúmulo de ROS nas células e tecidos (Bhatti JS. et al, 2017).

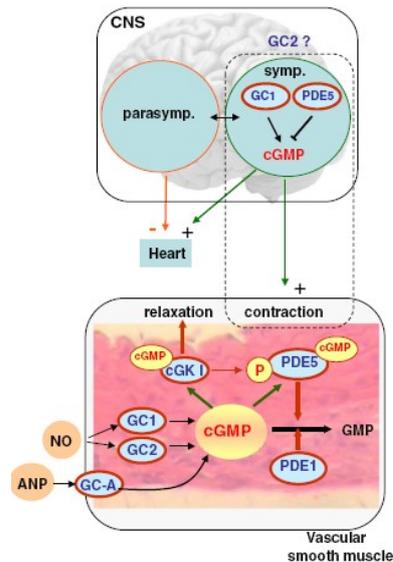
A via intrínseca da apoptose envolve os estímulos intracelulares que desencadeiam a apoptose não mediada por receptores da membrana celular (que é o caso da via extrínseca). A via intrínseca pode ser iniciada pela presença ou ausência de alguns fatores como ausência de fatores de crescimento, hormônios ou citocinas que são necessários na supressão da apoptose. Todos esses fatores desencadeiam o aumento da permeabilidade do poro mitocondrial permitindo a liberação do citocromo c e outros fatores que por sua vez ativam a caspase 9 e inibem a atividade anti-apoptótica. Outros mecanismos também regulam a permeabilidade do poro mitocondrial que são as moléculas da família Bcl2, anti-apoptóticas, e Bax, pró-apoptóticas. Ao ocorrer dano mitocondrial, a apoptose se dá pela via dos receptores Fas mediados pela caspase 8 (Elmore S. et al,2007).

Via do óxido nítrico

O óxido nítrico (ON) é uma molécula de extrema importância na manutenção do tônus vascular e regulação da pressão arterial. Sua síntese biológica se dá pela oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina catalisada pela enzima NO-sintase (NOS). Esta enzima possui três isoformas sendo uma neuronal (nNOS), uma endotelial (eNOS) e a sua forma induzida (iNOS) produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas.

A produção do ON se dá após estímulos como o aumento do atrito gerado pelas células sanguíneas com a parede dos vasos ou estímulos solúveis como a acetilcolina e outras moléculas. A eNOS após ser fosforilada sofre a translocação de sua ancoragem na membrana para o citosol onde o ON produzido se difundirá e atingirá a camada muscular do vaso sanguíneo (Figura 12). O ON interage com a guanilato ciclase tornando-a ativa (GCa) que converterá a molécula de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Deste modo o ON promove a sinalização do GMPc que por sua vez promove a resposta de relaxamento através da intervenção do balanço de íons de Ca^{++} (Dusse. et al,2003). O tratamento com doadores de ON aumentam a expressão de certos genes do DNA mitocondrial e o oposto também ocorre na limitação da disponibilidade do ON (Ventura-Clapier R. et al, 2008).

Figura 12: Visão geral esquemática da sinalização de GMPc nas células.



Nota: Visão geral esquemática da sinalização de GMPc nas células do músculo liso vascular e no sistema nervoso central (SNC). Nas células do músculo liso vascular, o cGMP pode ser formado pelas guanilil-ciclases não sensíveis (GC1 e GC2) ou pela guanilil-ciclase A ligada à membrana (GC-A) em resposta ao NO ou ANP, respectivamente.

Fonte: Adaptado de Mergia E, 2016.

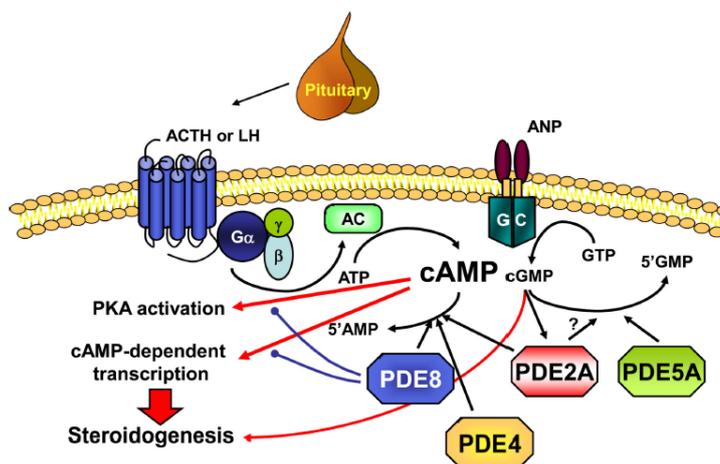
Citrato de sildenafil

O citrato de sildenafil é um bloqueador de fosfodiesterase que promove o relaxamento vascular gerado pelo acúmulo do óxido nítrico na túnica média dos vasos. Sua utilização mostrou eficiência ao reduzir a pressão arterial de ratos com hipertensão resistente causada pela estenose da artéria renal. O citrato de sildenafil também mostrou atividade anti-oxidante ao diminuir a peroxidação de lipídios (Cavalcanti CO. et al, 2016).

O bloqueio da fosfodiesterase na adrenal promove um aumento da expressão de GMPc que por sua vez diminui a expressão de aldosterona na zona glomerulosa, modulando cronicamente a expressão de corticosterona secretada pela zona fasciculada, e a expressão esteroideogênica na zona reticulada. O Citrato de sildenafil promove um aumento da AMPc que ativa a AMP-Dependente Kinase (PKA) regulando assim a expressão da Proteína Reguladora Aguda da Esteroidogênese. Nas células da zona glomerulosa o GMPc atua na produção de aldosterona via ativação de PDE2A, atenuando a produção de esteróides via

aumento da hidrólise de AMPc após a ativação do peptídeo natriourético atrial (ANP) da guanilil ciclase (GC) (Tsai LC. et al, 2011).

Figura 13: Regulação da esteroidogênese.



Nota: A figura mostra a relação direta do eixo hipotalâmico-adrenal e as fosfodiesterases na esteroidogênese.

Fonte: Tsai LC, 2011.

Foi descrito no artigo de La Russa et al. (2017), que a partir da vigésima semana de vida os ratos espontaneamente hipertensos atingem um platô hipertensivo. Deste modo, os efeitos da hipertensão estão em seu auge tornando seus efeitos mais acentuados. Yaguas K. et al. iniciaram tratamento de animais SHR a partir da décima terceira semana de idade dos animais (Yaguas K. et al, 2010).

Dados da literatura descrevem um amplo espectro das concentrações para tratamento com citrato de citrato de sildenafil. Por exemplo, no artigo de Cavalcanti, 2016, os ratos Wistar no modelo dois-rins-um-clip foram tratados com 45 mg/Kg/dia por sete dias (Cavalcanti, C.O. et al, 2016) enquanto em Yaguas K, 2010, foi administrado 2,5 mg/kg/dia.

Em um estudo sobre o efeito da administração de inibidores da fosfodiesterase 5 em humanos, foi detectado que a redução da PA nos pacientes ocorreu devido a resistência vascular periférica total, enquanto o débito cardíaco permaneceu inalterado. A redução acentuada nos níveis de pressão arterial média (PAM) e resistência periférica total (RTP) ocorreu após a primeira dose de citrato de

sildenafil (37,5 mg), que não foi sustentada com a administração consecutiva de doses crescentes (50 mg e 100 mg) o que está em concordância com outros estudos, indicando que o citrato de sildenafil não teve efeito dose-dependente (Faria AP. et al, 2015).

Com base nas informações anteriores, em nosso estudo, avaliamos o efeito do citrato de citrato de sildenafil na regulação da produção crônica de aldosterona pela zona glomerulosa, um processo com duração de horas a dias (Hattangady. et al, 2012).

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivos gerais

O presente trabalho propõe o estudo das alterações morfológicas e do estresse oxidativo nas zonas glomerulosa e indiferenciada da adrenal no processo hipertensivo crônico em ratos SHR comparados aos animais tratados com o citrato de citrato de sildenafil.

1.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito do tratamento com Citrato de citrato de sildenafil sobre a (o):

- 1.2.1 Espessura da cápsula que envolve a glândula adrenal entre os grupos;
- 1.2.2 Detecção de proteínas pró, anti-apoptóticas e de proliferação celular;
- 1.2.3 Detecção de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo.
- 1.2.4 Avaliação da biogênese mitocondrial na zona glomerulosa;
- 1.2.5 A ultraestrutura da zona glomerulosa, principalmente em relação às mitocôndrias;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e grupos experimentais

Os animais foram obtidos e mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade do Estado do Rio Janeiro (UERJ) sob condições controladas de temperatura (temperatura 21 ± 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 padrão (ração Nuvilab, Brasil) e água *ad libitum* durante todo o experimento. A investigação respeitou a orientação do “Guia para Uso e Cuidado de Animais de Laboratório” (Publicação do NIH N° 85-23, revisada em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (n.º CEUA/017/2018) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Trinta e dois animais (ratos SHR ou Wistar Kyoto) com 5 meses de idade foram utilizados neste estudo. Os animais foram divididos em quatro grupos (n=8), como descritos a seguir:

- **Kyoto**: animais Wistar Kyoto com administração de água filtrada via gavagem orogástrica por 30 dias no período de tratamento.
- **Kyoto + Citrato de sildenafil**: animais Wistar Kyoto com administração de citrato de citrato de sildenafil via gavagem orogástrica na dose 20mg /dia por 30 dias.
- **SHR**: animais SHR receberam administração de água filtrada via gavagem orogástrica por 30 dias.
- **SHR + Citrato de sildenafil**: animais SHR com administração de Citrato de citrato de sildenafil via gavagem orogástrica na dose 20mg/dia por 30 dias.

2.2 Análise da pressão arterial sistólica

A aferição da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada semanalmente através do método não invasivo da pletismografia da artéria caudal (Letica LE 5100; Panlab, Espanha) em todos os grupos experimentais com os animais conscientes a partir da semana vinte até a semana vinte e quatro. Todos os animais foram aclimatados durante duas semanas, antes do período experimental, para minimizar o estresse durante as aferições da PAS. As aferições foram feitas por meio de um garrote e de um sensor de pulso colocados em torno da cauda de cada animal. Estes foram conectados ao registrador, o qual insufla e exsufla automaticamente o garrote, e detecta o desaparecimento e o aparecimento da onda de pulso na artéria caudal determinando, assim, a PAS. A média de três aferições de cada animal foi utilizada. A gavagem foi realizada após a aferição pelo pletismógrafo a fim de registrar apenas alterações crônicas da administração do citrato de sildenafil. O citrato de sildenafil apresenta meia-vida terminal de aproximadamente 4 h (Laboratórios Pfizer Ltda.,2015).

2.3 Eutanásia

Ao final dos 30 dias de gavagem, os animais foram profundamente anestesiados com Tiopental sódico (80 mg/ kg), por via intraperitoneal e, em seguida, foi realizada a exsanguinação por punção cardíaca. Após a eutanásia, as glândulas adrenais dos animais foram retiradas, clivadas sagitalmente, armazenadas adequadamente em fixador Karnovsky para microscopia de luz e glutaraldeído 2,5% para microscopia eletrônica ou congeladas por nitrogênio líquido, para posteriores análises.

