

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Departamento de Fisiologia  
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

**Avaliação do Estresse Oxidativo no  
Desenvolvimento da Hipertensão Renovascular:  
Papel Protetor dos Estrogênios**

Dissertação de Mestrado

Jaqueline Barp

Porto Alegre, 2002.

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Departamento de Fisiologia**

**Avaliação do Estresse Oxidativo no  
Desenvolvimento da Hipertensão Renovascular:  
Papel Protetor dos Estrogênios**

Jaqueline Barp

Orientadora: Dra. Adriane Belló Klein

Dissertação apresentada ao curso de pós graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, do Instituto de Ciências Básica da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Porto Alegre, junho de 2002.

“É justamente a possibilidade de realizar um sonho  
o que torna a vida interessante.  
E quando se quer alguma coisa de todo o coração,  
todo o universo conspira para que se possa  
consegui-la.”

Paulo Coelho

Dedico este trabalho ao professor Antônio Andrea Belló, não só pelos ensinamentos em fisiologia, que foram muitos, mas por ter sido um grande mestre das lições de vida.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Adriane, pela orientação, pelo carinho, pela atenção e por toda sua confiança em mim e no meu trabalho;

À prof<sup>a</sup> Suzana Llesuy, pela amizade, pelas orientações e por todas suas contribuições e ensinamentos;

À Tânia, a indispensável técnica do laboratório, por estar sempre disposta e pronta para ajudar, e que muito me ajudou na realização dos experimentos;

Ao Alex pela grande ajuda na realização dos experimentos e por torná-los mais agradável com o seu excelente bom humor;

À minha amiga e colega, Patrícia Martins Bock, por toda ajuda na realização dos experimentos;

À todos os amigos e colegas (e ex-colegas) do laboratório Liliane, Álvaro, Maria Isabel, Pedro, Mauro, Celso, Klipel, Felipe, Nicole, Gilberti, Cris Pio, Cris Campos, Marcus, Jorge, Fabiano, Cassiana, Daniela, Roberta, Patrícia, Martine, Maria Helena, (desculpem se esqueci alguém) pelos momentos de descontração, conversas, cafezinhos, enfim por tornarem os dias mais agradáveis e menos cansativos;

Às minhas grandes amigas Lucila, Maris, Pati e Cláudia, por todos os bons momentos dentro e fora do laboratório;

Às amigas Pity, Ângela (B2), Sueli e Claudinha, que, mesmo de longe, continuaram sempre me acompanhando e apoiando;

Ao Eduardo, meu maior incentivador, pelo amor, carinho, apoio, paciência e ajuda em todos o momentos.

À minha amada mãe, por ensinar aos seus filhos que é preciso lutar pelo que se deseja, e por ela própria ter lutado pelos seus e nossos sonhos: Obrigado Mãe.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO.....	1
1.1.1 REATIVIDADE DAS EAO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	5
1.2 SISTEMAS DE DEFESA CONTRA AS EAO.....	8
1.2.1 DEFESAS ENZIMÁTICAS.....	9
1.2.2 DEFESAS NÃO-ENZIMÁTICAS.....	13
1.3 ESTROGÊNIOS.....	14
1.3.1 BIODÍNTENSE E METABOLISMO.....	14
1.3.2 MECANISMO DE AÇÃO E EFEITOS.....	17
1.4 ESTROGÊNIOS COMO ANTIOXIDANTES.....	18
1.5 EFEITOS DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES SOBRE DOENÇAS CARDÍACAS E HIPERTENSÃO.....	19
1.6 HIPERTENSÃO.....	21
1.6.1 MODELO DE HIPERTENSÃO GOLDBLATT.....	23
1.7 PAPEL DOS RADICAIS LIVRES NA HIPERTENSÃO.....	26
1.8 HIPÓTESE.....	29
1.9 OBJETIVO GERAL.....	30
1.9.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>2. METODOLOGIA .....</b>	<b>31</b>
2.1 ANIMAIS ESTUDADOS.....	31
2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	31
2.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	32
2.3.1 CIRURGIA DE CLAMPEAMENTO RENAL.....	32
2.3.2 CIRURGIA DE OVARIECTOMIA.....	33
2.4 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL.....	34
2.4.1 CANULAÇÃO.....	34
2.4.2 REGISTRO E PROCESSAMENTO DE SINAL.....	34
2.5 COLETA DE SANGUE.....	35
2.6 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS.....	36
2.7 DOSAGEM HORMONAL.....	36
2.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	37
2.9 DOSAGEM DE HEMOGLOBINA.....	38
2.10 QUIMILUMINESCÊNCIA INICIADA POR T-BOOH.....	39
2.11 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA-RS).....	40
2.12 SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	41
2.13 CATALASE.....	42
2.14 GLUTATIONA PEROXIDASE.....	43
2.15 GLUTATIONA S-TRANSFERASE.....	44
2.16 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP).....	45
2.17 DETERMINAÇÃO DE NITRATOS.....	47
2.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
3.1 CIRURGIA DE CLAMPEAMENTO RENAL.....	49
3.2 DOSAGEM HORMONAL.....	50
3.3 PRESSÃO ARTERIAL.....	51
3.4 FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	52
3.5 RESULTADOS CORAÇÃO.....	53
3.5.1 TBA-RS.....	53

3.5.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE .....	55
3.5.3 CATALASE .....	56
3.5.4 GLUTATIONA PEROXIDASE .....	57
3.5.5 GLUTATIONA S-TRANSFERASE.....	58
3.5.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP).....	59
3.5.7 NITRATOS.....	60
3.6 RESULTADOS RINS .....	61
3.6.1 TBA-RS.....	61
3.6.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	63
3.6.3 CATALASE.....	64
3.6.4 GLUTATIONA PEROXIDASE .....	66
3.6.5 GLUTATIONA S-TRANSFERASE.....	68
3.6.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP).....	69
3.6.7 NITRATOS.....	71
3.7 AVALIAÇÃO SISTÊMICA .....	72
3.7.1 QUIMILUMINESCÊNCIA .....	72
3.7.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE .....	74
3.7.3 CATALASE .....	76
3.7.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP).....	78
3.7.5 NITRATOS.....	80
3.8 RESUMO DOS RESULTADOS.....	82
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>99</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>100</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação das EAO, a partir da redução do O <sub>2</sub> .....	2
Figura 2: Distribuição eletrônica da molécula de oxigênio e alguns de seus derivados.....	4
Figura 3: Reação de Fenton.....	4
Figura 4: Reação de Haber – Weiss.....	5
Figura 5: Representação esquemática da reação da LPO.....	7
Figura 6: Dismutação do Radical Superóxido pela SOD .....	11
Figura 7: Decomposição do Peróxido de Hidrogênio pela Catalase .....	12
Figura 8: Redução de hidroperóxidos pela GPx e regeneração da glutathiona reduzida pela glutathiona redutase.....	12
Figura 9: Exemplo de reação de detoxificação através da glutathiona S-transferase .....	13
Figura 10: Biossíntese e Metabolismo de Estrogênios .....	16
Figura 11: Demonstração do local de colocação do clipe na artéria renal. ....	24
Figura 12: Mecanismo pressor do modelo de hipertensão 2 rins 1 clipe..	25
Figura 13: Reação do óxido nítrico com o superóxido.....	28
Figura 14: Cirurgia de colocação do clipe na artéria renal.....	33
Figura 15: Demonstração da atrofia apresentada por alguns dos rins esquerdos dos animais hipertensos.. ..	49
Figura 16: 17 β-estradiol. ....	50
Figura 17: Pressão arterial média.....	51
Figura 18: Frequência cardíaca.....	52
Figura 19: Conteúdo de TBA-RS em homogeneizado cardíaco.....	54
Figura 20: Atividade da superóxido dismutase em homogeneizado cardíaco. ....	55
Figura 21: Atividade da catalase em homogeneizado cardíaco .....	56
Figura 22: Atividade da glutathiona peroxidase em homogeneizado cardíaco. ....	57
Figura 23: Atividade da glutathiona S-transferase em homogeneizado cardíaco. ....	58
Figura 24: Avaliação da capacidade antioxidante total em homogeneizado cardíaco .....	59
Figura 25: Avaliação de nitratos em homogeneizado cardíaco .....	60

Figura 27: Conteúdo de TBA-RS em homogeneizado de rim direito e esquerdo.....	62
Figura 28: Atividade da superóxido dismutase em homogeneizado de rim direito e esquerdo.....	63
Figura 29: Atividade da catalase em homogeneizado de rim direito e esquerdo.....	65
Figura 30: Atividade da glutathione peroxidase em homogeneizado de rim direito e esquerdo.....	67
Figura 31: Atividade da glutathione S-transferase em homogeneizado de rim direito e esquerdo.....	68
Figura 32: Avaliação da capacidade antioxidante total em homogeneizado de rim direito e esquerdo.....	70
Figura 33: Avaliação de nitratos em homogeneizado de rim direito e esquerdo.....	71
Figura 34: Quimiluminescência em sangue no 3°, 10° e 20° dia do tratamento. ....	73
Figura 35: Atividade da superóxido dismutase em sangue, no 3°, 10° e 20° dia do tratamento.....	75
Figura 36: Atividade da catalase em sangue, no 3°, 10°, e 20° dia do tratamento. ....	77
Figura 37: Capacidade antioxidante total em plasma, no 3°, 10° e 20° dia do tratamento.....	79
Figura 38: Quantificação de nitratos em plasma, no 3°, 10° e 20° dia do tratamento .....	81

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Resumo dos resultados em tecido cardíaco.....	83
Tabela 2: Resumo dos resultados em tecido renal.....	84
Tabela 3: Resumo dos resultados da avaliação sistêmica. ....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS

CDNB - Cloro Dinitro Benzeno

CAT - Catalase

EAO - Espécies Ativas de Oxigênio

ECA - Enzima Conversora da Angiotensina

FC - Frequência Cardíaca

GPx - Glutathione Peroxidase

GR - Glutathione Redutase

GSH - Glutathione Reduzida

GSSG - Glutathione Oxidada

GST - Glutathione S-transferase

LDL - Lipoproteínas de Baixa Densidade

LH - Hormônio Luteinizante

LPO - Lipoperoxidação

NO - Óxido Nítrico

PAM - Pressão Arterial Média

PMSF - Fluoreto de Fenil Metil Sulfonila

QL - Quimiluminescência

SOD - Superóxido Dismutase

SRA - Sistema Renina Angiotensina

TBA-RS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TRAP - Capacidade Antioxidante Total

TRH - Terapia de Reposição Hormonal

## RESUMO

A contribuição dos radicais livres na hipertensão está relacionada com a produção do ânion radical superóxido e sua influência na ativação da enzima conversora da angiotensina (ECA). Os estrogênios têm um potencial antioxidante bastante relevante, uma vez que esse hormônio esteróide pode interferir no processo de iniciação da lipoperoxidação (LPO), atuando como “scavenger” de radicais livres. Foram objetivos deste trabalho avaliar a influência dos estrogênios na LPO, na capacidade antioxidante total (TRAP), na atividade das enzimas antioxidantes e no metabolismo do NO em coração e rins de ratas hipertensas. Procurou-se, ainda, avaliar a progressão temporal do estresse oxidativo sistêmico.

Foram utilizadas 60 ratas Wistar, divididas em 4 grupos: normotenso controle (NCO), hipertenso controle (HCO), normotenso castrado (NCA) e hipertenso castrado (HCA). Foi induzida a hipertensão renovascular (modelo Goldblatt 2) por 21 dias e, concomitantemente, realizada a ovariectomia. Num grupo de animais, amostras de sangue foram coletadas no 3º, 10º e 20º dia. Em outros animais, os corações e rins foram homogeneizados, no 21º dia.

Na avaliação sistêmica, a quimiluminescência (QL) aumentou do 3º para o 21º dia nos grupos HCO, NCA e HCA em relação ao grupo NCO. A atividade da superóxido dismutase (SOD) seguiu o mesmo padrão de oscilação. Os níveis de nitratos também aumentaram no 21º dia nos grupos HCO, NCA e HCA. No entanto, no 3º dia mostraram-se menores que os do grupo NCO. A atividade da catalase (CAT) mostrou-se aumentada no 10º dia nos grupos HCO e HCA em relação aos grupos NCO e NCA. Já o TRAP apresentou-se diminuído no 10º dia nos grupos HCO, NCA e HCA em relação ao 3º dia e ao grupo NCO.

Nos tecidos, a LPO apresentou-se aumentada no grupo NCA em relação ao grupo NCO e o grupo HCA apresentou-se aumentado em relação aos grupos HCO e NCA . A atividade da SOD em homogeneizado cardíaco apresentou-se aumentada nos grupos hipertensos. A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) em tecido cardíaco apresentou-se aumentada no grupo HCO em relação aos grupos NCO e HCA. A atividade da CAT em homogeneizado cardíaco apresentou-se aumentada nos grupos HCO e NCA em relação ao grupo NCO. No rim a CAT apresentou-se aumentada nos grupos castrados. A atividade da glutathiona S-transferase (GST), em coração e rins, apresentou-se aumentada com a hipertensão. O TRAP apresentou-se, em tecido cardíaco, diminuído no grupo HCO e aumentado no grupo HCA. No tecido renal, apenas o grupo NCA apresentou TRAP aumentado. O nível de nitratos em tecido cardíaco apresentou-se menor no grupo HCO e maior no grupo NCA em relação ao grupo NCO. O grupo HCA apresentou-se menor em relação ao grupo NCA. Nos homogeneizados de rins a SOD, a GPx e os nitratos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

Pode-se observar que tanto a hipertensão quanto a castração induziram um aumento de estresse oxidativo sistêmico que progride com o passar do tempo, assim como adaptações do sistema antioxidante enzimático e não enzimático. Nos tecidos, o estresse oxidativo é aumentado pela retirada dos estrogênios, efeito este potencializado quando concomitante à hipertensão. Os dados encontrados neste trabalho confirmam a ação antioxidante dos estrogênios.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo assim altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A formação destes compostos é estabelecida pela perda ou ganho de um elétron, como por exemplo, na fissão homolítica de uma ligação covalente, em que cada um dos átomos fica com um elétron desemparelhado. Cabe ressaltar, que o oxigênio molecular é um birradical, muito embora sua reatividade seja baixa porque seus dois elétrons desemparelhados têm spin paralelos (restrição de spin) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; YU, 1994).

A geração das EAO ocorre durante os processos de oxidação biológica. Dentre os quais, podemos destacar a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa, para formação de ATP na mitocôndria. A princípio, o oxigênio ( $O_2$ ) é reduzido até água ( $H_2O$ ) recebendo quatro elétrons de uma só vez pela citocromo oxidase. Entretanto, em razão de sua configuração eletrônica, o oxigênio tem uma forte tendência a receber um elétron de cada vez gerando compostos intermediários altamente reativos, como visto na figura 1. Destes compostos intermediários, pode-se destacar: o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ). Sendo que, a formação destas moléculas, ocorre em aproximadamente 5% de todo processo de redução do oxigênio até água. Algumas das EAO são fortemente oxidantes e apresentam pelo

menos um elétron desemparelhado, geralmente, no orbital mais externo, sendo denominados de radicais livres. Ainda deve-se relatar o estado excitado do oxigênio denominado de oxigênio “singlet”, que também pode causar danos à célula (DEL MAESTRO, 1980; MENEHINI, 1987; YU, 1994).

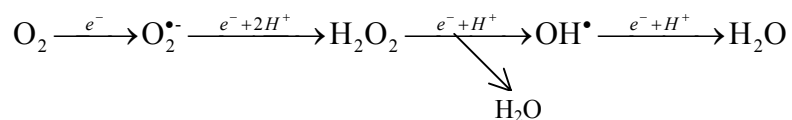


Figura 1: Formação das EAO, a partir da redução do O<sub>2</sub>.

Tem-se ainda outras fontes de radicais no organismo, que podem ser enzimáticas ou não. Os principais sistemas enzimáticos que catalisam a redução univalente do O<sub>2</sub>, são as cicloxigenases, lipoxigenases, xantina oxidase, aldeído oxigenase, flavina desidrogenase e peroxidases. A redução univalente do O<sub>2</sub> também ocorre em reações não enzimáticas e em reações de autooxidação como as que ocorrem com catecolaminas, flavinas e ferridoxinas, além de reações catalisadas por ferro, cobre e radiação ionizante (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Há também a formação de EAO em processos inflamatórios, quando ocorre isquemia – reperfusão, ativação de neutrófilos, hiperóxia, exposição à radiação, entre outros (Mc CORD, 1987; HARRIS, 1992).

Cada EAO tem suas próprias características, mostrando diferentes reatividades e tempos de meia-vida (DEL MAESTRO, 1980; YU, 1994). Na figura 2, podemos observar que a molécula diatômica de oxigênio é um radical livre, mas possui spins paralelos, o que dificulta a reação química com outras moléculas e torna o oxigênio mais estável quimicamente. As formas de oxigênio mais reativas são os oxigênios “singlets”  $\Delta$  e  $\Sigma$ , que não possuem restrição de spin e por isso são muito mais reativas que o oxigênio molecular no estado fundamental (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



O ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio à água, a partir do mesmo serão formadas as demais EAO. A sua dismutação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (YU, 1994). O peróxido de hidrogênio é o segundo intermediário do processo oxidativo, podendo ser produzido indiretamente, pela redução univalente do oxigênio, seguida da dismutação do ânion radical superóxido e/ou diretamente, pela redução bivalente do oxigênio molecular. Apesar de não ser um radical livre, esta espécie ativa pode originar o radical hidroxil, o que seria bastante prejudicial à célula, além de ter a propriedade de atravessar facilmente membranas biológicas (DEL MAESTRO, 1980; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), por sua vez, é um dos mais potentes oxidantes dos sistemas biológicos. Este radical livre possui a capacidade de atravessar as membranas e pode reagir com biomoléculas, como lipídios insaturados e o DNA, apesar de seu curto tempo de meia vida, da ordem de  $10^{-9}$  segundos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

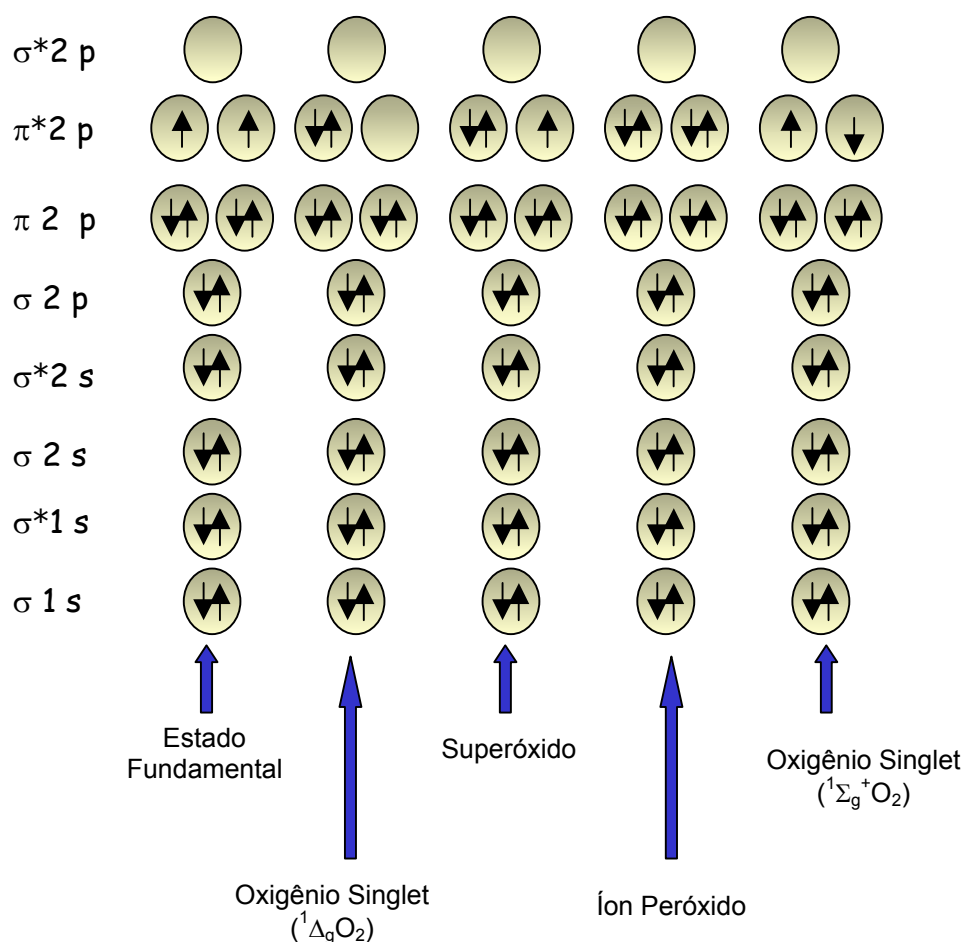


Figura 2: Distribuição eletrônica da molécula de oxigênio e alguns de seus derivados (modificado de Halliwell & Gutteridge, 1999).

A mais reativa destas espécies, o radical hidroxil, é formado através de reações que necessitam a presença de íons metais de transição como o ferro e o cobre. A reação do peróxido de hidrogênio com íons ferroso ou cúprico é chamada de reação de Fenton (1894) que leva à produção do radical hidroxil, altamente reativo (Fig 3).

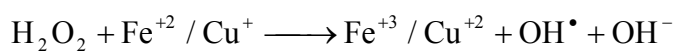


Figura 3: Reação de Fenton

O radical hidroxil também pode ser formado a partir da reação do ânion superóxido com o peróxido de hidrogênio em presença de íons divalentes de metais de transição, reação esta descrita por Haber-Weiss em 1934 (Fig 4).

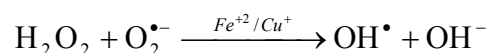


Figura 4: Reação de Haber – Weiss

Assim que o radical hidroxil é formado, reage imediatamente com qualquer biomolécula em sua vizinhança, que pode, por ser uma molécula pequena e não possuir carga, atravessar membranas e causar dano ao DNA. Já o ânion superóxido tem um tempo de meia-vida mais longo que o radical hidroxil, sendo mais estável quimicamente, mas podendo também reagir com biomoléculas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Muitas são as evidências de que as EAO provocam ou influenciam inúmeros processos orgânicos degenerativos como a catarata, o enfisema, a artrite, a doença de Parkinson, a porfiria aguda intermitente, a lesão isquêmica, o diabetes aloxânico e até mesmo a mutação, o câncer e o envelhecimento (MENEHINI, 1987; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Além disso, diversas enzimas têm sua atividade modulada por radicais livres como a aconitase, diversas hidratases e desidratases (GARDNER et al., 1995).

### 1.1.1 REATIVIDADE DAS EAO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

O mecanismo exato pelo qual as células são injuriadas pelas EAO ainda não é bem claro. Sabe-se que elas atacam os lipídios de membrana num processo denominado lipoperoxidação (LPO). A LPO é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares. Por serem formadas em grande parte por lipídios insaturados e proteínas, as membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo. Este processo pode modificar propriedades da membrana, sobretudo a permeabilidade e a

capacidade de transporte, o que pode gerar a liberação de enzimas que degradam os lisossomos e rapidamente destroem as células. Além de ser um fator de renovação da membrana, a LPO é um passo essencial na biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos a partir do ácido araquidônico. É também importante para formação de vesículas de endocitose e exocitose (MENEHINI, 1987). A LPO é uma reação em cadeia: um radical livre reage com um composto não radical, formando outro radical livre e assim sucessivamente. As EAO podem também levar à destruição de proteínas, através da oxidação de grupamentos sulfidril, além de poderem oxidar o DNA (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Na primeira fase das reações em cadeia, tem-se a iniciação, ou seja, uma EAO, provavelmente o radical hidroxil ou o oxigênio “singlet” – espécies com spins antiparalelos – ataca uma molécula orgânica, atraindo um átomo de hidrogênio do lipídio, formando um radical centrado no carbono, o qual, tende a se estabilizar por um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. Este, ao se combinar com o oxigênio, produz um radical peroxil, o qual reage com uma nova molécula de lipídio, gerando o lipoperóxido e um novo radical centrado no carbono (fase de propagação). Essa reação em cadeia continua até que a fase de terminação ocorre quando dois radicais reagem entre si formando um tetróxido, o qual é instável e pode ser decomposto. O lipoperóxido sofre rearranjo molecular, formando malondialdeído e outros aldeídos (Fig 5) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; THOMAS, 1997).

