

Campus Realengo
Graduação em Farmácia

Douglas Val Quintans Nunes

Efeitos do tempol sobre o estresse oxidativo e alterações estruturais e funcionais renais em modelo de hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe.

Rio de Janeiro
2021

DOUGLAS VAL QUINTANS NUNES

Efeitos do tempol sobre o estresse oxidativo e alterações estruturais e funcionais renais em modelo de hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia

Orientadoras:

Prof^a Dr^a Dayane Teixeira Ognibene

Prof^a Dr^a Mariana Martins Gomes Pinheiro

Rio de Janeiro
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.

Elaborada por Karina Barbosa dos Santos

Bibliotecária - CRB 7 n° 6212

N972 Nunes, Douglas Val Quintans

Efeitos do tempol sobre o estresse oxidativo e alterações estruturais e funcionais renais em modelo de hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe. / Douglas Val Quintans Nunes, 2020.

48f. : il.

Orientador: Prof^a Dr^a Dayane Teixeira Ognibene.

Prof^a Dr^a Mariana Martins Gomes Pinheiro.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Instituto Federal do Rio de Janeiro, 2020.

1. Dano renal. 2. Hipertensão renovascular. 3. Tempol . I. Instituto Federal do Rio de Janeiro. Campus Realengo. II. Ognibene, Dayane Teixeira. III. Pinheiro, Mariana Martins Gosmes. IV. Título.

COBIB/CReal

CDU 615


Douglas Val Quintans Nunes

**EFEITOS DO TEMPOL SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÕES
ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS RENAIS EM MODELO DE HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR 2 RINS, 1 CLIPE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Data da aprovação: 01/02/2021.

Banca Examinadora:



Dr^a. Dayane Teixeira Ognibene (Orientadora Externa – UERJ)



Dr^a. Mariana Martins Gomes Pinheiro (Orientadora Interna – IFRJ)



Dr^a. Cristiane Aguiar da Costa (UERJ)



Dr^a. Grazielle Freitas de Bem (UERJ)

Rio de Janeiro
2021

AGRADECIMENTOS

Sempre que imaginei a escrita desta parte lembrava da minha avó Maria José, mulher do interior do nordeste que se tornou farmacêutica apesar de todas as contravenções e impossibilidades que a vida lhe impôs. Vó, a sua vida e trajetória foram vitais para tornar possível essa conquista! Foi a partir de seus passos que pude caminhar adiante. Nos momentos mais difíceis, lembrar de você me inspirava a seguir. Te dedico este trabalho, meu agradecimento e amor, muito obrigado por tanto!

Aos meus pais, Wallace e Carla, por me ensinarem que a educação era fundamental. Pelos esforços possíveis ao longo dos anos para oferecerem o que acreditavam ser o melhor.

À minha irmã Carolina, pela leveza que você me traz!

À minha madrinha por todo suporte que me ofereceu ao longo da vida!

Às instituições e servidores da UEZO, IFRJ e UERJ pela minha formação.

À Dayane por todos esses anos, como professora, orientadora e amiga. Apreendi muito! Obrigado pela formação que foi para além da ciência, por toda ajuda, escuta e respeito ao longo desse processo.

Aos amigos que fiz ao longo dessa trajetória, vocês são importantes demais para mim!

Aos professores e amigos que fiz no laboratório. Vocês colaboraram para que isso fosse possível.

À Mariana por ter feito parte deste processo e ainda aceitar me orientar nesta reta final tão importante.

Obrigado a todos!

NUNES, Douglas Val Quintans. *Efeitos do tempol sobre o estresse oxidativo e alterações estruturais e funcionais renais em modelo de hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe*. -- f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia, Instituto federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2020.

RESUMO

Tempol, um nitróxido sintético mimético da enzima superóxido dismutase, demonstra atenuar danos induzidos por espécies reativas, exercendo efeitos benéficos em modelos animais de estresse oxidativo e hipertensão. Este estudo investigou os efeitos do tempol em alterações estruturais e funcionais renais de ratos com hipertensão renovascular dois rins, um clipe (2R1C). Ratos Wistar jovens e machos tiveram a artéria renal esquerda clipada (2R1C), e animais operados apenas com laparotomia (Sham) foram usados como grupos controle. O protocolo experimental foi de 5 semanas, em que os animais receberam tempol (1mmol/L em água potável, na mamadeira) ou veículo (água) de forma preventiva. A pressão arterial sistólica foi avaliada uma vez por semana. Ao final do período experimental, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina (24h) e, em seguida, anestesiados com tiopental (70mg/kg, via intraperitoneal). A coleta de sangue foi feita por punção da aorta descendente para análise bioquímica e o rim clipado retirado para análises morfológicas e imuno-histoquímicas. O efeito vasodilatador do tempol foi avaliado em leito arterial mesentérico (LAM) isolado de ratos Wistar adultos. O tratamento preventivo com tempol impediu o desenvolvimento da hipertensão arterial e o aumento dos níveis plasmáticos de ureia, creatinina e 8-isoprostano em animais 2R1C. O tempol também melhorou tanto o número de glomérulos quanto o volume renal para níveis normais no grupo 2R1C+Tempol. Além disso, o tratamento impediu o aumento da deposição de colágeno e da imunomarcagem para renina, caspase-3 e 8-isoprostano no rim clampeado de animais 2R1C. O tempol foi capaz de induzir resposta vasodilatadora dose-dependente em LAM de ratos Wistar. Esses resultados sugerem que o tempol protege o rim clampeado contra o dano renal crônico isquêmico e previne a disfunção renal no modelo 2R1C, provavelmente através de suas ações antioxidante, vasodilatadora e anti-hipertensiva.

Palavras-chave: Antioxidante. Dano renal. Hipertensão renovascular. Tempol. Hipertensão dois rins e um clipe.

NUNES, Douglas Val Quintans. *Effects of tempol on oxidative stress and renal structural and functional changes in a model of renovascular hypertension 2 kidneys, 1 clip*. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia, Instituto federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2021.

ABSTRACT

Tempol, a synthetic nitroxide superoxide dismutase-mimetic drug, has been shown to mitigate radical-induced damage, exerting beneficial effects in the animal models of oxidative stress and hypertension. This study investigated the effects of tempol on renal structural and functional changes in hypertensive rats with two kidneys, one-Clip hypertensive rats. Young and male Wistar rats had the left renal artery clipped (2R1C), and animals operated only with laparotomy (sham) were used as controls. The experimental protocol was 5 weeks, in which the animals received tempol (1mmol / L in drinking water) or vehicle (water). Systolic blood pressure was evaluated once a week. At the end of the experimental period, the animals were placed in metabolic cages for urine collection (24h) and then anesthetized with thiopental (70mg / kg intraperitoneal). Blood was collected by puncturing the descending aorta for biochemical analysis, and the clipped kidney for morphological and immunohistochemical analysis. The vasodilator effect of Tempol was evaluated in mesenteric arterial bed (MAB) isolated from adult Wistar rats. The preventive treatment with tempol prevented the development of hypertension and the increased plasma levels of urea, creatinine, and 8-isoprostane in 2K1C animals. Tempol also improved both glomeruli number and kidney volume to normal levels in the 2K1C+Tempol group. In addition, the treatment prevented the increased collagen deposition and immunostaining for renin, caspase-3, and 8-isoprostane in the stenotic kidney of 2K1C animals. Moreover, tempol induced a dose-dependent vasodilator response in MAB from Wistar rats. These results suggest that tempol protects the stenotic kidney against chronic ischemic renal injury and prevents renal dysfunction in the 2K1C model, probably through its antioxidant, vasodilator and antihypertensive actions.

Keywords: Antioxidant. Renal injury. Renovascular hypertension. Tempol. Two-kidney one-clip hypertension.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2R1C	2 rins, 1 clipe
AA	Ácido araquidônico
ACh	Acetilcolina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AVE	Acidente vascular encefálico
BK	Canais de potássio de grande condutância
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAP	Doença arterial periférica
DCV	Doenças cardiovasculares
DIC	Doenças isquêmicas do coração
DRC	Doença renal crônica
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ER	Espécies reativas
ERC	Espécies reativas de carbono
ERCI	Espécies reativas de cloro
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERS	Espécies reativas de sulfeto
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
GSSG	Glutaciona oxidada
HA	Hipertensão arterial
IAM	Infarto agudo do miocárdio
LAM	Leito arterial mesentérico
mmHg	Milímetro de mercúrio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NE	Norepinefrina
NG	Nitroglicerina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
RAT ₁	Receptor de angiotensina II subtipo 1
RAT ₂	Receptor de angiotensina II subtipo 2
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SOD	Superóxido dismutase
SRA	Sistema renina angiotensina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	10
1.2 DOENÇAS HIPERTENSIVAS.....	11
1.2.1 Hipertensão renovascular.....	12
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E HIPERTENSÃO.....	14
1.3.1 Antioxidantes.....	18
1.3.2 Tratamento farmacológico da hipertensão renovascular	20
1.3.3 Tempol	20
1.4 OBJETIVOS.....	21
1.4.1 Objetivo geral.....	21
1.4.2 Objetivos específicos.....	21
1.5 METODOLOGIA.....	22
2 DESENVOLVIMENTO	28
2.1 EFEITO VASODILATADOR DO TEMPOL EM LAM DE RATOS WISTAR.....	28
2.2 EFEITOS DO TEMPOL SOBRE A PRESSÃO ATERIAL SISTÓLICA E OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NO MODELO 2R1C.....	29
2.3 RENINA.....	30
2.4 EFEITOS DO TEMPOL SOBRE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS RENAS.....	31
2.4.1 Estereologia renal	31
2.4.2 Deposição de colágeno renal	33
2.5 EFEITOS DO TEMPOL NA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE DANO OXIDATIVO E DE APOPTOSE.....	34
2.6 Discussão	37
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

No Brasil, o perfil da morbimortalidade sofreu alterações nas últimas décadas devido ao aumento da expectativa de vida da população, redução da taxa de mortalidade infantil e por doenças infecciosas. Caracterizando, dessa forma, uma transição epidemiológica, complexa mudança da relação saúde/doença, que envolve determinantes demográficos, econômicos e sociais (PEREIRA; ALVES-SOUZA; VALE, 2015).

As doenças cardiovasculares (DCV) são um grupo de patologias que envolve o coração e os vasos sanguíneos e apresentam elevada morbimortalidade global (OMS, 2017). Em 2015, as DCV foram responsáveis por 1/3 das mortes no mundo, com prevalência estimada em 422 milhões de casos (ROTH, *et al.*, 2017). A doença isquêmica do coração (DIC) e o acidente vascular encefálico (AVE) foram as principais ocorrências em 2016, totalizando 15,2 milhões dos óbitos. Nos anos 2000, ambas já eram as mais expressivas, demonstrando que os desafios na redução da mortalidade destas se mantêm (OMS, 2018).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia, de 2004 a 2014, as DCV foram responsáveis por 28,73% do total de óbitos, sendo:

Tabela 1: Número de óbitos de acordo com os grupos de causas no Brasil, 2004 a 2014

Grupo de Causas	Total de Óbitos
Acidente vascular encefálico	1.055.643 (8,68%)
Doenças isquêmicas do coração	1.069.653 (8,80%)
Doenças Hipertensivas	457.305 (3,76%)
Outras doenças circulatórias	910.858 (7,49%)
Neoplasias	1.899.311 (15,62%)
Causas externas	1.538.892 (12,66%)
Respiratórias	1.276.345 (10,50%)
Mal definidas	931.234 (7,66%)
Digestivas	618.854 (5,09%)
Diabetes	560.300 (4,61%)
Outras doenças	1.839.541 (15,13%)

DCV sinalizadas de vermelho

Fonte: Adaptado SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017

1.2 DOENÇAS HIPERTENSIVAS

O sistema circulatório assegura a vitalidade do corpo, pois transporta oxigênio, nutrientes, os metabólitos a serem eliminados, hormônios e outros. O coração e os vasos sanguíneos são controlados para produzirem um débito cardíaco e pressão arterial (PA) necessária, gerando um fluxo sanguíneo que atenda à demanda de transporte requerida pelos tecidos do organismo. A força exercida contra a parede vascular é a pressão sanguínea, mensurada em milímetro de mercúrio (mmHg) devido ao histórico uso do manômetro de mercúrio, invenção de Poiseuille em 1846 (GUYTOHN; HALL, 2011). A PA, pressão sanguínea nas artérias sistêmicas, está relacionada à razão entre pressão arterial sistólica (PAS), ou seja, a pressão sanguínea no momento de contração cardíaca e a pressão arterial diastólica (PAD), o momento em que há relaxamento muscular cardíaco (OPARIL *et al.*, 2018).

A manutenção fisiológica da PA é resultante de uma complexa interação, envolvendo fatores como o volume sanguíneo e débito cardíaco, ao sistema neuro-humoral, incluindo o papel do sistema nervoso simpático (SNS), do sistema renina angiotensina (SRA), do sistema imunológico, dos peptídeos natriuréticos e do endotélio vascular. Alterações que comprometem o funcionamento destes sistemas ou a integração entre eles, podem levar a um aumento médio e/ou a variabilidade da PA, que ao longo do tempo provoca lesões em órgãos-alvo e outras DCV (OPARIL *et al.*, 2018).

Além disso, fatores ambientais e determinantes sociais integram as variáveis associadas ao aumento da PA (CAREY *et al.*, 2018). Determinantes sociais são definidos pela OMS como:

“Circunstâncias em que pessoas nascem, crescem, vivem, trabalham, envelhecem e os sistemas colocados em prática para lidar com as doenças.” (CSDH, 2008)

Demarcando, portanto, como posições ocupadas por indivíduos dentro da estrutura estratificada da sociedade, lhes asseguram maiores oportunidades de acesso à saúde, educação, renda, alimentação, melhores condições laborais, dentre outros, que influem no estilo de vida. Introduzidos na infância ou no início da vida adulta, os fatores ambientais como atividade física insuficiente, dieta não

saudável, consumo excessivo de sódio dietético e ingestão inadequada de potássio, sobrepeso/obesidade, consumo de álcool e tabagismo estão relacionados ao desenvolvimento da hipertensão arterial (HA) (CAREY *et al.*, 2018).