2.4 Microscopia de Luz

2.4.1 Processamento histológico

As amostras fixadas foram clivadas e lavadas por 1 h em água corrente. Após a lavagem, as amostras teciduais foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, 70%, 90%, 100% (2x), por 1 h em cada etapa. Posteriormente, o material foi clarificado através de dois banhos de xilol, sendo 20 min em cada. Em seguida, os fragmentos foram inseridos duas vezes em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a 60 °C por 30 min em cada etapa e incluídos na mesma. Todos os fragmentos incluídos em Paraplast Plus foram seccionados em 5 µm de espessura em micrótomo (American Optical, modelo Spencer, Estados Unidos). As secções foram desparafinadas em estufa a 60 °C por 5 min e 2 banhos de xilol. Os cortes foram hidratados, como a seguir: álcool 100%, 90%, 70% e água destilada, por 2 min em cada etapa.

2.4.2 Hematoxilina & Eosina (HE)

Primeiramente as laminas foram desparafinada em três banhos de xilol de dois minutos cada, em seguida os cortes foram hidratados em banhos de álcool decrescentes sendo eles um com álcool absoluto (100%), álcool noventa (90%) e álcool setenta (70%). As lâminas foram coradas pelos corantes Hematoxilina-Eosina. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada e desidratados em concentrações crescentes de álcool 70%, álcool 90%, álcool absoluto (100%), dois minutos cada, e diafanizados em três banhos de xilol. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck, Alemanha) e lamínulas de vidro de rotina. Após a coloração os cortes foram visualizados ao microscópio.

2.4.3 Tricrômico de Gomori

Como na maioria das colorações, os cortes histológicos passaram por desparafinização em banhos de xilol seguido da hidratação com banhos de álcool decrescentes sendo eles um com álcool absoluto (100%), álcool noventa (90%) e álcool setenta (70%). As lâminas foram coradas em solução de Tricrômico de Gomori por 15 minutos e em seguida imersas em solução de ácido acético a 1% por dois minutos. Em seguida o material foi desidratado e clarificado como na rotina das demais colorações antes da montagem e visualização dos cortes histológicos.

2.4.4 Imunohistoquímica

Inicialmente, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada utilizando peróxido de hidrogênio a 3%, por 15 min e os cortes foram lavados com tampão fosfato salino (PBS) 3 vezes, por 5 min cada vez. As lâminas foram submetidas à recuperação antigênica por tampão citrato, pH 6,0, ou Tampão tris, pH9,0, de acordo com as informações do fabricante de cada anticorpo, por 20 min a 60 °C. Em seguida, os cortes foram lavados novamente com PBS e marcações inespecíficas dos anticorpos foram bloqueadas através da incubação em PBS/BSA (soroalbumina bovina) 3%, por 20 min, em temperatura ambiente. Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários diluídos em PBS (proporção 1:100) em câmara úmida *overnight* a 10 °C.

As técnicas de Imunoperoxidase ou de imunofluorescência foram utilizadas para a detecção da proteína pró-apoptótica Bax (anticorpo anti-Bax Sc-6236), anti-apoptótica Bcl-2 (Sc-7382), o antígeno de proliferação celular (PCNA) (Sc-56), Citocromo c (Sc-13156), PGC1 α (Sc-5816), catalase (Sc50508) e superóxido dismutase 1 (FI11407) todos da Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos. Para detecção da imunomarcção por peroxidase foi utilizado o kit Polyvalent HRP kit (HRP-125, Spring Biosciences, Estados Unidos). Para análise de imunofluorescência, utilizamos anticorpos secundários anti-coelho acoplados ao

fluoróforo AlexaFluor 488 (Invitrogen, Estados Unidos) e anti-camundongo acoplado ao fluoróforo AlexaFluor 555 (Invitrogen).

No dia seguinte, os cortes foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário biotilado, por 1 h, e, posteriormente, com a estreptavidina (Dako, EUA), por 30 min, em temperatura ambiente. Após lavagens com PBS, os produtos da imunorreação foram visualizados usando o reagente diaminobenzidina (DAB) (Dako, EUA) e contracolorados com Hematoxilina. As lâminas foram então desidratadas em concentrações crescentes de álcool, 70%, 90%, 100% e xilol e montadas com Entellan e lamínulas para posterior observação ao microscópio óptico. Os cortes do controle negativo da reação foram obtidos omitindo a etapa de incubação do anticorpo primário.

Já na imunofluorescência após a recuperação antigênica, realizamos 3 lavagens com PBS (pH=7,2) e em seguida bloqueamos a autofluorescência com glicina 0,2 % por 20 minutos. Dando prosseguimento, lavamos mais três vezes com o PBS para em seguida bloquear sítios inespecíficos com PBS/BSA 3%. Nesta etapa a incubamos com o anticorpo primário, overnight a 4 graus. No dia seguinte iniciamos lavando mais três vezes com PBS e incubando com o anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo (Alexa 488 ou 555), por 1 hora. Depois de mais três lavagens com o PBS incubamos com DAPI por 5 minutos. Antes da montagem com glicerina tamponada fizemos mais três lavagens.

Para quantificação da expressão das proteínas citadas acima, foi utilizado o software Image-Pro Plus versão 7.0. Para tal, foram analisados 20 campos aleatórios de cada lâmina, ao microscópio óptico (Olympus BX53, câmera Olympus DP72, Japão) e no microscópio confocal (Microscópio confocal LSM 510 Meta, Zeiss.) para as imagens na técnica de imunofluorescência.

2.5 Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras teciduais foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, a 4°C por 24 h. O material foi clivado e lavado 3 vezes por 10 min em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e incubadas em tetróxido de

ósio 1% 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. Posteriormente, o material foi infiltrado com acetona e resina epon (TedPella, Estados Unidos) [25mL de Epon 812, 17 mL de anidrido metil náico (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, o material foi inserido em resina epon pura, em tubos abertos por 4 h, e posteriormente incluído em nova resina epon, polimerizada em estufa, a 60 °C, por 3 dias. Em seguida, foram realizados cortes ultrafinos (60-70 nm) de áreas selecionadas com ultramicrotomo (Leica Ultracut-UCT, Leica Aktiengesellschaft, Áustria) que foram contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo para observação em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol TEM JEM, Brasil) a 80 kV.

2.6 Análise Estatística

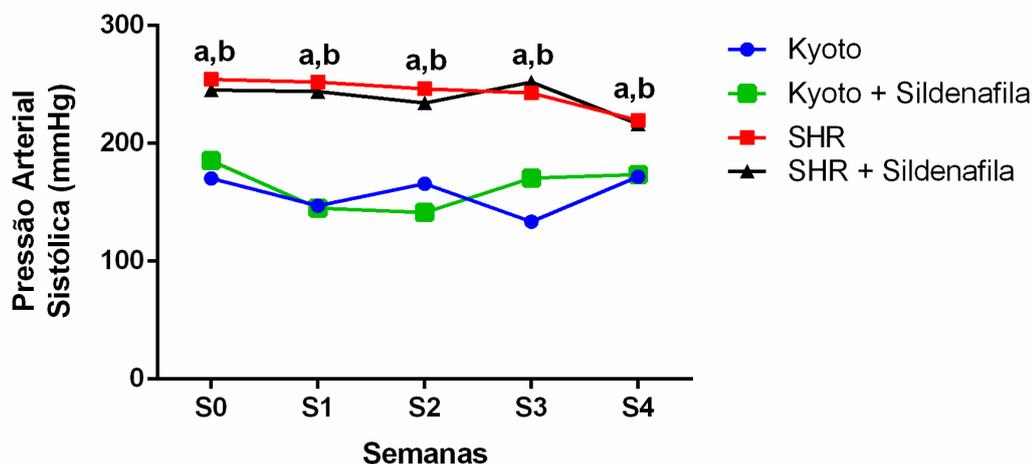
Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pela comparação entre os grupos, e as diferenças entre eles foram testadas. Todos os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) one-way com pós-teste de Holm-Sidak. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando valores de $p < 0,05$. O software *Graphpad Prism* versão 6.0 para *Windows* (GraphPad Software, Estados Unidos) foi utilizado para realizar as análises estatísticas e para confecção dos gráficos.

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação da pressão arterial sistólica

A aferição da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada semanalmente através do método não invasivo da pletismografia da artéria caudal em todos os grupos experimentais (Figura 14). Ao início do tratamento, o grupo SHR possuía a média pressórica de $254,3 \pm 5$ mmHg, o grupo SHR + citrato de sildenafil a média de $245,4 \pm 5$ mmHg, o grupo Kyoto com média de $170,4 \pm 5$ mmHg e o grupo Kyoto + citrato de sildenafil $185,4 \pm 5$ mmHg. Durante o tratamento não houve diferenças significativas entre os animais tratados com o citrato de sildenafil e os não tratados. Ao final do experimento, o grupo SHR possuía a média pressórica de $219,5 \pm 5$ mmHg, o grupo SHR + citrato de sildenafil a média de $216,5 \pm 5$ mmHg, o grupo Kyoto e $171,8 \pm 5$ mmHg e o grupo Kyoto + citrato de sildenafil $173,5 \pm 5$ mmHg.

Figura 14: Dados da aferição pressórica durante o período de gavagem orogástrica dos animais



Legenda: Dados da aferição pressórica durante o período de gavagem orogástrica dos animais. (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto, (b) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto + Citrato de sildenafil. Abreviatura: S = semana. Durante o período de tratamento não houve diferenças entre os animais tratados com o citrato de sildenafil e seus respectivos controles. A diferença estatística se deu apenas entre hipertensos e normotensos. Durante a semana zero: SHR = $254,3 \pm 5$ mmHg, SHR + citrato de sildenafil = $245,4 \pm 5$ mmHg, Kyoto = $170,4 \pm 5$ mmHg e Kyoto + citrato de sildenafil = $185,4 \pm 5$ mmHg. Ao final do experimento na semana 4: SHR = $219,5 \pm 5$ mmHg, SHR + citrato de sildenafil = $216,5 \pm 5$ mmHg, Kyoto = $171,8 \pm 5$ mmHg e Kyoto + citrato de sildenafil = $173,5 \pm 5$ mmHg.