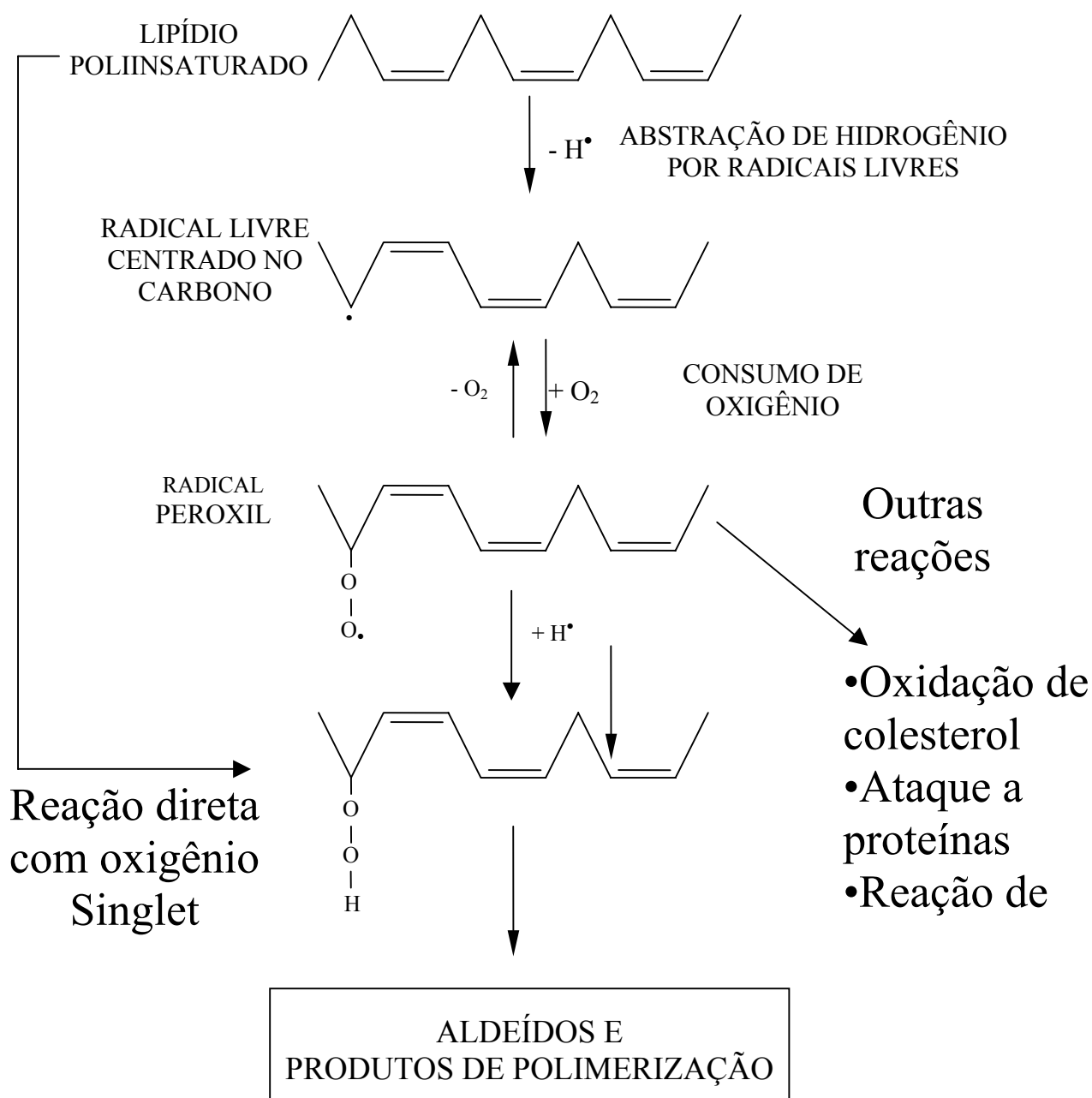


Figura 5: Representação esquemática da reação da LPO(modificado de Halliwell & Gutteridge,1999).

O tetróxido pode ser decomposto dando origem ao oxigênio “singlet” e carbonilas excitadas (RUSSEL, 1957). Estas espécies excitadas retornam ao seu estado fundamental emitindo quantas de luz visível. Este processo é conhecido como quimiluminescência e constitui-se em um importante método de quantificação da LPO.

Os efeitos da lipoperoxidação podem ser observados pela mudança não somente no ambiente lipídico das membranas biológicas (modificações na fluidez e na seletividade), mas também pelas alterações de suas proteínas (receptores e canais iônicos) (YU, 1994).

As proteínas também sofrem reações oxidativas iniciadas pelas EAO, que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais. Processos como fragmentação, agregação, além da maior susceptibilidade a proteases, exemplificam algumas das ações dos radicais livres sobre as proteínas (YU, 1994). Pode haver, também, ataque ao DNA nuclear, sobretudo pelo radical hidroxil, sendo identificado pela presença de bases oxidadas de DNA como a 8-hidroxideoxiguanosina. O DNA mitocondrial também é bastante atingido, uma vez que a mitocôndria é a grande fonte de EAO (YU, 1994).

## **1.2 SISTEMAS DE DEFESA CONTRA AS EAO**

Há substâncias que possuem o potencial de neutralizar as ações dos radicais livres, prevenindo, desta forma, os danos oxidativos. Tal grupo é chamado de antioxidantes. Quando presentes em baixa concentração, comparada ao substrato oxidável, os antioxidantes retardam ou previnem a oxidação deste substrato, que pode ser lipídio, proteína, DNA ou outras moléculas. O sistema

antioxidante é responsável pela proteção celular contra o estresse oxidativo. E seus mecanismos de ação são diversos, e podem incluir remoção do oxigênio presente no meio, varredura das EAO ou seus precursores, inibição da formação das EAO, quelação de metais que catalisam sua formação, indução de aumento da geração de antioxidantes endógenos, entre outros mecanismos, envolvendo muitas vezes integração funcional de vários destes componentes (HALLIWELL, 1997). Os antioxidantes minimizam os distúrbios no meio interno e preservam a ótima atividade celular além de estarem estrategicamente compartimentalizados nas organelas celulares para gerarem proteção máxima (YU, 1994).

Existem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que atuam, concomitantemente, na proteção celular. Os sistemas enzimáticos consistem na primeira linha de defesa frente à produção de EAO. Estas enzimas evitam o acúmulo de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não haja produção do radical hidroxil, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa (YU, 1994).

Quando o antioxidante age neutralizando os radicais livres na fase de iniciação ou propagação da LPO, havendo a formação de um composto menos reativo, é chamado de “scavenger”. A substância antioxidante pode, também, ter a propriedade de absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, neste caso é chamada de “quencher” (SIES & MURPHY, 1991; HALLIWELL, 1997).

### **1.2.1 DEFESAS ENZIMÁTICAS**

A distribuição das enzimas antioxidantes está intimamente relacionada com as fontes de espécies ativas de oxigênio (EAO). A regulação das enzimas antioxidantes, necessária para manutenção

da homeostase celular em condições adversas ao organismo, depende de vários fatores, como especificidade do órgão, idade, estágio de desenvolvimento, perfil hormonal e disponibilidade de cofatores (HARRIS, 1992).

Dentre as defesas enzimáticas responsáveis pela detoxificação das espécies ativas de oxigênio (EAO) salientam-se três enzimas: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase (GPx)(SIES, 1997).

As superóxido dismutases ( $SOD_1$ ,  $SOD_2$  e  $SOD_3$ ) são metaloenzimas que catalisam muito eficientemente a dismutação de dois íons superóxido para formar peróxido de oxigênio (que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas) e oxigênio (Fig 6). Esta reação pode ocorrer espontaneamente em pH fisiológico, porém, com presença da SOD, a velocidade desta reação é  $10^4$  vezes maior (FRIDOVICH, 1975; YU, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Esta enzima está amplamente distribuída, com uma variedade de formas, as que contém cobre e zinco em seu sítio de ativação são encontradas no citoplasma das células eucarióticas ( $SOD_1$ ), as que contém manganês que encontram-se na mitocôndria ( $SOD_2$ ), mais precisamente na matriz mitocondrial, as encontradas nos fluidos extracelulares (EC-SOD ou  $SOD_3$ ) que podem apresentar grande variação na sua atividade em diferentes espécies e há ainda uma ferro-enzima que foi identificada em bactérias (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; CHANCE et al., 1979). Sua função enzimática foi associada em 1969 a proteínas já conhecidas que continham cobre, que eram chamadas de cupreínas (MCCORD & FRIDOVICH, 1969). Porém, posteriormente foram descobertas outras SODs que continham outros metais além do cobre, como manganês e ferro (KEELE et al., 1970; YOST & FRIDOVICH, 1973).



Tem sido reconhecido que estas enzimas, que estão presentes em quase todos os organismos vivos, são um sistema de defesa essencial para a sobrevivência em condições aeróbias. O papel deletério do superóxido durante a isquemia, que ocorre em transplante de órgãos, muitas intervenções cirúrgicas e durante acidentes vasculares no cérebro e coração, sugerem que a SOD pode ter um uso clínico potencial. Isto levou à pesquisa por SOD miméticos, uma vez que a SOD humana tem curto tempo de meia-vida (<10min), e não penetra nas células (GOLDSTEIN & CZAPSKI, 1996). Além disso, a modulação da atividade da SOD extracelular pode ser utilizada no tratamento de doenças vasculares, como a arteriosclerose (LUOMA et al., 1998).

O mecanismo de catálise da dismutação do superóxido por SOD e SOD miméticos tem sido sugerido como “mecanismo de ping-pong”, no qual o catalisador oscila entre dois estados de oxidação (GOLDSTEIN & CZAPSKI, 1996).

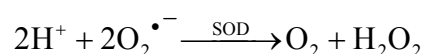


Figura 6: Dismutação do Radical Superóxido pela SOD

A geração de peróxido de hidrogênio foi demonstrada como um evento fisiológico diretamente relacionado ao consumo de oxigênio, sendo a catalase e as peroxidases as enzimas que metabolizam este peróxido de hidrogênio à água e oxigênio, impedindo assim a formação de radical hidroxil e conseqüente dano celular. A catalase (CAT) está presente em todos os tipos de células de mamíferos, porém ela é uma enzima altamente específica pois possui atividade apenas para peróxidos de hidrogênio, de etila e de metila (Fig 7) (CHANCE et al., 1979).

A CAT está presente principalmente nos peroxissomas, e por não possuírem peroxissomas alguns órgãos estão mais expostos a danos, como o coração, pulmões e cérebro. Nestes órgãos, a defesa se dá por um mecanismo que pode ser a difusão do peróxido de hidrogênio para o sangue, onde reage com a catalase eritrocitária (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

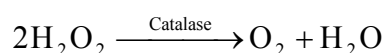


Figura 7: Decomposição do Peróxido de Hidrogênio pela Catalase

Entre as peroxidases, a mais importante é a glutathione peroxidase. A glutathione peroxidase (GPx), catalisa a redução de vários peróxidos, principalmente do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos (YU, 1994). Para a redução dos peróxidos, esta enzima utiliza o grupamento sulfidril da glutathione reduzida, que pode ser reciclada pela interação da forma oxidada com NADPH através da enzima glutathione reductase (Fig 8). Os grupamentos sulfidril doam dois hidrogênios, formando uma ligação dissulfeto, que pode transformar a molécula de peróxido em um álcool, ou, no caso do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), em água. Há dois tipos de glutathione peroxidase uma que utiliza selênio como cofator, que é encontrada na matriz mitocondrial e no citosol e uma selênio independente, que se encontra apenas no citosol e metaboliza exclusivamente hidroperóxidos orgânicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

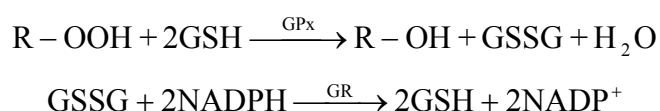


Figura 8: Redução de hidroperóxidos pela GPx e regeneração da glutathione reduzida pela glutathione reductase.

A glutathione tem alta atividade no fígado e eritrócitos, onde ela foi descoberta. Tem moderada atividade no coração e nos pulmões e baixa atividade no músculo (MILLS, 1960).

Outra classe de enzimas que também tem um importante papel fisiológico na detoxificação são as enzimas chamadas glutathione S-transferases (GSTs). Estas enzimas agem na detoxificação de potentes agentes alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos como herbicidas, pesticidas e xenobióticos. Como pode ser visto na figura 9, as GSTs catalisam a reação destes compostos (no exemplo, o cloro dinitro benzeno) com o grupamento SH da glutathione, neutralizando assim seus sítios eletrofílicos e transformando-os em produtos mais hidrossolúveis, que são mais facilmente metabolizáveis (HABIG et al., 1974).

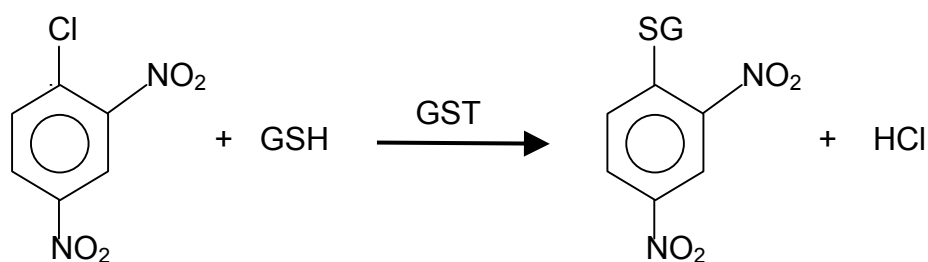


Figura 9: Exemplo de reação de detoxificação através da glutathione S-transferase (GST).

### 1.2.2 DEFESAS NÃO-ENZIMÁTICAS

As defesas não enzimáticas incluem os antioxidantes lipofílicos como os tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides e os antioxidantes hidrofílicos como o ácido ascórbico, o ácido úrico, a glutathione, a melatonina, indóis e catecóis (SIES & MURPHY, 1991; SIES, 1997).

Mais recentemente, tem sido identificada, uma ação antioxidante para os estrogênios. Os estrogênios podem ser considerados “scavengers” de radicais livres, atuando na defesa não enzimática. Os estrogênios protegem da arteriosclerose, pois inibem a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) por ligação aos radicais livres de oxigênio (KUHL, 1994). Os estrogênios são terminadores da reação de oxidação em cadeia dos radicais livres, além de suprimirem a peroxidação tanto “in vitro” como “in vivo” (NIKI & NAKANO, 1990).

### **1.3 ESTROGÊNIOS**

#### **1.3.1 BIODISSÍNTese E METABOLISMO**

Os estrogênios de ocorrência natural são o 17  $\beta$ -estradiol, a estrona e o estriol, sendo o estradiol o hormônio mais potente e o mais produzido e o estriol, o menos potente. A estrutura destes hormônios é formada, basicamente, de um núcleo esteroidal de dezoito carbonos. Os estrogênios podem ser produzidos, em mulheres na pré-menopausa, pelas células da granulosa e da teca interna dos folículos ovarianos, corpo amarelo e placenta (GANONG, 1995). Em mulheres na pós-menopausa e no homem, a principal fonte deste hormônio é o tecido adiposo, onde a estrona é sintetizada a partir da desidroepiandrosterona, que é secretada no córtex da supra renal. Em gestantes, os estrogênios são produzidos pela placenta, com a utilização da desidroepiandrosterona e de seu derivado 16-alfa-hidroxil, para a produção de estrona e estriol, respectivamente (WILLIAMS & STANCEL, 1996).

A biossíntese estrogênica pode se dar a partir de androgênios, com a aromatização da androstenediona resultando na formação de estrona. Essa reação é catalisada pela aromatase, que também catalisa a passagem da testosterona para  $17\beta$ -estradiol (Fig 10) (HOUSSAY, 1984; GANONG, 1995).

A atividade da aromatase é induzida pelas gonadotrofinas (LH), que aumentam os níveis de  $AMP_{cíclico}$ . Desta forma, ocorre a elevação da atividade da enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (precursor dos hormônios esteróides) nas células da teca interna. Com a formação da androstenediona, parte dela é convertida em estradiol e vai para circulação sanguínea. Outra parte vai para as células da granulosa, que vão produzir estradiol após suprirem as necessidades de androgênios (WILLIAMS & STANCEL, 1996).

As células granulosas têm receptores para LH o que facilita a liberação do estradiol e aumenta a atividade da aromatase. Além disso, as células granulosas maduras adquirem receptores para LH o que estimula a produção de estradiol (HOUSSAY, 1984; GANONG, 1995).

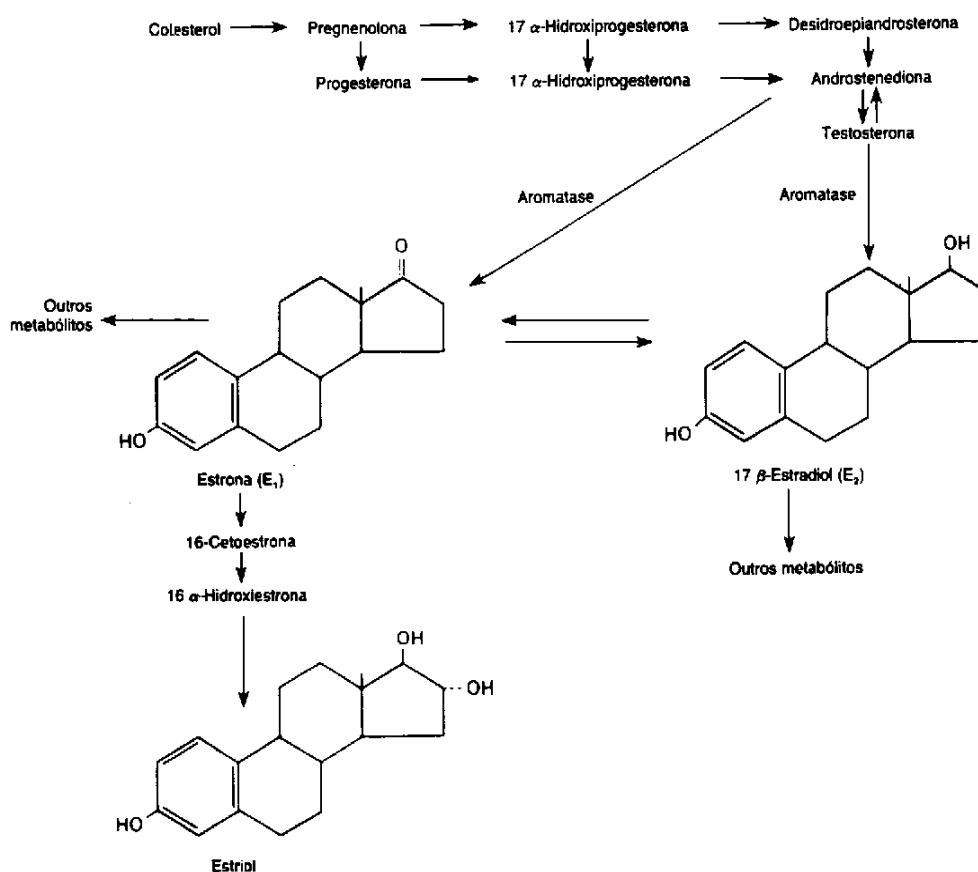


Figura 10: Biossíntese e Metabolismo de Estrogênios (Ganong, 1995)

Os níveis de 17β-estradiol estão sempre em equilíbrio com os de estrona na circulação. A estrona é metabolizada a estriol em grande parte no fígado (GANONG, 1995). O estradiol é oxidado reversivelmente à estrona, mantendo o equilíbrio referido acima (WILLIAMS & STANCEL, 1996).

Cerca de 2% do estradiol circulante está livre, o restante está ligado às proteínas (60% à albumina, 38% globulinas fixadoras de esteróides gonádicos) (GANONG, 1995).

A metabolização dos estrogênios ocorre principalmente no fígado, onde os mesmos são oxidados ou conjugados com o ácido glicurônico ou sulfatos, facilitando a sua eliminação pela bile e, principalmente, pela urina (WILLIAMS & STANCEL, 1996).

### 1.3.2 MECANISMO DE AÇÃO E EFEITOS

Os estrogênios, bem como os demais hormônios esteroidais, têm como mecanismo de ação clássico a regulação da transcrição gênica. Através da sua capacidade de atravessar as membranas celulares, ligam-se aos receptores do núcleo formando um complexo que se liga ao DNA, estimulando a transcrição de alguns genes (WILLIAMS & STANCEL, 1996; GANONG, 1995).

Mais recentemente, tem-se estudado também mecanismos de ação não clássicos, ou de efeito rápido, onde os hormônios esteróides atuam na membrana plasmática. A ação na membrana pode se dar através de efeitos não específicos na sua fluidez ou de ligações em receptores de membrana específicos para hormônios esteróides. Estudos já identificaram sítios de ligação para hormônios esteróides, com moderada atividade e alta especificidade. Outra ação na membrana pode ser por ligações com receptores de membrana de neurotransmissores, como o do GABA (BRANN et al., 1995).

Os estrogênios causam efeitos importantes no desenvolvimento da genitália e da mama feminina, facilitam o crescimento dos folículos ovarianos e aumentam a motilidade das trompas uterinas. Juntamente com essas ações, o seu papel nas alterações cíclicas do endométrio, colo uterino e vagina é bastante relevante. Os estrogênios não só aumentam a quantidade de proteínas contráteis da musculatura uterina, como também o seu fluxo sanguíneo, tornando-a mais ativa e mais sensível à ação da ocitocina. Esse hormônio sexual também age sobre as demais glândulas, diminuindo a liberação do FSH e, de acordo com a situação, aumentando ou diminuindo a secreção de LH (HOUSSAY, 1984). Além disso, podem aumentar a liberação de angiotensinogênio (GANONG, 1995).

Outra ação, também muito importante, dos estrogênios é sobre o comportamento, estimulando o libido em humanos e o estro em animais (talvez por estímulos em certos neurônios do hipotálamo) (GANONG,1995). Os estrogênios também são responsáveis pelas características secundárias femininas e por isso são ditos “hormônios feminilizantes” (WILLIAMS & STANCEL, 1996; GANONG, 1995).

#### **1.4 ESTROGÊNIOS COMO ANTIOXIDANTES**

Sabe-se que a estrutura das moléculas estrogênicas influencia bastante na sua atividade antioxidante, devido à presença de um grupamento hidrofênólico. O  $17\beta$ -estradiol, por exemplo, tem um potencial antioxidante bastante relevante, uma vez que esse hormônio esteróide pode interferir no processo de iniciação da LPO. Esta interferência se dá pela modificação na rota reacional da peroxidação, evitando assim a sua propagação e subsequente geração das EAO. O dano no DNA também pode ser evitado por ação estrogênica, principalmente, pela inibição da produção do  $O_2^{\bullet-}$ . Assim, os estrogênios possuem uma grande importância como antioxidantes, podendo ser usados contra os danos oxidativos teciduais, por exemplo nas arritmias que ocorrem na reperfusão (Mc HUGH et al., 1998).

Sabe-se também, que as modificações nas estruturas dos estrogênios são extremamente importantes para sua atividade antioxidante. Pode-se citar o exemplo dos sulfamatos de estrogênios que inibem a formação do radical  $O_2^{\bullet-}$  que pode ser gerado pelo sistema xantina-xantina oxidase.

Outra propriedade antioxidante dos estrogênios, além da atividade de “scavenger” de radicais livres, é a ação sobre a



regulação da atividade das enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase (GPx). Investigou-se a atividade da GPx eritrocitária ao longo do ciclo menstrual, foi verificado um aumento de sua ação enzimática quando houve picos de estrogênios ao longo do ciclo. Desta forma, sugere-se que a produção de estrogênios, no estado fisiológico, durante o ciclo hormonal regular, é de extrema importância na regulação da atividade da GPx eritrocitária (MASSAFRA et al., 1998).