A elevação sustentada dos níveis pressóricos, PAS \geq 140 e/ou PAD \geq 90 mmHg, caracteriza a HA que atinge 32,5% (36 milhões) de adultos e mais de 60% dos idosos no país, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por DCV. A HA possui associação independente com outras condições clínicas e eventos como AVE, infarto agudo do miocárdio (IAM), doença arterial periférica (DAP) e doença renal crônica (DRC). Repercutindo, portanto, em óbitos, alta frequência de internações, perda da produtividade do trabalho e da renda familiar, um considerável impacto socioeconômico (DIRETRIZ..., 2016).

A hipertensão é o fator de risco evitável mais comum para as DCV e sua etiologia pode ser classificada como: primária ou essencial quando a causa é heterogênea, não sendo possível ser determinada mesmo após extensa investigação clínica, possui o componente genético e ambiental como fatores predominantes; secundária ou não essencial quando a etiologia pode ser definida, como por exemplo, no aldosteronismo primário, feocromocitoma ou estenose da artéria renal (OPARIL *et al.*, 2018).

1.2.1 Hipertensão renovascular

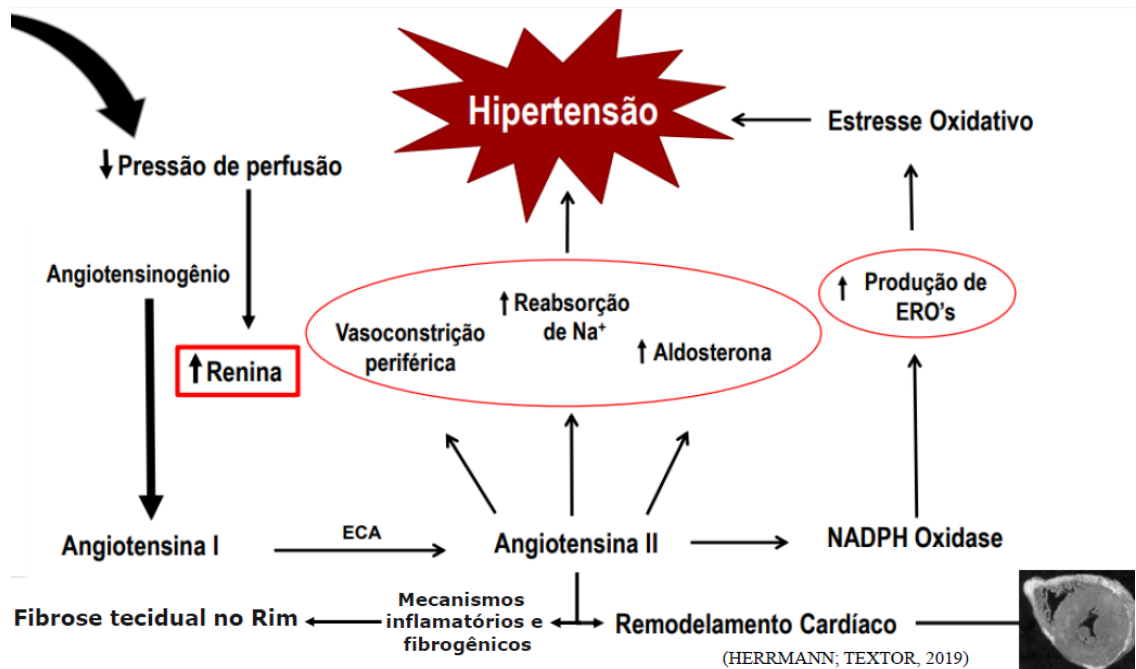
A hipertensão renovascular é o caso mais prevalente de etiologia secundária, tem como causa a doença renovascular e pode representar até 5% dos casos de hipertensão. A estenose da artéria renal por origem aterosclerótica, a mais associada, resulta em hipoperfusão renal e ativação de forma patológica do SRA (HERRMANN; TEXTOR, 2017).

O papel fisiológico do SRA é importante quando há reduções no volume plasmático, que pode resultar em baixa pressão de perfusão renal, diminuição da carga de sódio no túbulo distal e/ou resposta do sistema nervoso simpático por queda da pressão arterial, já que a via produz respostas que restabelecem a hemodinâmica cardiovascular (PETI-PETERDI; HARRIS, 2010).

Na visão clássica da via, estas circunstâncias estimulam a secreção da enzima renina pelas células justaglomerulares do córtex renal. Sua ação é a

clivagem do angiotensinogênio (AGT) circulante inativo em angiotensina I (Ang I), substrato da enzima conversora de angiotensina (ECA), que a converte em angiotensina II (Ang II), com ação em dois receptores: receptor de angiotensina II tipo 1 (RAT1) que induz vasoconstrição periférica, liberação de vasopressina e aldosterona, anti-diurese e anti-natriurese, conforme retratado na Figura 1, enquanto o receptor de angiotensina II subtipo 2 (RAT2) produz ações que contrapõem essa resposta, junto a outros componentes da via, modulando o efeito final (CHAPPELL, 2016). Essa é uma retratação do SRA sistêmico, que envolve a participação de vários órgãos, como o AGT produzido no fígado, a renina que é produzido no rim e a ECA que está majoritariamente presente no endotélio pulmonar. Porém já está documentada a existência de SRA locais em múltiplos tecidos, como no rim, em que há evidências de possuir todos os elementos necessários para produção de Ang II, demonstrando complexidade do SRA em seus efeitos sistêmicos e os desdobramentos locais (YANG; XU, 2017).

Figura 1: Retratação da ativação patológica do SRA



Conforme ilustrado na Figura 1, a hiperatividade do SRA gera um quadro de hipertensão, contribuindo para diversas alterações estruturais e funcionais em órgãos-alvo. Além disso, essa hiperatividade do SRA sistêmico leva a um aumento

expressivo do SRA intrarenal, condicionando que a interação de Ang II seja majoritariamente com RAT1 (CASARE *et al.*, 2016). Elevados níveis de Ang II estão relacionados à lesão vascular pela indução exacerbada da vasoconstrição, proliferação e hipertrofia das células musculares lisas, degradação da matriz extracelular, inflamação vascular, aumento da contratilidade miocárdica, fibrose e estresse oxidativo (CALZERRA *et al.*, 2018). Montezano e colaboradores apontam que a injúria vascular, caracterizada pela disfunção do endotélio, ocorre de forma alicerçada a outros processos, destacando que Ang II possui como mecanismo para seus efeitos fisiopatológicos a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) via enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase vascular (MONTEZANO *et al.*, 2014).

Diferentes modelos experimentais reproduzem as condições fisiopatológicas da hipertensão renovascular humana, sendo um dos mais conhecidos o modelo 2 rins, 1 clipe (2R1C) de Goldblatt e colaboradores. Neste modelo, um clipe de prata é colocado na artéria renal esquerda, mimetizando a estenose renal humana, e com a obstrução parcial do fluxo sanguíneo ocorre o desenvolvimento da hipertensão renovascular (GOLDBLATT *et al.*, 1934) que é dependente de renina. O aumento de Ang II neste modelo aciona mecanismos inflamatórios e fibrogênicos, ocasionando remodelamento vascular, fibrose tecidual no rim e hipertrofia ventricular. Além do aumento da atividade simpática, a disfunção endotelial e o estresse oxidativo também estão presentes (HERRMANN; TEXTOR, 2019).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E HIPERTENSÃO

Espécies reativas (ER) são um produto comum do metabolismo celular e desempenham efeitos fisiológicos importantes, mas são quimicamente instáveis e por isso podem reagir com uma série de estruturas e componentes do organismo. Já está amplamente descrito que os sistemas biológicos não só convivem como contam com uma regulação redox que transforma essas espécies em produtos menos reativos ou não reativos. Porém, não havendo equilíbrio, o excesso de espécies reativas gera um desbalanço, oxidante > antioxidante, nomeado como estresse oxidativo, que tem sido amplamente associado a diversos processos

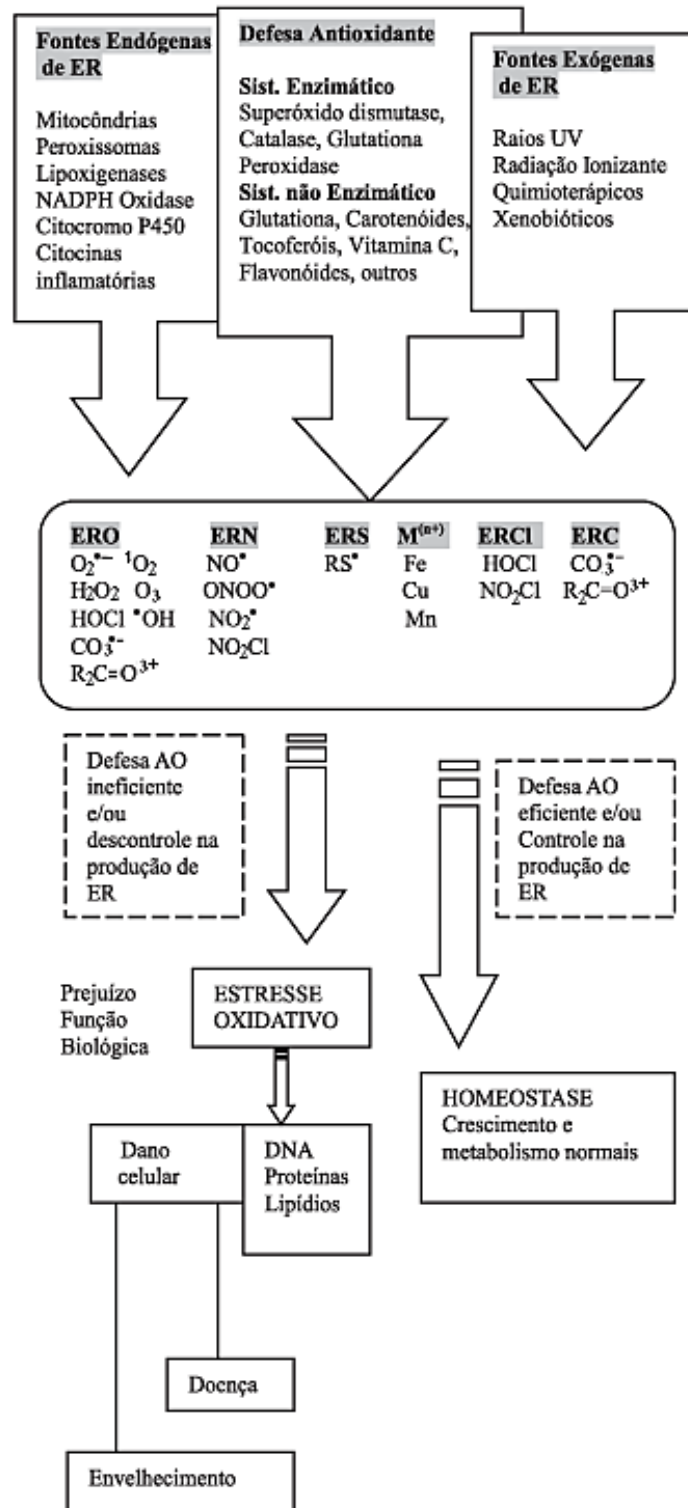
fisiopatológicos como na hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, aterosclerose, dentre outras complicações cardiovasculares e renais (GRIENGLING *et al.*, 2016).

Para além de serem um produto do metabolismo celular, o acúmulo de ER também pode ter origem exógena a partir da exposição a poluentes ambientais, radiação ionizante, fumaça de tabaco (GRIENGLING *et al.*, 2016) e outros, conforme esquematizado pela Figura 2.

As fontes endógenas de ER são múltiplas, destacando-se as mitocôndrias, que são organelas celulares responsáveis pela fosforilação oxidativa para a obtenção de energia, mas que geram ER como subproduto, por exemplo o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conforme mostrado na Figura 2. Atualmente, são reconhecidos inúmeros outros papéis mitocondriais além da fosforilação oxidativa, como na morte celular programada, imunidade inata, autofagia, sinalização redox, homeostase do cálcio e outros, processos que demandam a participação dessas ER, que ainda sim, quando em excesso, ocasionam efeitos deletérios (DUNN *et al.*, 2015).

Outra importante fonte endógena são as enzimas lipoxigenases e ciclo-oxigenases, que participam do metabolismo do ácido araquidônico (AA) oriundo da atividade da fosfolipase citosólica A_2 sobre fosfolipídeos. O produto principal da via são os eicosanoides bioativos, como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e outros, que possuem papel central na inflamação, imunidade e como mensageiros do sistema nervoso central. Durante a oxidação do AA por essas enzimas há também geração de ERO como subproduto. Estudos também sugerem que intermediários de ambas as enzimas, lipoxigenases e ciclo-oxigenases, são capazes de estimular a produção de ERO via enzima NADPH (CHO; SEO; KIM, 2011).

Figura 2: Fontes e respostas celulares as espécies reativas



Fontes de espécies reativas (ER), de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), de enxofre (ERS), de cloro (ERCl), de carbono (ERC), metais de transição (M^{n+}) e atuação da defesa antioxidante (AO) em contextos fisiológicos e fisiopatológicos.

Fonte: VASCONCELOS, 2007.

A NADPH oxidase é um complexo enzimático que ocupa a membrana plasmática celular dos mais variados tipos, incluindo células endoteliais e musculares lisas, que constituem os vasos sanguíneos. Evidências demonstram que a Ang II estimula a produção de O_2^- nos vasos através da NADPH oxidase, levando à redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), produto da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (FÖRSTERMANN, 2010). São dois os mecanismos principais envolvidos nessa redução: ERO podem interagir diretamente com o NO, o que leva a sua inativação e formação do ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), uma ERN com alto potencial oxidante; e/ou reduzem a biodisponibilidade por interagirem com substratos e cofatores das sintases de NO, como a oxidação do cofator tetraidrobiopterina (BH_4) da NOS endotelial (DIAS; NEGRAO; KRIEGER, 2011).

Sendo uma das substâncias vasoativas que asseguram a homeostase cardiovascular, o NO além de promover vasodilatação, previne agregação e adesão plaquetária, inibe a proliferação das células musculares lisas e ativação de genes pró-inflamatórios. Portanto, a redução da biodisponibilidade do NO é apontada como um fator de risco cardiovascular, sendo associada como fenótipo na hipertensão e em outras DCV (FÖRSTERMANN, 2010).

Dentre as macromoléculas biológicas prejudicadas pelo estresse oxidativo, conforme o esquematizado pela Figura 2, também podemos citar os lipídeos. O ácido linoleico e o AA são importantes alvos da oxidação por ER, produzindo intermediários ativos como isoprostanos, que desencadeiam ações inflamatórias, vasoconstritoras e, portanto, estão associados às DCV (BASU, 2008) e são considerados biomarcadores de estresse oxidativo (YOSHIDA; UMENO; SHICHIRI, 2013).