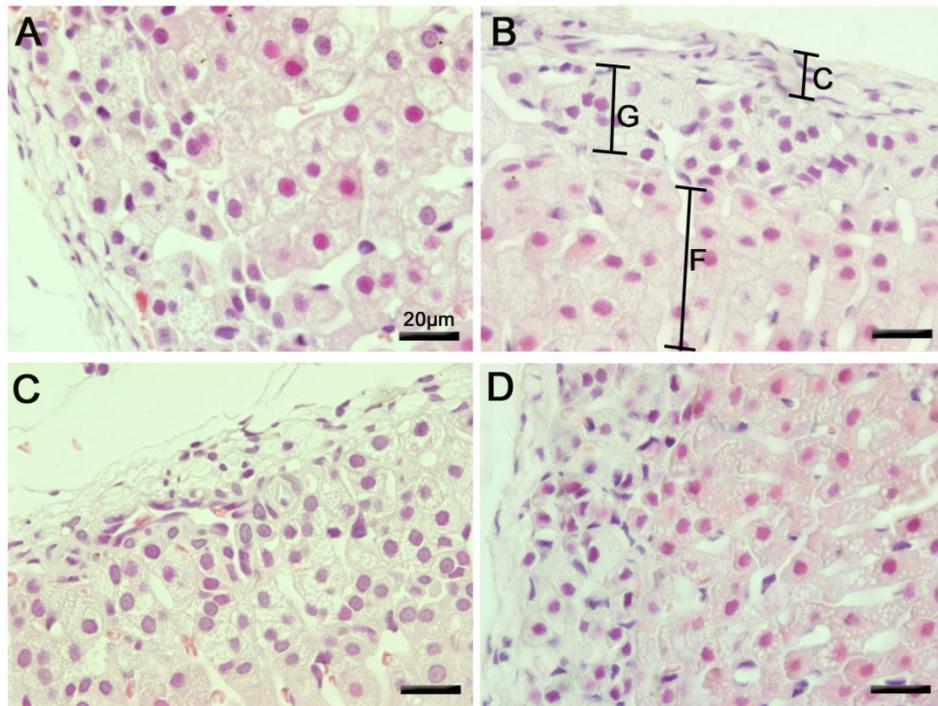
Fonte: software *Graphpad Prism* versão 6.0 para *Windows*

3.2 Avaliação histológica

Inicialmente a coloração por hematoxilina e eosina foi empregada a fim de caracterizar a zona glomerulosa e suas características entre os grupos de estudo. Esta camada é a primeira camada de três camadas concêntricas já mencionadas. Na Figura 15, a zona glomerulosa se apresenta logo a baixo da capsula adrenal com núcleos bem corados pela hematoxilina (roxo). A zona fasciculada pode ser caracterizada pelos capilares fenestrados em disposição concêntrica em relação à medula. O grupo SHR apresentou uma diminuição da espessura zona glomerulosa e desorganização em relação ao grupo Kyoto. O grupo SHR + citrato de sildenafil

apresentou um espessamento da zona glomerulosa em relação ao grupo SHR, o que sugere que o tratamento reverte o remodelamento tecidual.

Figura 15: Avaliação da morfologia da zona glomerulosa.



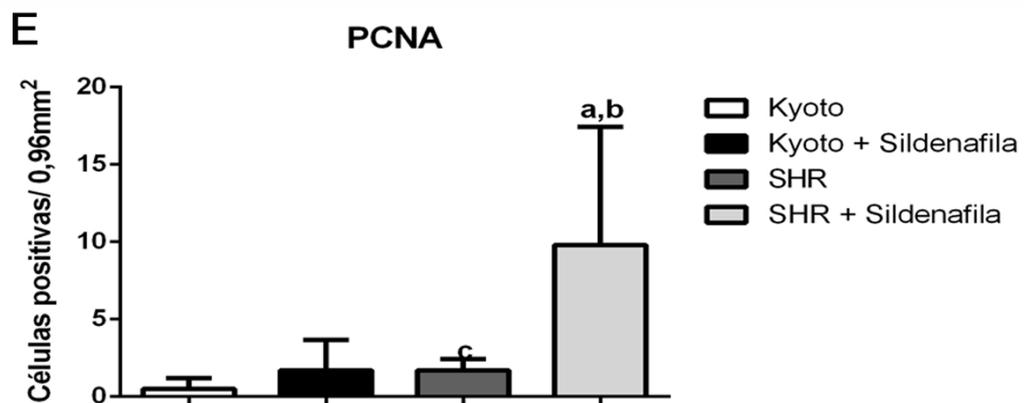
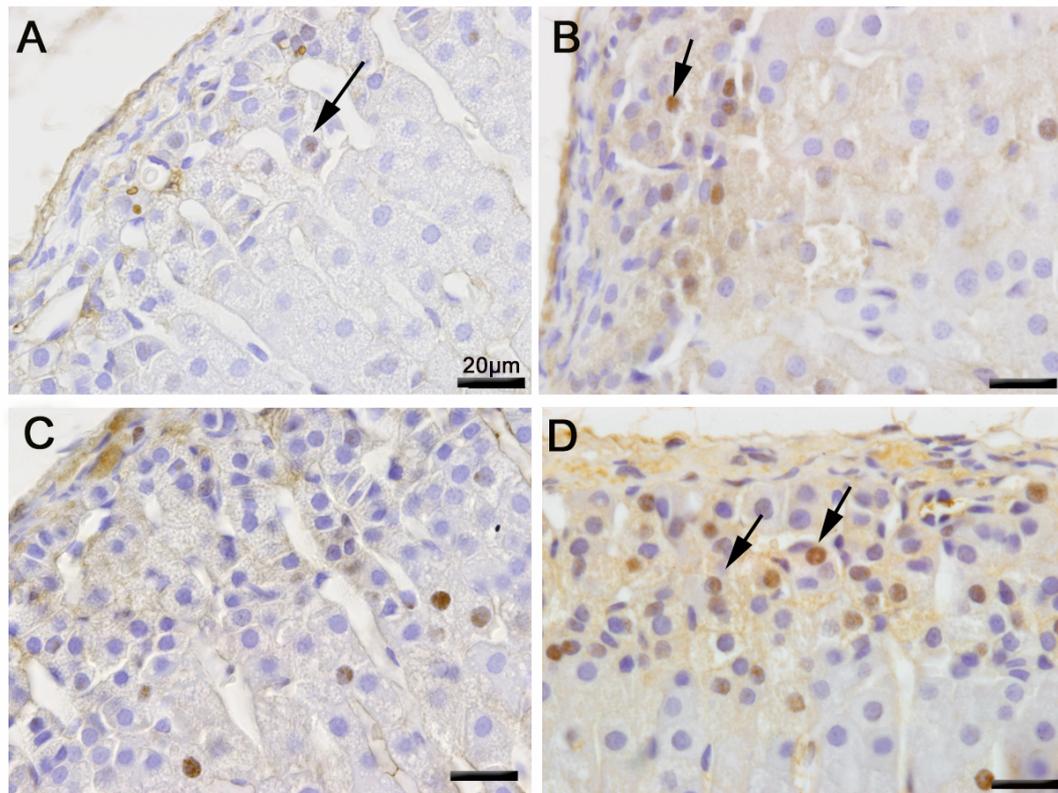
Legenda: A: grupo Kyoto; B: grupo Kyoto+ citrato de sildenafil; C: grupo SHR; D: SHR + citrato de sildenafil. O grupo SHR apresentou uma diminuição da espessura da zona glomerulosa apresentando desorganização em relação ao grupo Kyoto, o que foi revertido com o tratamento com citrato de sildenafil.

Fonte: Imagens obtidas ao microscópio óptico (Olympus BX53, câmera Olympus DP72, Japão) através do software Image-Pro Plus versão 7.0.

3.3 Avaliação da proliferação celular pela detecção de PCNA

Na Figura 16 podemos observar uma maior proliferação nos animais tratados com o citrato de sildenafil (Figura 16 B e C), pela detecção da proteína PCNA.

Figura 16: Imunohistoquímica para detecção do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)



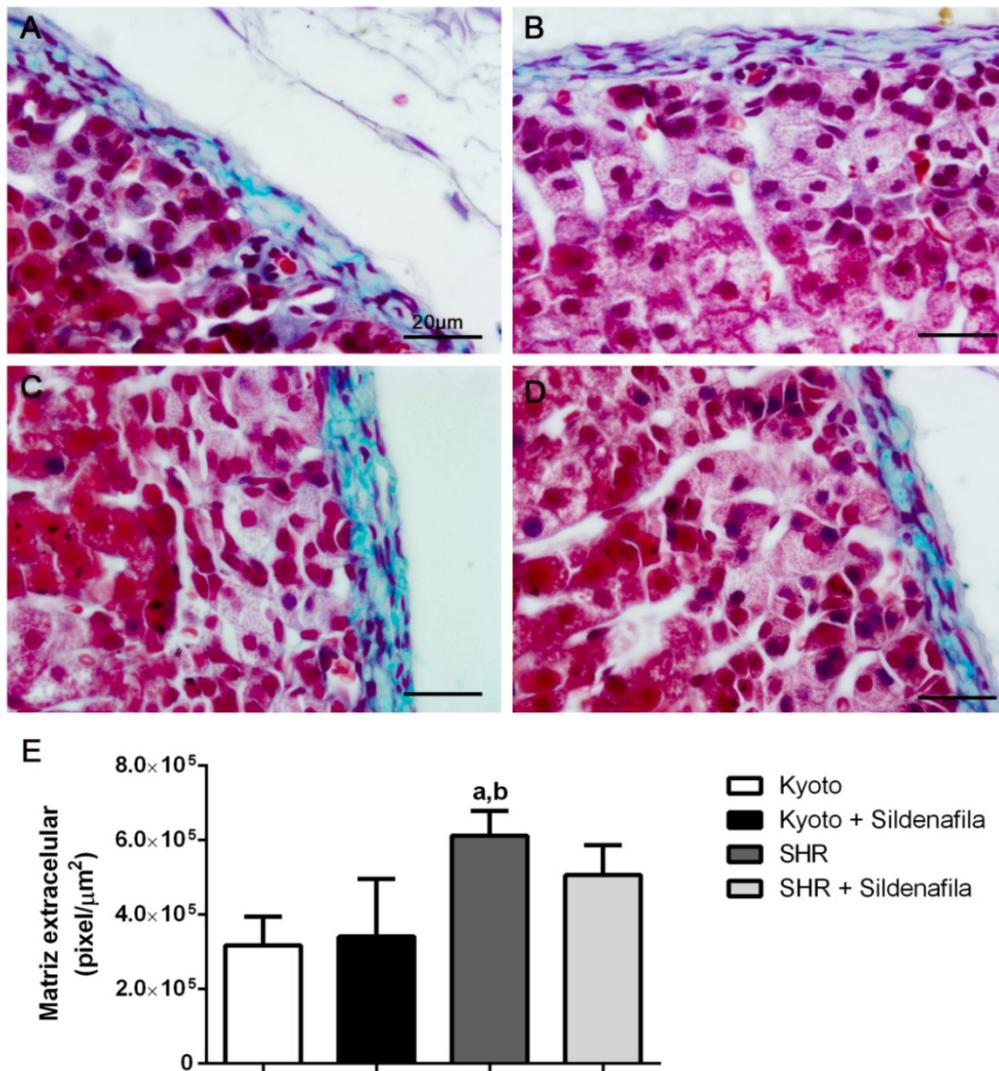
Legenda: A: grupo Kyoto; B: grupo Kyoto+ citrato de sildenafil; C: grupo SHR; D: SHR + citrato de sildenafil. Os grupos Kyoto + citrato de sildenafil e SHR+ citrato de sildenafil possuem uma maior quantidade de células proliferativas. E) Quantificação das células positivas para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). O grupo SHR + Citrato de sildenafil apresentou uma proliferação 4 vezes maior em relação ao grupo SHR. (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto, (b) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto + Citrato de sildenafil, (c) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo SHR + Citrato de sildenafil.

Fonte: software *Graphpad Prism* versão 6.0 para *Windows*

3.4 Análise das fibras da cápsula da adrenal

A análise das fibras da cápsula da glândula adrenal foi realizada através da coloração de Tricrômico de Gomori (Figura 17). As células da cápsula nos grupos SHR + citrato de sildenafil e Kyoto + citrato de sildenafil apresentaram aspecto mais organizado, compacto e filamentososo do que os grupos não tratados. O grupo SHR apresentou maior quantidade de fibras e uma celularidade menor comparado aos demais grupos.