Tal propriedade antioxidante, pode ser observada pela diminuição da LPO nas lipoproteínas. Por exemplo, o LDL quando se oxida gera o malondialdeído e outros derivados tóxicos para a célula que podem ser combatidos por ação dos estrogênios (ROMERO & RECKELHOFF, 1999).

Observou-se, entretanto, que o mesmo hormônio pode ser pró-oxidante, em consequência da formação de um metabólito denominado catecol-estrógeno (GENUTH, 1996; YOSHIE & OHSHIMA, 1998). O catecol-estrógeno pode ser oxidado à quinona por ação enzimática ou pela presença de um íon metálico, obtendo um sistema redox quinona-hidroquinona. A interconversão de um estado de oxidação para o outro favorece a formação do radical  $O_2^{\bullet-}$ , podendo levar a uma série de danos celulares em virtude da reatividade deste radical (YOSHIE & OHSHIMA, 1998).

## **1.5 EFEITOS DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES SOBRE DOENÇAS CARDÍACAS E HIPERTENSÃO**

Os estrogênios têm significativa ação redutora do colesterol plasmático, inibindo a aterogênese, por isso eles podem contribuir para reduzir a incidência de infarto do miocárdio e outras

complicações da doença vascular arteriosclerótica em mulheres na pré-menopausa. No entanto, altas doses de estrogênios ativos por via oral parecem promover trombozes, por chegarem ao fígado pelo sangue, em altas concentrações e alterarem a produção hepática dos fatores de coagulação. O aumento de estrogênio na circulação pode acarretar também um aumento dos níveis circulantes de angiotensinogênio, que pode causar uma estenose arterial renal e acarretar uma elevação significativa da pressão arterial em algumas mulheres. Devido a estes fatos, o tratamento estrogênico oral tem pouco valor prático na prevenção das coronariopatias (GANONG, 1995).

Em mulheres na pós-menopausa há um aumento na incidência de doenças cardiovasculares, devido à deficiência de estrogênios. Nestes casos, doses orais de estrogênios, que se assemelhem às quantidades orgânicas do hormônio, podem contribuir para redução destas cardiopatias (GENUTH, 1996). O uso de estrogênios reduz, significativamente, a incidência de doenças cardíacas, especialmente em mulheres pós-menopáusicas. Isso ocorre pela diminuição dos níveis de lipoproteínas plasmáticas. Porém, os riscos desta terapia devem ser mais estudados (PELZER et al., 1996).

As doenças cardiovasculares após a menopausa são causadas, principalmente, pelo desenvolvimento de arteriosclerose causada por deficiência de estrogênios. A principal causa destas doenças é o aumento do LDL-colesterol e de triglicerídeos como resultado de uma menor eliminação do LDL e outros lipídios pelo fígado e o aumento da oxidação do LDL na membrana arterial. Além disso, no sítio da lesão endotelial há ocorrência de vasoespasmos e agregação plaquetária que foi facilitada pela deficiência de estrogênios e que pode conduzir à isquemia (KUHL, 1994). Os estrogênios podem causar vasodilatação, endotélio-dependente, ou por bloqueio no influxo de cálcio dentro das células do músculo liso. Isto é muito

importante para as mulheres com lesões endoteliais e esclerose coronária (KUHL, 1994).

Os hormônios esteróides sexuais, sobretudo, os estrogênios, possuem uma grande relevância no processo de hipertensão. O 17 $\beta$ -estradiol, por exemplo, pode aumentar a liberação de NO, quando administrado cronicamente. Ao passo que, o mesmo tem ação sobre a musculatura lisa, como vasodilatador, se aplicado agudamente (DI et al., 1999). Os estrogênios também podem modular a expressão do receptor AT<sub>1</sub> de angiotensina II. Por este motivo, sendo de extrema importância na regulação da pressão arterial e nas doenças cardiovasculares (KRISHNAMURTHI et al., 1999).

Por outro lado, os estrogênios, como o 17 $\beta$ -estradiol, podem aumentar a resposta de contração vascular dependente do endotélio. Esta constatação está baseada na influência destes hormônios na ação da norepinefrina sobre o metabolismo do ácido araquidônico nas células do endotélio, potencializando a contração da musculatura lisa vascular por ação deste agonista adrenérgico (MILLER & VANHOUTTE, 1990).

## **1.6 HIPERTENSÃO**

A hipertensão é a elevação sustentada da pressão arterial sistêmica (sistólica e/ou diastólica). Pode ser produzida pelo aumento do débito cardíaco ou principalmente pelo aumento da resistência periférica, constituindo-se, desta forma, em uma das doenças cardiovasculares mais comuns e relevantes (WILLIAMS & STANCEL, 1996; GANONG, 1995).

Cerca de 90 a 95% das pessoas hipertensas apresentam hipertensão essencial, existindo dados que demonstram uma forte tendência hereditária ligada a isso (GUYTON & HALL, 1996). Informações obtidas no projeto Genoma Humano e em estudos recentes sobre as bases genéticas da hipertensão podem revolucionar os tratamentos e auxiliar no desenvolvimento de terapias mais efetivas, baseadas no genótipo do paciente (CARRETERO & OPARIL, 2000). Observa-se, na hipertensão, uma disfunção endotelial, mas ainda não se pode afirmar se ela está relacionada com a causa da hipertensão ou é secundária a esta (EVORA et al., 1995). Na maior parte dos pacientes hipertensos, as endotelinas, que são peptídeos com potente ação vasoconstritora derivados do endotélio, estão em níveis normais no plasma, podendo estar elevadas somente em pacientes com hipertensão severa (SCHIFFRIN, 1998).

Devido à grande ocorrência de casos de hipertensão na população e de todos problemas decorrentes da hipertensão, foram desenvolvidos uma série de modelos experimentais para o estudo desta em animais. Esses podem envolver a manipulação dos rins, do sistema nervoso ou das supra-renais, além da inibição da síntese de óxido nítrico. Também há várias cepas de ratos que desenvolvem hipertensão espontaneamente (ratos espontaneamente hipertensos-SHR), ou quando alimentados com dieta rica em sódio (ratos DAHL) (RIBEIRO et al., 1992; JOVER et al., 1993; GANONG, 1995). O estudo de animais hipertensos pode elucidar alguns mecanismos envolvidos na hipertensão, facilitando o controle clínico desta e melhorando a qualidade de vida de pacientes com esta doença.

### **1.6.1 MODELO DE HIPERTENSÃO GOLDBLATT**

O modelo de hipertensão descrito por Goldblatt e colaboradores em 1934 é um modelo de hipertensão renovascular. O fundamento do modelo experimental envolve a restrição do suprimento de sangue para o rim esquerdo, por clampeamento da artéria renal esquerda (Fig 11), sendo que o rim direito pode ser mantido intacto (modelo 2 rins, 1 clipe) ou ser retirado (modelo 1 rim, 1 clipe). A artéria renal esquerda é a escolhida para colocação do clipe devido às dificuldades de se acessar a artéria renal direita em ratos (RUZICKA & LEENEN, 1994).

A constrição de uma das artérias renais, preservando-se o rim colateral, em ratos, resulta numa elevação progressiva da pressão arterial, cujos níveis pressóricos são dependentes do grau de constrição da artéria renal imposta pelo diâmetro do clipe e da extensão desta constrição. A aplicação do clipe de prata na artéria renal esquerda produz pequena elevação da pressão arterial já no primeiro dia após estenose. A elevação gradual da pressão independe do grau de estenose imposto pelo clipe, mas os valores de pressão arterial atingidos variam conforme este grau, podendo causar hipertensão de moderada a severa (RUZICKA & LEENEN, 1994).

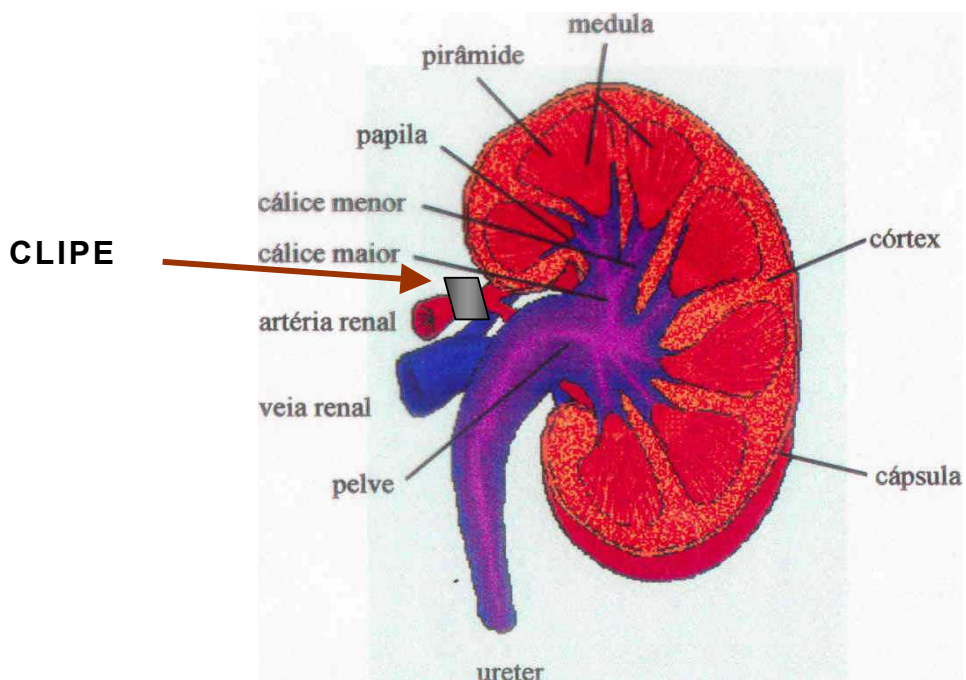


Figura 11: Demonstração do local de colocação do clipe na artéria renal.

O peso inicial dos animais deve ser verificado, pois o estreitamento produzido pelo clipe irá variar conforme o peso do animal. Em cerca de 10 a 20% dos animais a pressão arterial é normalizada após uma resposta pressora inicial, e os rins destes animais normalmente mostram-se atróficos (RUZICKA & LEENEN, 1994).

No modelo de hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe, o estabelecimento e a manutenção do aumento da pressão arterial é dependente, principalmente, do sistema renina-angiotensina (SRA), existindo componentes pressores rápidos (agudos) e lentos (crônicos) para o desenvolvimento da hipertensão (Fig 12). O componente rápido é o aumento da resistência periférica total mediada por angiotensina II circulante. O componente lento é o aumento no volume sanguíneo mediado por ações renais da angiotensina II e aldosterona, efeitos tróficos da angiotensina II nos músculos cardíacos e lisos vasculares (resultando em hipertrofia cardiovascular), e efeitos da angiotensina II na atividade simpática,

além de ativação do SRA vascular. Nesse modelo, o rim colateral ao que recebeu o clipe vai excretar com eficiência a sobrecarga de sódio imposta pelo rim isquêmico, prevenindo assim o acúmulo deste íon no organismo. Assim, este modelo de hipertensão está associado com altos níveis de renina plasmática e hipersecreção de aldosterona (RUZICKA & LEENEN, 1994).

O rim intacto, também tem um importante papel para o desenvolvimento da hipertensão, uma vez que este apresenta um aumento na atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) intra-renal e contém altos níveis de angiotensina II, mesmo apresentando uma baixa taxa de renina (RUZICKA & LEENEN, 1994). Neste modelo, o sistema de endotelinas não é ativado (SCHIFFRIN, 1998).



Figura 12: Mecanismo pressor do modelo de hipertensão 2 rins 1 clipe. SRA: sistema renina-angiotensina; AngII: angiotensina II

## 1.7 PAPEL DOS RADICAIS LIVRES NA HIPERTENSÃO

O estresse oxidativo é definido como um distúrbio no balanço dos pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos pró-oxidantes, levando a um potencial dano às células (HALLIWELL, 1997). Dentre as doenças cardiovasculares que estão relacionadas com o desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo, pode-se destacar a hipertensão, já que o estresse oxidativo causa uma redução do vasorrelaxamento dependente do endotélio. A regulação do tônus vascular, em condições fisiológicas e patológicas, está relacionada com mecanismos de oxi-redução, destacando-se o papel do óxido nítrico, que é um radical livre gasoso com atividade vasorrelaxante (MONCADA, 1991). As EAO podem reagir com o NO endotelial, sendo importantes mediadores da regulação do tônus vascular. Estas podem ainda estar envolvidas em várias etapas da hipertensão arterial, como aumento da resistência vascular periférica, disfunção do relaxamento dependente do endotélio, remodelamento vascular e complicações tardias, como hipertrofia cardíaca (LAURINDO & LUZ, 1995). Estudos realizados em cultura de células, demonstram que o peróxido de hidrogênio induz contração de células endoteliais, um efeito que parece ser essencialmente dependente de proteína quinase C e cálcio, que causam a liberação de outros fatores vasoativos secundários (LOPES-ONGIL et al., 1999).

Foram encontradas ligações entre a hipertensão por doença renal crônica e síntese do óxido nítrico. Em pacientes com falência renal crônica, foi verificado um aumento nas concentrações de arginina dimetilada, um falso substrato de ocorrência natural da enzima NO sintase, em níveis suficientemente altos para inibir a síntese de NO (KUO & SCHROEDER, 1995).



Um aumento na produção de EAO, como peróxido de hidrogênio, superóxido e também um aumento de lipoperóxidos, além de uma diminuição da síntese de NO foi observado em pacientes com hipertensão essencial quando comparados a indivíduos normais. Já quando tratados com fármacos anti-hipertensivos, os níveis voltaram a ser semelhantes aos dos controles. Estes pacientes com hipertensão arterial ainda apresentaram diminuídas as concentrações de antioxidantes, tais como a vitamina E e a superóxido dismutase (KUMAR & DAS, 1993).

A angiotensina II estimula a produção do radical superóxido, que tem grande importância na regulação do tônus vascular, pois pode se combinar com o óxido nítrico, sendo considerado um fator constritor derivado do endotélio. O superóxido pode reagir diretamente com o NO, inativando-o e formando nitratos com atividade biológica reduzida, ou ainda reage com o NO formando o radical peroxinitrito que é um subproduto tóxico fortemente oxidante, além de inativar diretamente a guanilato ciclase no endotélio (LAURINDO & LUZ, 1995).

O mecanismo de formação do peroxinitrito pela reação do superóxido com o NO é independente de ferro e outros íons de metais de transição. O decaimento espontâneo do peroxinitrito a nitrato ocorre após sua protonação, formando radical hidroxil. O processo de oxidação de moléculas próximas pelo peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) compete com sua transformação em nitrato ( $\text{NO}_2$ ), sendo o potencial redox do peroxinitrito próximo ao do radical hidroxil (Fig 13) (DENICOLA et al., 1995).

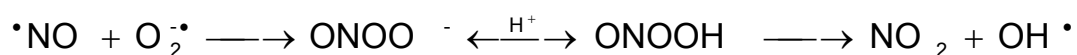


Figura 13: Reação do óxido nítrico (NO) com o superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) formando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que é rapidamente protonado a ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ), e a decomposição do mesmo em nitrato ( $\text{NO}_2$ ) e radical hidroxil ( $\text{OH}\cdot$ ).

Estudos em ratos mostram, que quando ocorre a inibição da síntese do NO por longo período, há um aumento da produção do ânion radical superóxido, com a elevação do estresse oxidativo intracelular no endotélio das aortas. O mecanismo sugerido, para explicar esta situação, baseia-se na propriedade do NO fazer uma “down-regulation” da expressão dos genes e na atividade das enzimas xantina oxidase e NADPH oxidase dos vasos sanguíneos (USUI et al., 1999).

Por outro lado, a contribuição dos radicais livres na hipertensão está relacionada com a produção do ânion radical superóxido e sua influência na ativação da enzima conversora da angiotensina (ECA). Usando antioxidantes como a N-acetil-cisteína (NAC) (“scavenger” de radicais livres) ocorreu uma diminuição da atividade da ECA. O mecanismo proposto para explicar este fato, identifica o superóxido como um segundo mensageiro intracelular. Este último é proveniente da resposta celular aos estímulos de fatores de promoção de crescimento como, por exemplo, o fator de crescimento de fibroblastos e endotelina (USUI et al., 1999).

## 1.8 HIPÓTESE

A contribuição dos radicais livres na hipertensão está relacionada com a produção do ânion radical superóxido e sua influência na ativação da enzima conversora da angiotensina (ECA). Os estrogênios têm um potencial antioxidante bastante relevante, uma vez que esse hormônio esteróide pode interferir no processo de iniciação da LPO, atuando como “scavenger” de radicais livres. Os estrogênios, também possuem uma grande relevância no processo de hipertensão, podendo aumentar a liberação de NO, potente vasodilatador.

Baseado nestes dados, o presente estudo procurou testar a hipótese de que a retirada dos estrogênios poderia alterar o perfil oxidativo e, assim, interferir no desenvolvimento da hipertensão em ratas. Tanto a hipertensão quanto a castração poderiam levar a um aumento do estresse oxidativo e adaptação do sistema antioxidante. Os animais castrados e hipertensos teriam o estresse oxidativo aumentado e maior depleção das reservas antioxidantes.

## **1.9 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a influência da retirada dos estrogênios e da hipertensão, assim como seu efeito combinado sobre o estresse oxidativo cardíaco, renal e sistêmico em ratas.

### **1.9.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Induzir a castração e a hipertensão em ratas, verificando seus níveis pressóricos sanguíneos e frequência cardíaca após 21 dias.

- Avaliar o estresse oxidativo após 21 dias no coração e rins de ratas normo e hipertensas, castradas ou não, através das medidas de LPO, por TBA-RS, capacidade antioxidante total (TRAP), atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST) e metabólitos do NO.

- Avaliar a progressão temporal do estresse oxidativo sistêmico em ratas normo e hipertensas, na presença ou ausência de níveis fisiológicos de estrogênios, através das medidas de LPO, por QL, capacidade antioxidante total (TRAP), atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) e metabólitos do NO.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 ANIMAIS ESTUDADOS**

Foram utilizados, neste trabalho, ratas fêmeas Wistar, pesando entre 200–250 gramas. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS. Eles foram mantidos em caixas plásticas de 27 x 26 x 31 cm, com o assoalho recoberto com serragem, sendo cinco animais por caixa. Receberam alimentação e água à vontade e foram mantidos sob períodos de 12 horas luz/12 horas escuro e com temperatura em torno de 25°C.

### **2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais, sendo eles:

Grupo normotenso controle: animais que sofreram apenas a simulação das cirurgias de indução da hipertensão e de ovariectomia (n=10).

Grupo normotenso castrado: animais ovariectomizados que sofreram a simulação da cirurgia de indução à hipertensão (n=8).

Grupo hipertenso controle: animais não ovariectomizados que sofreram a indução da hipertensão renovascular pelo modelo proposto por Goldblatt (n=10).

Grupo hipertenso castrado: animais ovariectomizados e que, concomitantemente, sofreram a indução da hipertensão renovascular (n=12).

Todos os animais foram sacrificados três semanas após a realização das cirurgias de indução à hipertensão renovascular e/ou de ovariectomia e de simulação. Um grupo de animais foi utilizado para as análises de tecido, com o n variando de 8 a 12. Outro grupo foi utilizado para coleta de sangue no 3º, 10º e 20º dia após as cirurgias, para os 4 grupos experimentais detalhados anteriormente, no entanto, com n=5.

## **2.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS**

### **2.3.1 CIRURGIA DE CLAMPEAMENTO RENAL**

A cirurgia para indução da hipertensão arterial sistêmica, nos animais, foi feita seguindo o modelo experimental de hipertensão renovascular, segundo a técnica de Goldblatt (GOLDBLATT et al., 1934). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, depilados e sofreram uma incisão longitudinal no abdômen, de aproximadamente 2 cm de comprimento na pele e no tecido subcutâneo. Em seguida, uma segunda incisão atingiu a camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal. Nos animais hipertensos, foi colocado um clipe de prata de 0,3 mm de diâmetro interno por 2 mm de extensão na artéria renal esquerda, como pode ser observado na figura 14, deixando-se intacto o rim direito. Nos animais controle, foi realizada a mesma cirurgia, no entanto não houve a colocação do clipe. Para a realização da cirurgia os animais foram anestesiados

com quetamina (90 mg/Kg de peso corporal) e xilazina (10mg/Kg de peso corporal).

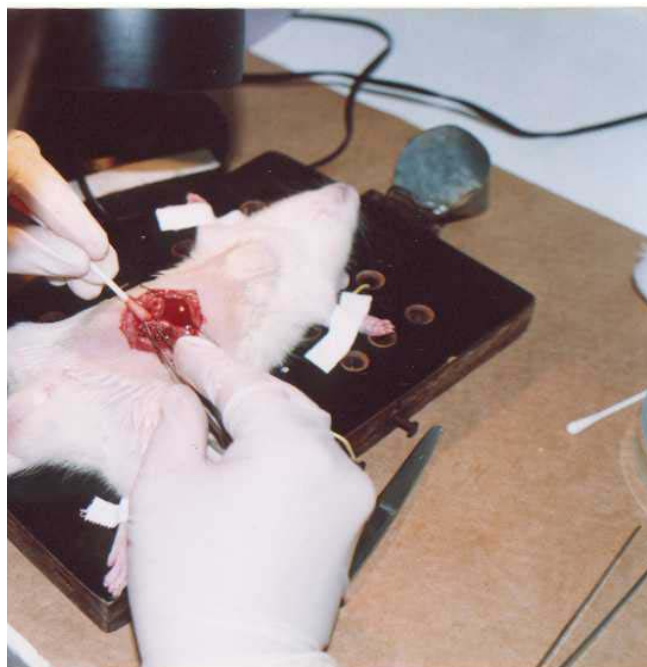


Figura 14: Cirurgia de colocação do clipe na artéria renal.

### **2.3.2 CIRURGIA DE OVARIECTOMIA**

Juntamente com a indução da hipertensão renovascular, foi feito o procedimento cirúrgico denominado de ovariectomia. Nas ratas, já anestesiadas e com a cavidade peritoneal exposta, foi encontrada uma massa de gordura que delimitava o ovário. Assim que o ovário era identificado, efetuava-se a ligadura abaixo da trompa uterina, retirando-o. Nos animais controle, foi realizada a mesma cirurgia, no entanto não houve a ligadura nem a retirada dos ovários. Após a cirurgia, era feita a sutura da incisão da pele em planos separados, primeiro a camada muscular e depois a cutânea.

## **2.4 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL**

### **2.4.1 CANULAÇÃO**

O procedimento cirúrgico bem como o cuidado pós-operatório, foram baseados na descrição feita por Waynforth e Flecknell (1992). Um dia antes do sacrifício dos animais, estes foram anestesiados novamente com quetamina (90 mg/Kg de peso corporal) e xilazina (10mg/Kg de peso corporal) e receberam catéteres na artéria carótida, exteriorizados na região dorsal do peçoço. Os catéteres foram confeccionados com tubos de Tygon PE-90, conectados a tubos de polietileno PE-50 (Clay Adms, USA). A desobstrução das cânulas se deu através da lavagem com heparina sódica (0,01 mL de Lique mine - Roche, 5000U) em 0,1 ml de solução fisiológica de NaCl 0,9%, antes de cada registro de pressão. A implantação das cânulas foi feita 24 horas antes da realização do registro de pressão arterial.

### **2.4.2 REGISTRO E PROCESSAMENTO DE SINAL**

Após o término das três semanas, foram feitos os registros de pressão batimento-a-batimento nos animais acordados. Teve-se o cuidado de mantê-los em local silencioso, evitando qualquer fator externo que interferisse na medida da pressão. Era feita também uma adaptação, colocando-se os ratos na sala onde eram feitos os registros uns 15 minutos antes. O tempo de registro da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) foi de 15 minutos.