São várias as doenças que apresentam o estresse oxidativo envolvido em seus processos fisiopatológicos, o que vem sendo alvo de extensas pesquisas pela comunidade científica (GIUSTARINI, *et al.*, 2009). A forma com que esses processos respondem à ação de antioxidantes, como uma possível abordagem terapêutica, também é alvo de investigações (PISOSCHI; POP, 2015). Na hipertensão renovascular, o estresse oxidativo se relaciona intimamente com a inflamação vascular, a disfunção endotelial e o dano vascular devido às lesões oxidativas (SITI; KAMISAH; KAMSI AH, 2015). Nos rins, ERO ativam vias que

modulam a função microvascular renal, aumentando a sensibilidade a vasoconstritores como a Ang II, devido à redução da biodisponibilidade de NO associada à formação de ONOO⁻, eventos que resultam na redução da filtração glomerular, prejudicando a hemodinâmica e função renal (LERMAN; TEXTOR; GRANDE, 2009).

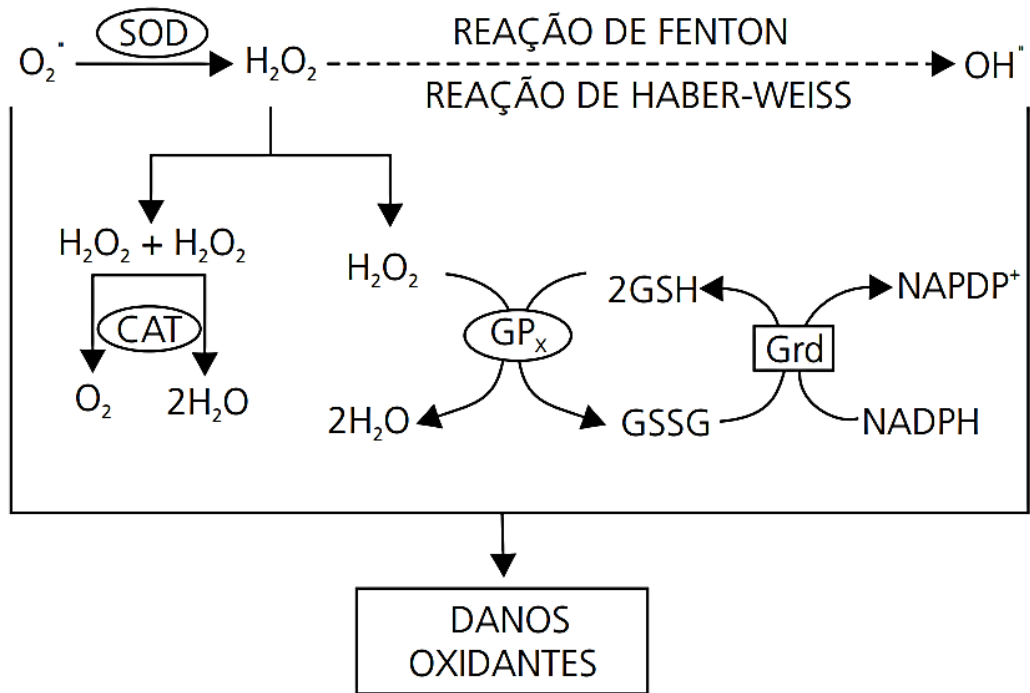
1.3.1 Antioxidantes

O sistema antioxidante foi definido por Halliwell e Gutteridge (1989) como substâncias capazes de competir com substratos oxidáveis, reduzindo ou inibindo a oxidação (DRÖGE, 2002). O mecanismo relacionado envolve a doação de elétrons e/ou átomos de hidrogênio para as ER, o que leva à interrupção das reações em cadeia (SITI; KAMISAH; KAMISIAH, 2015). Nosso organismo conta com uma defesa antioxidante que protege os sistemas biológicos da toxicidade da ER, podendo ser moléculas endógenas e exógenas. As exógenas são adquiridas a partir da ingestão, como tocoferol (vitamina E), que atua contra a peroxidação lipídica, o ácido ascórbico (vitamina C), que atua contra o radical hidroxila (OH[•]) e O₂⁻, lecitinas, antioxidantes fenólicos (resveratrol, ácidos fenólicos e flavonoides), selênio, medicamentos como acetilcisteína e outros. A defesa endógena possui componentes não enzimáticos como albumina e ácido úrico, que são responsáveis pela maior parte da atividade antioxidante no plasma, e a glutatona (GSH), além dos componentes enzimáticos (Figura 3), como superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (LIGUORI *et al.*, 2018).

O O₂⁻ e H₂O₂ são as ER mais produzidas e são contidas pelas enzimas da defesa antioxidante. A SOD, por meio da reação de dismutação, catalisa a geração de H₂O₂ a partir de O₂⁻. A ação da catalase leva à redução de H₂O₂ em água, assim como a GPx, porém à custa da conversão da GSH reduzida em oxidada (GSSG). Para manter esse dinamismo é fundamental a presença da glutatona redutase (GRd), que recupera a GSH reduzida. Não havendo a contenção na formação de H₂O₂, o acúmulo pode levar à reação com íons de Fe²⁺ ou Cu⁺ (reação de Fenton), gerando OH[•]. Os referidos íons também podem catalisar a reação entre H₂O₂ e O₂⁻

(reação de Haber-Weiss), havendo a formação OH^\cdot da mesma forma, conforme ilustrado pelo esquema da Figura 3 (BARBOSA *et al.*, 2010).

Figura 3: Esquemática da defesa antioxidante endógena



Fonte: BARBOSA, *et al.*, 2010

A hipóxia e a isquemia renal promovem disfunção vascular, inflamação e citotoxicidade das células do túbulo renal a partir da formação de ER. Antioxidantes podem potencialmente intervir precocemente na patogênese da lesão, eliminando fontes oxidantes ou ER. Estudos em células renais e em modelos animais de lesão renal demonstraram agentes antioxidantes sendo capazes de promover proteção renal pois mitigaram danos oxidativos (DENNIS, WITTING, 2017). Ratliff e colaboradores ponderam, entretanto, que apesar dos relatos otimistas demonstrados pelas pesquisas, a aplicação de antioxidantes na clínica tem sido limitada, um obstáculo significativo é a complexidade das variadas fontes de ER e sua interconexão dinâmica, incluindo o papel fisiológico desempenhado por estas (RATLIFF *et al.*, 2016).

1.3.2 Tratamento farmacológico da Hipertensão Renovascular

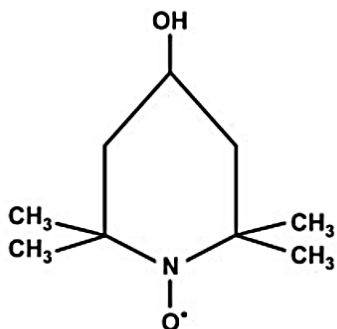
O tratamento da hipertensão renovascular tem como alvo o manejo e controle da PA, como em outras doenças hipertensivas, reduzindo morbimortalidades correlacionadas. Outro objetivo, não menos importante, é preservar a circulação e a função renal. A terapia medicamentosa feita com inibidores do SRA (captopril, losartana, entre outros) demonstram eficaz redução da PA e efeitos adversos mínimos sobre os rins estenóticos. Antes da década de 90, outros medicamentos foram utilizados como tratamento, como o minoxidil, no entanto, os efeitos eram limitados e no geral mal tolerados pelos pacientes (HERRMANN; TEXTOR, 2017).

A utilização de inibidores do SRA é cautelosa em casos de elevação da creatinina não justificada clinicamente. Além disso, há o risco da doença vascular progressiva em terapia a longo prazo. Outra intervenção médica, como a revascularização por cirurgia, representa outros riscos devido ao caráter invasivo, em especial em idosos (HERRMANN; TEXTOR, 2017). Portanto, a terapia com antioxidantes pode representar uma estratégia para manutenção da estrutura e função renal, mitigando lesões oxidativas promovidas pelas ER (DENNIS, WITTING, 2017).

1.3.3 Tempol

A atividade biológica de nitróxidos foi reconhecida pela primeira vez em 1964 por Emmerson e Howard-Flanders, que reportaram a sensibilização das bactérias por estes compostos aos efeitos da radiação, despertando interesse do potencial terapêutico dos nitróxidos. Eis que nos anos 90, Schnackenberg, Welch e Wilcox demonstraram que a administração intravenosa e intraperitoneal de 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (tempol), Figura 4, reduzia a pressão arterial e a peroxidação lipídica em modelos de hipertensão em ratos (WILCOX; PEARLMAN, 2008).

Figura 4: Estrutura química do tempol



Fonte: WILCOX; PEARLMAN, 2008

O tempol é um antioxidante, um nitróxido sintético permeável às membranas celulares e que mimetiza a atividade da enzima SOD (WILCOX; PEARLMAN, 2008). Estudos demonstraram que o tempol foi capaz de reduzir a pressão arterial em modelo 2R1C e recuperar a função endotelial em leito arterial mesentérico (COSTA *et al.*, 2009). Além disso, o tempol melhora a dilatação induzida pela acetilcolina em artérias mesentéricas de ratos hipertensos DOCA-sal e 2R1C, assim como em aorta de animais sensíveis ao sal (BANDAY *et al.*, 2007; CHRISTENSEN *et al.*, 2007; ADEAGBO *et al.*, 2003). Considerando que na condição de hipóxia renal ocorre a redução da regulação e expressão de proteínas, dentre elas a Cu/Zn-SOD, que desempenha papel fundamental na defesa antioxidante (SON *et al.*, 2008), o tempol enquanto mimético da SOD poderia apresentar um efeito protetor renal na hipertensão renovascular, já que ER ativam vias que modulam a função microvascular renal, reduzem a biodisponibilidade de NO, associado à formação de ONOO⁻, promovendo mais lesões oxidativas (LERMAN; TEXTOR; GRANDE, 2009).

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo principal

Investigar os efeitos do tratamento preventivo com tempol sobre o estresse oxidativo, alterações estruturais e funcionais renais em modelo de hipertensão renovascular experimental.

1.4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito vasodilatador do tempol em leito arterial mesentérico isolado de ratos Wistar;

- Investigar o efeito do tratamento preventivo com tempol em modelo 2R1C, estudando os seguintes parâmetros:
 - Pressão arterial sistólica e função renal;
 - Estereologia renal;
 - Fibrose, apoptose e estresse oxidativo renal.

1.5 METODOLOGIA

• Execução do trabalho

Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais (LFCPM) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), localizado na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), como atividade de iniciação científica orientada pela Prof^a Dr^a Dayane Teixeira Ognibene, a responsável pelo projeto de pesquisa.

• Tempol

O tempol foi fornecido pelo Professor Doutor Alexandro Kappel Jordão, líder do grupo de pesquisa Síntese Orgânica de Moléculas Bioativas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sintetizado conforme descrito previamente na literatura (RAUCKMAN; ROSEN; ABOU-DONIA, 1975; SOUZA *et al.*, 2011).

• Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com 3 meses pesando cerca de 250-300g para os experimentos de reatividade vascular e com 45 dias de vida, 150-180g, para a indução do modelo experimental de hipertensão. Todos os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em ciclo de claro-escuro e 12 horas, em salas climatizadas a 25°C, com presença de luz a partir das 6:00 horas da manhã, sendo os experimentos realizados durante o dia. Os animais tiveram livre acesso à ração e água.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia da UERJ (Protocolo n^o

CEUA/030/2013) em consonância às práticas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

- **Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM)**

Ratos Wistar machos foram eutanasiados em câmara de CO₂ e logo submetidos à laparotomia para isolamento do leito arterial mesentérico de acordo com o método descrito por McGregor (1965). O LAM foi estendido para o exterior da cavidade abdominal e envolto em gaze umedecida com solução nutriente de Krebs modificada (composição em mmol/L: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, EDTA 0.026, NaHCO₃ 25 e C₆H₁₂O₆ 6) e constantemente aerada com solução de carbogênio [O₂ (95%) e CO₂ (5%)]. A temperatura do banho foi mantida em 37 °C. Os ramos pancreático-duodenal, íleo e cólico direito da artéria mesentérica superior foram ligados e seccionados. O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada na sua origem, à altura da artéria aorta abdominal e canulada com um tubo de polietileno (PE 50; Clay-Adams), de aproximadamente 4 cm de comprimento, preenchida com solução de Krebs. Em seguida, o intestino delgado foi separado do leito vascular, cortando-se rente à borda intestinal, e a preparação lavada com solução de Krebs modificada.

- **Reatividade do LAM ao Tempo**

Após o isolamento, a preparação vascular foi colocada em uma cuba (volume de 10 mL) e constantemente perfundida por meio da cânula inserida na artéria mesentérica superior que foi conectada a uma bomba peristáltica (Model MINIPULS 3, Gilson®). A solução de Krebs, mantida à 37 °C e aerada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) foi infundida à velocidade constante de 4 mL/min e a pressão de perfusão registrada continuamente em um computador através do programa (PowerLab 4/30). Os experimentos foram precedidos de um período de trinta minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal foi mantida entre 20 e 40 mmHg (RESENDE *et al.* 1998) e então foram administradas injeções de 120 µmol de KCl até obter uma resposta consistente. Em seguida, iniciou-se a pré-contração do LAM, no qual a norepinefrina (NE) foi

adicionada à solução de perfusão, em concentração suficiente (30 μM) para que a pressão de perfusão se mantivesse estável em torno de 80-100 mmHg.