Figura 17: Avaliação das fibras constituintes da cápsula da glândula adrenal por Tricrômio de Gomori.



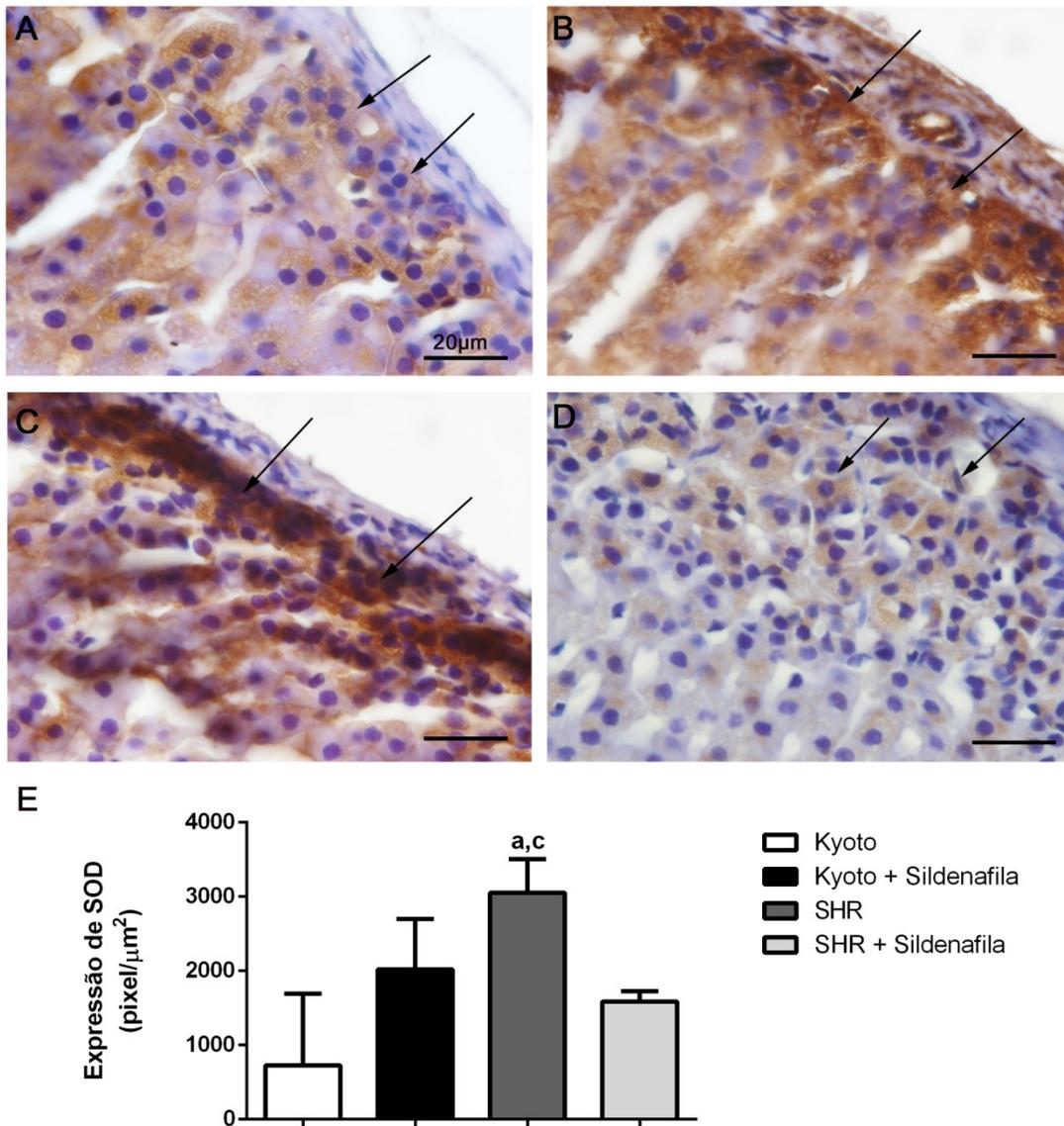
Legenda: A: grupo Kyoto; B: grupo Kyoto+ citrato de sildenafil; C: grupo SHR; D: SHR + citrato de sildenafil. Nesta imagem podemos observar um aumento deposição de matriz na cápsula da adrenal nos animais pertencentes ao grupo hipertenso e mais proeminente no grupo SHR (C) do que SHR + citrato de sildenafil (D). E) Quantificação das fibras coradas por Tricrômio de Gomori na cápsula da adrenal. (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto, (b) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto + Citrato de sildenafil.

Fonte: software *Graphpad Prism* versão 6.0 para *Windows*
Fonte:

3.5 Análise do estresse oxidativo pela detecção de SOD

A fim de investigar o estresse oxidativo que a hipertensão pode causar e o possível efeito benéfico do tratamento com citrato de sildenafil, foi feita a detecção da enzima SOD por imunoperoxidase. Todos os grupos expressaram a proteína, mas o grupo SHR + citrato de sildenafil apresentou menor expressão indicando que o citrato de sildenafil pode atuar na modulação da SOD ou reduzido o estresse oxidativo.

Figura 18: Avaliação da Imunoperoxidase para superóxido dismutase (SOD).



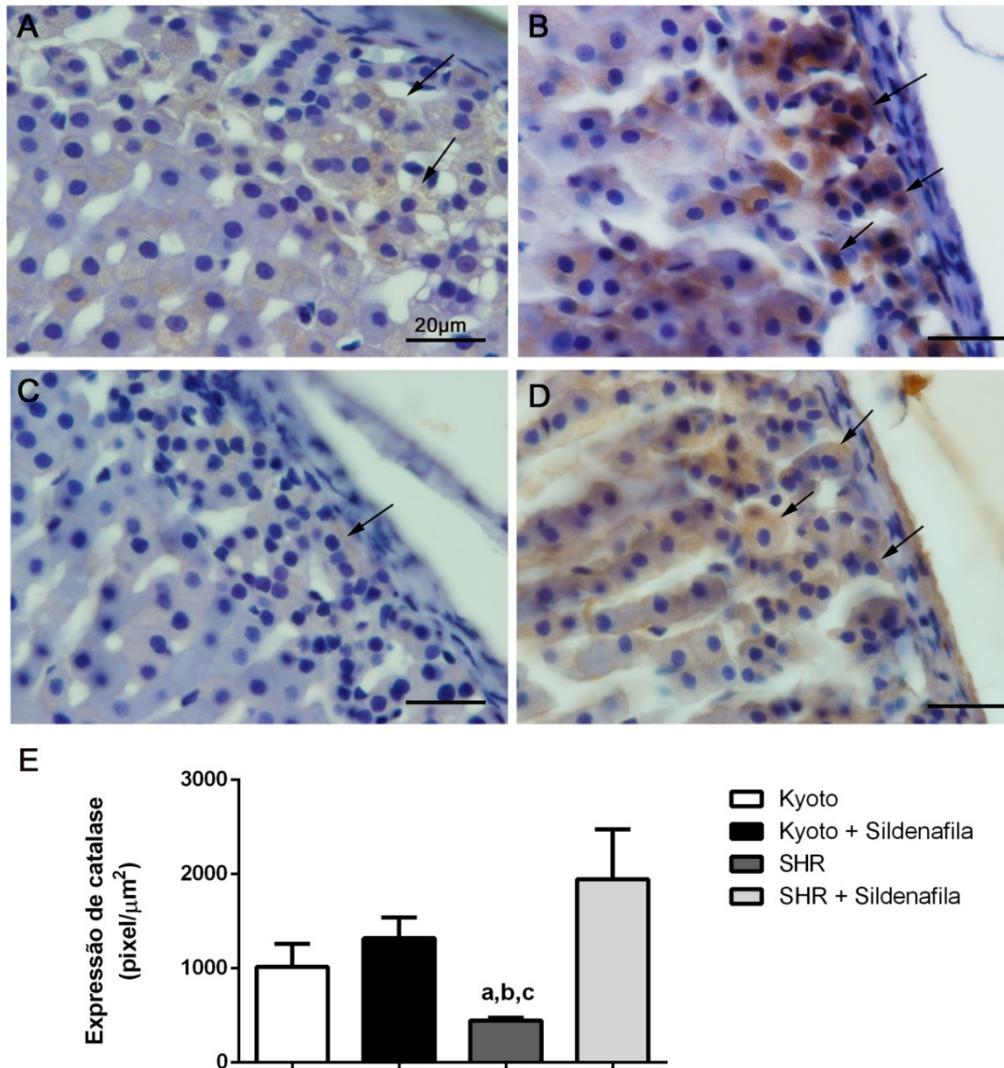
Legenda: A: grupo Kyoto; B: grupo Kyoto+ citrato de sildenafil; C: grupo SHR; D: SHR + citrato de sildenafil. E) Quantificação da expressão de superóxido dismutase na zona glomerulosa. (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto, (c) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo SHR + Citrato de sildenafil.

Fonte: Imagens obtidas ao microscópio óptico (Olympus BX53, câmera Olympus DP72, Japão) através do software Image-Pro Plus versão 7.0.

3.6 Análise do estresse oxidativo pela detecção de Catalase

Em seguida continuamos as análises e verificando a expressão da catalase que depende em parte do peróxido de hidrogênio gerado pela SOD como substrato. Observamos que o grupo kyoto + citrato de sildenafil teve uma expressão maior de catalase que o grupo Kyoto (Figura 19, B e A). O grupo SHR + citrato de sildenafil também apresentou maior expressão da catalase do que o grupo SHR (Figura 19, D e C).

Figura 19: Detecção e quantificação de catalase por imunohistoquímica.