Os registros foram adquiridos a partir da conexão da cânula, introduzida na carótida, a um transdutor de pressão (P23Db, Gould-Statham, Oxford, CA, USA) acoplado a um codificador de sinais



Hewlett Packard (HP 8805) que se encontrava ligado à placa analógico-digital CODAS (AT/MCA CODAS-DATAQ Instruments, Inc., Akron, Ohio, USA) por um seletor de canais, em um computador 486 (66 MHz e 8Mb RAM). A frequência de amostragem para realizar os registros de PA e FC foi de 2000 Hz. O programa utilizado (CODAS) permite trabalhar diretamente com a onda de pulso, que é vista na tela do computador, e os dados podem ser gravados em disco rígido. Neste mesmo programa, podem-se executar cálculos a partir dos valores obtidos, assim é possível trabalhar com valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) para cada batimento. A FC é obtida a partir do inverso do período, entre um pico e outro, multiplicado por 60 (segundos). Após gravados os sinais em disco rígido, gera-se uma planilha que pode ser analisada em programa Excel for Windows, a partir da qual se obtém valores de PAM e FC e seus respectivos gráficos, para cada animal experimental registrado.

## **2.5 COLETA DE SANGUE**

O sangue dos animais foi coletado no 3º, 10º e 20º dia após as cirurgias, através de punção do plexo venoso retro-orbital com um tubo de microhematócrito com uma das extremidades quebrada em bisel (HALPERN & PACAUD, 1951). Para isso, os animais foram previamente anestesiados com éter etílico. Após a coleta, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), o plasma foi retirado e congelado em freezer a -80°C para posteriores dosagens de estresse oxidativo. Os eritrócitos foram lavados com soro fisiológico (NaCl 0,9%), novamente centrifugados e aliquotados. Uma parte foi ressuspensa em soro para medida de lipoperoxidação, ao restante foi adicionado uma solução de ácido acético 1mM e sulfato de magnésio 4mM, e as

amostras foram congeladas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores dosagens das enzimas antioxidantes.

## **2.6 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS**

Os animais foram sacrificados após o registro de pressão arterial (21<sup>o</sup> dia) através de anestesia etérea. Os corações e rins foram rapidamente retirados e homogeneizados durante 30 segundos em Ultra-Turrax, na presença de KCl 1,15% (5 mL por g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10 $\mu$ L por mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para que não houvesse degradação das enzimas cuja atividade foi medida. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as dosagens posteriores (LLESUY et al., 1985).

## **2.7 DOSAGEM HORMONAL**

O método utilizado para dosar os estrogênios foi de quimiluminescência por imunoensaio competitivo. O aparelho utilizado para esta medida foi o IMMULITE 2000, com os seguintes reagentes: substrato quimiluminescente dioxetano (L2SUBM), reagente estradiol Wedge (L2E2A2), que é constituído pela combinação de estradiol com fosfatase alcalina e esferas recobertas com um anticorpo altamente específico para o estradiol (L2E212). O método se baseia na competição, pelo anticorpo específico para

estradiol, das moléculas de hormônio da amostra analisada com as moléculas do estradiol ligadas à fosfatase alcalina (Kit Immulite, Diagnostic Products Corporation - DPC, Los Angeles).

Inicialmente, a amostra sangüínea foi incubada com o reagente estradiol Wedge. Após o término desta, fez-se a lavagem dos vials para remover o restante das moléculas não ligadas ao anticorpo. Imediatamente, adicionou-se o substrato quimiluminescente dioxietano que reage com a fosfatase alcalina presente no meio, emitindo energia quimiluminescente.

A concentração de locais de ligação, ou seja, a quantidade de anticorpos, é fixa e limitante. Por essa razão, o aumento progressivo do número de moléculas de estradiol da amostra vai deslocar do anticorpo das moléculas do reagente estradiol Wedge, levando a diminuição da quimiluminescência. Esse decaimento de energia se deve a menor concentração de fosfatase alcalina no meio.

A quantidade absoluta de hormônio na amostra é calculada através de uma curva padrão. Esta curva é obtida pela incubação de quantidades variadas de hormônio autêntico com quantidades idênticas de anticorpos e de hormônio marcado.

Os níveis plasmáticos dos estrogênios (estradiol) foram avaliados no laboratório Weinmann no 20° dia após a cirurgia de castração. Os resultados foram expressos em pg por mL de plasma.

## **2.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS**

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, que utiliza como padrão uma solução de

albumina bovina na concentração de 1mg/mL (LOWRY et al., 1951). Para a realização das dosagens foram utilizados os seguintes reagentes:

Reativo de Folin Ciocalteu diluído em água destilada na proporção de 1:3;

2) Reativo C, que é composto por 50mL do reativo A, 0,5mL do reativo B1 e 0,5mL do reativo B2, onde os reativos A, B1 e B2 são respectivamente:

- $\text{NaHCO}_3$  (bicarbonato de sódio) 2% em NaOH (hidróxido de sódio) 0,1N;
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de cobre) 1%;
- $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (tartarato de sódio e potássio) 2%.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 20 $\mu$ L de amostra (homogeneizado de tecido ou sangue) em 0,78mL de água destilada e 2mL de reativo C preparado a fresco, aguardando-se 10 minutos. Depois, adicionava-se 0,2mL do reativo de Folin Ciocalteu, aguardando-se mais 30 minutos. Após, a solução adquiria uma coloração azulada que foi medida, em espectrofotômetro marca Varian modelo Cary, a 625 nm.

O cálculo foi feito utilizando-se um fator de correção médio calculado a partir da curva de calibração construída utilizando-se a solução padrão de albumina bovina.

## **2.9 DOSAGEM DE HEMOGLOBINA**

A hemoglobina foi dosada nas amostras de sangue preparadas para a medida de lipoperoxidação, ou seja, eritrócito diluído em soro

fisiológico. Esta análise foi feita utilizando-se uma mistura de cianetos para se obter o reativo de Drabkin, que reage com a hemoglobina formando cianometahemoglobina, medida, em espectrofotômetro marca Varian modelo Cary, a 546 nm.

#### SOLUÇÃO DE DRABKIN:

- ⇒ 0,85mL de KCN 9mM
- ⇒ 6,6mL de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 0,9mM
- ⇒ q.s.p. 10mL água destilada

Em um tubo de ensaio foi adicionado 5mL de Drabkin e 20 $\mu$ L de amostra, deixou-se reagir por 5 minutos e a absorbância foi lida em espectrofotômetro.

## 2.10 QUIMILUMINESCÊNCIA INICIADA POR T-BOOH

Este método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética, à amostra sangüínea, avaliando a capacidade de resposta produzida pela amostra. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar que gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. Este método é um dos mais sensíveis para a medida de LPO.

A QL foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em sala escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 4mL de uma solução

reguladora de KCl 140mM, fosfatos 20mM, pH 7,4, na qual foi adicionado 10 $\mu$ L de eritrócito diluído em soro fisiológico. Após, foi realizada uma leitura inicial, considerada a emissão de luz basal. O hidroperóxido orgânico utilizado foi o hidroperóxido de tert-butila, na concentração de 400mM, dos quais foram adicionados 30 $\mu$ L no meio de reação, para uma concentração final de 3mM. Foi medida, então, a emissão de luz e, desta, foi descontada a emissão basal para fins de cálculos. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por miligrama de hemoglobina (GONZALEZ-FLECHA et al., 1991).

## **2.11 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA-RS)**

Esta técnica é bastante utilizada para medir a LPO, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos.

A técnica consiste em aquecer o material biológico a ser testado na presença de ácido tiobarbitúrico em meio ácido, para medir espectrofotometricamente a formação de um composto corado (base de Schiff). Para que ocorresse a reação, adicionou-se, à 0,25mL de homogeneizado, 0,75mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%(P/V), que tem a função de desnaturar as proteínas presentes e acidificar o meio de reação. Essa mistura foi então agitada e centrifugada durante 3 minutos a 1000 g. Foram retirados 0,5mL do sobrenadante e a este foi adicionado 0,5mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V), que reage com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada no gelo. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 535 nm em

espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmoles de TBA-RS por mg de proteína (BUEGE & AUST, 1978).

## **2.12 SUPERÓXIDO DISMUTASE**

Como já comentado, a superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase e a glutathione peroxidase. A velocidade da reação catalisada pela SOD é  $10^4$  vezes maior que a velocidade de dismutação espontânea em pH fisiológico.

A técnica utilizada neste trabalho para determinação da SOD baseou-se na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela autooxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Portanto, quanto maior for a concentração de SOD na amostra, menor seria a autooxidação do pirogalol.

Neste ensaio, não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, por isso, se utiliza a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (MARKLUND, 1985).

Utilizou-se uma solução tampão (Tris-base na concentração de 50mM; EDTA na concentração de 1mM em pH 8,2), pirogalol 24mM (em ácido clorídrico a 10mM) e catalase a 30 $\mu$ M. Para se ter o resultado em unidade de SOD, necessita-se de um fator de calibração. Por isso, fez-se necessário a construção de uma curva padrão com uma solução de SOD de concentração conhecida. Desta forma, calculou-se o fator de calibração necessário para converter a percentagem de inibição da autooxidação em unidades de enzima.

No ensaio, adicionou-se à cubeta 988 $\mu$ L de tampão Tris, 4 $\mu$ L de catalase. Zerou-se o espectrofotômetro e adicionou-se 8 $\mu$ L de pirogalol, observando a oxidação do mesmo. Desta forma, obtivemos o máximo (100%) de oxidação desta substância, para calcular a percentagem de inibição causada pela SOD da amostra. Com a amostra, procedeu-se da mesma forma, apenas com o reajuste do volume de tampão de acordo com a quantidade de sangue ou homogeneizado de tecido adicionada, para se ter um volume final de 1mL. Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

### **2.13 CATALASE**

A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem. Sendo assim, a atividade da enzima catalase pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio.

Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm, sendo este o comprimento de onda onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se



cubetas de quartzo devido à alta energia do comprimento de onda no qual foram realizadas as medidas.

Para realização deste ensaio foram utilizados os seguintes reagentes: solução tampão de fosfato de sódio a 50mM e pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3M.

Em cubeta de quartzo, foram adicionados 955 $\mu$ L do tampão fosfato e 10 $\mu$ L de amostra do tecido ou 30 $\mu$ L de amostra de sangue, esta cubeta foi colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, foram adicionados 35 $\mu$ L do peróxido de hidrogênio para o tecido e 15 $\mu$ L para amostra de sangue e foi feito o monitoramento da diminuição da absorbância no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (BOVERIS & CHANCE, 1973).

## **2.14 GLUTATIONA PEROXIDASE**

A enzima glutathione peroxidase (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido, por isso, a sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx.

A amostra foi previamente preparada, adicionando-se uma mistura de cianetos (cianeto de potássio KCN 9mM e ferrocianeto de potássio  $K_3[Fe(CN)_6]$  0,9mM), para inibir a atividade pseudo-peroxidase da hemoglobina. Inicialmente, utilizou-se a mistura de cianetos para se obter o reativo de Drabkin, para medir a quantidade de hemoglobina. Depois de conhecida a concentração de

hemoglobina, estas mesmas soluções foram utilizadas, em diferentes proporções, para se obter a solução transformante, que vai transformar toda a hemoglobina em cianometahemoglobina.

#### SOLUÇÃO DE DRABKIN:

0,85mL de KCN 9mM  
6,6mL de  $K_3[Fe(CN)_6]$  0,9mM  
q.s.p. 10mL água destilada

#### SOLUÇÃO TRANSFORMANTE:

5,0mL de KCN 9mM  
5,0mL de  $K_3[Fe(CN)_6]$  0,9mM

A atividade da GPx foi medida em um espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary. Foi monitorada a diminuição de absorbância do NADPH a 340 nm, em um meio de reação contendo os seguintes reagentes: Solução tampão de fosfatos 143mM e EDTA 1mM, com pH 7,5; NADPH 0,24mM; Azida sódica 1mM, utilizada para inibir a atividade da catalase; GSH 5mM; Glutathiona redutase (GR) 0,25U/mL e Hidroperóxido de tert-butila 0,5mM.

Na cubeta do espectrofotômetro, foram adicionados 330 $\mu$ L de tampão, 50 $\mu$ L de homogeneizado de tecido, 500 $\mu$ L de NADPH, 10 $\mu$ L de azida sódica, 50 $\mu$ L de GSH e 10 $\mu$ L de GR. A absorbância foi registrada por um período de aproximadamente 3 minutos, até haver uma certa estabilização da linha base. Após, foram adicionados 50 $\mu$ L de hidroperóxido de tert-butila, e a diminuição da absorbância, devido ao consumo de NADPH, foi monitorada por aproximadamente 5 minutos. Os resultados foram expressos em  $\eta$ moles por minuto por mg de proteína (FLOHÉ & GUNZLER, 1984).

## 2.15 GLUTATIONA S-TRANSFERASE

As glutathionas transferases são um grupo de enzimas que catalisam reações de conjugação de glutathiona com vários substratos, tendo um papel importante na detoxificação de agentes alquilantes. Todas as transferases são ativas com o composto cloro-dinitro-benzeno (CDNB). A glutathiona S-transferase (GST) vai catalisar a reação de conjugação da glutathiona reduzida (GSH) com outras substâncias tóxicas, que possam vir a prejudicar o funcionamento celular. Essa combinação forma os conjugados de glutathiona que serão exportados para fora da célula. Deste modo, esta enzima desempenha um papel importante na detoxificação celular.

Este ensaio está baseado na capacidade da GST de combinar o 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno (CDNB) com a GSH formando 2,4 dinitro-fenil-glutathiona (DNP-SG), que é um composto corado. A formação do DNP-SG pode ser observada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 340 nm, utilizando os seguintes reagentes: Tampão fosfato de sódio 0,2M pH 6,5; GSH 20mM e CDNB 20mM.

Na cubeta de 1mL foram adicionados 850 $\mu$ L de tampão, 50 $\mu$ L de amostra, mais 50 $\mu$ L de GSH (de concentração final de 1mM), zerou-se o espectrofotômetro a 340nm, e, por fim, adicionou 50 $\mu$ L de CDNB e observou-se a formação do DNP-SG. O resultado é dado em  $\eta$ moles/minuto/mg proteína (MANNERVIK & GLUTHENBERG, 1981).

## **2.16 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)**

A técnica utilizada para medir a capacidade antioxidante total está baseada na formação de um radical que emite luz, e que vai ser detectado em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation

Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio, como descrito por Lissi e colaboradores em 1992. As determinações foram realizadas em sala escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente.

Esta técnica é dependente da temperatura. Em baixas temperaturas a reação é muito mais lenta. Isto porque esta técnica é baseada na decomposição do 2,2' Azo-bis (2-amidino-propano) diidrocloreto que gera radicais livres. Esta substância tem uma ligação dupla entre dois nitrogênios, bastante instável e que com o aumento da temperatura há rompimento (termólise), gerando dois radicais livres.

Estes radicais livres por sua vez vão reagir com o luminol e gerar um outro radical livre mais energético e com maior emissão de luz e, assim, mais facilmente detectado pelo contador. No entanto se tivermos presente no meio de reação um antioxidante, ele irá neutralizar os radicais livres e assim diminuir a emissão de luz. Como padrão utiliza-se o antioxidante trolox que forma um radical estável. Quando todo o antioxidante tiver reagido, o luminol reage novamente com o Azo radical e, novamente, há um aumento na emissão de luz.

Para medir a capacidade antioxidante da amostra, coloca-se a amostra no vial contendo Azo e luminol e observa-se por quanto tempo esta amostra inibe a formação dos radicais do luminol. Esta análise foi feita utilizando-se os seguintes reagentes: Tampão fosfato 50mM, pH 7,4; 2,2' Azo-bis (2-amidino-propano) diidrocloreto 0,5% em tampão fosfato; Luminol 1mg/mL em NaOH 0,1N e Trolox 8mg% em tampão fosfato.

O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 3,0mL de uma solução de Azo, na qual foi adicionado 10 $\mu$ L de luminol, fez-se uma leitura que tem que ser maior que 50000 cps. Após, adicionou-se amostra (50 $\mu$ L de plasma ou 5 $\mu$ L de homogeneizado de rim ou 10 $\mu$ L de homogeneizado de coração). Foram feitas também duas leituras utilizando-se trolox nas quantidades de 5 $\mu$ L e 10 $\mu$ L, para fazer a curva padrão. Os resultados foram expressos em mM de trolox (LISSI et al., 1992; EVELSON et al., 2001).

## 2.17 DETERMINAÇÃO DE NITRATOS

Os níveis de nitratos no plasma foram medidos pela reação das amostras com o reagente de Griess, pelo método descrito por Granger e colaboradores. Alíquotas de 50 $\mu$ L foram incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase por trinta minutos em temperatura ambiente, para conversão de nitrato em nitrito. O nitrito formado foi, então, analisado pela reação deste com o reagente de Griess. Forma-se um composto corado que foi medido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

A quantificação dos níveis de nitratos foi feita utilizando-se os seguintes reagentes: Reativo de Griess (1g de sulfanilamina, 0,1g de naftiletilendiamina, 2,3mL de ácido ortofosfórico 85%, 97,7mL de água); Tris 1 M, pH 7,5; NADPH 0,02 mM; Glicose 6-fosfato (G6P) 5 mM; Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) 10 U/mL e Nitrato redutase (NR) 1,0 U/mL.

No meio de reação, foram adicionados 50  $\mu$ L de amostra, 10  $\mu$ L de NADPH, 7  $\mu$ L de Tris, 23  $\mu$ L de uma mistura de G6P/G6PDH e

10 $\mu$ L de NR. A mistura foi incubada à temperatura ambiente, sob agitação, por 30 minutos. Após, foi adicionado 100  $\mu$ L do reagente de Griess, foi incubado à temperatura ambiente sob agitação por mais 10 min e a absorbância foi lida a 540 nm. Os resultados foram avaliados comparando-se com uma curva padrão feita utilizando-se nitrato de sódio 1 mM (GRANGER et al., 1999).

## **2.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Após efetuados todos os testes, foram calculadas as médias e os erros padrões das médias para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Para a análise estatística dos dados, foi realizado o teste de análise de variância complementado com o teste de comparações múltiplas de Student-Newmann-Keuls, sendo as diferenças consideradas significativas para  $p < 0,05$  (nível de significância de, pelo menos, 5%).

### 3. RESULTADOS

A apresentação dos resultados deste trabalho refere-se à média de cada grupo  $\pm$  o erro padrão da média. Para cada fenômeno estudado há uma figura, para que se obtenha uma melhor visualização dos dados.

#### 3.1 CIRURGIA DE CLAMPEAMENTO RENAL

Foi observado que cerca de 15% dos animais não desenvolveram hipertensão. E cerca de 10% dos animais, após o final do tratamento estavam com os rins esquerdos atróficos, sendo que alguns destes apresentavam hipertensão.

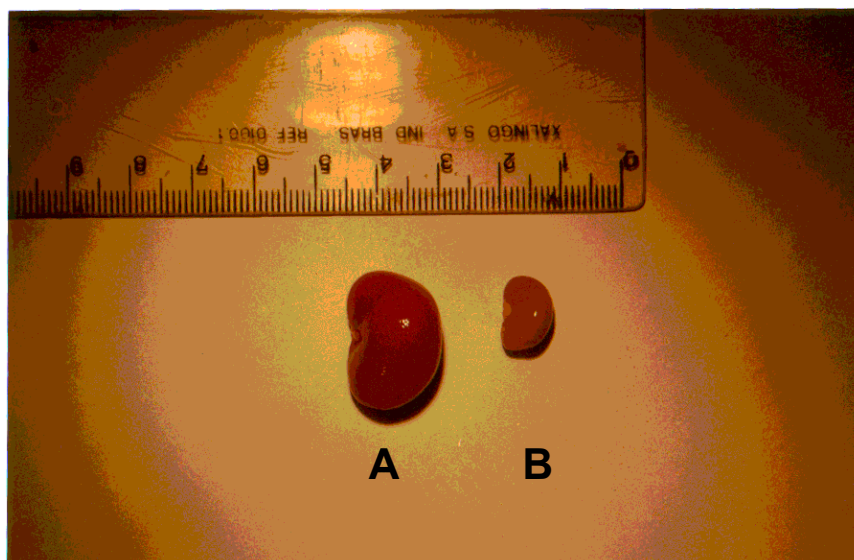


Figura 15: Demonstração da atrofia apresentada por alguns dos rins esquerdos dos animais hipertensos. Em A, vê-se um rim não isquêmico (rim direito), e em B, vê-se um rim atrófico de um animal hipertenso (rim esquerdo).

### 3.2 DOSAGEM HORMONAL

Os hormônios foram medidos para que houvesse uma avaliação da variação hormonal após a castração. Para isso, foram medidos os níveis de  $17\beta$ -estradiol.

Os níveis hormonais foram avaliados (em pg / mL) no plasma sangüíneo no 20° dia após a castração. Observou-se significativa redução dos níveis de  $17\beta$ -estradiol no grupo castrado em relação ao controle (Figura 16). Os níveis de  $17\beta$ -estradiol foram 96% menores no grupo NCA ( $28 \pm 3,4$ ) em relação as grupo NCO ( $690 \pm 52,5$ ).

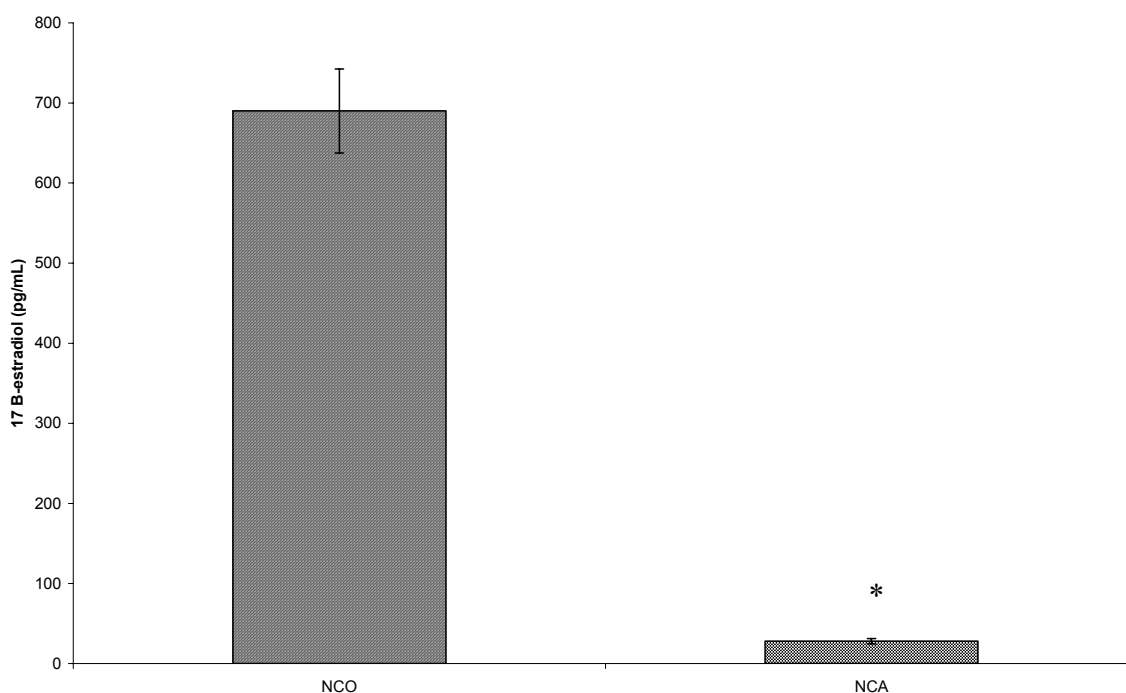


Figura 16:  $17\beta$ -estradiol (em pg por mL) nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

\* representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,001$ ).

NCO= normotenso controle e NCA= normotenso castrado.



### 3.3 PRESSÃO ARTERIAL

Foi analisada a pressão arterial média de cada grupo. Os resultados, em mmHg, estão apresentados na figura 17. A pressão arterial média foi 25% maior no grupo HCO ( $129,07 \pm 8,70$ ) e 31% maior no grupo HCA ( $133,26 \pm 7,35$ ), em relação ao grupo NCO ( $103,19 \pm 4,23$ ) e NCA ( $101,89 \pm 3,61$ ), respectivamente.