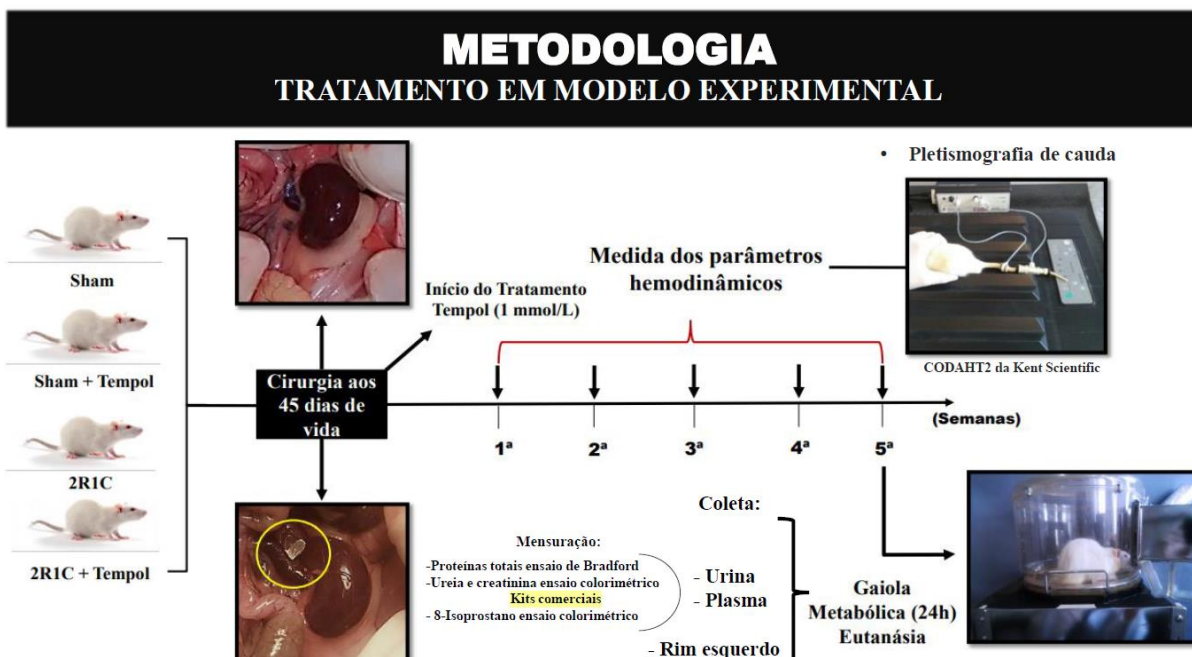
Antes verificar o efeito do tempol, foi avaliada a viabilidade vasodilatadora dependente e independente do endotélio do LAM isolado. Foi administrada uma dose de acetilcolina (ACh) (10 pmol), a qual produz um efeito médio de 50% de relaxamento através da liberação de NO pelas células endoteliais, seguida da dose de 10 nmol de nitroglicerina (NG), que promove vasodilatação de forma não dependente do endotélio. Checada a viabilidade do LAM, foi realizada a curva dose-resposta do tempol (10-300 μmol). A resposta aos agentes vasodilatadores foi expressa em termos de % de queda da resposta pressora induzida pela norepinefrina (30 μM). As injeções *in bolus* das substâncias utilizadas no experimento foram realizadas por meio de um injetor acoplado ao sistema de perfusão, com microsseringas Hamilton de 10 e 100 μl .

- **Modelo de hipertensão**

O modelo de Goldblatt 2R1C foi utilizado para a indução de animais com hipertensão renovascular (GOLDBLATT *et al.*, 1934). Ratos Wistar machos foram anestesiados com tiopental (70 mg/kg; via intraperitoneal) e, após laparotomia, um clipe de prata com diâmetro interno de 0,20 mm foi inserido em torno da artéria renal esquerda. Os ratos controles (sham) foram submetidos somente à laparotomia, reproduzindo o estresse cirúrgico no grupo controle. Após a cirurgia, ainda sedados, os animais foram mantidos em local a temperatura ambiente, receberam dipirona via retal para analgesia e tiveram os pontos cirúrgicos limpos com álcool 70%.

Para avaliação do efeito do tratamento preventivo com tempol foram utilizados os seguintes grupos experimentais (n= 8-12 indivíduos): Grupo 2R1C, Grupo 2R1C + Tempol, Grupo Sham e Grupo Sham + Tempol. Já no pós-cirúrgico, os grupos 2R1C + Tempol e Sham + Tempol foram tratados com tempol (86 mg/Kg) de peso ao dia via oral na água fornecida na mamadeira por 5 semanas (COSTA *et al.*, 2009). Os grupos 2R1C e Sham não tratados receberam apenas água durante todo o período experimental.

Figura 5: Retratação geral do protocolo experimental



- **Medida dos parâmetros hemodinâmicos**

As medidas da pressão arterial sistólica, diastólica e média (mmHg) foram feitas utilizando a técnica de pleetismografia de cauda, por meio do aparelho CODAHT2 da Kent Scientific. Os animais são expostos a uma lâmpada por 10 min e têm sua temperatura verificada para atender a faixa de 30-35 °C, visando assegurar um fluxo sanguíneo com a vasodilatação da artéria caudal possível para a medição. Um garrote e um sensor de pulso são colocados em torno da cauda do animal, e através do volume de sangue que flui pela cauda, os dados de pressão são registrados. Nas duas semanas anteriores à cirurgia, os animais passaram pelo procedimento para iniciar a aclimatação. Após a cirurgia, o protocolo experimental foi de 5 semanas, nas quais os animais tinham as medidas de pressão verificadas uma vez por semana com 15 ciclos em cada medição, sendo as 5 primeiras descartadas.

- **Coleta de urina 24 h para análise bioquímica**

No dia anterior à eutanásia, os animais foram alocados individualmente em gaiolas metabólicas para a coleta de urina de 24h, sendo posteriormente avolumada, centrifugada a 3.500 rpm, e aliqüotadas para armazenamento a – 80 °C. Os níveis de proteínas totais foram avaliados através do ensaio de Bradford

(BRADFORD, 1976). Os níveis de ureia e creatinina foram mensurados através do ensaio colorimétrico com utilização de Kits comerciais (Bioclin).

- **Eutanásia, coleta do plasma e do rim esquerdo**

No dia da eutanásia, os ratos foram anestesiados com tiopental (70 mg/kg; via intraperitoneal). O sangue foi coletado por punção da artéria aorta torácica, centrifugado a 4500 rpm por 10 min e armazenado em alíquotas a -80C°. Os níveis de creatinina e ureia foram verificados utilizando o ensaio colorimétrico dos Kits comerciais (Bioclin). A concentração plasmática do 8-isoprostano foi feita através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) utilizando Kit comercial (Cayman Chemical). O rim esquerdo foi isolado e armazenado para análises morfológicas e imunohisto-químicas.

- **Análise morfológica: estereologia renal e deposição de colágeno**

Após a eutanásia, o rim esquerdo foi imediatamente fixado em paraformaldeído 4%, pH 7,4. Posteriormente, os rins foram cortados longitudinalmente em duas metades, e para a análise morfofuncional foi necessário também fazer cortes transversais. As partes foram colocados em cassetes para o processo de desidratação e clarificação, com uma gradação de álcool (%) 70, 80, 90, 100 e xilol (%) 80, 90 e 100, seguido de inclusão em blocos de paraplast plus (Sigma-Aldrich). Os blocos foram seccionados em micrótomo (Easy Path) com espessura de 5 µm e passados para lâminas histológicas.

Para a estereologia renal, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE), as imagens digitais não consecutivas foram capturadas na objetiva 20x, utilizando-se o microscópio Olympus BX51 com câmera acoplada LC Evolution (imagens em formato TIFF, 36-bit color, 1280X1024 pixels). O volume do rim foi determinado de acordo com método de Sherle (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). O número de glomérulos por área foi estimado pelo método de contagem de pontos e o método de fracionamento foi utilizado para estimar o número de glomérulos em uma lâmina, levando em conta as frações analisadas do rim, corrigido para o órgão inteiro (BERTRAM, *et al.*, 1992).

Para estimar a área (%) de deposição do colágeno, extensão da fibrose, os cortes foram corados com *picrosirius red*, as imagens digitais não consecutivas foram capturadas na objetiva 20x, utilizando-se o microscópio Olympus BX51 com câmera acoplada LC Evolution (imagens em formato TIFF, 36-bit color, 1280X1024 pixels). As regiões dos cortes coradas de vermelho foram quantificadas pelo programa Image Pro Plus (version 7).

- **Imuno-histoquímica**

Secções de 5µm foram desparafinizadas, reidratadas e incubadas (15 min) com H₂O₂ a 3% para bloqueio da peroxidase endógena. O bloqueio das ligações inespecíficas foi feito com incubação da albumina de soro bovino 2,5% diluído em tampão fosfato (PBS/BSA). Para a recuperação de antígenos, foi usado tripsina (3%) diluída em água destilada durante 10 min a 37°C ou tampão citrato (a 60°C). Os cortes foram incubados com anticorpo primário diluído 1:100 com 1% de PBS/BSA durante a noite, a 4°C em atmosfera úmida. As seguintes proteínas foram identificadas a partir deste procedimento: renina, caspase-3 (1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc.) e 8-isoprostano (1:100, Oxford Biomedical Research). O sinal da marcação foi amplificado com um complexo biotina-estreptavidina, kit comercial (Vectastain Universal), e a imunorreação positiva foi identificada com incubação do 3,3 tetracloro de diaminobenzidina (DAB; Dako Universal Cytomation). Os cortes também foram corados com hematoxilina para possibilitar a identificação dos núcleos celulares. As imagens digitais não consecutivas foram capturadas na objetiva 40x, utilizando-se o microscópio Olympus BX51 com câmera acoplada LC Evolution (imagens em formato TIFF, 36-bit color, 1280X1024 pixels). As regiões coradas de castanho claro dos cortes foram quantificadas pelo programa Image Pro Plus (version 7).

- **Análise estatística**

Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (e.p.m.). Os dados foram analisados por meio de “one-way analyses of variance” (ANOVA) para comparar a diferença entre os grupos experimentais, com posterior uso do

pós-teste Bonferroni ou Tukey., sendo considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 EFEITO VASODILATADOR DO TEMPOL EM LAM DE RATOS WISTAR

Foi realizado um estudo em LAM de ratos Wistar adultos para avaliar as propriedades vasodilatadoras do tempol (Figura 6A e 6B). Uma dose única *in bolus* de ACh (10 μmol) e NG (10 nmol) induz uma rápida e transiente queda da pressão de perfusão. Após confirmada a integridade das respostas vasodilatadoras dependente e independente do endotélio, doses *in bolus* de tempol produziram uma resposta vasodilatadora dose-dependente de 10-300 μmol ($\text{ED}_{50} = 53,3 \pm 7,3 \mu\text{mol}$).

Figura 6: Efeito vasodilatador do tempol

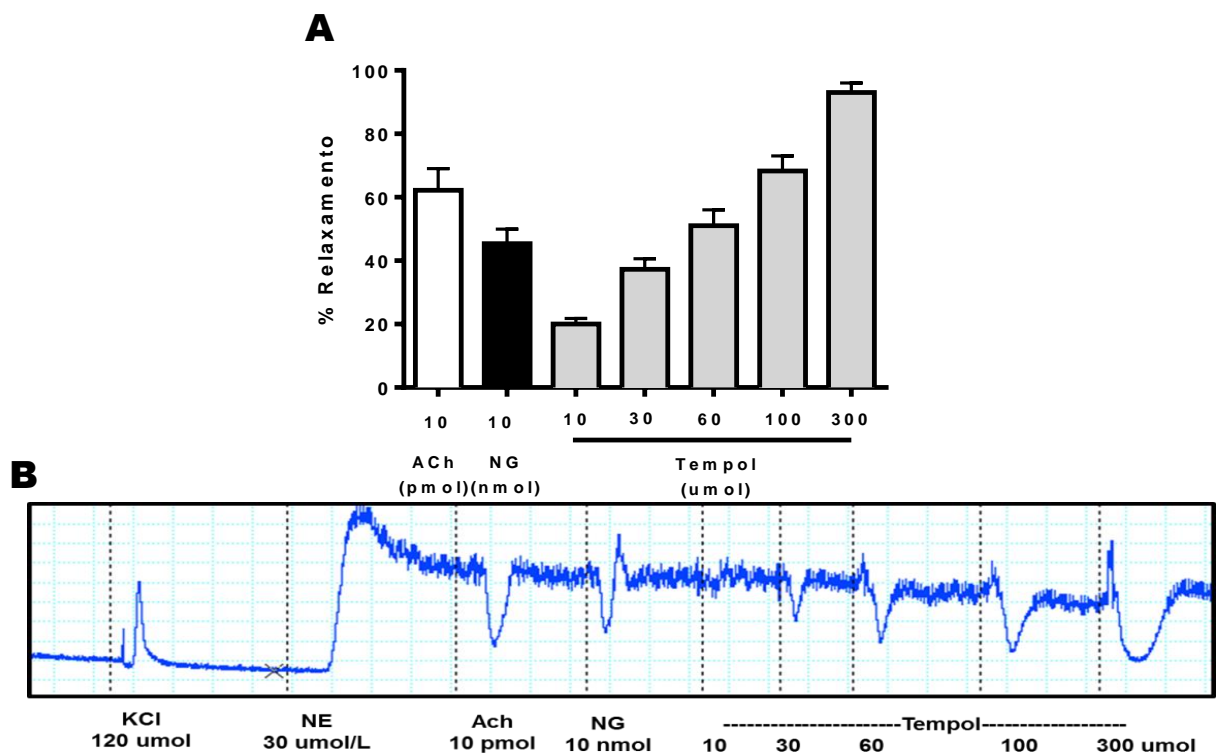


Figura 6 Efeitos do tempol sobre a pressão de perfusão em LAM de ratos Wistar normotensos pré-contraindidos com NE (A). ACh e NG foram usadas para avaliar o efeito vasodilatador dependente e independente de endotélio, respectivamente. A vasodilatação é expressa como % de queda da resposta pressora induzida pela norepinefrina ($n=10$ por grupo). Curva representativa da pressão de perfusão (em mmHG) demonstrando os efeitos vasodilatadores induzidos pela acetilcolina (ACh), nitroglicerina (NG) e tempol em LAM (B). Abreviações: ACh, acetilcolina; NE, norepinefrina; NG, nitroglicerina.

2.2 EFEITOS DO TEMPOL SOBRE A PRESSÃO ATERIAL SISTÓLICA E OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NO MODELO 2R1C

Conforme demonstrado na Tabela 2, não há diferença entre os animais na pressão arterial sistólica (PAS) na semana 0, antes da cirurgia. Cinco semanas após a cirurgia, a PAS foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) no grupo 2R1C em relação os grupos controles. O tempol foi capaz de prevenir parcialmente o aumento da PAS no grupo 2R1C + Tempol em comparação ao grupo 2R1C e não demonstrou diferença estatística em relação ao grupo Sham.

Além disso, os níveis plasmáticos de creatinina, ureia e 8-isoprostano foram significativamente elevados ($p \leq 0,05$) no grupo 2R1C quando comparados com os controles. O volume urinário e níveis de ureia, creatinina e proteína total na urina não foram diferentes entre os grupos experimentais. O tratamento com tempol reduziu os níveis de creatinina, ureia e 8-isoprostano no grupo 2R1C+Tempol ($p \leq 0,05$), de forma comparável aos grupos Sham ($p \leq 0,05$).