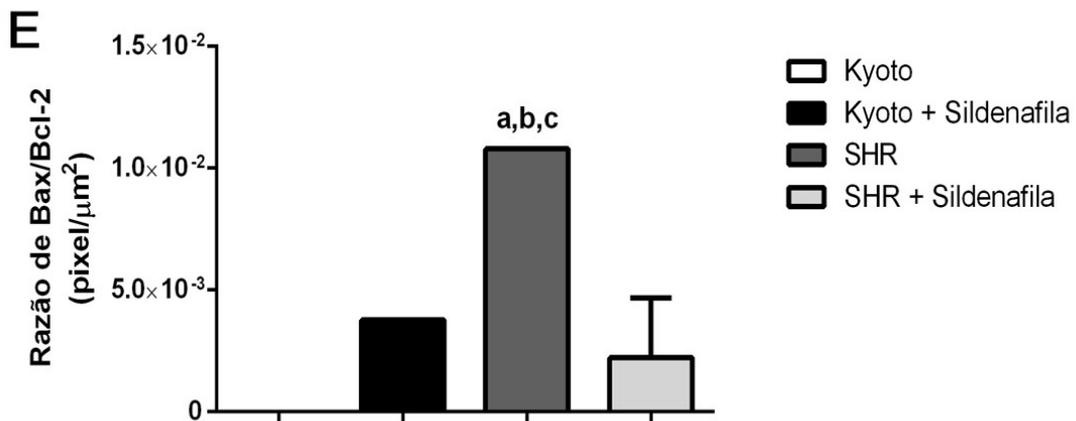
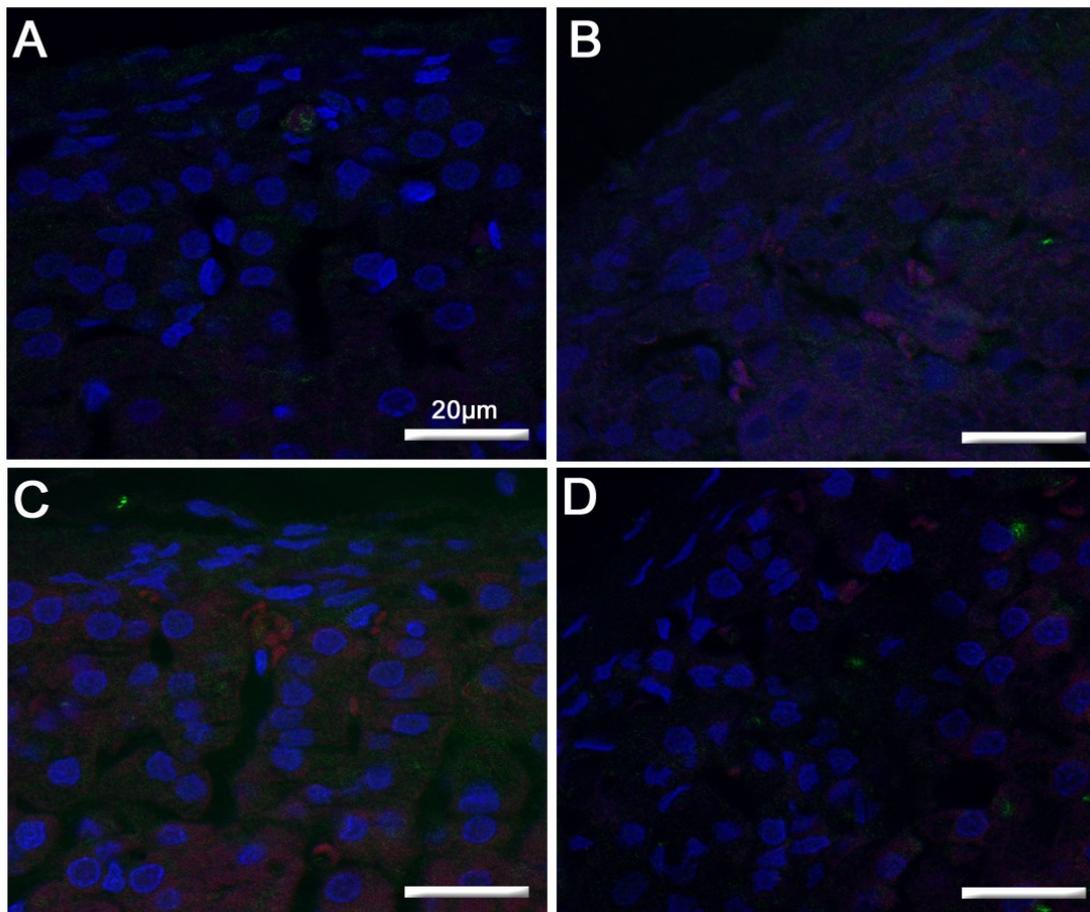
Legenda: A: grupo Kyoto; B: grupo Kyoto+ citrato de sildenafil; C: grupo SHR; D: SHR + citrato de sildenafil. Os grupos Kyoto + citrato de sildenafil e SHR + citrato de sildenafil apresentam uma marcação que sugere um efeito do citrato de sildenafil sobre a expressão da enzima catalase. E) Quantificação da expressão da enzima catalase. (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto, (b) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto + citrato de sildenafil, (c) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo SHR + Citrato de sildenafil.

Fonte: Imagens obtidas ao microscópio óptico (Olympus BX53, câmera Olympus DP72, Japão) através do software Image-Pro Plus versão 7.0.

3.7 Imunofluorescência de dupla marcação para Bax e Bcl2.

Na Imunohistoquímica por fluorescência de dupla marcação para Bax (vermelho) e Bcl2 (verde), avaliamos a expressão dessas duas proteínas e sua razão nos diferentes grupos estudados (Figura 20). A razão da Bax/Bcl2 demonstrou ser maior no grupo SHR em relação aos outros grupos, sugerindo maior apoptose, como esperado. O grupo SHR+ citrato de sildenafila apresentou diminuição significativa na razão Bax/Bcl2.

Figura 20: Avaliação da expressão de Bax (vermelho) e Bcl2 (verde) por fluorescência de dupla marcação.



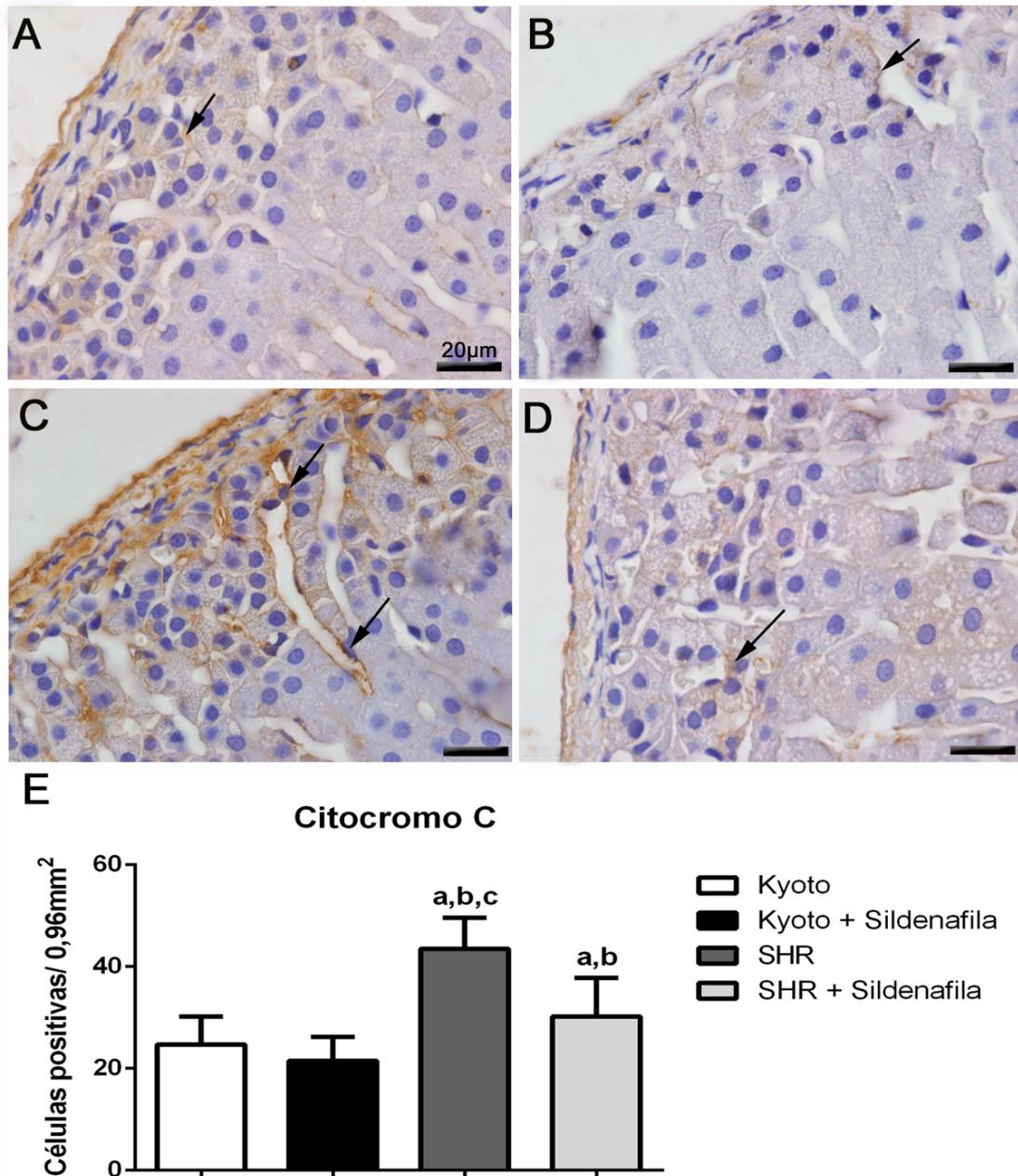
Legenda: A: grupo Kyoto; B: grupo Kyoto+ citrato de sildenafil; C: grupo SHR; D: SHR + citrato de sildenafil. E) Razão da expressão de Bax e Bcl2. (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto, (b) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto + Citrato de sildenafil, (c) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo SHR + Citrato de sildenafil.

Fonte: microscópio confocal Microscópio confocal LSM 510 Meta, Zeiss e quantificado através do software Image-Pro Plus versão 7.0.

3.8 Imunoperoxidase para detecção de citocromo c

Dando sequência as nossas análises, realizamos a técnica de imunoperoxidase para a detecção da proteína citocromo c (Figura 21). A marcação foi maior nas regiões da cápsula e das células endoteliais da glândula adrenal. O grupo SHR apresentou maior marcação para citocromo c, sugerindo um possível processo de apoptose nestas células do grupo SHR (figura 21, C). O grupo Kyoto + citrato de sildenafil e SHR + citrato de sildenafil (figura 21, B e D) apresentaram menor marcação em relação aos grupos não tratados. Esses dados sugerem que o citrato de sildenafil possui efeito protetivo em relação a liberação mitocondrial de citocromo c no processo hipertensivo crônico.

Figura 21: Avaliação da Imunoperoxidase para citocromo c.