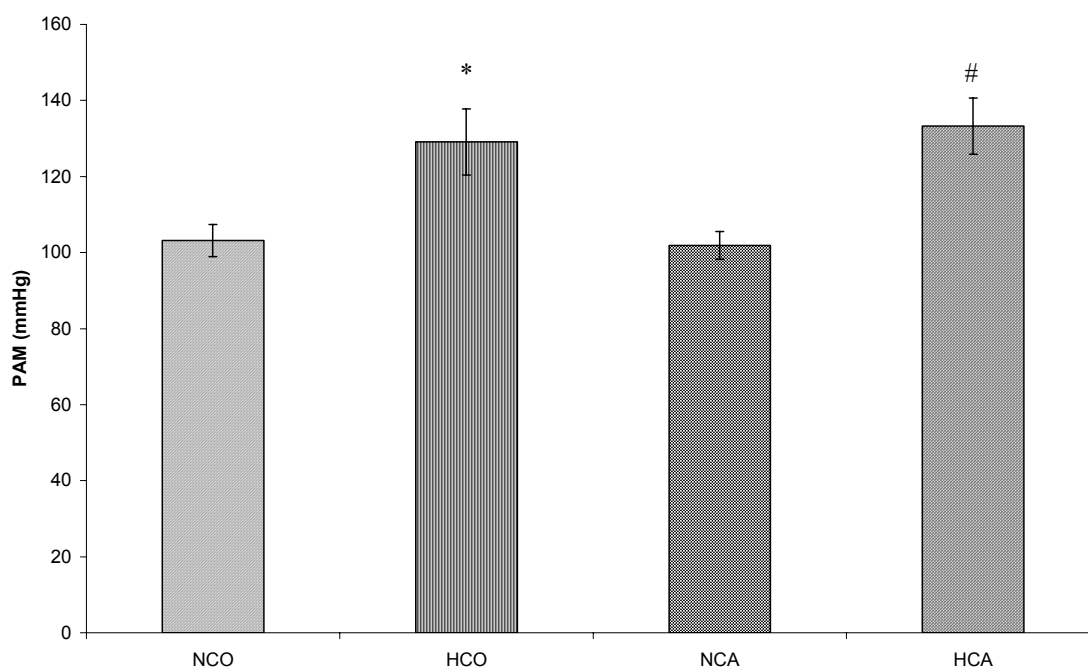


Figura 17: Pressão arterial média (em mmHg) nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

\* representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,01$ ).

# representa diferença significativa em relação ao grupo NCA ( $p < 0,01$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.4 FREQUÊNCIA CARDÍACA

A frequência cardíaca (em batimentos por minuto) não mostrou diferenças significativas entre os grupos estudados. Os valores obtidos foram os seguintes: grupo NCO  $390 \pm 32$ , grupo HCO  $370 \pm 15$ , grupo NCA  $360 \pm 13$  e grupo HCA  $365 \pm 12$ . Os resultados estão demonstrados na figura 18.

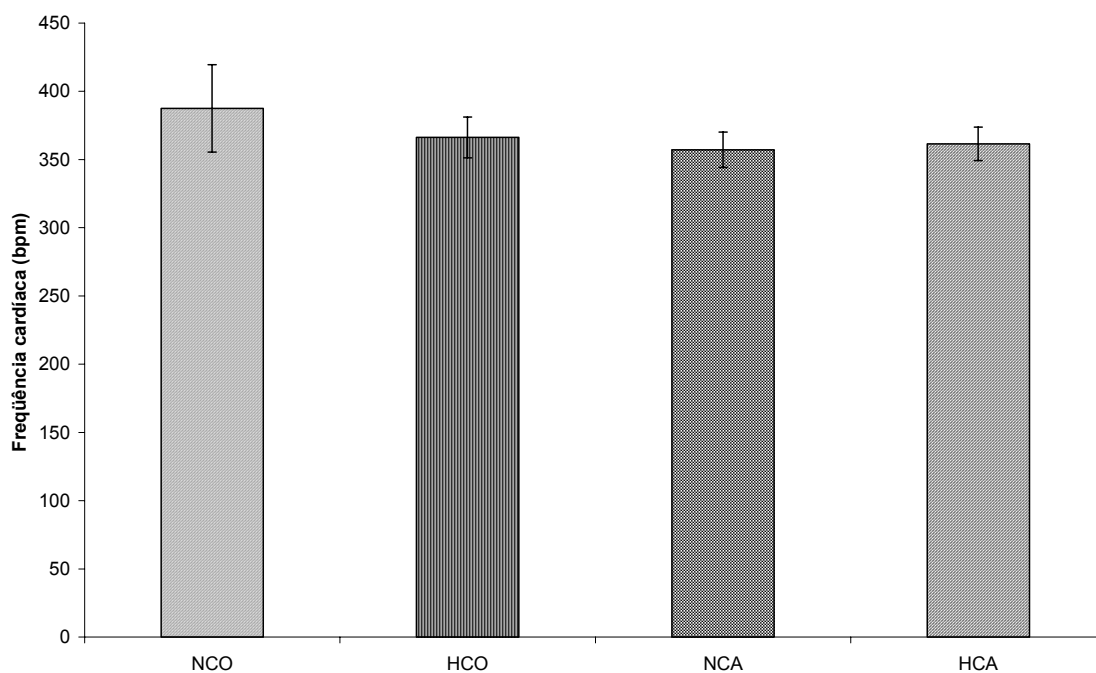


Figura 18: Frequência cardíaca (em batimentos por minuto) nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### **3.5 RESULTADOS CORAÇÃO**

Primeiramente, serão apresentados os resultados das análises bioquímicas realizadas em homogeneizados de corações.

#### **3.5.1 TBA-RS**

A lipoperoxidação tecidual foi avaliada pelo teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. O conteúdo de TBA-RS (em nmoles / mg de proteína) apresentou-se aumentado no grupo NCA ( $0,615 \pm 0,031$ ) em relação ao grupo NCO ( $0,174 \pm 0,017$ ). No grupo HCA ( $0,783 \pm 0,042$ ) o TBARS apresentou-se aumentado em relação aos grupos HCO ( $0,190 \pm 0,034$ ) e NCA. Já o grupo HCO não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo NCO. Os resultados são apresentados na figura 19.

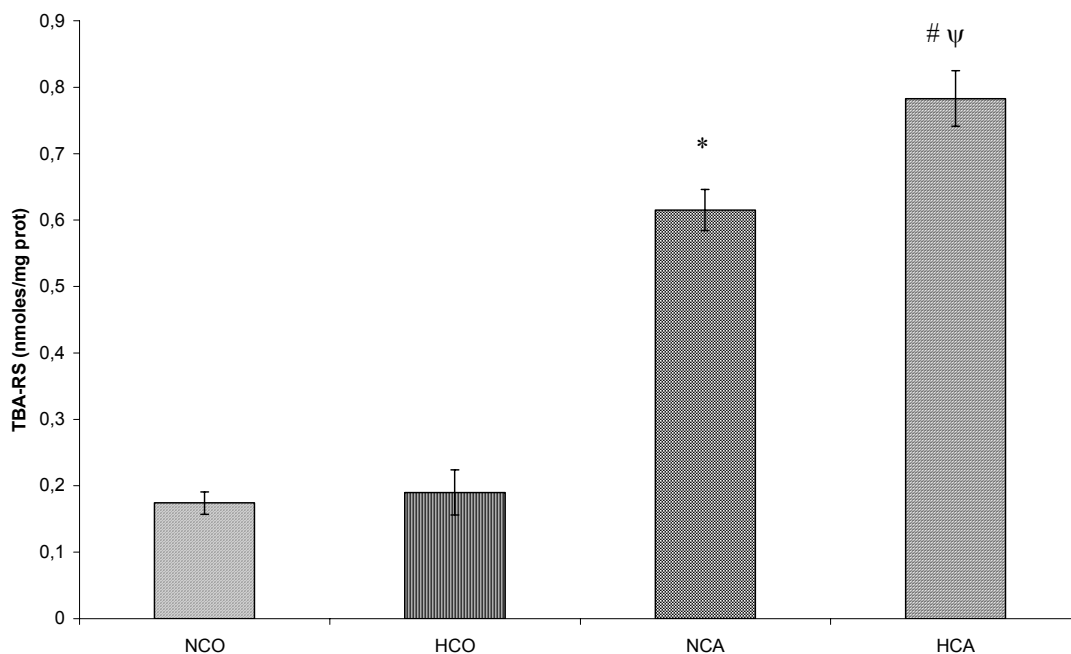


Figura 19: Conteúdo de TBA-RS (em nmoles por mg de proteína) em homogeneizado cardíaco nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

\* representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,001$ ).

# representa diferença significativa em relação ao grupo HCO ( $p < 0,001$ ).

$\psi$  representa diferença significativa em relação ao grupo NCA ( $p < 0,01$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.5.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE

Foram também avaliadas, neste trabalho, a atividade de algumas enzimas antioxidantes, uma delas foi a superóxido dismutase, que detoxifica ânion superóxido. A atividade desta enzima (em U / mg de proteína) apresentou-se aumentada no grupo HCO ( $13,42 \pm 1,00$ ) em relação ao grupo NCO ( $7,96 \pm 0,62$ ). O grupo HCA ( $13,55 \pm 0,92$ ) apresentou-se aumentado em relação ao grupo NCA ( $9,93 \pm 0,70$ ). Já os grupos HCA e NCA não apresentaram diferenças significativas em relação aos seus respectivos controles não castrados, grupos HCO e NCO. Os resultados são apresentados na figura 20.

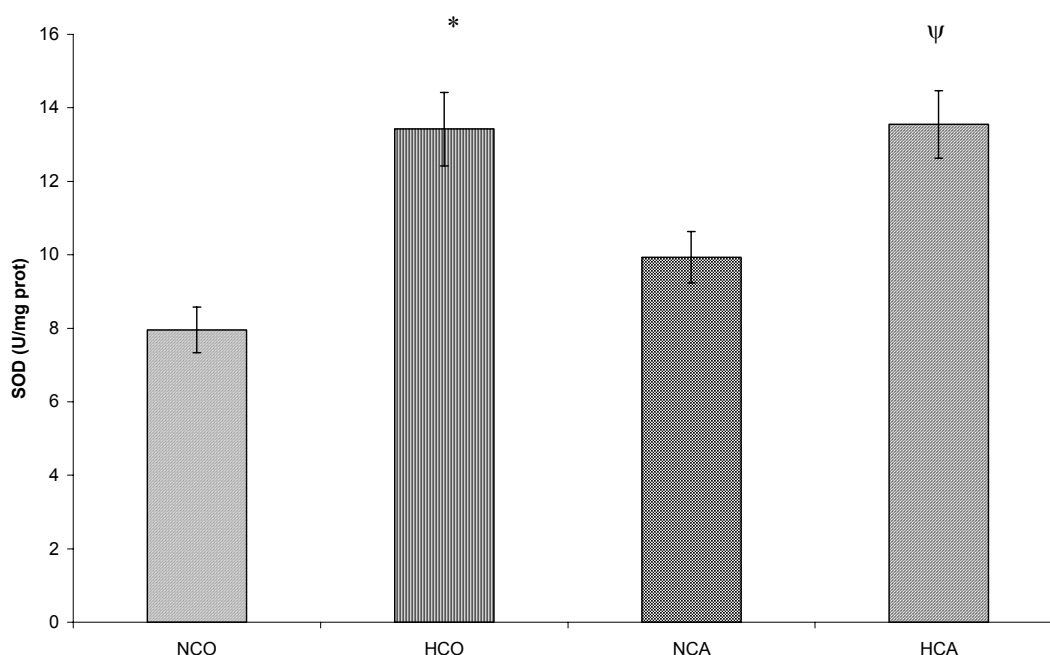


Figura 20: Atividade da superóxido dismutase (em U por mg de proteína) em homogeneizado cardíaco nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

\* representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,001$ ).

$\psi$  representa diferença significativa em relação ao grupo NCA ( $p < 0,05$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.5.3 CATALASE

Outra enzima antioxidante que teve sua atividade avaliada foi a catalase, de atuação específica sobre  $H_2O_2$ . A atividade desta enzima (em pmoles / mg de proteína) apresentou-se aumentada nos grupos HCO ( $34,78 \pm 2,73$ ) e NCA ( $48,68 \pm 4,34$ ) em relação ao grupo NCO ( $24,84 \pm 0,87$ ). O grupo HCA ( $40,24 \pm 2,58$ ) apresentou-se diminuído em relação ao grupo NCA. Já o grupo HCA não apresentou diferença significativa em relação ao seu controle não castrado, grupo HCO. Os resultados são apresentados na figura 21.

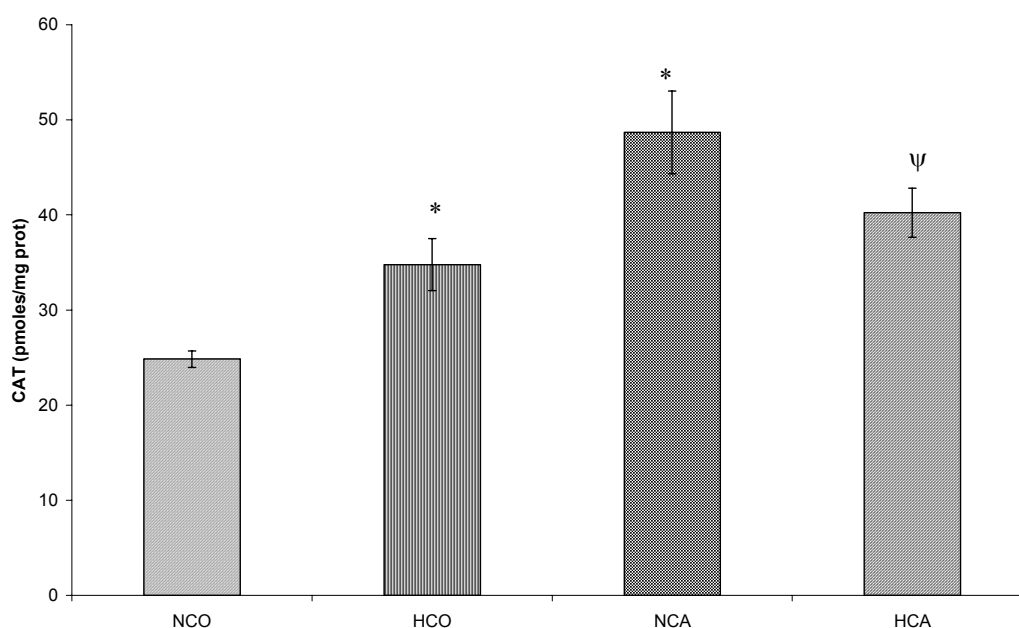


Figura 21: Atividade da catalase (em pmoles por mg de proteína) em homogeneizado cardíaco nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

\* representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,05$ ).

$\psi$  representa diferença significativa em relação ao grupo NCA ( $p < 0,05$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.5.4 GLUTATIONA PEROXIDASE

A terceira enzima antioxidante que teve sua atividade avaliada foi a glutathiona peroxidase, detoxificadora de  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos. A atividade desta enzima (em  $\eta$ moles / min / mg proteína) apresentou-se aumentada no grupo HCO ( $46,49 \pm 3,96$ ) em relação ao grupo NCO ( $26,57 \pm 2,88$ ). O grupo HCA ( $33,29 \pm 2,78$ ) apresentou-se diminuído em relação ao grupo HCO. Já o grupo NCA ( $28,71 \pm 0,67$ ) não apresentou diferença significativa em relação ao seu controle não castrado, grupo NCO, nem em relação ao grupo também castrado mas hipertenso, grupo HCA. Os resultados são apresentados na figura 22.

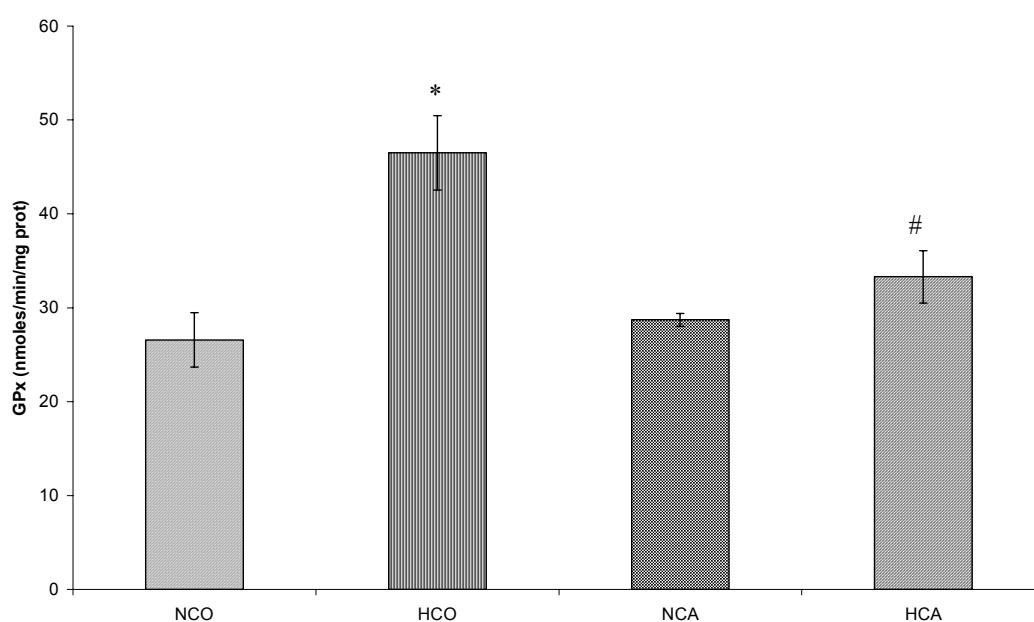


Figura 22: Atividade da glutathiona peroxidase (em  $\eta$ moles por minuto por mg de proteína) em homogeneizado cardíaco nos grupos estudados. Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,001$ ). # representa diferença significativa em relação ao grupo HCO ( $p < 0,01$ ). NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.5.5 GLUTATIONA S-TRANSFERASE

A última enzima a ser avaliada foi enzima detoxificante glutatona S-transferase. A atividade desta enzima (em  $\eta$ moles / min / mg de proteína) apresentou-se aumentada no grupo HCO ( $0,028 \pm 0,0031$ ) em relação ao grupo NCO ( $0,020 \pm 0,0015$ ). Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si, NCA ( $0,024 \pm 0,0024$ ) e HCA ( $0,024 \pm 0,0011$ ). Os resultados são apresentados na figura 23.

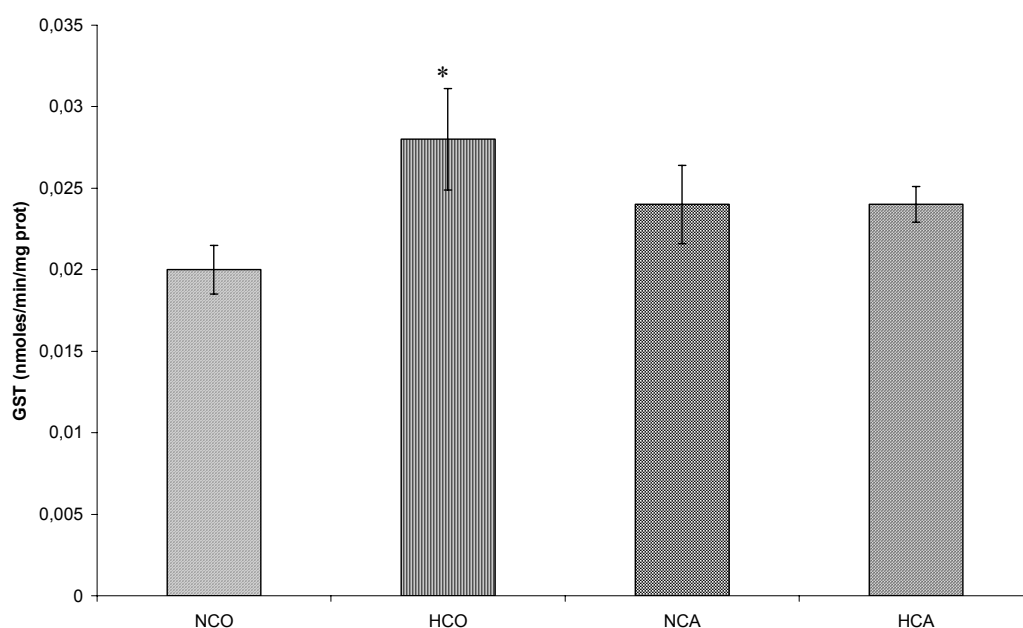


Figura 23: Atividade da glutatona S-transferase (em  $\eta$ moles por minuto por mg de proteína) em homogeneizado cardíaco nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

\* representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,05$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.



### 3.5.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)

A avaliação de TRAP (em mM trolox) em homogeneizado cardíaco apresentou-se diminuída no grupo HCO ( $44,64 \pm 7,38$ ) em relação ao grupo NCO ( $66,85 \pm 6,77$ ). O grupo HCA ( $71,72 \pm 4,69$ ) apresentou-se aumentado em relação ao grupo HCO. Já o grupo NCA ( $86,48 \pm 5,38$ ) não apresentou diferença significativa em relação ao seu controle não castrado, grupo NCO, nem em relação ao grupo também castrado mas hipertenso, HCA. Os resultados são apresentados na figura 24.

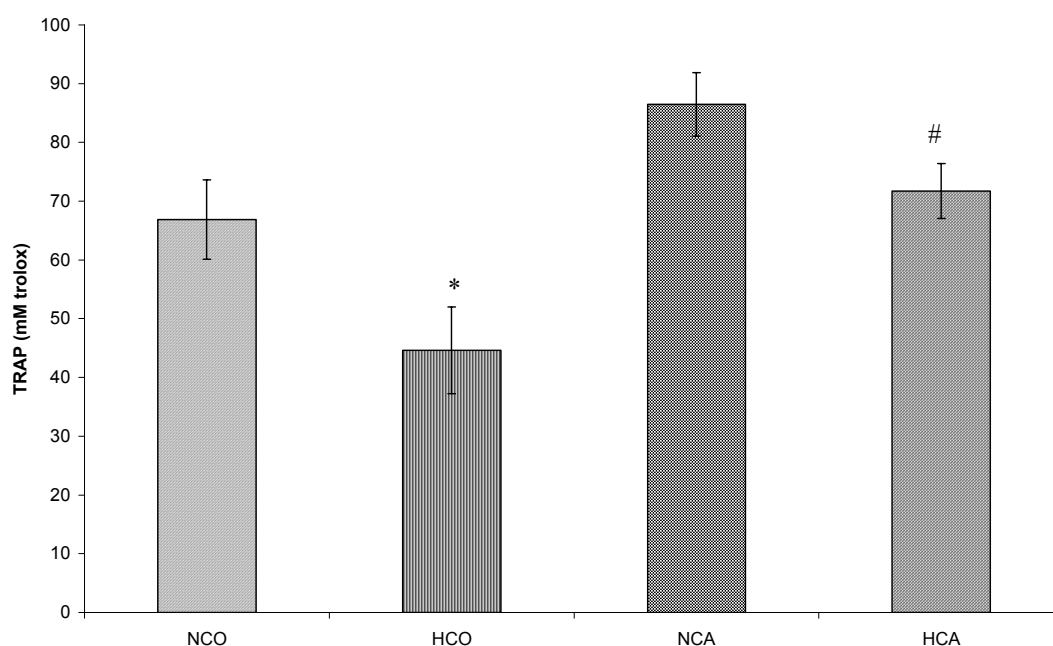


Figura 24: Avaliação da capacidade antioxidante total (em mM de trolox) em homogeneizado cardíaco nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

\* representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,05$ ).