Tabela 2: Dados da pressão sistólica e os parâmetros bioquímicos dos diferentes grupos experimentais

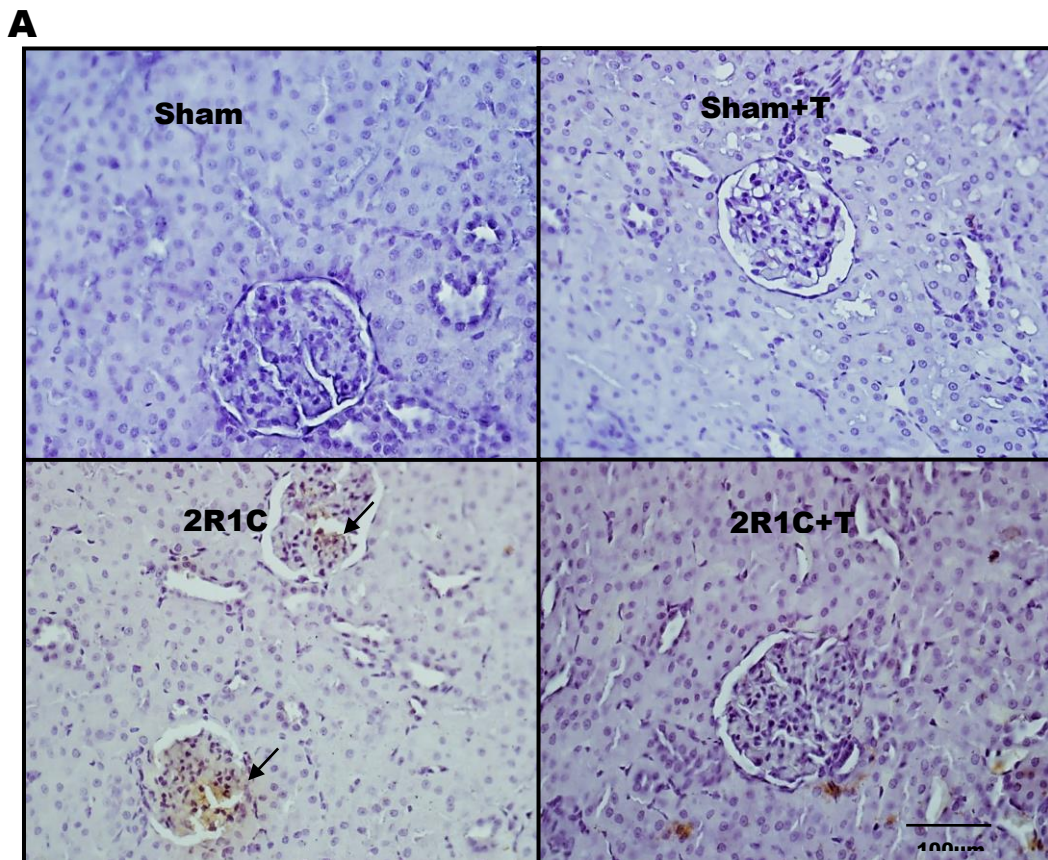
	Sham	Sham+T	2R1C	2R1C+T
Pressão sistólica sanguínea				
Semana 0	137 ± 2.3	126 ± 5.5	119 ± 3.4	112 ± 4.6
Semana 5	129 ± 5.1	116 ± 5.1	199 ± 13.5*	150 ± 7.9* ⁺
Plasma				
Ureia (mg/dL)	43 ± 1	38.3 ± 2.6	61.6 ± 4.9*	39.6 ± 0.7 ⁺
Creatinina (mg/dL)	0.18 ± 0.04	0.16 ± 0.05	0.38 ± 0.03*	0.16 ± 0.06 ⁺
8-Isoprostano (pg/mL)	16.4 ± 0.1	16.5 ± 0.1	17.3 ± 0.2*	16.5 ± 0.2 ⁺
Urina				
Volume Urinário (mL/24h)	15.3 ± 2.7	20.1 ± 3.8	15.8 ± 3.4	14.2 ± 2.3
Proteinúria (mg/24h)	10.8 ± 0.4	10.2 ± 0.9	8.4 ± 1.1	8.2 ± 0.9
Creatinina (mg/24h)	7.5 ± 1.0	7.9 ± 0.6	7.2 ± 0.6	7.0 ± 0.4
Ureia (g/24h)	0.5 ± 0.06	0.5 ± 0.02	0.5 ± 0.08	0.5 ± 0.06

Os valores estão representados como média \pm e.p.m (n = 8-9 por grupo). * Significativamente diferente do grupo Sham ($p \leq 0,05$, ANOVA). + Significativamente diferente do grupo 2R1C ($p \leq 0,05$, ANOVA). Abreviaturas: Sham, animais que passaram apenas pela laparotomia; Sham + T, animais que passaram pela laparotomia e foram tratados com tempol; 2R1C, animais que tiveram a artéria renal esquerda clampeada; 2R1C+T animais que tiveram a artéria renal esquerda clampeada e foram tratados com tempol.

2.3 RENINA

A imunomarcção de renina foi mensurada em cortes histológicos renais (Figura 7A). Como demonstra a Figura 7B, a imunomarcção de renina foi aumentada no grupo 2R1C em comparação aos grupos Sham ($p \leq 0,05$). O tratamento com o tempol restaurou a expressão de renina no grupo 2R1C+T a níveis comparáveis com os controles.

Figura 7: Imunomarcção para renina



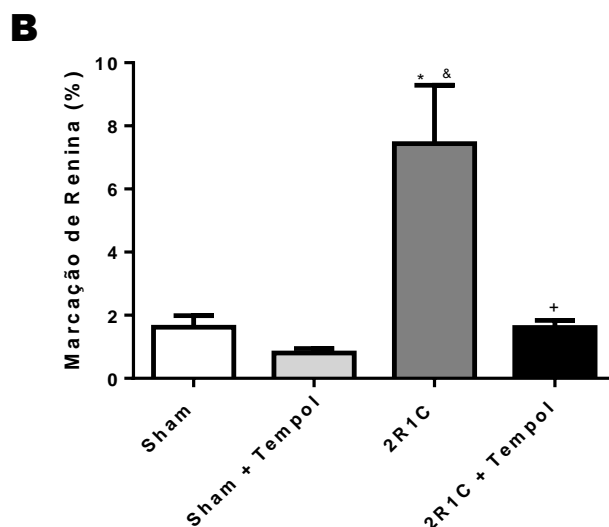


Figura 7: Efeito do tempol sobre a imunomarcação de renina (em castanho) em cortes histológicos renais de animais 2R1C (A, B) (40x). Os resultados estão representados como média \pm e.p.m (n= 5 por grupo). *Significativamente diferente do grupo Sham ($p \leq 0,05$); &Significativamente diferente do grupo Sham+T; +Significativamente diferente do grupo 2R1C ($p \leq 0,05$). Abreviaturas: Sham, animais que passaram apenas pela laparotomia; Sham + T, animais que passaram pela laparotomia e foram tratados com tempol; 2R1C, animais que tiveram o rim esquerdo clampeado; 2R1C + T animais que tiveram o rim esquerdo clampeado tratados com tempol.

2.4 EFEITOS DO TEMPOL SOBRE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS RENAIS

2.4.1 Estereologia renal

Fotomicrografias representativas de cortes histológicos renais estão ilustradas na Figura 8A. Uma avaliação qualitativa mostrou alterações na estrutura tecidual no grupo 2R1C com depleção do número de néfrons. Essas alterações estruturais foram evitadas pelo tratamento com tempol (Figura 8A). Como demonstra a Figura 6B, o volume do rim esquerdo (clipado) foi menor ($p \leq 0,05$) no grupo 2R1C do que os grupos Sham e o tratamento com o tempol aumentou este parâmetro nos animais 2R1C+T em comparação aos 2R1C ($p \leq 0,05$). O número de glomérulos por área (Figura 8C) e por rim (Figura 8D) foi reduzido no grupo 2R1C em comparação com os controles. O tratamento com o tempol impediu a redução do número de glomérulos por área (Figura 8C), e aumentou o número de glomérulos por rim no grupo 2R1C+T ($p \leq 0,05$, Figura 8D).

Figura 6: Estereologia renal

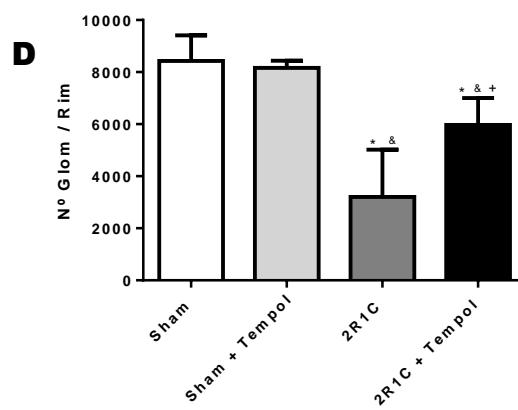
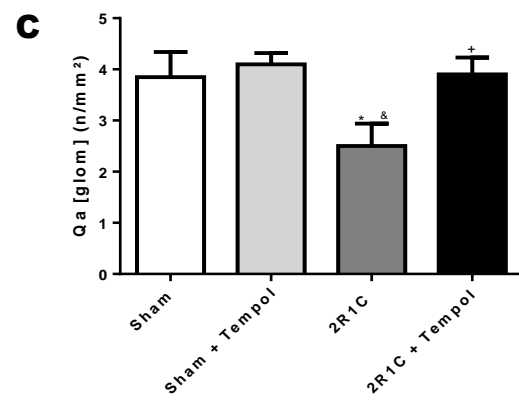
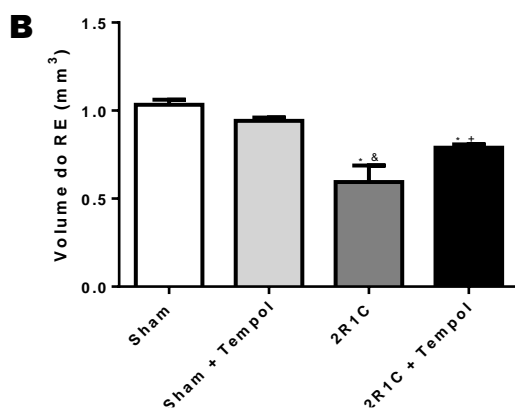
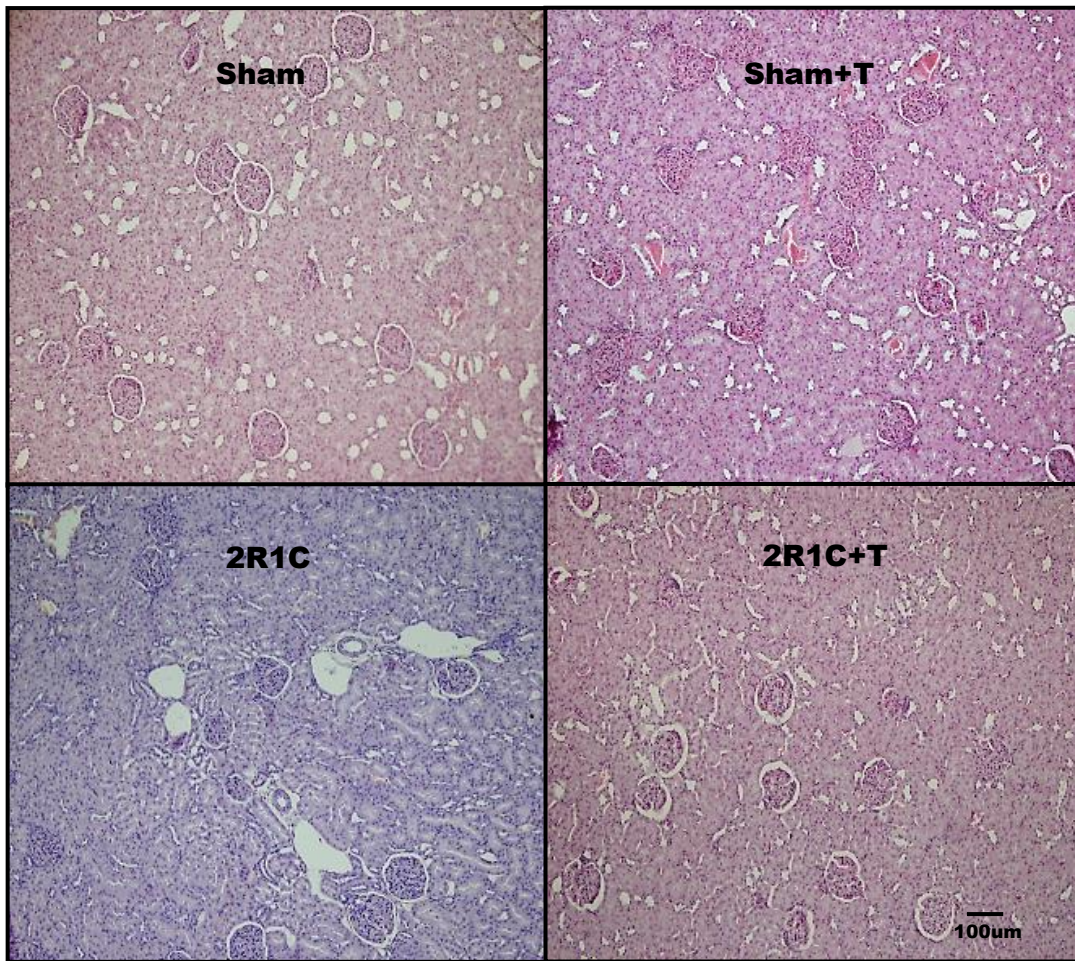
A