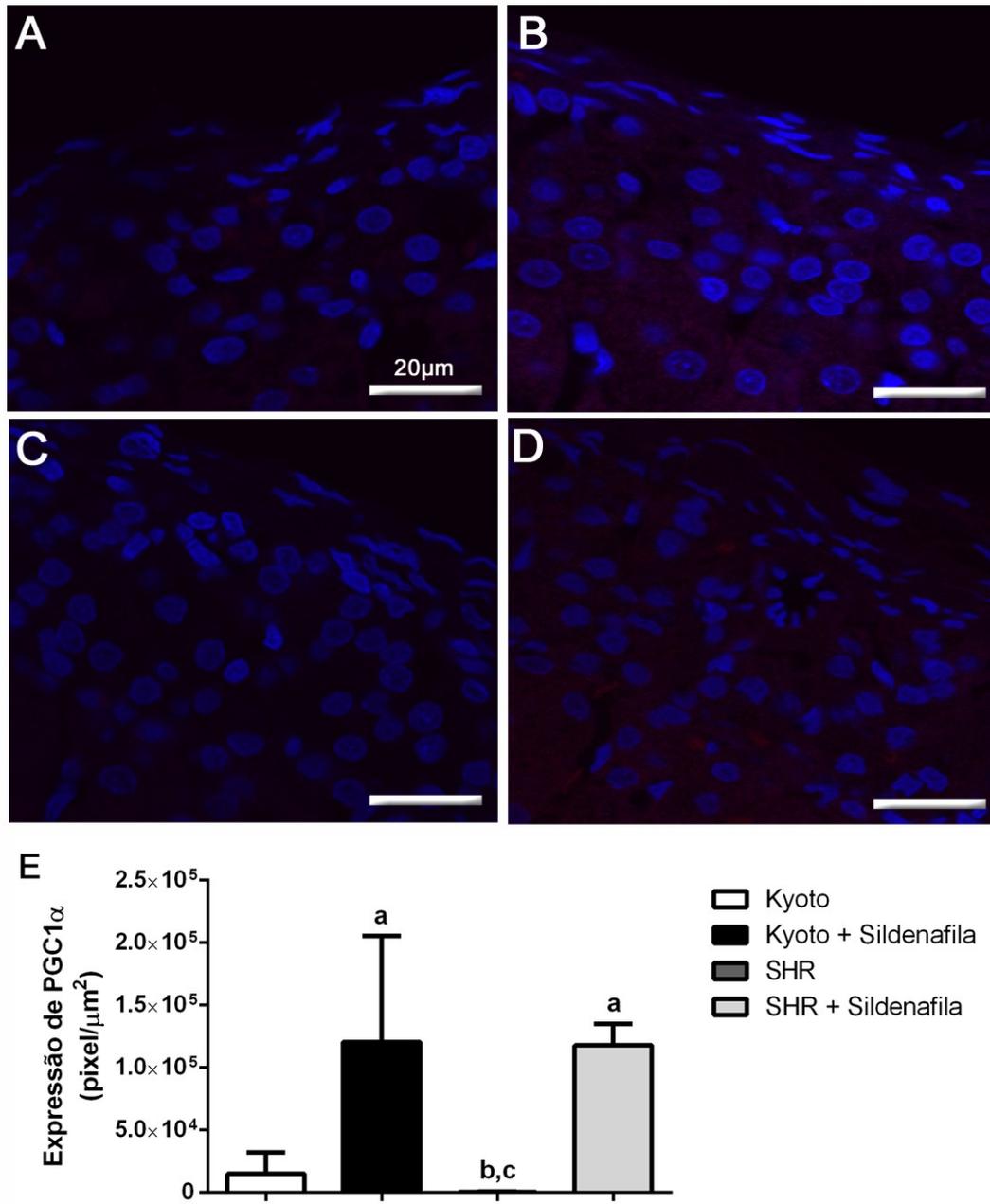
Legenda: A: grupo Kyoto; B: grupo Kyoto+ citrato de sildenafil; C: grupo SHR; D: SHR + citrato de sildenafil. E) Quantificação da Imunohistoquímica para citocromo c. (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto, (b) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto + Citrato de sildenafil, (c) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo SHR + Citrato de sildenafil.

Fonte: Imagens obtidas ao microscópio óptico (Olympus BX53, câmera Olympus DP72, Japão) através do software Image-Pro Plus versão 7.0.

3.9 Análise da biogênese mitocondrial pela detecção de PGC1 α

Avaliamos a expressão de PGC1 α por imunofluorescência, a fim de avaliar um dos principais reguladores da biogênese mitocondrial nos diferentes grupos de estudo. Em uma análise preliminar, os Grupos SHR + citrato de sildenafil e kyoto + citrato de sildenafil apresentaram marcação mais intensa do que nos grupos SHR e Kyoto, sugerindo que o citrato de sildenafil interfere na expressão de PGC1 α .

Figura 22: Avaliação da expressão de PGC1 α por imunofluorescência.



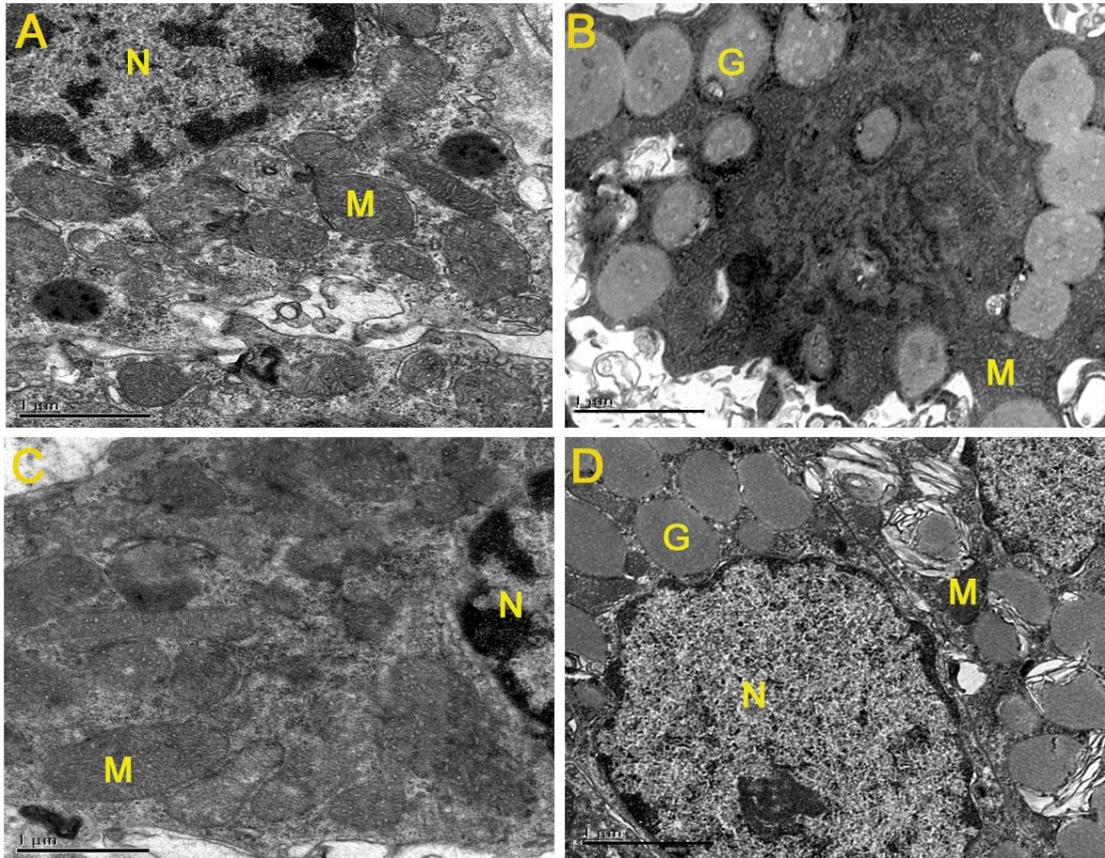
Legenda: A: grupo Kyoto; B: grupo Kyoto+ citrato de sildenafil; C: grupo SHR; D: SHR + citrato de sildenafil. Podemos observar intensa marcação do PGC1 α nos grupos tratados com o citrato de sildenafil, B e D. E) Quantificação da expressão de PGC1 α . (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto, (b) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo Kyoto + Citrato de sildenafil, (c) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo SHR + Citrato de sildenafil.

Fonte: Microscópio confocal LSM 510 Meta, Zeiss e quantificado através do software Image-Pro Plus versão 7.0.

3.10 Avaliação ultraestrutural das células da zona glomerulosa

Na análise ultraestrutural das células da zona glomerulosa, o grupo Kyoto apresentou mitocôndrias bem preservadas, com cristas normais, enquanto o grupo dos ratos espontaneamente hipertensos, SHR (Figura 23 C) apresentou diminuição de cristas mitocondriais e mitocôndrias não muito delimitadas (figura 23, D). Os grupos Kyoto + citrato de sildenafil e SHR + citrato de sildenafil (Figura 23 D) apresentaram desorganização da matriz extracelular e cristas mitocondriais tubulares. O grupo Kyoto + citrato de sildenafil (Figura 23 B) apresentou citoplasma mais vacuolizado em relação ao grupo kyoto (Figura 23 A). O Grupo SHR + citrato de sildenafil (Figura 23 D) também apresentou citoplasma mais vacuolizado em relação ao grupo SHR (Figura 23 C) sugerindo que o citrato de sildenafil possui algum efeito sobre o acúmulo ou produção de grânulos de secreção. O grupo Kyoto + citrato de sildenafil (Figura 23 B) e o grupo SHR + citrato de sildenafil (Figura 23 D) apresentaram a cromatina menos densa que nos respectivos controles, sugerindo maior atividade nuclear.

Figura 23: Avaliação ultraestrutural das células da zona glomerulosa, por microscopia eletrônica de transmissão.



Legenda: A: grupo Kyoto; B: grupo Kyoto+ citrato de sildenafil; C: grupo SHR; D: SHR + citrato de sildenafil. Em A) observamos o núcleo bem definido, contendo eucromatina e heterocromatina, mitocôndrias com cristas preservadas e algumas vesículas de secreção eletrondensas. Em B) Podemos observar numerosos lisossomos. Em C) temos numerosas mitocôndrias com cristas tubulares e um núcleo com cromatina densa e cromatina frouxa bem delimitada. E em D) Numerosos grânulos de secreção em amadurecimento, alguns lisossomos e dois núcleos vizinhos bem delimitados e com grande parte da cromatina descondensada.

Fonte: Imagens obtidas ao microscópio eletrônico GEOL GEM1200 EX (GEOL São Paulo Brasil em 80kv)

4. DISCUSSÃO

A secreção de aldosterona, o principal mineralocorticoide do córtex adrenal, é um processo regulado de forma rigorosa pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona para o controle da pressão arterial. O nível circulante de aldosterona é o resultado de vários mecanismos reguladores, sendo os mais significativos aqueles controlados pelo sistema renina angiotensina e os níveis plasmáticos de potássio. Nos casos de desregulação, pode resultar em hipertensão grave e aumento significativo do risco cardiovascular (MacKenzie SM. et al,2019). O hiperaldosteronismo, que é a hiperexpressão da aldosterona, está associado a hipertensão, hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca congestiva (Kopf PG, 2018). Desde os primeiros trabalhos com citrato de sildenafil em humanos é relatada a diminuição da pressão arterial média (PAM) em doses crescentes, quando comparada aos níveis basais ($84,17 \pm 21,04$ a $75 \pm 17,21$ mmHg, $p < 0,05$) (Faria AP. et al, 2015). O citrato de sildenafil possui o tempo de duração de aproximadamente 4 horas. Seguindo o modelo de Yaguas K, 2010, a pressão sistólica dos animais se mantém igual após a décima terceira semana de idade. O que se confirmou com nossas primeiras medições neste experimento. No nosso trabalho, a pressão arterial sistólica dos animais SHR a partir da vigésima semana de vida estava de acordo com o apresentado em La Russa D. *et al.*, 2017, em um platô hipertensivo. Já foi observado em outros trabalhos, que animais SHR que recebem uma dose única diária de citrato de sildenafil não tem alteração significativa na pressão arterial de maneira crônica (Kristek F. et al, 2007).

Observamos uma alteração na camada da zona glomerulosa dos animais SHR não tratados, que estava menor e estreita, comparado com os animais dos outros grupos. Já no grupo SHR que recebeu o tratamento com citrato de sildenafil, observamos a zona glomerulosa com sua espessura mais aproximada em relação ao grupo kyoto, sugerindo que o citrato de sildenafil mantenha a integridade da zona glomerulosa mesmo durante a hipertensão. Os animais tratados com o citrato de citrato de sildenafil em nosso experimento apresentaram uma marcação expressiva de PCNA, sugerindo a proliferação entre a zona glomerulosa e a zona fasciculada. A disposição da maioria das células em proliferação está compatível

com a teoria proliferativa bidirecional de Mitani que demonstrou que células indiferenciadas localizadas entre a zona glomerulosa e a zona fasciculada dão origem a novas células de ambas as camadas (Mitani F, 1995). A regeneração do córtex adrenal já era objeto de estudo na década de 1990. Mitani F e colaboradores realizaram experimentos de separação entre as zonas glomerulosa e fasciculada, onde havia células da zona indiferenciada em cada camada extraída e verificou após o vigésimo dia que as porções separadas estavam regeneradas com populações de células da zona fasciculada e glomerulosa onde não havia antes (Mitani F. et al., 1995).