# representa diferença significativa em relação ao grupo HCO ( $p < 0,05$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.5.7 NITRATOS

A avaliação de nitratos (em  $\mu\text{M NO}_3^-$ ) em homogeneizado cardíaco apresentou-se diminuída no grupo HCO ( $4,67 \pm 0,27$ ) e aumentada no grupo NCA ( $7,66 \pm 0,18$ ) em relação ao grupo NCO ( $6,13 \pm 0,61$ ). O grupo HCA ( $5,06 \pm 0,39$ ) apresentou-se diminuído em relação ao grupo NCA, mas não apresentou diferença significativa em relação ao seu controle não castrado, grupo HCO. Os resultados são apresentados na figura 25.

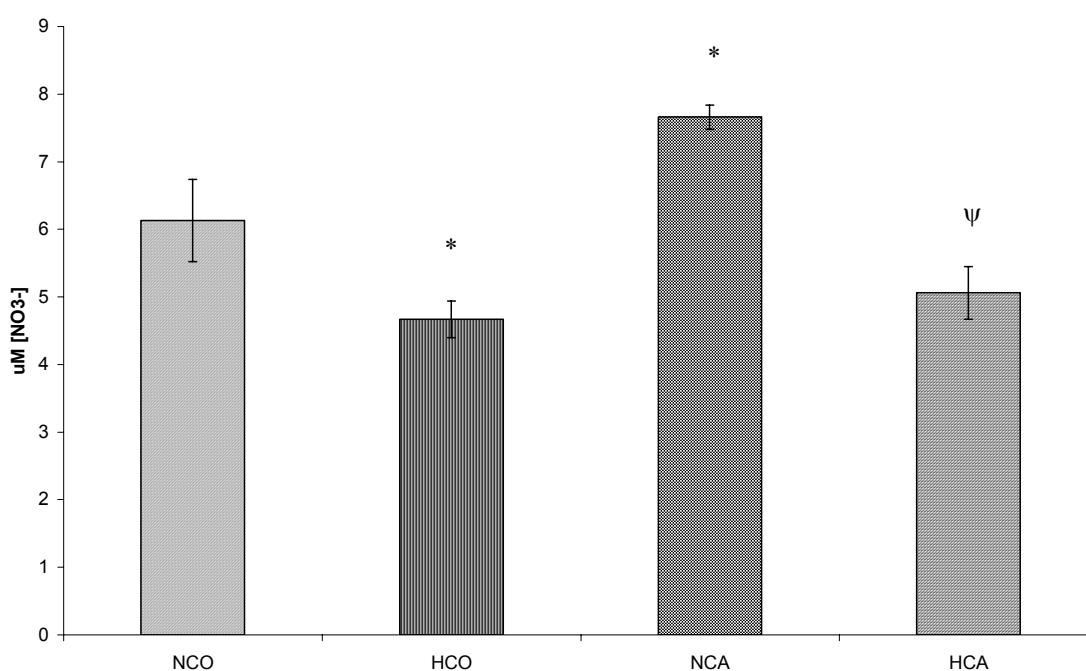


Figura 25: Avaliação de nitratos (em  $\mu\text{M de NO}_3^-$ ) em homogeneizado cardíaco nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

\* representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,05$ ).

$\psi$  representa diferença significativa em relação ao grupo NCA ( $p < 0,01$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.6 RESULTADOS RINS

Em uma segunda etapa do trabalho, serão apresentados os resultados das análises realizadas em homogeneizados de rins direito e esquerdo. Foi verificada ainda a diferença entre rim direito e esquerdo em animais hipertensos.

#### 3.6.1 TBA-RS

O conteúdo de TBA-RS (em nmoles / mg prot) apresentou-se aumentado no grupo NCA ( $0,671 \pm 0,078$ ) em relação ao grupo NCO ( $0,185 \pm 0,034$ ). O grupo HCA ( $1,000 \pm 0,087$ ) apresentou-se aumentado em relação aos grupos HCO ( $0,284 \pm 0,018$ ) e NCA. Já o grupo HCO não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo NCO, no rim direito. Os rins esquerdos apresentaram TBA-RS aumentada no grupo NCA ( $0,708 \pm 0,056$ ) em relação ao grupo NCO ( $0,152 \pm 0,028$ ). O grupo HCA ( $0,744 \pm 0,066$ ) apresentou-se aumentado em relação ao grupo HCO ( $0,117 \pm 0,008$ ). Já os grupos HCO e HCA não apresentaram diferenças significativas em relação aos seus controles não hipertensos, grupos NCO e NCA, respectivamente. Quando comparamos os grupos hipertensos observamos que no grupo HCA o rim esquerdo apresentou-se significativamente menor que o rim direito. Já o grupo HCO não apresentou diferença significativa entre os rins direito e esquerdo. Os resultados são apresentados na figura 27.

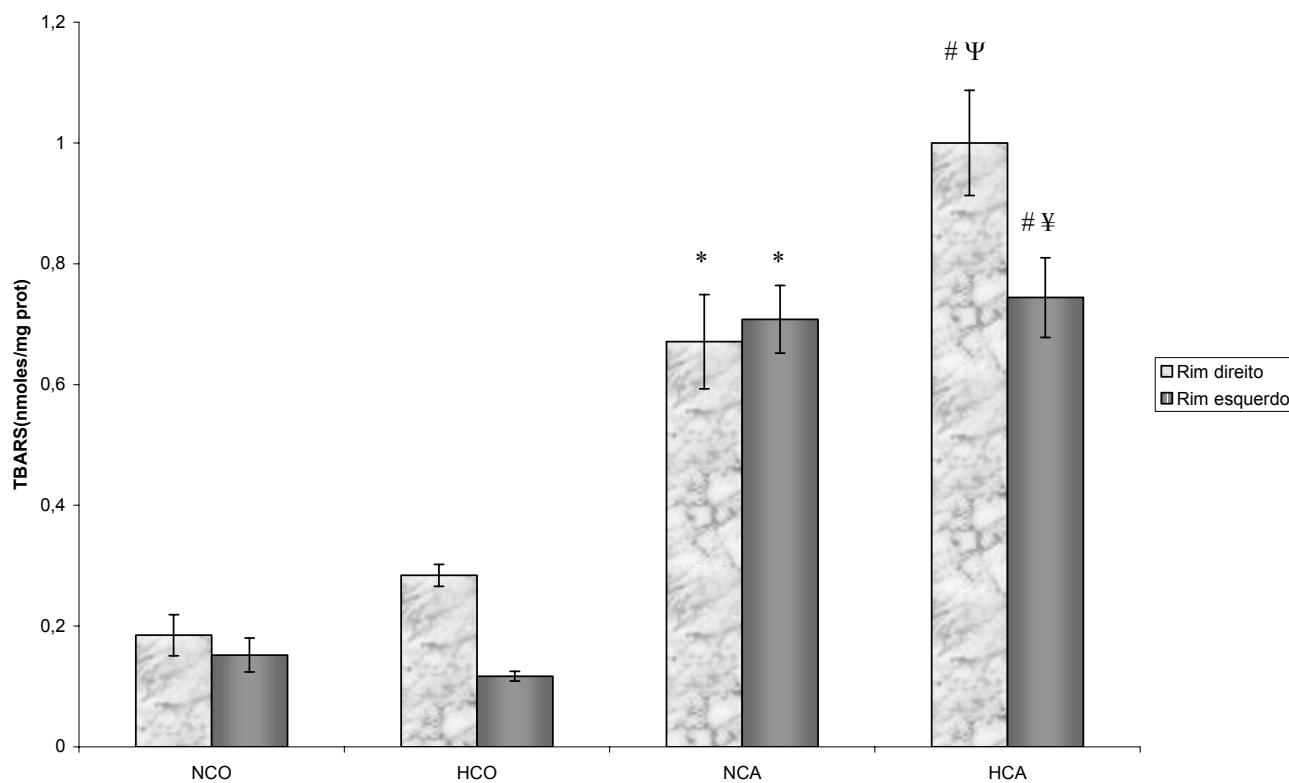


Figura 27: Conteúdo de TBA-RS (em nmoles por mg de proteína) em homogeneizado de rim direito e esquerdo nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

\* representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,001$ ).

# representa diferença significativa em relação ao grupo HCO ( $p < 0,001$ ).

ψ representa diferença significativa em relação ao grupo NCA ( $p < 0,01$ ).

¥ representa diferença significativa em relação ao rim direito do grupo HCA ( $p < 0,01$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.6.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE

A atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (em U / mg prot) não apresentou diferenças significativas entre nenhum dos grupos. Os resultados foram os seguintes, para rim direito e esquerdo respectivamente: NCO  $7,95 \pm 0,84$  e  $10,44 \pm 1,25$ ; HCO  $11,59 \pm 1,30$  e  $9,92 \pm 0,75$ ; NCA  $13,40 \pm 2,38$  e  $13,50 \pm 2,12$  e HCA  $11,47 \pm 1,13$  e  $12,25 \pm 1,63$ . Estes resultados estão apresentados na figura 28.

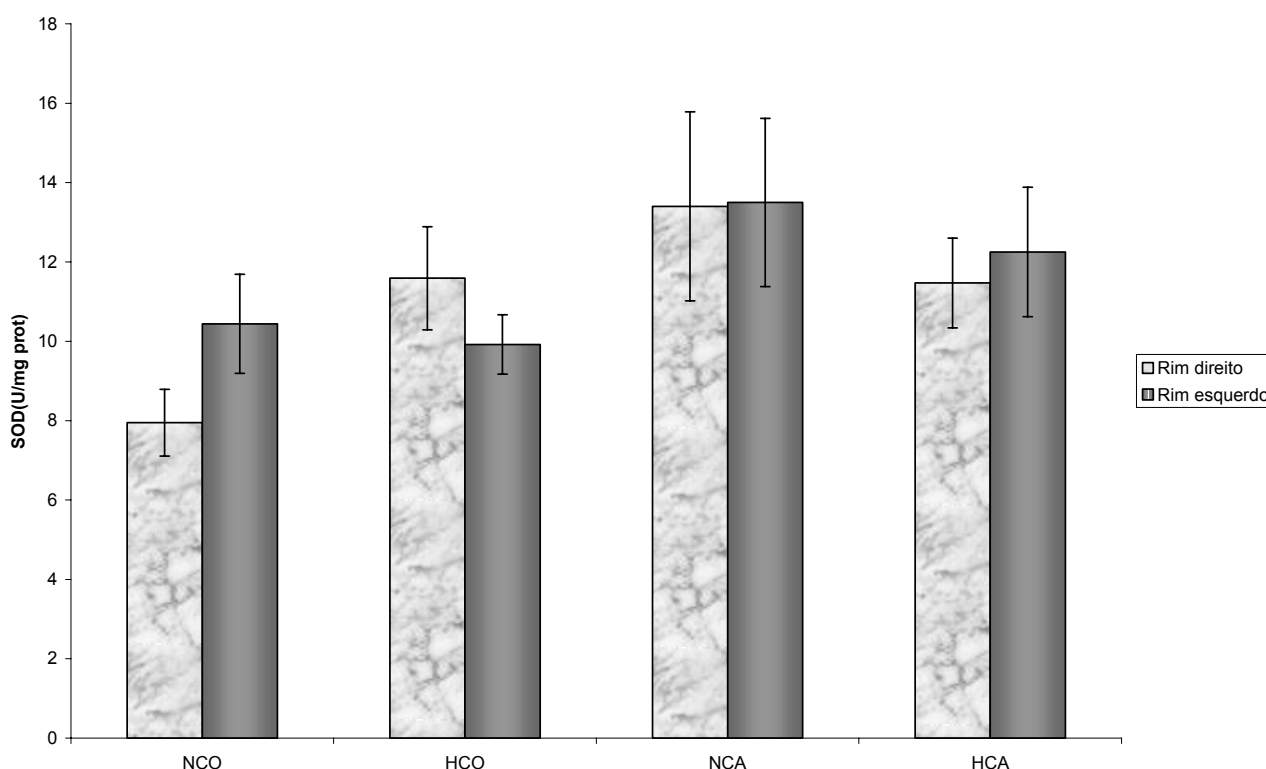


Figura 28: Atividade da superóxido dismutase (em U por mg de proteína) em homogeneizado de rim direito e esquerdo nos grupos estudados. Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.6.3 CATALASE

A atividade desta enzima (em pmoles / mg prot), no rim direito, apresentou-se aumentada no grupo NCA ( $128,60 \pm 16,94$ ) em relação ao grupo NCO ( $68,85 \pm 2,64$ ). O grupo HCA ( $135,58 \pm 12,26$ ) apresentou-se aumentado em relação ao grupo HCO ( $91,86 \pm 3,76$ ). Já os grupos HCO e HCA não apresentaram diferenças significativas em relação aos seus controles não hipertensos, grupos NCO e NCA, respectivamente. Os rins esquerdos apresentaram a atividade da catalase aumentada no grupo NCA ( $124,29 \pm 11,85$ ) em relação ao grupo NCO ( $69,16 \pm 2,67$ ). O grupo HCA ( $113,18 \pm 9,54$ ) apresentou-se aumentado em relação ao grupo HCO ( $59,73 \pm 5,47$ ). Já os grupos HCO e HCA não apresentaram diferenças significativas em relação aos seus controles não hipertensos, grupos NCO e NCA, respectivamente. Quando comparamos os grupos hipertensos, HCO e HCA, observamos que não há diferença significativa entre rins direito e esquerdo em nenhum dos grupos. Os resultados são apresentados na figura 29.

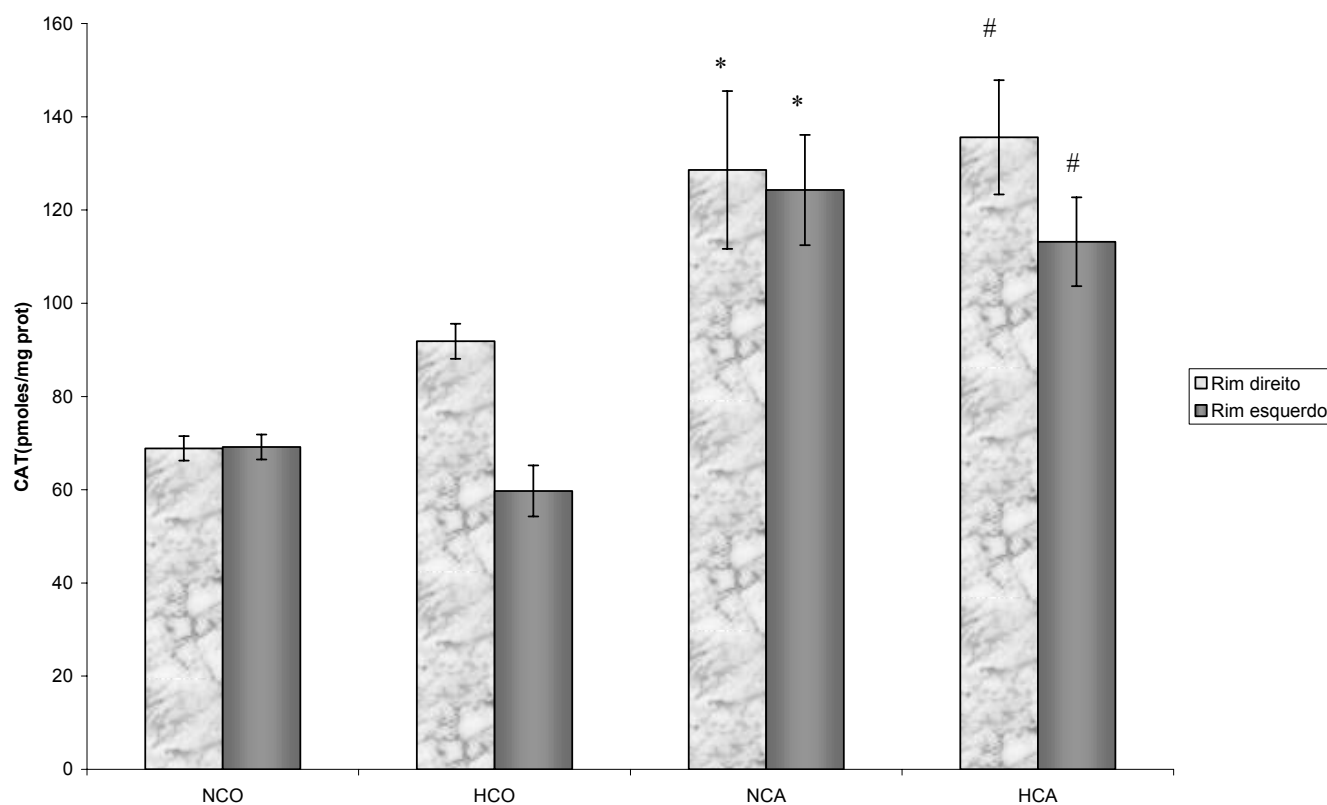


Figura 29: Atividade da catalase (em pmoles por mg de proteína) em homogeneizado de rim direito e esquerdo nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

\* representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,001$ ).

# representa diferença significativa em relação ao grupo HCO ( $p < 0,01$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.6.4 GLUTATIONA PEROXIDASE

A atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase ( $\eta$ moles / min / mg prot) não apresentou diferenças significativas entre nenhum dos grupos, quando comparamos rim direito (NCO  $23,13 \pm 1,70$ ; HCO  $22,10 \pm 3,55$ ; NCA  $20,06 \pm 3,94$  e HCA  $31,43 \pm 4,62$ ) e rim esquerdo (NCO  $22,82 \pm 2,49$ ; HCO  $17,55 \pm 2,10$ ; NCA  $24,86 \pm 3,77$  e HCA  $14,44 \pm 1,70$ ) separadamente. No entanto, quando comparamos os grupos hipertensos observamos que no grupo HCA o rim esquerdo apresentou-se significativamente menor que o rim direito. Já o grupo HCO não apresentou diferença significativa entre os rins direito e esquerdo. Os resultados são apresentados na figura 30.



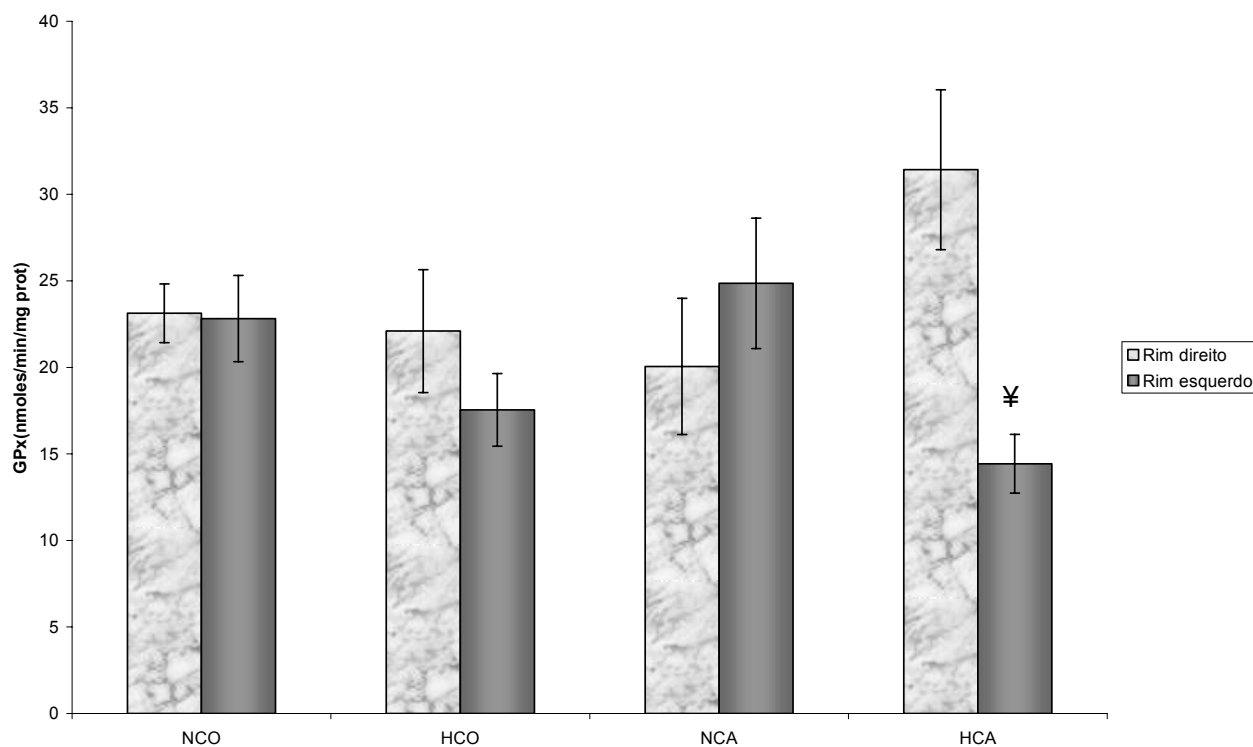


Figura 30: Atividade da glutathiona peroxidase em  $\eta$ moles por minuto por mg de proteína em homogeneizado de rim direito e esquerdo nos grupos estudados.

¥ representa diferença significativa em relação ao rim direito do grupo HCA ( $p < 0,01$ ).

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média  
NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.6.5 GLUTATIONA S-TRANSFERASE

A atividade da enzima glutaciona S-transferase ( $\eta$ moles / min / mg prot) apresentou-se aumentada nos grupos HCO em rim direito ( $0,060 \pm 0,0066$ ) e rim esquerdo ( $0,59 \pm 0,0075$ ) em relação aos seus respectivos grupos NCO ( $0,023 \pm 0,0015$  e  $0,027 \pm 0,0028$ ). Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si, NCA ( $0,042 \pm 0,0060$  e  $0,039 \pm 0,0024$ ) e HCA ( $0,053 \pm 0,0031$  e  $0,0045 \pm 0,0052$ ), rins direito e esquerdo, respectivamente. Os resultados são apresentados na figura 31.

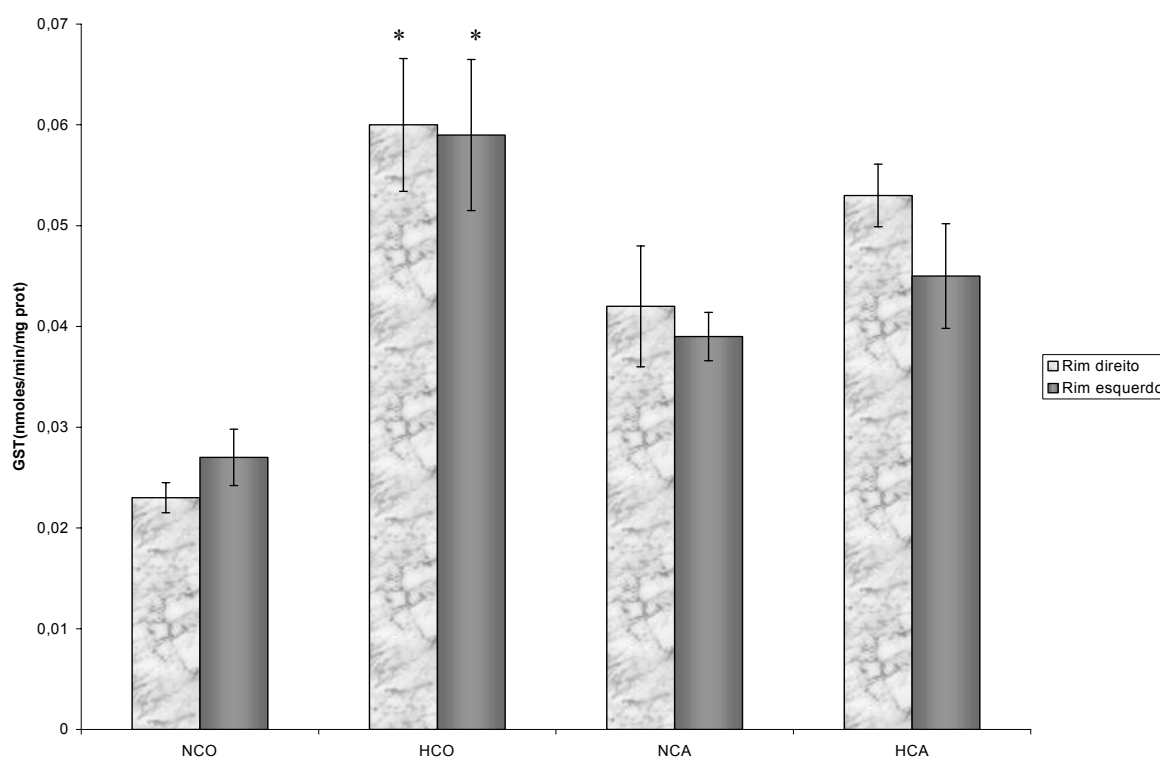


Figura 31: Atividade da glutaciona S-transferase em ( $\eta$ moles por minuto por mg de proteína) em homogeneizado de rim direito e esquerdo nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

\* representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,001$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.6.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)

A avaliação de TRAP (em mM trolox) em homogeneizado de rim, pode ser observada na figura 32. O TRAP no homogeneizado de rim direito apresentou-se maior no grupo NCA ( $534,85 \pm 57,32$ ) em relação ao grupo NCO ( $223,57 \pm 22,53$ ) e ao grupo HCA ( $358,54 \pm 37,56$ ). O grupo HCO ( $244,76 \pm 13,45$ ) não apresentou diferença significativa em relação ao seu controle não hipertenso, grupo NCO, nem em relação ao grupo também hipertenso mas castrado, HCA. No homogeneizado de rim esquerdo, foi observado um aumento no grupo NCA ( $394,69 \pm 50,88$ ) em relação ao grupo NCO ( $214,72 \pm 22,07$ ). Os grupos HCO ( $304,28 \pm 27,33$ ) e HCA ( $330,96 \pm 34,49$ ) não apresentaram diferenças significativas entre si, nem em relação aos seus controles não hipertensos, NCO e NCA, respectivamente.