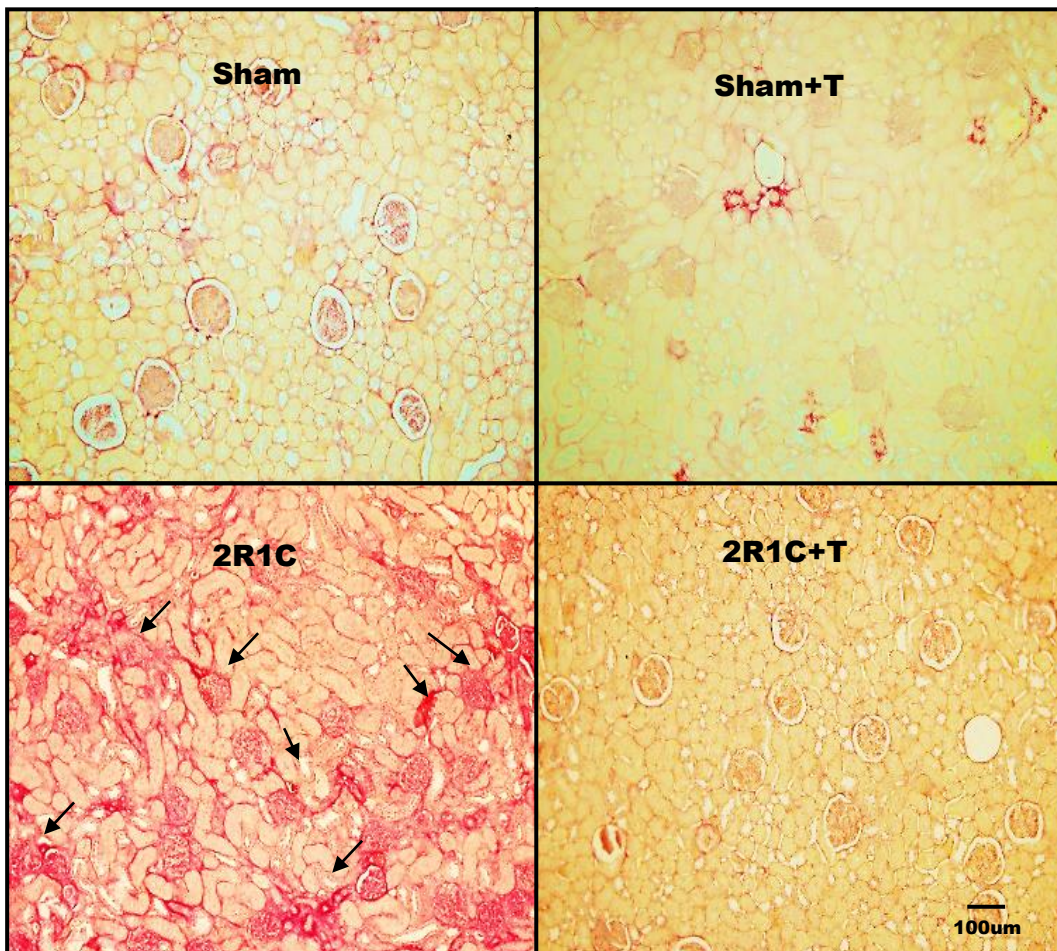
Figura 8 – Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do rim esquerdo, corados com hematoxilina e eosina (A) (20x). Efeitos do tempol sobre o volume renal (B), número de glomérulos por área (C) e por rim (D) em cortes histológicos do rim esquerdo de animais 2R1C. Os resultados estão representados como média \pm e.p.m. (n= 5-7 por grupo). *Significativamente diferente do grupo Sham ($p \leq 0,05$); &Significativamente diferente do grupo Sham+T; +Significativamente diferente do grupo 2R1C ($p \leq 0,05$). Abreviaturas: Sham, animais que passaram apenas pela laparotomia; Sham + T, animais que passaram pela laparotomia e foram tratados com tempol; 2R1C, animais que tiveram o rim esquerdo clampeado; 2R1C + T animais que tiveram o rim esquerdo clampeado tratados com tempol.

2.4.2 Deposição de colágeno renal

A fibrose intersticial renal (Figura 9A e 9B), avaliada por deposição de colágeno, foi significativamente ($p \leq 0,05$) maior nos animais 2R1C em comparação aos controles e o tratamento com tempol impediu esse aumento em 2R1C+T ($p \leq 0,05$).

Figura 9: Superfície de colágeno

A



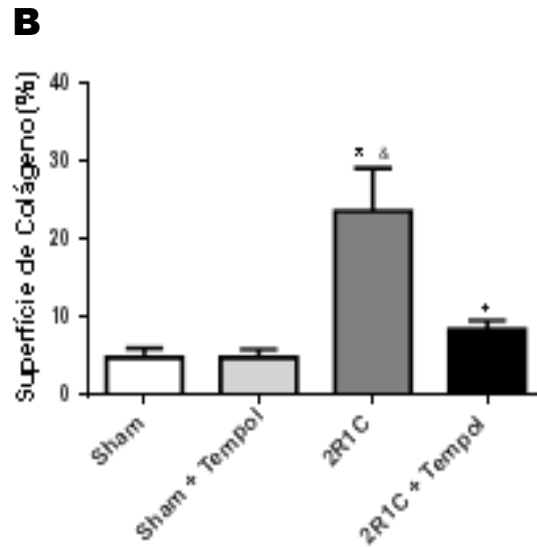


Figura 9: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do rim esquerdo, corados com *picrosirius red* (A) (20x). Efeitos do tempol sobre a superfície de colágeno (B) em cortes histológicos do rim esquerdo de animais 2R1C. Os resultados estão representados como média \pm e.p.m. (n= 5-7 por grupo). *Significativamente diferente do grupo Sham ($p \leq 0,05$); Δ Significativamente diferente do grupo Sham+T; +Significativamente diferente do grupo 2R1C ($p \leq 0,05$). Abreviaturas: Sham, animais que passaram apenas pela laparotomia; Sham+T, animais que passaram pela laparotomia e foram tratados com tempol; 2R1C, animais que tiveram o rim esquerdo clampeado; 2R1C + T animais que tiveram o rim esquerdo clampeado tratados com tempol.

2.5 EFEITOS DO TEMPOL NA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE DANO OXIDATIVO E DE APOPTOSE

O 8-Isoprostano e a caspase-3 foram mensurados em cortes histológicos renais por imuno-histoquímica para avaliar o dano oxidativo e a apoptose, respectivamente (Figura 10A e 11A). A imunomarcção renal de 8-isoprostano (Figura 10B) e caspase-3 (Figura 11B) foi elevada no grupo 2R1C em comparação aos grupos Sham ($p \leq 0,05$). O tratamento com o tempol reduziu ($p \leq 0,05$) a imunomarcção de ambos os parâmetros no grupo 2R1C+T, a níveis comparáveis com os controles.

Figura 10: Imunomarcção de 8-Isoprostano

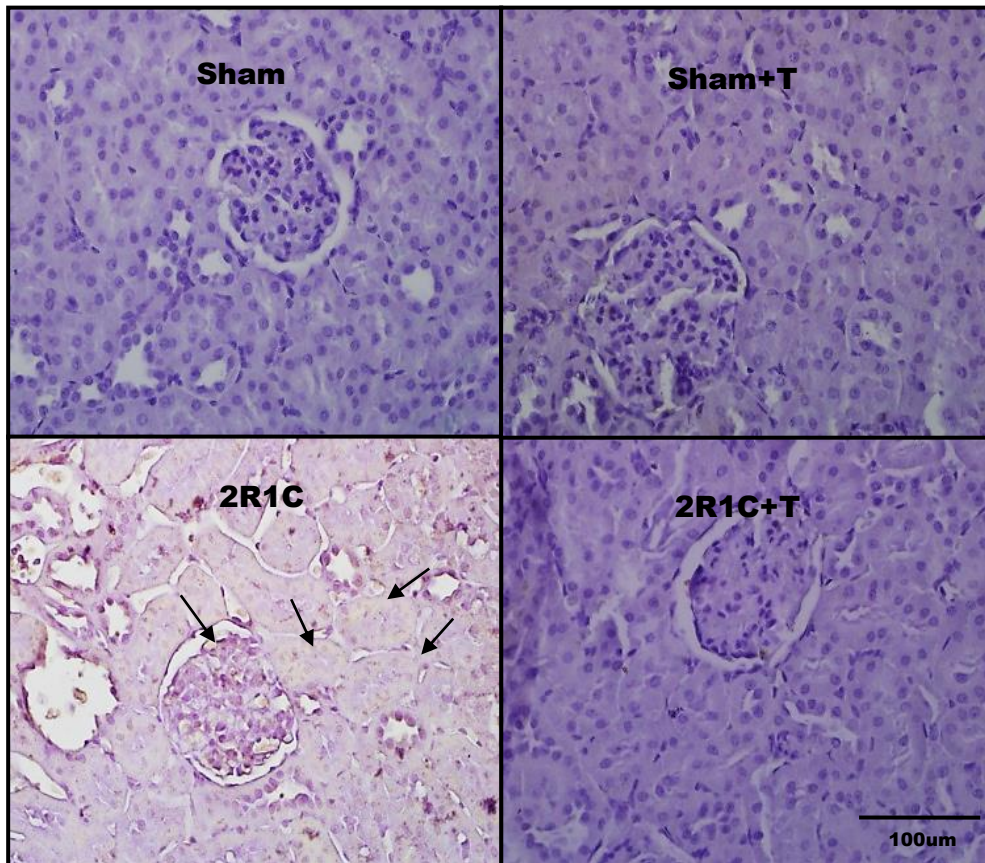
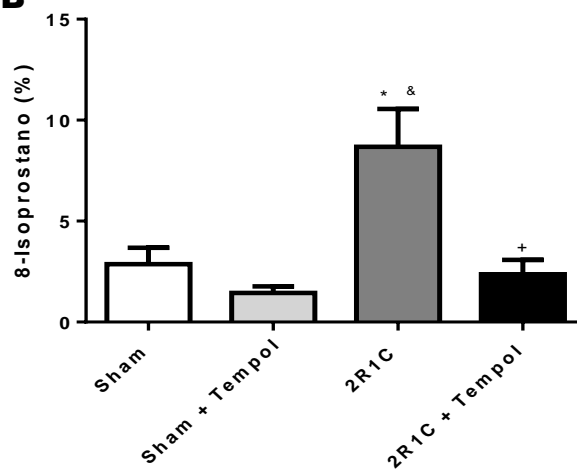
A**B**

Figura 10: Efeito do tempol sobre a imunomarcção de 8-isoprostano (em castanho) em cortes histológicos renais de animais 2R1C (A, B) (40x). Os resultados estão representados como média \pm e.p.m. (n= 5 por grupo). *Significativamente diferente do grupo Sham ($p \leq 0,05$); &Significativamente diferente do grupo Sham+T; +Significativamente diferente do grupo 2R1C ($p \leq 0,05$). Abreviaturas: Sham, animais que passaram apenas pela laparotomia; Sham + T, animais que passaram pela laparotomia e foram tratados com tempol; 2R1C, animais que tiveram o rim esquerdo clampeado; 2R1C + T animais que tiveram o rim esquerdo clampeado tratados com tempol.

Figura 11: Imunomarcção de caspase-3

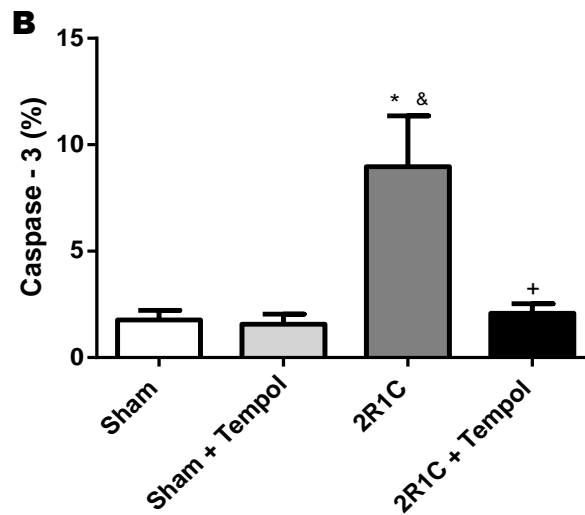
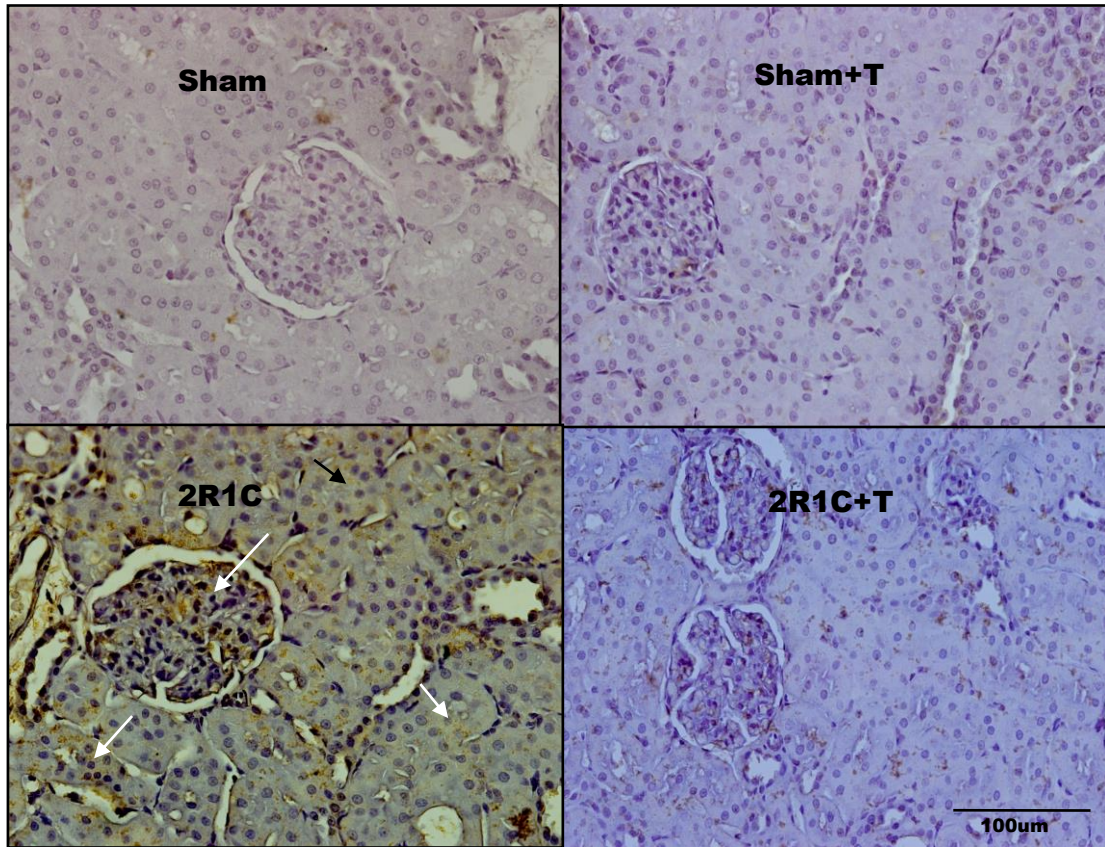
A

Figura 11: Efeito do tempol sobre a imunomarcção de caspase-3 (em castanho) em cortes histológicos renais de animais 2R1C (**A**, **B**) (40x). Os resultados estão representados como média \pm e.p.m. (n= 5 por grupo). *Significativamente diferente do grupo Sham ($p \leq 0,05$); &Significativamente diferente do grupo Sham+T; +Significativamente diferente do grupo 2R1C ($p \leq 0,05$). Abreviaturas: Sham, animais que passaram apenas pela laparotomia; Sham + T, animais que passaram pela laparotomia e foram tratados com tempol; 2R1C, animais que tiveram o rim esquerdo clampeado; 2R1C + T animais que tiveram o rim esquerdo clampeado tratados com tempol.