Em 2014, Mitani F. realizou experimentos relacionados a proliferação celular com células marcadas com 5-bromo-2B-deoxyuridine (BrdU) e verificou que a proliferação celular ocorria em torno das células da zona indiferenciada entre a zona glomerulosa e fasciculada. Porém, essa proliferação sugeriu ser influenciada pelo ciclo circadiano, onde o pico de células proliferativas para a zona fasciculada ocorria acompanhando o pico do Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e do cortisol enquanto em outro experimento verificou-se a proliferação para a zona glomerulosa logo após o início da noite em animais com deficiência nutricional de sódio (Mitani F, 2014).

A cápsula da glândula adrenal é constituída de tecido conjuntivo e sua matriz é rica em colágeno. A cápsula secreta um componente importante para a estimulação e orientação de novas células para a zona glomerulosa, o RSPO3. A deleção de RSPO3 leva à perda da sinalização, ao comprometimento do crescimento e regeneração do órgão. A integridade da cápsula é vital para a manutenção da zona glomerulosa (Vidal V. et al, 2016). O aumento das fibras da matriz extracelular da capsula no animal hipertenso pode levar à alterações na síntese dos componentes da cápsula. O tratamento com o citrato de sildenafil foi eficiente ao diminuir essas fibras da matriz, além de apresentar maior organização.

A produção descontrolada de ROS pode ocorrer em várias condições como na hipertensão, levando a uma situação conhecida como "estresse oxidativo", onde altos níveis de ROS podem danificar muitas biomoléculas essenciais como a hemoglobina (Hb), DNA, RNA, lipídios e várias estruturas celulares.

A relação SOD / CAT elevada resulta de um aumento do estresse oxidativo nas células da zona glomerulosa, que é representado principalmente em

consequência da elevação na concentração de peróxido de hidrogênio celular. A SOD é uma enzima capaz de reduzir o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é o substrato da catalase. Quando as células aumentam os níveis de SOD sem um aumento proporcional nas peroxidases, as células enfrentam um desafio de sobrecarga de peróxido (Speranza L, 2008).

O citrato de sildenafil tem efeitos inibitórios na produção de radicais superóxido na mitocôndria, aumentando os níveis de GMPc e inibindo a expressão da NADPH oxidase (Perk H. et al, 2008). Foi demonstrado que os antioxidantes exógenos podem reduzir a expressão e/ou atividade de enzimas antioxidantes endógenas (Prevatto, 2017), porém outros trabalhos com o citrato de sildenafil demonstraram que o medicamento restaurou os valores normais do conteúdo de GSH e MDA no tecido renal, confirmando o potencial antioxidante do sildenafil (Khames A, 2017; Morsy MA, 2014). Entretanto, no trabalho de Prevatto, 2017, animais tratados com antioxidantes sugeriram uma hiperativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal o que aumentou a expressão de glicocorticoides e apresentando alterações prejudiciais a homeostase do eixo diminuindo fatores de estimulação de antioxidantes endógenos (Prevatto. et al, 2017).

Em relação a expressão de SOD, em todos os grupos houve marcação no tecido. No grupo SHR houve maior expressão de SOD, comparado ao grupo controle, Kyoto (Figura 17, C e A). Porém, nos grupos tratados com o citrato de sildenafil observamos que o grupo Kyoto + citrato de sildenafil apresentou maior marcação em relação ao grupo kyoto (Figura 17, B e A), o que pode caracterizar aumento do estresse ou estímulo da expressão da SOD pelo tratamento. O grupo SHR + citrato de sildenafil apresentou menor marcação do que o grupo SHR, o que pode resultar de uma diminuição do estresse oxidativo.

Acredita-se que a disfunção da respiração mitocondrial pode levar diretamente à produção de espécies reativas de oxigênio. Se o fluxo de elétrons é interrompido, intermediários respiratórios transferem elétrons para ânions superóxidos produtores de oxigênio molecular e H_2O_2 . Com a capacidade oxidativa mitocondrial prejudicada, as espécies reativas de oxigênio se acumulam. A diminuição da atividade enzimática da catalase parece ocorrer devido ao rápido consumo e exaustão do armazenamento destas enzimas, uma consequência de seu papel em evitar os radicais livres gerados pela hipertensão. Altas concentrações de

enzimas antioxidantes representam a tentativa de reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo, resultando na menor expressão da catalase (Marinho et al., 2018).

A hipertensão está associada à lesão endotelial, que pode resultar em apoptose, disfunção e ativação das células endoteliais causada por espécies reativas de oxigênio (Sakao S, 2009). A via do tipo II da apoptose envolve a via mitocondrial, desencadeando a liberação do citocromo c para aumentar a ativação da caspase-3 (Pérez AR. et al,2017). No nosso trabalho, observamos uma grande marcação de citocromo c nas células endoteliais dos vasos presentes na zona glomerulosa da adrenal, no qual o grupo hipertenso sem o tratamento apresentou maior expressão.

O estresse oxidativo pode levar as células a morte celular, sendo assim, realizamos as marcações para detectar Bax, Bcl-2 e citocromo c. A Bax é uma proteína pró-apoptótica, que desencadeia a liberação de caspases ou medeia a liberação do citocromo c. Já a Bcl-2 está envolvida na prevenção da apoptose, dificultando a clivagem e ativação de caspases ou restringindo a liberação de fatores apoptogênicos mitocondriais no citoplasma, (Li X. et al, 2018). A homeostasia em relação a apoptose se dá pelo balanço entre a quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de se combinar em homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2). O Bcl-2 inibe a apoptose prevenindo a liberação de citocromo c. A proteína Bax quando associada à *Bcl-2* induz a liberação da APAF-1 induzindo a apoptose pela ativação da caspase 9. A Bax pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas antiapoptóticas (Grivicich I, 2007). Em nosso estudo, os grupos tratados com o citrato de sildenafil demonstraram uma menor expressão de Bcl2 e um aumento da marcação para Bax na zona glomerulosa destes animais.

Em casos de estresse oxidativo ou depleção de nutrientes, a ativação da biogênese mitocondrial ajuda a “resgatar” as mitocôndrias da apoptose (Palikaras K. et al,2014). A estimulação da adenililciclase resulta num aumento do cAMP, que ativa a proteína quinase A (PKA) que, por sua vez, fosforila a proteína de ligação ao elemento responsiva ao AMP cíclico (CREB). O CREB é um ativador transcricional do PGC1 α e pode, portanto, estimular a biogênese mitocondrial. Finalmente, níveis

aumentados de GMPc induzidos pela restrição calórica e a inibição de fosfodiesterases podem estimular a ativação da PGC1 α e a biogênese mitocondrial *in vivo* (Bhargava P. et al,2017).

O co-ativador de receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama (PGC-1 α) é a principal proteína reguladora da biogênese mitocondrial (Ventura-Clapier R. et al, 2008). O artigo de Whitaker et al., 2013, demonstrou que um inibidor da fosfodiesterase 5 promove a formação de novas mitocôndrias no rim de ratos tratados com a droga. Estes achados corroboram com o nosso trabalho, no qual a marcação para PGC1 α foi bem expressiva na zona glomerulosa dos animais Kyoto tratados e SHR tratados em relação aos seus respectivos controles. Esta pode ser uma das formas pela qual o citrato de sildenafil poderia reverter a apoptose tecidual da zona glomerulosa causada na hipertensão.

Na avaliação ultraestrutural observamos que nos animais tratados com o citrato de sildenafil as mitocôndrias apresentavam cristas tubulares definidas. A imagem dos animais tratados (Figura 22, B e D) um aumento no número de grânulos de secreção em amadurecimento sugerindo que o citrato de sildenafil pode possuir um papel estimulatório. No grupo SHR (Figura 22, D) podemos ver alguns lisossomos demonstrando intensa renovação de estruturas possivelmente danificadas. Nos grupos Kyoto e SHR (Figura 22, A e C) podemos observar mitocôndrias com cristas bem definidas em disposição paralelas diferindo das mitocôndrias dos grupos tratados com o citrato de sildenafil que possuíam um padrão tubular característico de mitocôndrias sintetizadoras de hormônios esteróides. Podemos notar também que o citoplasma dos grupos tratados na figura 22, B e C, com uma configuração mais eletrondensa que dificulta a delimitação da membrana mitocondrial.

CONCLUSÃO

Com este trabalho, podemos concluir que o citrato de sildenafil é capaz atenuar os danos gerados pelo processo hipertensivo, pois foi capaz de melhorar a integridade da cápsula da adrenal, auxiliou na proliferação de células para a zona glomerulosa, melhorou os níveis de SOD na zona glomerulosa, diminuiu o estresse oxidativo e reduziu a expressão do citocromo c, o que caracterizou diminuição do dano mitocondrial, e conseqüentemente reduziu a apoptose.

Nossos resultados corroboram com a literatura mostrando o potencial do citrato de sildenafil como um fator antioxidante capaz de causar um efeito protetivo na zona glomerulosa de animais hipertensos. Estes dados podem significar o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento dos casos de estresse oxidativo, para avançarmos no entendimento sobre a hipertensão essencial e seus efeitos.

REFERÊNCIAS

- BHARGAVA P, SCHNELLMANN RG. Mitochondrial energetics in the kidney.. **Nat Rev Nephrol.** , p. 629-646, 2017.
- BHATTI, J. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.** **2017 May**, p. 1863(5):1066-1077, 2016.
- CAVALCANTI CO, ALVES RR, DE OLIVEIRA AL, CRUZ JC, DE FRANÇA-SILVA MS. Inhibition of PDE5 Restores Depressed Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats. **Front Physiol.**, p. 7:15, 2016.
- DENG B, SHEN WJ, DONG D, AZHAR S, KRAEMER FB. Plasma membrane cholesterol trafficking in steroidogenesis. **FASEB J.**, p. 1389-1400, 2019.
- DORIS, P. Genetics of hypertension: an assessment of progress in the spontaneously hypertensive rat. **Physiol Genomics.**, p. 601-617, 2017.
- DRELON C, BERTHON A, MATHIEU M, MARTINEZ A, VAL P. Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: A WNT perspective. **Mol Cell Endocrinol.**, p. 156-164, 2015.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death.. **Toxicol Pathol.**, p. 495-516, 2007.
- FARIA AP, MODOLO R, MORENO BV, MORENO H. Effects of PDE type 5 inhibitors on left ventricular diastolic dysfunction in resistant hypertension. **Arq Bras Cardiol.**, p. 85-89, 2015.
- GRIVICICH, I. Morte Celular por Apoptose.. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 335-343, 2007.
- GU C, TAN H, YANG J, LU Y. Congenital adrenal hyperplasia due to 11-hydroxylase deficiency-Compound heterozygous mutations of a prevalent and two novel CYP11B1 mutations. **Gene.**, p. 89-94, 2017.
- HAGE, F. C-reactive protein and hypertension. **J Hum Hypertens.**, p. 410-415, 2014.
- HATTANGADY NG, OLALA LO, BOLLAG WB, RAINEY WE. Acute and chronic regulation of aldosterone production.. **Mol Cell Endocrinol.**, p. 151-62, 2012.
- IBGE, I. B. D. G. E. E. –. **Pesquisa Nacional de Saúde: Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas.** [S.l.]. 2013.
- JOINT-7, U. S. D. O. H. A. H. S. R. (. **The Seventh Report of the Joint National Committee on: Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.** [S.l.]. 2017.