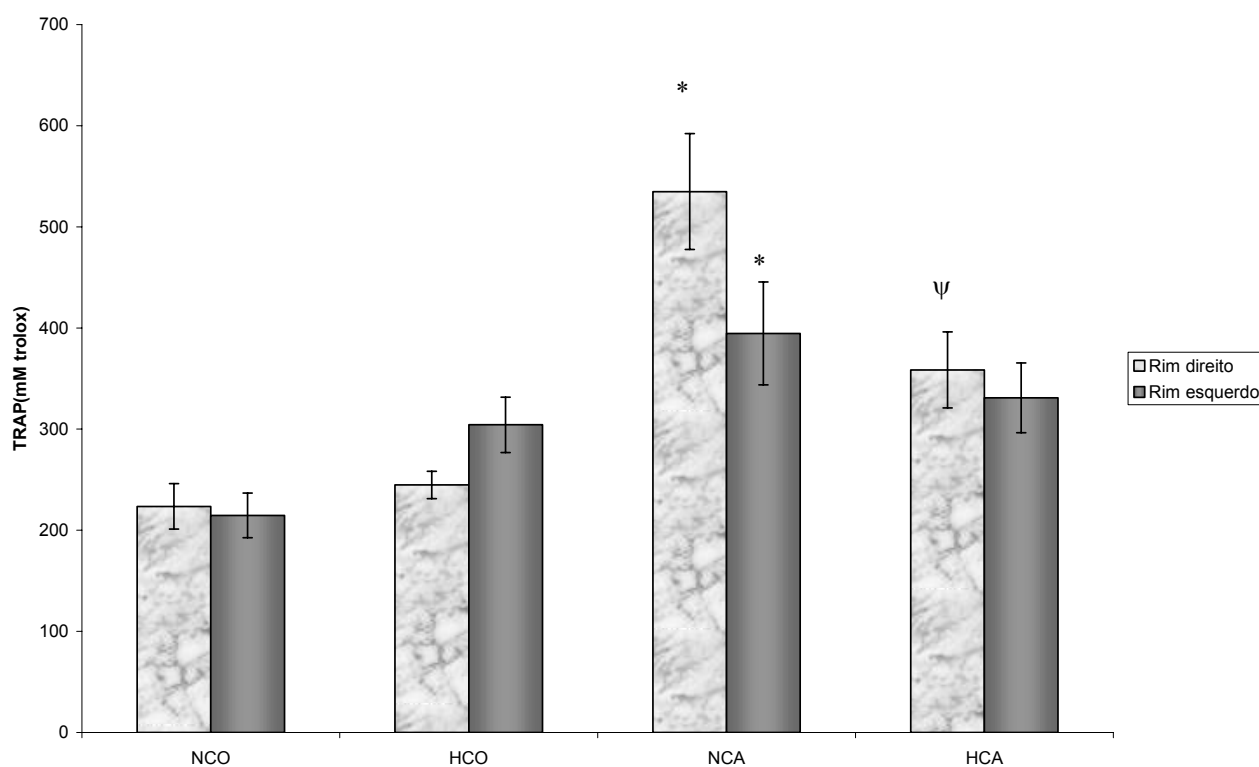


Figura 32: Avaliação da capacidade antioxidante total em mM de trolox em homogeneizado de rim direito e esquerdo nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

\* representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,001$ ).

$\psi$  representa diferença significativa em relação ao grupo NCA ( $p < 0,01$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.6.7 NITRATOS

A avaliação de nitratos (em  $\mu\text{M NO}_3^-$ ) em homogeneizado de rim não apresentou diferenças significativas entre nenhum dos grupos. Os resultados foram os seguintes, para rim direito e esquerdo, respectivamente: NCO  $6,52 \pm 0,86$  e  $10,89 \pm 0,59$ ; HCO  $9,22 \pm 1,50$  e  $7,62 \pm 0,51$ ; NCA  $8,65 \pm 0,66$  e  $10,22 \pm 0,26$  e HCA  $9,02 \pm 0,65$  e  $10,20 \pm 1,23$ . Estes resultados são apresentados na figura 33.

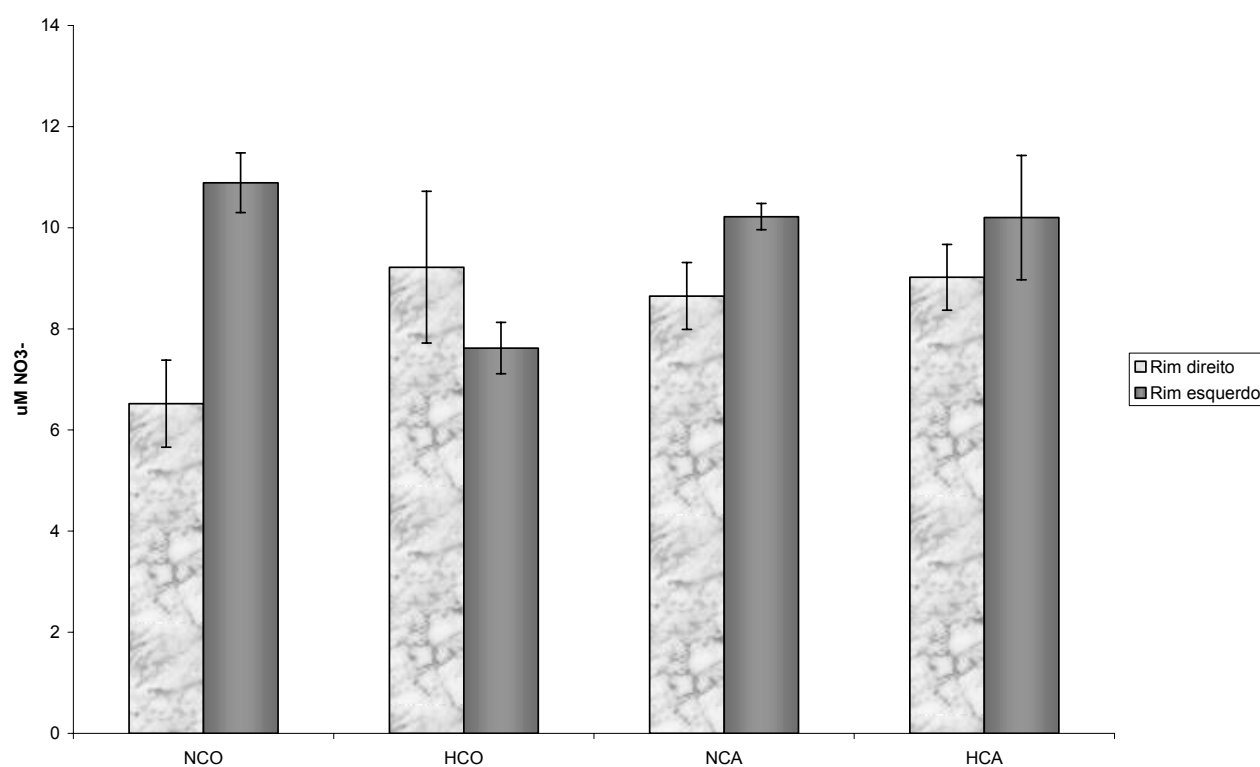


Figura 33: Avaliação de nitratos (em uM de  $\text{NO}_3^-$ ) em homogeneizado de rim direito e esquerdo nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.7 AVALIAÇÃO SISTÊMICA

Na última etapa deste trabalho, serão apresentados os resultados das análises realizadas em sangue, comparando o 3º, 10º e 20º dias de tratamento.

#### 3.7.1 QUIMILUMINESCÊNCIA

A quimiluminescência em sangue (em cps / mg hemoglobina) seguiu o mesmo padrão de variação para os três tempos estudados. A QL apresentou-se aumentada nos grupos HCO (3º dia:  $584 \pm 14$ ; 10º dia:  $585 \pm 25$  e 20º dia:  $687 \pm 33$ ) e NCA (3º dia:  $458 \pm 20$ ; 10º dia:  $403 \pm 22$  e 20º dia:  $581 \pm 25$ ) em relação ao grupo NCO (3º dia:  $173 \pm 4$ ; 10º dia:  $313 \pm 16$  e 20º dia:  $379 \pm 19$ ). Houve aumento também do grupo HCA (3º dia:  $567 \pm 49$ ; 10º dia:  $574 \pm 68$  e 20º dia:  $676 \pm 14$ ) em relação ao grupo NCA. No entanto, não observou-se diferença significativa entre o grupo HCA e o seu controle não castrado, grupo HCO. Foi observado também um aumento progressivo do 3º para o 20º dia de tratamento em todos os grupos estudados. Os resultados são apresentados na figura 34.

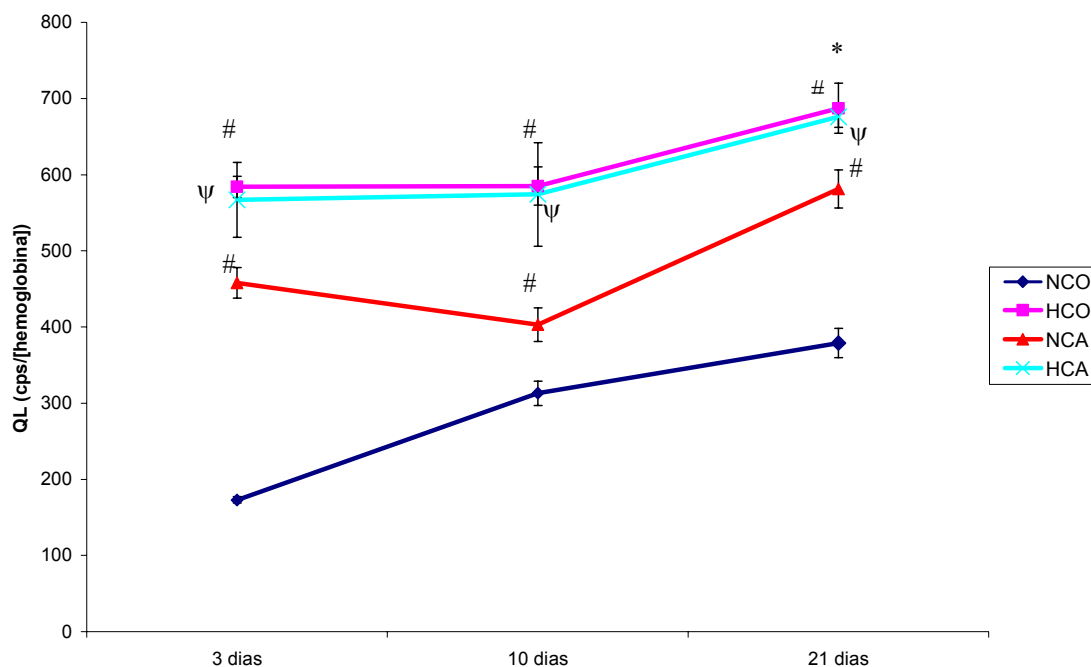


Figura 34: Quimiluminescência (em contagens por segundo por mg de hemoglobina) em sangue no 3°, 10° e 20° dia do tratamento nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

# representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,05$ ).

$\psi$  representa diferença significativa em relação ao grupo NCA ( $p < 0,05$ ).

\* representa diferença significativa em relação ao 3° dia em todos os grupos ( $p < 0,05$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.7.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE

A atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase nos eritrócitos (em U / mg prot) apresentou-se aumentada no grupo HCO ( $37,73 \pm 1,74$ ) e NCA ( $42,44 \pm 0,82$ ) em relação ao grupo NCO ( $30,61 \pm 1,14$ ). O grupo HCA ( $43,19 \pm 1,25$ ) apresentou-se maior que o grupo HCO, mas não apresentou diferença significativa quando comparado ao seu controle não hipertenso, grupo NCA. Estes resultados se referem ao 3° dia de tratamento. No 10° dia de tratamento, os grupos HCO ( $45,03 \pm 3,54$ ) e HCA ( $47,01 \pm 4,25$ ) apresentaram-se maiores que os seus controles não hipertensos, grupos NCO ( $31,92 \pm 0,44$ ) e NCA ( $34,26 \pm 0,77$ ), respectivamente. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos NCA e HCA e seus controles não castrados, grupos NCO e HCO, respectivamente. No 20° dia, os grupos HCO ( $52,94 \pm 2,39$ ) e NCA ( $41,73 \pm 0,90$ ) apresentaram-se aumentados em relação ao grupo NCO ( $30,89 \pm 1,20$ ). O grupo HCA ( $50,46 \pm 2,95$ ) apresentou-se maior que o seu controle não hipertenso, grupo NCA, mas não apresentou diferença em relação ao seu controle não castrado, grupo HCO. Em relação à avaliação temporal, observamos que os grupos HCO e HCA apresentaram um aumento na atividade da SOD no 20° dia quando comparado com o 3° dia de tratamento. Essa progressão não foi observada nos grupos NCO e NCA. Estes resultados são apresentados na figura 35.



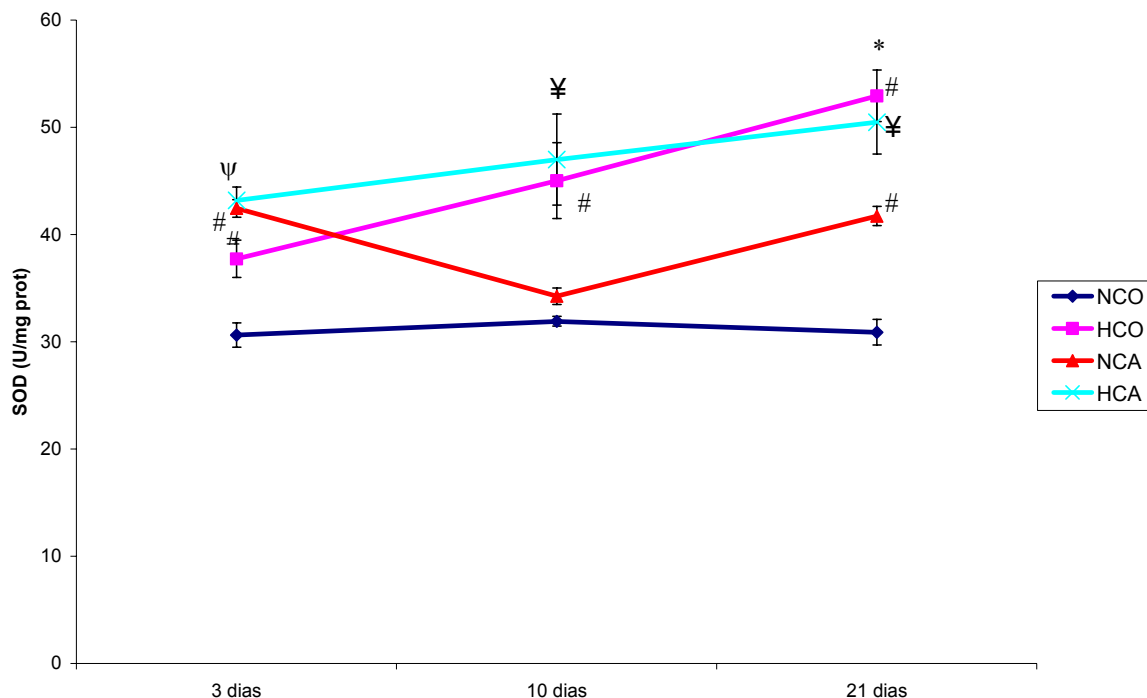


Figura 35: Atividade da superóxido dismutase (em U SOD por mg de proteína) em sangue, no 3°, 10° e 20° dia do tratamento, nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

# representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,05$ ).

$\psi$  representa diferença significativa em relação ao grupo HCO ( $p < 0,05$ ).

¥ representa diferença significativa em relação ao grupo NCA ( $p < 0,05$ ).

\* representa diferença significativa em relação ao 3° dia nos grupos hipertensos HCO ( $p < 0,01$ ) e HCA ( $p < 0,05$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.7.3 CATALASE

A atividade desta enzima antioxidante em eritrócitos (em pmoles / mg prot), não apresentou diferenças significativas no 3° dia de tratamento em nenhum dos grupos estudados. Os resultados foram: NCO  $17,15 \pm 0,66$ ; HCO  $25,04 \pm 2,98$ ; NCA  $19,63 \pm 1,35$  e HCA  $26,00 \pm 4,01$ . No 10° dia de tratamento, os grupos HCO ( $39,45 \pm 1,92$ ) e HCA ( $38,58 \pm 5,96$ ) apresentaram-se maiores que os seus controles não hipertensos, grupos NCO ( $19,09 \pm 1,55$ ) e NCA ( $19,50 \pm 1,04$ ), respectivamente. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos NCA e HCA e seus controles não castrados, grupos NCO e HCO, respectivamente. No 20° dia de tratamento, a atividade da catalase apresentou-se aumentada no grupo HCO ( $36,19 \pm 1,90$ ) em relação ao grupo NCO ( $25,30 \pm 3,07$ ). O grupo HCA ( $39,11 \pm 4,02$ ) não apresentou diferença significativa em relação aos seus controles, grupo NCA ( $29,41 \pm 4,02$ ) e HCO. O grupo NCA também não apresentou diferença significativa em relação ao seu controle não castrado, grupos NCO. Em relação à avaliação temporal, observamos que os grupos HCO e HCA apresentaram um aumento na atividade da catalase no 10° dia quando comparado com o 3° dia de tratamento e este aumento é mantido no 20° dia. Já nos grupos NCO e NCA, observamos um aumento na atividade desta enzima quando comparamos o 20° dia com o 3° dia de tratamento. Estes resultados são apresentados na figura 36.

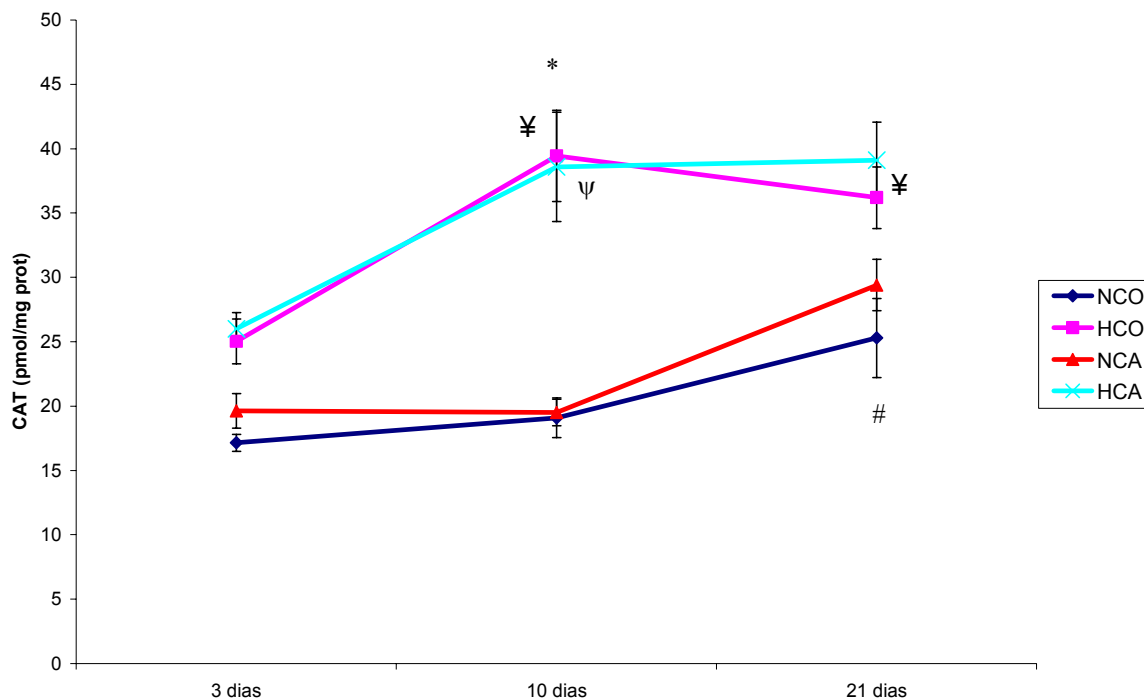


Figura 36: Atividade da catalase (em pmoles por mg de proteína) em sangue, no 3°, 10°, e 20° dia do tratamento, nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

† representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,05$ ).

‡ representa diferença significativa em relação ao grupo NCA ( $p < 0,05$ ).

\* representa diferença significativa em relação ao 3° dia nos grupos hipertensos HCO ( $p < 0,01$ ) e HCA ( $p < 0,05$ ).

# representa diferença significativa em relação ao 3° dia nos grupos normotensos NCO ( $p < 0,05$ ) e NCA ( $p < 0,01$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.7.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)

A avaliação do TRAP plasmático (em mM trolox) no 3° dia do tratamento mostrou os grupos HCO ( $28,68 \pm 1,71$ ) e NCA ( $20,95 \pm 3,97$ ) aumentados em relação ao grupo NCO ( $7,05 \pm 0,97$ ) e diminuídos em relação ao grupo HCA ( $46,28 \pm 6,98$ ). No 10° dia de tratamento, os grupos HCO ( $22,45 \pm 3,25$ ) e HCA ( $26,11 \pm 2,20$ ) apresentaram-se maiores que os seus controles não hipertensos, grupos NCO ( $6,30 \pm 0,91$ ) e NCA ( $9,30 \pm 1,67$ ), respectivamente. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos NCA e HCA e seus controles não castrados, grupos NCO e HCO, respectivamente. No 20° dia de tratamento, o TRAP mostrou-se aumentado nos grupos HCO ( $23,04 \pm 2,64$ ) e NCA ( $28,59 \pm 3,39$ ) em relação ao grupo NCO ( $8,66 \pm 1,26$ ). O grupo HCA ( $35,50 \pm 2,64$ ) apresentou-se maior do que o seu controle não castrado, grupo HCO, e não apresentou diferença significativa em relação ao seu controle não hipertenso, grupo NCA. Em relação à avaliação temporal, observamos que os grupos NCA, HCO e HCA apresentaram uma menor taxa de TRAP no 10° dia quando comparado com o 3° dia de tratamento, essa diminuição foi revertida no 20° dia nos grupos NCA e HCA. Esse resultado não foi observado no grupo NCO. Estes resultados são apresentados na figura 37.