2.6 Discussão

Os nitróxidos se tornaram alvos de pesquisas por sofrerem reações de redução de um ou dois elétrons, tendo o tempol um maior destaque. Os relatos de utilização e efeitos com tempol no sistema cardiovascular começam na década de 90 quando Schnackenberg, Welch e Wilcox descrevem que a administração intravenosa e intraperitoneal do tempol reduzem a PA em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Por ser estável, um mimético da SOD permeável às membranas, que reduz ER como os íons superóxido e radicais hidroxil, o tornou atrativo para estudos, pois além de explorarem o potencial terapêutico do composto em si, este agente também põe em lente de aumento o papel das ER na patogênese dos modelos experimentais que possuem o estresse oxidativo associado (WILCOX; PEARLMAN, 2008).

Previamente, o tratamento com o tempol demonstrou prevenir o desenvolvimento da hipertensão e da disfunção endotelial em ratos hipertensos 2R1C, associado com a redução do dano oxidativo e aumento da atividade da SOD em artérias mesentéricas (COSTA *et al.*, 2009). O principal achado do presente estudo revela que a administração crônica com o tempol oferece proteção contra a injúria renal crônica isquêmica e a disfunção renal no modelo 2R1C, provavelmente através de sua ação antioxidante, vasodilatadora e anti-hipertensiva.

A princípio, os resultados expõem que o tempol induz uma reposta vasodilatadora dose-dependente em leito arterial mesentérico pré-contraído de ratos normotensos. Dados publicados anteriormente apontam que a vasodilatação induzida pelo tempol em artérias mesentéricas perfundidas oriundas de ratos hipertensos no modelo DOCA-Sal, poderia ser reduzida pelo bloqueio vascular de canais de potássio de grande condutância (BK) ativados por cálcio (XU *et al.*, 2005). Portanto, além da ação mimética da SOD, a modulação dos canais BK tem sido sugerida como envolvida nos mecanismos de ação do tempol. Quando ativados diretamente, esses canais levam à hiperpolarização do potencial de membrana, fechamento dos canais de Ca^{2+} o que reduz o tônus vascular, contribuindo com o efeito vasodilatador do tempol (XU *et al.*, 2006).

A estenose da artéria renal é uma das nefropatias vasculares mais comuns. A obstrução significativa do fluxo sanguíneo para os rins ativa múltiplos mecanismos

que envolve a amplificação do SRA, estresse oxidativo, inflamação e fibrose. Tais mecanismos desdobram em lesões com caráter de deterioração progressiva da estrutura e função do tecido renal, levando à doença renal crônica que, em última instância, significa desfechos desfavoráveis e irreversíveis para os rins e outros órgãos-alvo (LERMAN *et al.*, 2009).

Como descrito, no modelo 2R1C, a inserção do clipe na artéria renal esquerda reduz a pressão de perfusão renal, estimulando a secreção da enzima renina e ativação exacerbada do SRA, elevando os níveis de Ang II, um potente vasoconstritor e fator pró-oxidante (PRADHAN; ROSSI, 2013). A infusão crônica de Ang II foi capaz de acionar a hiperatividade do SRA sistêmico, ocorrendo um aumento expressivo do SRA intrarenal, propiciando ao peptídeo Ang II maior interação com R_{AT1} , que induz lesão pré e pós-glomerular, altera a hemodinâmica e a função renal ao comprometer sua capacidade autorregulatória (CASARE *et al.*, 2016). Outros estudos demonstram que após essa primeira etapa, as fases do desenvolvimento e da manutenção da hipertensão arterial tem um forte componente neurogênico, que envolve perda da sensibilidade reflexa barorreceptora, desencadeando um aparente aumento da atividade vasomotora simpática (de OLIVEIRA-SALES *et al.*, 2010; OLIVEIRA-SALES *et al.*, 2008). Além disso, evidências anatômicas e fisiológicas demonstram que as células justaglomerulares e túbulos renais são inervados por nervos simpáticos. Na isquemia renal, o aumento da atividade nervosa simpática renal contribui para a manutenção da hipertensão através da modulação e reabsorção de sódio nos túbulos renais (NISHI; BERGAMASCHI; CAMPOS, 2015).

Em consonância a estudos publicados anteriormente, os resultados deste trabalho constataam que, cinco semanas após a cirurgia, os ratos 2R1C apresentaram elevada imunomarcagem de renina no rim clipado (KIM *et al.*, 2016), bem como o aumento da pressão arterial (COSTA *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2016). O tempol reduz a pressão arterial em diferentes modelos de hipertensão (HOFFMANN *et al.*, 2008; MENG *et al.*, 2003; WELCH *et al.*, 2005). Hoffmann e colaboradores utilizaram o tempol como tratamento no modelo BPH/5, que manifesta espontaneamente as características clínicas da pré-eclâmpsia: aumento da pressão arterial acompanhado de proteinúria e estresse oxidativo placentário. O tempol foi

capaz de prevenir os aumentos induzidos da pressão e proteinúria, bem como normalizou a produção de ERO na zona placentária, melhorando o crescimento fetal e sobrevivência dos filhotes (HOFFMANN *et al.*, 2008). Em ratos hipertensos modelo DOCA-sal, que desenvolve a doença hipertensiva a partir da ingesta de sódio dietético, o tempol também foi usado como tratamento e mostrou ser capaz de reduzir a pressão arterial e danos renais. Como hipótese, o mecanismo sugerido pelos autores envolve uma maior biodisponibilidade de NO, reduzindo não só os níveis pressóricos, como também à sensibilidade ao sal (MENG *et al.*, 2003). Welch e colaboradores investigaram o tempol como tratamento em modelo de ratos SHR, que possui características da hipertensão essencial humana: um aumento gradual da pressão sem aumentos notáveis da atividade da renina plasmática, endotelina, catecolaminas; possuem leve sensibilidade ao sal e estresse oxidativo aumentado. O tratamento com o antioxidante reduziu a pressão arterial e a excreção de 8-isoprostano, um biomarcador de estresse oxidativo (WELCH *et al.*, 2005). Os achados do presente estudo demonstram que o tratamento preventivo com tempol normalizou os níveis de renina e atenuou o desenvolvimento da hipertensão em animais 2R1C. Suas ações antioxidantes (COSTA *et al.*, 2009; KARANOVIC *et al.*, 2016) e vasodilatadoras (XU *et al.*, 2005), bem como a capacidade de modular a entrada simpática ao sistema cardiovascular (HAN *et al.*, 2011), podem contribuir para o efeito benéfico sobre a secreção de renina em animais com hipertensão 2R1C. Além disso, resultados apresentados anteriormente revelaram que o tratamento preventivo com o tempol restaura a função endotelial nas artérias mesentéricas de ratos hipertensos 2R1C (COSTA *et al.*, 2009), contribuindo para os benefícios cardiovasculares.

Na hipertensão renovascular, o SRA é ativado sistematicamente e no rim estenótico, ao passo que Ang II é responsável pela geração de ROS, principalmente o radical ânion superóxido através da enzima NADPH oxidase. O desequilíbrio entre a geração e a inativação da ER favorece a oxidação de componentes celulares, especialmente lipídeos e proteínas, causando danos teciduais (GILL; WILCOX, 2006). Foi observado que no modelo 2R1C ocorre estresse oxidativo intrarenal, aumento expressivo do teor de produtos oxidados (oriundos de lipídeos e proteínas) e redução da atividade de enzimas antioxidantes. Associado ao aumento da

resposta inflamatória renal, que, em última análise, estimula a produção de mediadores pró-fibrogênicos e, portanto, inicia a fibrogênese neste modelo (ALAM *et al.*, 2015). Além disso, o ânion superóxido pode reagir com o NO, diminuindo sua biodisponibilidade e gerando peroxinitrito, contribuindo para lesões oxidativas que promove danos vasculares e renais (SAVOIA *et al.*, 2011). Meng e colaboradores constataram que os animais DOCA-sal possuem um aumento significativo de ânion superóxido na região do córtex e medula renal, e nos animais tratados com tempol ocorre redução dos níveis deste radical e da proteinúria, o que reforça a relação entre estresse oxidativo e danos renais (MENG *et al.*, 2003). Estudos demonstram que antioxidantes podem intervir precocemente na patogênese da lesão por eliminar fontes oxidantes ou ER. Em células renais e em modelos animais de lesão renal, os agentes antioxidantes são capazes de promover proteção renal pois mitigaram danos oxidativos (DENNIS, WITTING, 2017). Além disso, o uso eficiente de oxigênio renal está intimamente relacionado com a energia necessária para o transporte tubular de sódio. No quadro de estresse oxidativo e na hipertensão renovascular, as ER suprimem o uso eficiente do oxigênio, que é corrigido pelo uso do antioxidante tempol no modelo 2R1C (WELCH *et al.*, 2003), possivelmente a partir da melhora do *feedback* tubuloglomerular (REN; CARRETERO; GARVIN, 2002).

Conforme relatado anteriormente na literatura (ALAM *et al.*, 2015; COSTA, *et al.*, 2009; DA COSTA *et al.*, 2012; OLIVEIRA-SALES *et al.*, 2008; WELCH *et al.*, 2003), os resultados apresentados levam a entender que o estresse oxidativo foi elevado sistematicamente e no rim estenótico de animais 2R1C. O dano oxidativo, avaliado pelos níveis plasmáticos e imunoquantificação renal do biomarcador 8-isoprostano, foi aumentado no grupo 2R1C em comparação aos controles. Demostramos que o tempol impediu o aumento dos níveis sistêmico e renais de 8-isoprostano, indicando um importante efeito antioxidante que pode contribuir para sua ação protetora renal.

No presente estudo, foram observados glomerulosclerose e fibrose intersticial tubular no rim estenótico, que foi evidenciado pela redução do volume renal e do número de glomérulos, bem como pelo aumento da deposição de colágeno. Os dados sobre fibrose renal foram relatados anteriormente (ALAM *et al.*, 2015). Também foi observado um aumento da imunomarcagem de caspase-3 renal nos

animais 2R1C, sugerindo células em apoptose. A administração de tempol foi capaz de prevenir a atrofia renal, alterações no número de glomérulos, deposição de colágeno e expressão de caspase-3 no rim de ratos hipertensos 2R1C. Juntos, esses resultados sugerem que o tempol protege o rim estenótico de alterações morfológicas. Sua atividade antioxidante como mecanismo subjacente contribuiu para a proteção da estrutura renal, reduzindo células em apoptose e a fibrose renal. Além disso, suas ações vasodilatadora e anti-hipertensiva também podem participar da proteção renal, melhorando a perfusão do rim estenótico. Foi possível observar que a supressão do estresse oxidativo pelo tempol neste modelo corrige parcialmente a hipóxia cortical renal e o uso ineficiente de O_2 no transporte de sódio tubular (WELCH *et al.*, 2003).

No modelo 2R1C, a atrofia renal, a perda de glomérulos e a fibrose foram acompanhadas pelo declínio da função renal, o que está de acordo com dados prévios da literatura (HUANG *et al.*, 2014; WENZEL *et al.*, 2003). Alterações na função renal nos animais 2R1C foram evidenciadas por altos níveis de creatinina e ureia no plasma, quadro de azotemia, indicativo de um estágio inicial de insuficiência renal. Demonstramos que a administração crônica de tempol melhorou esses parâmetros, sugerindo sua capacidade de proteção em animais 2R1C contra a disfunção renal.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças cardiovasculares permanecem como a principal causa de morte no Brasil e no mundo, dentre elas, as doenças hipertensivas possuem destaque epidemiológico mesmo com o conhecimento científico acumulado e das numerosas intervenções terapêuticas disponíveis. A hipertensão renovascular possui etiologia conhecida e o desfecho clínico renal pode ser preocupante, o que demonstra a relevância clínica da pesquisa básica na busca de novas abordagens terapêuticas.

Em conclusão, os efeitos do tratamento preventivo com tempol mostrou fornecer benefícios sobre a estrutura e função renal na hipertensão em modelo 2R1C, evidenciado pela prevenção de altos níveis de creatinina e ureia no plasma, associado a redução de danos glomerulares e fibrose renal. Os mecanismos subjacentes do efeito protetor renal exercido pelo tempol podem envolver sua ação antioxidante, e pelo menos em parte, seus efeitos vasodilatador e anti-hipertensivo.

Os resultados apresentados sugerem um potencial uso do tempol como um agente renoprotetor na estenose da artéria renal e hipertensão renovascular.

REFERÊNCIAS

- ADEAGBO, A. S. O., JOSHUA, I. G., FALKNER, C., MATHESON, P. J. Tempol, an antioxidant, restores endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasodilation during hypertension. **European Journal of Pharmacology**, v. 481, n. 1, p. 91–100, 2003.
- ALAM, M. A., CHOWDHURY, M. R. H., JAIN, P., SAGOR, M. A. T., REZA, H. M. DPP-4 inhibitor sitagliptin prevents inflammation and oxidative stress of heart and kidney in two kidney and one clip (2K1C) rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 7, n. 1, 2015.
- BANDAY, A. A., MUHAMMAD, A. B., FAZILI, F. R., LOKHANDWALA, M. Mechanisms of Oxidative Stress-Induced Increase in Salt Sensitivity and Development of Hypertension in Sprague-Dawley Rats. **Hypertension**, v. 49, n. 3, p. 664–671, 2007.
- BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BASU, S. F2-Isoprostanes in Human Health and Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 8, p. 1405-1434, 2008.
- BERTRAM J.F., SOOSAIPILLAI M.C., RICARDO S.D., RYAN G.B. Total numbers of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney. **Cell and Tissue Research**, v. 270, n. 1, p. 37–45, 1992.
- BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–54, 1976.
- CALZERRA, N. T. M., GOMES, C. F., QUEIROZ, T. M. Physiological aspects of angiotensin II-dependent Hypertension: an overview. **Acta Brasiliensis**, v. 2, n. 2, p. 69-73, 2018.
- CAREY, R. M., MUNTNER, P., BOSWORTH, H. B., WHELTON, P. K. Prevention and Control of Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 72, n. 11, p. 1278–1293, 2018.