JUNQUEIRA, LUIZ CARLOS UCHOA. **Junqueira & Carneiro, Histologia básica.** 12. ed. ed. [S.I.]: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

KHAMES A, KHALAF MM, GAD AM, ABD EL-RAOUF OM. Ameliorative effects of sildenafil and/or febuxostat on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats.. **Eur J Pharmacol.** , p. 118-124, 2017.

KOPF PG, PARK SK, HERRNREITER A, KRAUSE C, ROQUES BP, CAMPBELL WB. Obligatory Metabolism of Angiotensin II to Angiotensin III for Zona Glomerulosa Cell-Mediated Relaxations of Bovine Adrenal Cortical Arteries. **Endocrinology.**, p. 238-247, 2018.

LABORATÓRIOS PFIZER LTDA. **Bula do medicamento citrato de sildenafil, Viagra ®.** [S.I.]. 2015.

LI X, QU Z, JING S, LI X, ZHAO C, MAN S, WANG Y. Dioscin-6'-O-acetate inhibits lung cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis. **Phytomedicine.**, p. 124-133, 2018.

M BEG, A GUPTA, VN KHANNA. Oxidative Stress in Essential Hypertension and Role of Antioxidants. **Journal, Indian Academy of Clinical Medicine** , 2010.

MACINKO J, LEVENTHAL DGP, LIMA-COSTA MF. Primary Care and the Hypertension Care Continuum in Brazil.. **J Ambul Care Manage.**, p. 34-46, 2018.

MACKENZIE SM, VAN KRALINGEN JC, DAVIES E. Regulation of Aldosterone Secretion. **Vitam Horm.**, p. 241-263, 2019.

MERGIA E, STEGBAUER J. Role of Phosphodiesterase 5 and Cyclic GMP in Hypertension.. **Curr Hypertens Rep.**, p. 39, 2016.

MILLER, W. Steroidogenesis: Unanswered Questions. **Trends Endocrinol Metab.**, p. 771-793, 2017.

MITANI F, OGISHIMA T, MIYAMOTO H, ISHIMURA Y. Localization of P450aldo and P45011 beta in normal and regenerating rat adrenal cortex. **Endocr Res.**, p. 413-23, 1995.

MITANI, F. Functional zonation of the rat adrenal cortex: the development and maintenance.. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.**, p. 163-83, 2014.

MORSY MA1, IBRAHIM SA, AMIN EF, KAMEL MY, RIFAAI RA, HASSAN MK. Sildenafil Ameliorates Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats: Role of iNOS and eNOS.. **J Toxicol.** , 2014.

NICKERSON, P. The adrenal cortex in spontaneously hypertensive rats. A quantitative ultrastructural study.. **Am J Pathol.** , p. 545-60, 1976.

ORDUNEZ P, CAMPBELL N. Global health metrics and non-communicable diseases: the case of hypertension.. **Lancet Diabetes Endocrinol.**, p. 763, 2015.

PALIKARAS K, T. N. Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. **Exp Gerontol.**, p. 182-8, 2014.

PÉREZ AR, LAMBERTUCCI F, GONZÁLEZ FB, ROGGERO EA, BOTTAS. Death of adrenocortical cells during murine acute T. cruzi infection is not associated with TNF-R1 signaling but mostly with the type II pathway of Fas-mediated apoptosis.. **Brain Behav Immun.**, 2017.

PERK H, ARMAGAN A, NAZIROĞLU M, SOYUPEK S, HOSCAN MB, SÜTCÜ R, OZORAK A, D. Sildenafil citrate as a phosphodiesterase inhibitor has an antioxidant effect in the blood of men. **J Clin Pharm Ther.**, p. 635-40, 2008.

POLYANA C. MARINHO ,1 ALINE B. VIEIRA ,2 PRISCILA G. PEREIRA,1 KÍSSILA RABELO,1 BIANCA T. CIAMBARELLA,1 ANA L. R. NASCIMENTO,1 ERIKA CORTEZ ,3 ANÍBAL S. MOURA,4 FERNANDA V. GUIMARÃES,5 MARCO A. MARTINS,5 GONZALO BARQUERO,6 RODRIGO N. FERREIRA,7 AND JORGE. Capybara Oil Improves Hepatic Mitochondrial Dysfunction, Steatosis, and Inflammation in a Murine Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018.

PRASAD R, KOWALCZYK JC, MEIMARIDOU E, STORR HL, METHERELL LA. Oxidative stress and adrenocortical insufficiency.. **J Endocrinol.**, p. 63-73, 2014.

PREVATTO JP, TORRES RC, DIAZ BL, SILVA PMRE, MARTINS MA. Antioxidant Treatment Induces Hyperactivation of the HPA Axis by Upregulating ACTH Receptorin the Adrenal and Downregulating Glucocorticoid Receptors in the Pituitary. **Oxid Med Cell Longev.**, 2017.

SAKAO S, TATSUMI K, VOELKEL NF. Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation.. **Respir Res.**, 2009.

SANJULIANI A, TORRES M, PAULA L , BASSAN F. Eixo renina-angiotensina-aldosterona: bases fisiológicas e fisiopatológicas. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**, 2011.

SHOKOLENKO IN, WILSON GL, ALEXEYEV MF. Aging: A mitochondrial DNA perspective, critical analysis and an update.. **World J Exp Med.**, p. 46-57, 2014.

SOLAK Y, AFSAR B, VAZIRI ND, ASLAN G, YALCIN CE, COVIC A, KANBAY M. Hypertension as an autoimmune and inflammatory disease.. **Hypertens Res.**, p. 567-73, 2016.

SPERANZA L, FRANCESCHELLI S, PESCE M, VINCIGUERRA I, DE LUTIIS MA, GRILLI A, FELACO M, PATRUNO A. Phosphodiesterase type-5 inhibitor and oxidative stress.. **Int J Immunopathol Pharmacol.**, 2008.

TE RIET L, VAN ESCH JH, ROKS AJ, VAN DEN MEIRACKER AH, DANSER AH. Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations.. **Circ Res.**, p. 960-75, 2015.

TSAI LC, B. J. The roles of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) in steroidogenesis. **Curr Opin Pharmacol.** , p. 670-5, 2011.

TURCU AF, AUCHUS RJ. Adrenal steroidogenesis and congenital adrenal hyperplasia.. **Endocrinol Metab Clin North Am.**, p. 275-96, 2015.

VENTURA-CLAPIER R, GARNIER A, VEKSLER V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha.. **Cardiovasc Res.** , p. 208-17, 2008.

VIDAL, V. The adrenal capsule is a signaling center controlling cell renewal and zonation through Rspo3. **Genes Dev.**, p. 1389-94, 2016.

VIGITEL, MINISTÉRIO DA SAÚDE-SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DE DOENÇAS E AGRAVOS NÃO TRANSMISSÍVEIS E PROMOÇÃO DA SAÚDE. **VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO (Vigitel).** [S.I.]. 2016.

WHITAKER RM, WILLS LP, STALLONS LJ. cGMP-selective phosphodiesterase inhibitors stimulate mitochondrial biogenesis and promote recovery from acute kidney injury.. **J Pharmacol Exp Ther.**, p. 626-34, 2013.

YAGUAS K, BAUTISTA R, QUIROZ Y, FERREBUZ A, PONS H, FRANCO M, VAZIRI ND, RODRIGUEZ-ITURBE. Chronic sildenafil treatment corrects endothelial dysfunction and improves hypertension. **Am J Nephrol.**, p. 283-91, 2010.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação dos efeitos do citrato de sildenafil no córtex da glândula adrenal de ratos espontaneamente hipertensos**", registrada com o nº 017/2018, 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 Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 27/03/2018.

| | |
|-------------------------|---|
| Finalidade | <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 27/03/2022 |
| Espécie/linhagem/raça | Rato Wistar Kyoto / SHR |
| Nº de animais | 20 |
| Peso/idade | 400 g / 120 dias |
| Sexo | Macho |
| Origem | Botério setaria |

Rio de Janeiro, 27 de Março de 2018.

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

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

ANEXO B – Comprovação de submissão do 1º artigo científico

Journal of Hypertension

Evaluation of sildenafil effects on morphology and oxidative stress of adrenal glomerular zone in spontaneously hypertensive animals

–Manuscript Draft–

| | |
|--|--|
| Manuscript Number: | |
| Full Title: | Evaluation of sildenafil effects on morphology and oxidative stress of adrenal glomerular zone in spontaneously hypertensive animals |
| Short Title: | Evaluation of sildenafil on morphology and oxidative stress in spontaneously hypertensive animals |
| Article Type: | Original Manuscript |
| Keywords: | Hypertension; ROS; Adrenal glomerular Zone; Sildenafil |
| Corresponding Author: | Victor Hugo Vieira de Oliveira Araujo Universidade do Estado do Rio de Janeiro Rio de Janeiro - RJ, BRAZIL |
| Corresponding Author's Institution: | Universidade do Estado do Rio de Janeiro |
| First Author: | Victor Hugo Vieira de Oliveira Araujo |
| Order of Authors: | Victor Hugo Vieira de Oliveira Araujo Sheila Nunes GRACIANO Ana Lucia Rosa Nascimento Kissila Rabelo Jorge José de Carvalho |
| Abstract: | <p>Essential hypertension has a multifactorial origin and the most appropriate animal model is the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR). Hypertension is associated with reactive oxygen species increase, combining with vital cellular components causing structural damage. Sildenafil citrate is an inhibitor of phosphodiesterase 5 that allows prolongment of vasorelaxment. Our aim is the adrenal's glomerular zone, responsible for hormones production that act on reabsorption of sodium. All adrenal steroid hormones are produced by mitochondria, which suffers directly with oxidative stress damage. Initially, we evaluated in histology a decrease in zona glomerulosa thickness in SHR, which was reversed through cell proliferation in treated group. Sod's expression was elevated during hypertension and the treatment reduce it expression. The enzyme catalase did not present high levels of expression in the SHR group, which may have occurred due to protein exhaustion, but the expression increase with treatment. The detection of cytochrome C as well as the pro-apoptotic Bax protein were higher in the hypertensive group, indicating the apoptotic process at zona glomerulosa in this group. The treatment with sildenafil citrate show a protective effect. In the analysis of mitochondrial biogenesis, it was observed that sildenafil citrate stimulate the synthesis of PGC1α in treated animals. In the zona glomerulosa ultrastructural evaluation, we observed preserved mitochondria tubular crests with treatment, which had a greater number of secretory granules at cytoplasm in normotensive and SHR treated groups. Thus all results indicate that sildenafil citrate may attenuate effects of oxidative stress on hypertension.</p> |