CASARE, F.A. M., THIEME, K., COSTA-PESSOA, J. M., ROSSONI, L. V., COUTO, G. K., FERNANDES, F. B., CASARINI, D. E., SOUZA-OLIVEIRA, M. Renovascular remodeling and renal injury after extended angiotensin II infusion. **American Journal of Physiology- Renal Physiology**, v. 310, n. 11, p. 1295-1307, 2016.

CHAPPELL, M. C. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: the good, bad, and absolute? **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 310, n. 2, p. 137-152, 2016.

CHO, K.-J., SEO, J.-M., KIM, J.-H. Bioactive lipoxigenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species. **Molecules and Cells**, v. 32, n. 1, p. 1–5, 2011.

CHRISTENSEN, F. H., STANKEVICIUS, E., HANSEN, T., JORGENSEN, M. M., VALVERDE, V. L., SIMONSEN, U., BUUS, N. H. Flow- and acetylcholine-induced dilatation in small arteries from rats with renovascular hypertension — effect of tempol treatment. **European Journal of Pharmacology**, v. 566 n. 1-3, p.160–166, 2007.

COMMISSION ON SOCIAL DETERMINANTS OF HEALTH (CSDH). **CSDH final report: closing the gap in a generation: health equity through action on the social determinants of health**, 2008. Disponível em:<
https://www.who.int/social_determinants/final_report/csdh_finalreport_2008.pdf>
Acesso em: 16 jan. 2021.

CORRÊA, T. D., NAMURA, J. J., SILVA, C. A. P., CASTRO, M. G., MENEGHINI, A., FERREIRA, C. Hipertensão arterial sistêmica: atualidades sobre sua epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Arquivos Médicos do ABC**, v. 31, n. 2, p. 91-101, 2005.

COSTA, C. A., AMARAL, T. A. S., CARVALHO, L. C. R. M., OGNIBENE, D. T., DA SILVA, A. F. E., MOSS, M. B., VALENÇA, S.S., DE MOURA, R.S., RESENDE, A. C. Antioxidant Treatment With Tempol and Apocynin Prevents Endothelial Dysfunction and Development of Renovascular Hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 22, n. 12, p. 1242–1249, 2009.

Da Costa, C. A., de Oliveira, P. R. B., de Bem, G. F., de Cavalho, L. C. R. M., Ognibene, D. T., da Silva, A. F. E. Dos Santos Valença S., Pires K. M. P., da Cunha Sousa P. J., de Moura R. S., Resende, A. C. Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 12, p. 1199–1209, 2012.

DENNIS, J. M., WITTING, P. K. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease. **Nutrients**, v. 9, n. 7, p. 718, 2017.

DE OLIVEIRA-SALES, E. B., NISHI, E. E., BOIM, M. A., DOLNIKOFF, M. S., BERGAMASCHI, C. T., CAMPOS, R. R. Upregulation of AT₁R and iNOS in the

Rostral Ventrolateral Medulla (RVLM) Is Essential for the Sympathetic Hyperactivity and Hypertension in the 2K-1C Wistar Rat Model. **American Journal of Hypertension**, v. 23, n. 7, p. 708–715, 2010.

DIAS, R. G., NEGRAO, C. E., KRIEGER, M. H. Nitric Oxide and the Cardiovascular System: Cell Activation, Vascular Reactivity and Genetic Variant. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n. 1, p. 68-75, 2011.

DUNN, D. J., ALVAREZ, L. A., ZHANG, X., SOLDATI, T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. **Redox Biology**, v. 6, p. 472–485, 2015.

DIRETRIZ Brasileira de Hipertensão Arterial, 7, 2016. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, p.1-83, 2016.

FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 923–939, 2010.

GILL, P. S., WILCOX, C. S. NADPH Oxidases in the Kidney. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1597–1607, 2006.

GIUSTARINI, D., DALLE-DONNE, I., TSIKAS, D., ROSSI, R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 46, n. 5-6, p. 241–281, 2009.

GOLDBLATT H., LYNCH J., HANZAL R.F., SUMMERVILLE W.W. Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **Journal of Experimental Medicine**, v. 59, n. 3, p. 347-379, 1934.

GRIENGLING, K. K., TOUYZ, R. M., ZWEIER, J. L., DIKALOV, S., CHILIAN, W., CHEN, Y.-R., HARRISON, D. G., BHATNAGAR, A. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System. **Circulation Research**, v. 119, n. 5, p. 39–75, 2016.

GUYTON, A. C., HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HAN, Y., FAN, Z.-D., YUAN, N., XIE, G.-Q., GAO, J., DE, W., GAO X-Y., ZHU, G.-Q. Superoxide anions in the paraventricular nucleus mediate the enhanced cardiac sympathetic afferent reflex and sympathetic activity in renovascular hypertensive rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 110, n. 3, p. 646–652, 2011.

HERRMANN, S. M., TEXTOR, S. C. Current Concepts in the Treatment of Renovascular Hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 31, n. 2, p. 139-149, 2017.

HERRMANN S.M., TEXTOR S. C. Renovascular Hypertension. **Endocrinology and Metabolism Clinics North America**, v. 48, n. 4, p. 765-778, 2019.

HOFFMANN, D. S., WEYDERT, C. J., LAZARTIGUES, E., KUTSCHKE, W. J., KIENZLE, M. F., LEACH, J. E., SHARMA J.A., SHARMA R.V., DAVISSON, R. L. Chronic Tempol Prevents Hypertension, Proteinuria, and Poor Feto-Placental Outcomes in BPH/5 Mouse Model of Preeclampsia. **Hypertension**, v. 51, n. 4, v. 1058–1065, 2008.

HUANG -L-L, PAN C., YU -T-T., GUO K., WANG X-H., ZHANG J-Y., WANG H-Z. G. S. Beneficial therapeutic effect of Chinese Herbal Xinji'erkang formula on hypertension-induced renal injury in the 2-kidney-1-clip hypertensive rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 11, n. 5, p. 16–27, 2014.

KARANOVIC, D., GRUJIC-MILANOVIC, J., MILORADOVIC, Z., IVANOV, M., JOVOVIC, D., VAJIC, U.-J., ZIVOTIC M., MARKOVIC-LIPKOVSKI J., MIHAILOVIC-STANOJEVIC, N. Effects of Single and Combined Losartan and Tempol Treatments on Oxidative Stress, Kidney Structure and Function in Spontaneously Hypertensive Rats with Early Course of Proteinuric Nephropathy. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1-21, 2016.

KIM, Y. G., LEE, S. H., KIM, S.-Y., LEE, A., MOON, J. Y., JEONG, K.-H., LEE TW, LIM S.J., SOHN I.S., IHM, C.-G. Sequential activation of the intrarenal renin-angiotensin system in the progression of hypertensive nephropathy in Goldblatt rats. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 311, n. 1, p. 195–206, 2016.

LERMAN, L. O., TEXTOR, S. C., GRANDE, J. P. Mechanisms of Tissue Injury in Renal Artery Stenosis: Ischemia and Beyond. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 52, n. 3, p. 196–203, 2009.

LIGUORI, I., RUSSO, G., CURCIO, F., BULLI, G., ARAN, L., DELLA-MORTE, D., GARGIULO, G., TESTA, G., CACCIATO, F., BONADUCE, D. ABETE, P. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 757–772, 2018.

MANDARIM-DE-LACERDA C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 4, p. 469–486, 2003.

MCGREGOR, D.D. The effect of sympathetic nerve stimulation of vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. **The Journal of Physiology**, v. 177, n. 1, p. 21–30, 1965.

MENG, S., CASON, G. W., GANNON, A. W., RACUSEN, L. C., MANNING, R. D. Oxidative Stress in Dahl Salt-Sensitive Hypertension. **Hypertension**, v. 41, n. 6, p. 1346–1352, 2003.

MONTEZANO, A. C., CAT, D. N. A., RIOS, F. J., TOUYZ, R. M. Angiotensin II and Vascular Injury. **Current Hypertension Reports**, v. 16, n. 6, p. 431-442, 2014.

NISHI, E. E., BERGAMASCHI, C. T., CAMPOS, R. R. The crosstalk between the kidney and the central nervous system: the role of renal nerves in blood pressure regulation. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 5, p. 479–484, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Mortes por doenças cardiovasculares no Brasil, 2017. Disponível em: <<http://www.cardiometro.com.br/anteriores.asp>>. Acesso em: 06 mai. 2020.

OLIVEIRA-SALES, E. B., TOWARD, M. A., CAMPOS, R. R., PATON, J. F. R. Revealing the role of the autonomic nervous system in the development and maintenance of Goldblatt hypertension in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 183, n. 100, p. 23–29, 2014.

OLIVEIRA-SALES, E. B., DUGAICH, A. P., CARILLO, B. A., ABREU, N. P., BOIM, M. A., MARTINS, P. J., D'ALMEIDA V., DOLNIKOFF M.S., BERGAMASCHI C.T., CAMPOS, R. R. Oxidative Stress Contributes to Renovascular Hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 21, n. 1, p. 98–104, 2008.

OPARIL, S., ACELAJADO, M. C., BAKRIS, G. L., BERLOWITZ, D. R., CÍFKOVÁ, R., DOMINICZAK, A. F., GRASSI, G., JORDAN, J., POULTER, N. R., RODGERS, A., WHELTON, P. K. Hypertension. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 18014, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Organização Pan-americana de Saúde Brasil. **Doenças Cardiovasculares**, 2017. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096>. Acesso em: 05 mai. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Organização Pan-americana de Saúde Brasil. **10 principais causas de morte no mundo**, 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5638:10-principais-causas-de-morte-no-mundo&Itemid=0>. Acesso em: 05 mai. 2020.

PRADHAN N., ROSSI N.F. Interactions between the sympathetic nervous system and angiotensin system in renovascular hypertension. **Current Hypertension Reviews**, v. 9, n. 2, p. 121–29, 2013.

PEREIRA, R. A., ALVES-SOUSA, R. A., VALE, J. S. O processo de transição epidemiológica no Brasil: uma revisão de literatura. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v.6, n.1, p. 99-108, 2015.

PETI-PETERDI, J., HARRIS, R. C. Macula Densa Sensing and Signaling Mechanisms of Renin release. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 21, n. 7, p. 1093-1096, 2010.

PISOSCHI, A. M., POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, n. 5, p. 55–74, 2015.

RATLIFF, B. B., ABDULMAHDI, W., PAWAR, R., WOLIN, M. S. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 25, n. 3, p. 119–146, 2016.

RAUCKMAN E.J., ROSEN G.M., ABOU-DONIA M.B. Improved methods for the oxidation of secondary amines to nitroxides. **Synthetic Communications**, v. 5, n.6, p. 409–413, 1975.

REN, Y., CARRETERO, O. A., GARVIN, J. L. Mechanism by Which Superoxide Potentiates Tubuloglomerular Feedback. **Hypertension**, v. 39, n. 2, p. 624–628, 2002.

RESENDE, A. C., BALLEJO G., LEITE R, SALGADO M. C. O. Role of NO-independent mechanisms in bradykinin-induced vasodilation in the rat mesenteric bed. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 9, p. 1229-1235, 1998.

ROTH, G. A., JOHNSON, C., ABAJOBIR, A., *et al.* Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 1, p. 1–25, 2017.

SITI, H. N., KAMISAH, Y., KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 40–56, 2015.

SON, D., KOJIMA, I., INAGI, R., MATSUMOTO, M., FUJITA, T., NANGAKU, M. Chronic hypoxia aggravates renal injury via suppression of Cu/Zn-SOD: a proteomic analysis. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 294, n. 1, p. 62–72, 2008.

SOUZA, D. A., MORENO, Y., PONZIO, E. A., RESENDE, J. A. L. C., JORDÃO, A. K., CUNHA, A. C., FERREIRA, V. F., NOVAK, M. A., VAZ, M. G. F. Synthesis, crystal structure, magnetism and electrochemical properties of two copper(II) furoyltrifluoroacetate complexes with nitroxide radical. **Inorganica Chimica Acta**, v. 370, n. 1, p. 469-473, 2011.

VASCONCELOS, S. M. L., GOULART, M. O. F., MOURA, J. B. DE F., MANFREDINI, V., BENFATO, M. DA S., KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

WELCH, W. J., MENDONCA, M., ASLAM, S., WILCOX, C. S. Roles of Oxidative Stress and AT1 Receptors in Renal Hemodynamics and Oxygenation in the Postclipped 2K,1C Kidney. **Hypertension**, v. 41, n. 3, p. 692–696, 2003.

WELCH, W. J., MENDONCA, M., BLAU, J., KARBER, A., DENNEHY, K., PATEL, K., LAO Y-S., JOSÉ P.A., WILCOX, C. S. Antihypertensive response to prolonged tempol in the spontaneously hypertensive rat. **Kidney International**, v. 68, n. 1, p. 179–187, 2005.

WENZEL, U. O. WOLF G., JACOB I., SCHWEGLER C., QASQAS A., AMANN K., HELMCHEN U., STAHL R. A. K. Beneficial and adverse renal and vascular effects of the vasopeptidase inhibitor omapatrilat in renovascular hypertensive rats. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. 10, p. 2005–2013, 2003.

WILCOX, C. S., PEARLMAN, A. Chemistry and Antihypertensive Effects of Tempol and Other Nitroxides. **Pharmacological Reviews**, v. 60, n. 4, p. 418–469, 2008.

YANG, T., XU, C. Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 4, p. 1040–1049, 2017.

YOSHIDA, Y., UMENO, A., SHICHIRI, M. Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 52, n. 1, p. 9-16, 2013.

XU, H.; BIAN, X.; WATTS, S. W.; HLAVACOVA, A. Activation of Vascular BK Channel by Tempol in DOCA-Salt Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 46, n. 5, p. 1154–1162, 2005.

XU, H.; JACKSON, W. F.; FINK, G. D.; GALLIGAN, J. J. Activation of Potassium Channels by Tempol in Arterial Smooth Muscle Cells From Normotensive and Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 48, n. 6, p. 1080–1087, 2006.