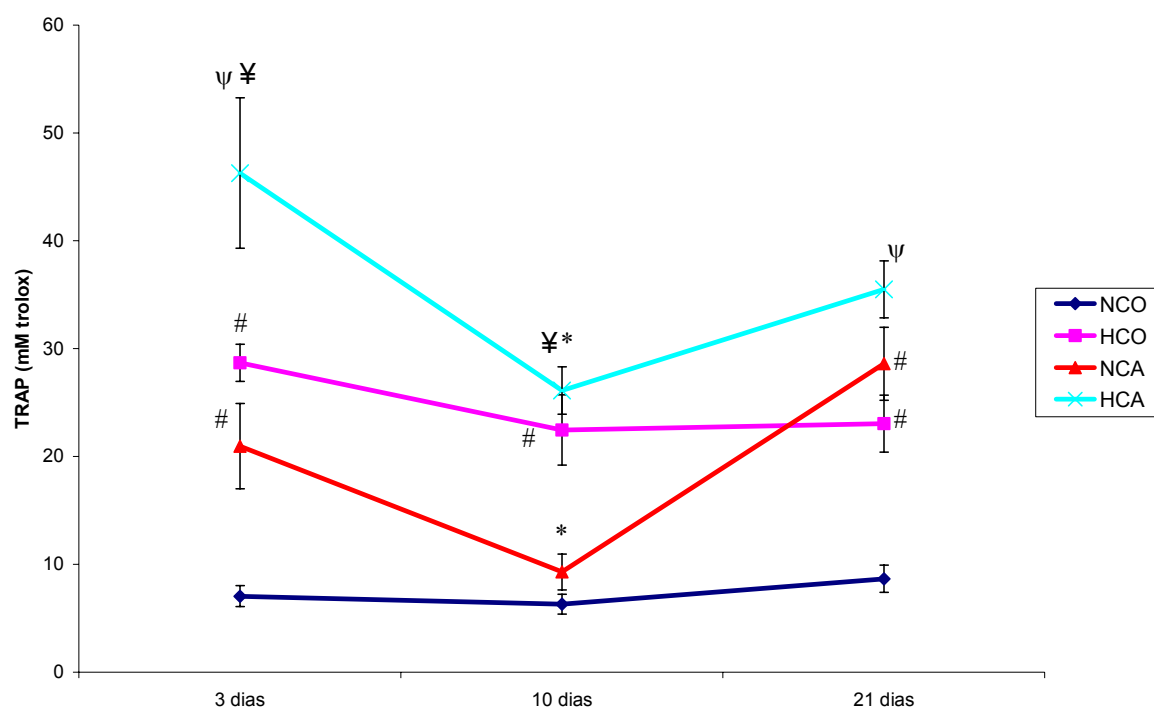


Figura 37: Capacidade antioxidante total (em mM trolox) em plasma, no 3°, 10° e 20° dia do tratamento, nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

# representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,05$ ).

$\psi$  representa diferença significativa em relação ao grupo HCO ( $p < 0,01$ ).

$\text{¥}$  representa diferença significativa em relação ao grupo NCA ( $p < 0,01$ ).

\* representa diferença significativa em relação ao 3° dia nos grupos NCA, HCO e HCA ( $p < 0,05$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### 3.7.5 NITRATOS

A avaliação sistêmica de nitratos (em  $\mu\text{M NO}_3^-$ ) no 3° dia do tratamento mostrou-se menor nos grupos HCO ( $3,41 \pm 0,34$ ) e NCA ( $2,84 \pm 0,34$ ) em relação ao grupo NCO ( $5,93 \pm 0,34$ ). Já o grupo HCA ( $3,72 \pm 0,42$ ) não apresentou diferenças significativas em relação aos seus controles não castrado (HCO) e não hipertenso (NCA). No 10° e no 20° dias de tratamento, os grupos não apresentaram diferenças significativas nos níveis plasmáticos de nitratos. Os resultados foram: NCO (10° dia  $4,62 \pm 0,34$  e 20° dia  $4,77 \pm 0,19$ ); HCO (10° dia  $4,63 \pm 0,26$  e 20° dia  $5,00 \pm 0,37$ ); NCA (10° dia  $4,33 \pm 0,48$  e 20° dia  $5,95 \pm 0,39$ ) e HCA (10° dia  $3,89 \pm 0,14$  e 20° dia  $4,97 \pm 0,24$ ). Em relação à avaliação temporal, observamos que os grupos HCO, NCA e HCA apresentam um maior nível plasmático de nitratos no 20° dia quando comparado com o 3° dia de tratamento. Já o grupo NCO apresentou-se significativamente menor no 10° dia, quando comparado com o 3° dia de tratamento. Estes resultados são apresentados na figura 38.

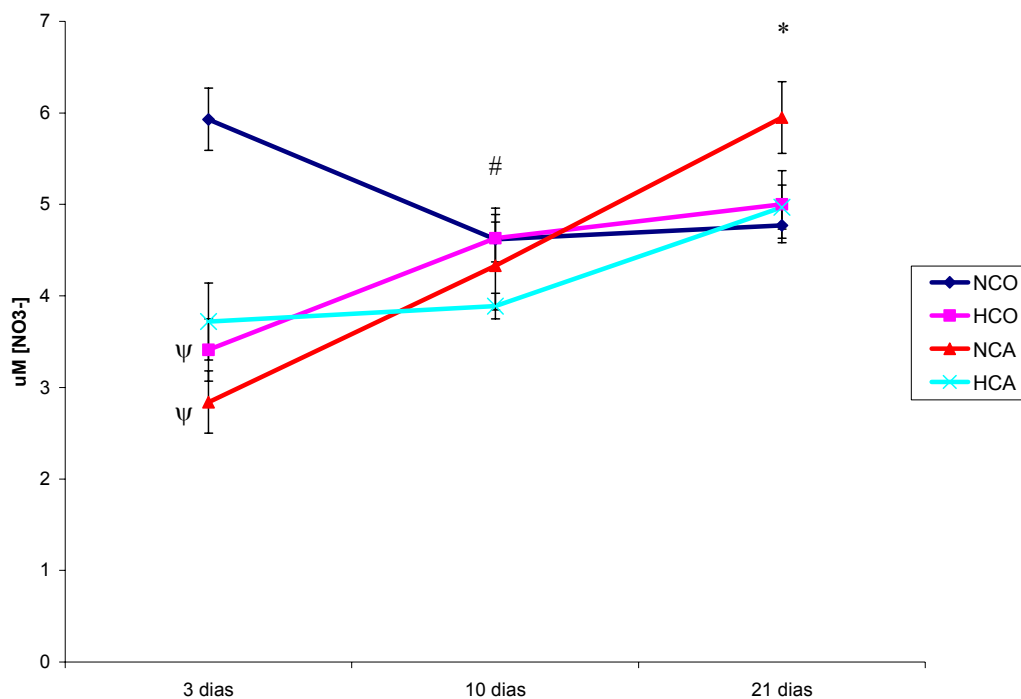


Figura 38: Quantificação de nitratos (em  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_3^-$ ) em plasma, no 3°, 10° e 20° dia do tratamento, nos grupos estudados.

Os valores da figura são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

$\psi$  representa diferença significativa em relação ao grupo NCO ( $p < 0,05$ ).

\* representa diferença significativa em relação ao 3° dia nos grupos HCO, NCA e HCA ( $p < 0,05$ ).

# representa diferença significativa em relação ao 3° dia no grupo NCO ( $p < 0,05$ ).

NCO= normotenso controle; HCO= hipertenso controle; NCA= normotenso castrado e HCA= hipertenso castrado.

### **3.8 RESUMO DOS RESULTADOS**

Foram analisadas a pressão arterial média e a frequência cardíaca de cada grupo. A pressão arterial média foi 25% maior no grupo HCO e 31% maior no grupo HCA, em relação ao grupo NCO e NCA, respectivamente. A frequência cardíaca não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados.

A dosagem hormonal apresentou níveis de  $17\beta$ -estradiol 96% menores no grupo castrado do que no grupo controle.

Os demais resultados são apresentados nas tabelas 1, 2 e 3, a seguir.



Tabela 1: Resumo dos resultados em tecido cardíaco.

	HCO	NCA	HCA
TBARS	=NCO	253%>NCO	312%>HCO 28%>NCA
SOD	68%>NCO	= NCO	= HCO 36%>NCA
CAT	39%>NCO	95%>NCO	= HCO 18%<NCA
GPx	75%>NCO	= NCO	29%<HCO = NCA
GST	40%>NCO	= NCO	= HCO = NCA
TRAP	34%<NCO	= NCO	60%>HCO = NCA
Nitrato	24%<NCO	25%>NCO	= HCO 34%<NCA

Tabela 2: Resumo dos resultados em tecido renal.

	HCO		NCA		HCA	
	RD	RE	RD	RE	RD	RE
TBARS	= NCO	= NCO =RD(HCO)	263%> NCO	365%> NCO	252%> HCO 49%>NCA	535%> HCO 26%<RD (HCA)
SOD	Não apresentou diferenças significativas entre nenhum dos grupos					
CAT	= NCO	= NCO =RD(HCO)	86%>NCO	80%>NCO	48%>HCO = NCA	89%>HCO = NCA =RD(HCA)
GPx	= NCO	= NCO =RD(HCO)	= NCO	= NCO	= HCO = NCA	= HCO = NCA 54%<RD
GST	160%> NCO	156%> NCO =RD(HCO)	= NCO	= NCO	= HCO = NCA	= HCO = NCA =RD(HCA)
TRAP	= NCO	= NCO =RD(HCO)	140%>NC O	84%>NCO	= HCO 50%<NCA	= HCO = NCA =RD(HCA)
Nitrato	Não apresentou diferenças significativas entre nenhum dos grupos					

Tabela 3: Resumo dos resultados da avaliação sistêmica.

	HCO			NCA			HCA		
	3°	10°	20°	3°	10°	20°	3°	10°	20°
QL	237%> NCO	87%> NCO	81%> NCO	164%> NCO	29%> NCO	53%> NCO	24%> NCA =HCO	42%> NCA =HCO	17%> NCA =HCO
↑ 3° p/ 20° dia em todos os grupos estudados									
SOD	24%> NCO	41%> NCO	71%> NCO	39%> NCO	=NCO	35%> NCO	15%> HCO =NCA	37%> NCA =HCO	21%> NCA =HCO
↑ 3° p/ 20° dia			NCO e NCA não ↑ 3° p/ 20° dia			↑ 3° p/ 20° dia			
CAT	=NCO	106%> NCO	43%> NCO	=NCO	=NCO	=NCO	=HCO =NCA	98%> NCA =HCO	=HCO =NCA
↑ 3° p/ 10° dia			NCO e NCA ↑ 3° p/ 20° dia			↑ 3° p/ 10° dia			
TRAP	306%> NCO	256%> NCO	166%> NCO	197%> NCO	=NCO	230%> NCO	40%> HCO 55%> NCA	180%> NCA =HCO	54%> HCO =NCA
↓ 3° p/ 10° dia			↓ 3° p/ 10° dia			↓ 3° p/ 10° dia			
NCO não ↑ com o tempo de tratamento									
Nitrato	43%< NCO	=NCO	=NCO	52%< NCO	=NCO	=NCO	=HCO =NCA	=HCO =NCA	=HCO =NCA
↑ 3° p/ 20° dia			↑ 3° p/ 20° dia			↑ 3° p/ 20° dia			
NCO ↓ 3° p/ 10° dia									

#### 4. DISCUSSÃO

Vários estudos epidemiológicos têm relatado que a incidência de doenças cardiovasculares é maior em homens do que em mulheres com atividade menstrual, no entanto, esta situação se equilibra em mulheres na pós-menopausa. Isto se dá devido ao papel protetor dos estrogênios sobre as doenças cardiovasculares (DANTAS & CARVALHO, 2000). O mecanismo exato pelo qual este hormônio pode interferir no sistema cardiovascular ainda é pouco esclarecido. Acredita-se que os estrogênios podem aumentar o angiotensinogênio e diminuir os níveis da enzima conversora da angiotensina (ECA). Ainda supõe-se que os estrogênios modulam a regulação do receptor da angiotensina tipo 1 (AT1) em células do músculo liso vascular, pois têm sido identificados receptores estrogênicos nestas células e nas do endotélio (NICKENIG et al., 1998). Estudos anteriores, têm se concentrado nos efeitos vasculares do estrogênio. Mas a cardioproteção não é necessariamente restrita à vasculatura. Numa revisão recente, Babiker e colaboradores constataram que os benefícios do estrogênio têm gradualmente mudado do sistema vascular para o miocárdio (BABIKER et al., 2002). Esta hipótese é confirmada pelo fato de que têm sido encontrados receptores funcionais de estrogênio no miocárdio. Estes receptores regulam a expressão de muitos genes tal como a conexina 43 e  $\alpha$ -miosina de cadeia pesada (principal proteína contrátil no coração) (GROHÉ et al., 1997). Tem-se, também, mostrado que o estrogênio age como bloqueador de canal de cálcio, o que pode promover uma proteção cardiovascular adicional (COLLINS et al., 1996).

Apesar dos efeitos dos estrogênios não serem completamente conhecidos, sabe-se que ele diminui as lipoproteínas plasmáticas, influencia o sistema renina-angiotensina (SRA), e tem propriedades

antioxidantes. Os estrogênios ainda exercem efeito direto na parede do vaso, aumentando a produção de NO vascular e modulando a expressão de NO sintase endotelial (WASSMANN et al., 2001). Sabe-se, também, que a administração de estrogênios exógenos, podem levar a uma melhora na expressão das isoformas de NO sintase (endotelial - eNOS e induzível - iNOS)(FARHAT et al., 1996; NUEDLING et al., 1999).

Sabendo-se que os estrogênios podem modular o receptor AT1 e que sua ativação tem origem predominantemente na produção de radicais livres nos vasos, conclui-se que a deficiência de estrogênios pode induzir um aumento de estresse oxidativo via um aumento na expressão de receptor AT1 (WASSMANN et al., 2001).

Neste estudo, procurou-se avaliar possíveis alterações no perfil oxidativo do coração, dos rins e sistêmico na ausência de estrogênios e no desenvolvimento da hipertensão renovascular Goldblatt 2. A aplicação do clipe para a indução da hipertensão já resulta em um aumento da pressão arterial após um dia da cirurgia, porém o alcance do platô se dá cerca de uma semana após o procedimento cirúrgico (RUZICKA & LEENEN, 1994). Foi verificado também que os níveis hormonais já estão abaixo dos níveis fisiológicos uma semana após o procedimento de ovariectomia (BARP et al., 2002). Em razão disto, foi coletado sangue em distintos tempos a fim de se realizar uma avaliação temporal do estresse oxidativo sistêmico durante a progressão da castração e do desenvolvimento da hipertensão. O primeiro tempo escolhido para a avaliação temporal foi três dias após a cirurgia, ou seja, durante o desenvolvimento da hipertensão, antes de atingir o platô. A amostragem aos 20 dias seria para se ter um período onde a hipertensão já estaria plenamente estabelecida. O 10º dia seria o intermediário para que pudéssemos acompanhar o desenvolvimento da hipertensão. O tecido cardíaco foi utilizado como primeiro objetivo

de nosso estudo, uma vez que os estrogênios estão intimamente relacionados ao sistema cardiovascular, como já foi visto anteriormente. Já o tecido renal foi analisado por ser este um órgão envolvido no controle da pressão arterial (mecanismos a longo prazo), e principalmente no modelo utilizado neste trabalho.

Os animais que sofreram cirurgia de colocação do clipe na artéria renal esquerda mostraram aumento da pressão arterial média em relação aos animais controle para hipertensão. Além disso, neste trabalho, foi observado que cerca de 15% dos animais não desenvolveram hipertensão, resultado que está de acordo com a literatura (RUZICKA & LEENEN, 1994). Cerca de 10% dos animais estavam, após o final do tratamento, com os rins esquerdos atroficos. Destes, cerca de 80% apresentavam hipertensão, demonstrando que o fluxo sanguíneo para o rim não foi impedido, somente diminuído. Os outros 20% não desenvolveram hipertensão, e apresentavam o rim direito maior que o normal, mostrando que o fluxo foi impedido e o rim direito compensou a atividade do rim esquerdo e os animais não ficaram hipertensos. Os demais animais que não desenvolveram hipertensão estavam com os rins esquerdos com aparência normal. Estes que não desenvolveram a patologia provavelmente devido à pequena estenose da artéria renal, foram descartados do estudo.

Neste modelo de hipertensão, há um aumento da angiotensina II, à qual tradicionalmente atribui-se um efeito vasoconstritor predominante por interações com o receptor AT1 no músculo liso vascular. No entanto, recentemente, foi visto que a angiotensina II induz ativação da fosfolipase C, que resulta num aumento da concentração de cálcio livre intracelular e numa rápida vasoconstrição (TOUYS & SCHIFFRIN, 1999). Outro mecanismo sugerido para a hipertensão induzida por angiotensina II, demonstra um aumento na produção vascular de ânion superóxido via NADH/NADPH oxidase. O superóxido que é gerado pela

NADH/NADPH oxidase é convertido pela superóxido dismutase a peróxido de hidrogênio que é neutralizado pela catalase e por peroxidases. O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio podem estimular a hipertrofia e a hiperplasia das células do músculo liso vascular (ZAFARI et al., 1998). Este aumento na produção do ânion superóxido pode contribuir para as alterações no relaxamento vascular dependente do endotélio, por promover inativação do óxido nítrico. A reação entre superóxido e óxido nítrico, que produz peroxinitrito, é extremamente rápida, excedendo inclusive a velocidade de reação entre o ânion superóxido e a enzima superóxido dismutase. Dessa forma, o equilíbrio entre ânion superóxido, óxido nítrico e superóxido dismutase é tênue e pequenas mudanças nos níveis de qualquer um destes pode alterar substancialmente a regulação do tônus vascular, elevando a pressão arterial (RAJAGOPALAN et al., 1996).

A hipertensão induzida por angiotensina II, aumenta o superóxido aórtico, isso sugere que os efeitos induzidos por angiotensina II na hipertensão são em parte mediados pelo estresse oxidativo (RAJAGOPALAN et al., 1996).

Sendo assim, o sistema renina-angiotensina (SRA) não somente influencia a pressão arterial, mas pode afetar uma variedade de outros importantes fenômenos fisiológicos, por aumentar a produção de radicais livres como superóxido e peroxinitrito (OSKARSSON & HEISTAD, 1997). Além da hipertensão, este sistema também participa na produção de superóxido via NADH e NADPH oxidases em processos ateroscleróticos (WARNHOLTZ et al., 1999)

O tratamento com anti-hipertensivos que bloqueiam a atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) ou antagonizam o efeito da angiotensina II sobre o receptor AT1, diminuem os níveis

plasmáticos de peróxido de hidrogênio, indicando uma menor produção de superóxido. Estas observações indicam que a produção de radicais livres na hipertensão pode ser mediada pelo aumento da atividade do SRA (LACY et al., 1998). Além disso, os inibidores da ECA inibem a degradação de bradicinina e outras cininas, que liberam óxido nítrico; assim, além de aumentarem a liberação de óxido nítrico, diminuem a produção de superóxido (OSKARSSON & HEISTAD, 1997).

Na fase crônica da hipertensão, causada pelo modelo utilizado neste trabalho, ocorre uma facilitação da liberação de noradrenalina mediada por angiotensina II (RUZICKA & LEENEN, 1994). Pacientes com hipertensão essencial têm hiperresponsividade à noradrenalina, que pode envolver um mecanismo dependente de inativação de óxido nítrico por EAO, pois esta vasoconstrição é diminuída pelo tratamento com ascorbato (LEMBO et al., 2000).

Alguns trabalhos mostram que ocorre um aumento da lipoperoxidação na hipertensão, em plasma de pacientes (RUSSO et al., 1998) ou em órgãos de animais hipertensos (BOCK et al., 1998). O aumento da lipoperoxidação nesta enfermidade pode ser devido ao aumento do consumo de oxigênio, pelo aumento da carga de trabalho ao coração, que levaria a um aumento na formação de EAO. Em estudos prévios realizados em nosso laboratório, foi observado que a castração também causa um aumento da lipoperoxidação, provavelmente devido à ausência de estrogênios (BARP et al., 2002). No entanto, outro estudo feito em mulheres na pós-menopausa que fazem terapia de reposição hormonal foi verificado que houve um aumento da lipoperoxidação com o aumento dos níveis de estrogênios (ACKAY et al., 2000).

Neste trabalho, foram utilizados dois métodos para medir a lipoperoxidação (LPO): TBA-RS (para tecidos) e quimiluminescência



(para sangue). Para a avaliação sistêmica foi utilizada a técnica da quimiluminescência por ser mais sensível e de execução mais prática, uma vez que para o TBA-RS no sangue há necessidade de pré incubação por 2 horas e há muita dispersão dos resultados.

Na literatura verificamos que Ackay e colaboradores observaram um aumento de LPO com o aumento de estrogênios, já Wasmann e colaboradores relataram um aumento das EAO com a diminuição de estrogênios. Por isso, acreditamos que, mecanismos distintos estão envolvidos em diferentes métodos de avaliação de LPO.

A lipoperoxidação sistêmica medida por quimiluminescência, apresentou-se aumentada tanto com a castração, como com a hipertensão. Estes dados estão de acordo com outros estudos realizados em nosso laboratório. Um estudo mostra que ratos machos hipertensos por inibição da síntese do óxido nítrico, apresentaram aumento da LPO cardíaca (BOCK et al., 1998). Outro estudo mostra que ratas ovariectomizadas apresentaram um aumento na LPO cardíaca, quando comparadas com ratas controle (BARP et al., 2002). Neste estudo, a LPO não se mostrou alterada com a hipertensão tanto no tecido cardíaco quanto no renal nos grupos controle (não castrados). Isto poderia ser devido à grande indução do sistema enzimático antioxidante observada no tecido cardíaco. Todas as enzimas avaliadas mostraram aumentadas suas atividades e o TRAP foi reduzido, indicando um consumo de antioxidantes não enzimáticos. O tecido renal mostrou um aumento extremamente significativo na atividade da GST. Estas alterações podem ter contribuído para manter o LPO sob controle neste tecidos. Ainda pode se associar à este fator o estrogênio, uma vez que as ratas hipertensas com menores níveis de estrogênios sofrem aumento de LPO. Ou seja, fêmeas sem estrogênios apresentam maiores níveis de

LPO na hipertensão, resultados semelhantes aos encontrados em experimentos com ratos machos.

Foi realizada também uma avaliação temporal da LPO e foi observado que houve um aumento da lipoperoxidação com o desenvolvimento da hipertensão e com a diminuição dos estrogênios. É possível que esse aumento seja devido ao estabelecimento da hipertensão que só vai acontecer após o 7º dia (RUZICKA & LEENEN, 1994). E também pelo estresse por que passam os animais, como a manipulação e cirurgia, uma vez que o aumento se observou também no grupo controle.

Como citado anteriormente, foi observado um aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD) no tecido cardíaco em animais hipertensos. Isto pode ocorrer devido a um aumento na produção de ânion superóxido, o que já foi verificado em outros estudos no desenvolvimento da hipertensão (TOUYS & SCHIFFRIN, 1999 e USUI et al., 1999). Não foi observado, neste estudo, um aumento da SOD no tecido cardíaco nos animais castrados. Arnal e colaboradores mostraram que os estrogênios podem diminuir a produção do ânion superóxido em cultura de células endoteliais. Naquele estudo, foi também observado que concentrações progressivas de estradiol foram efetivas em bloquear a produção do ânion superóxido, mas não do radical hidroxil (ARNAL et al., 1996). Em outro estudo, Oberley e colaboradores mostraram que o estradiol de origem exógena aumenta os níveis de superóxido dismutase (OBERLEY et al., 1994). No entanto, neste trabalho não foi administrado estrogênio aos animais, apenas diminuimos os níveis de estrogênio de origem endógena. Assim, é possível que o aumento do ânion superóxido dos animais castrados não tenha sido suficiente para aumentar a atividade da enzima superóxido dismutase no tecido cardíaco. Estes resultados também podem estar relacionados com os achados no sangue onde foi observado um aumento da SOD nos

grupos hipertensos e este aumento progride com o passar do tempo, levando-nos a concluir que o ânion superóxido permanece aumentado com o estabelecimento da hipertensão. A SOD estaria aumentada para minimizar os efeitos deste radical livre. Observamos, também, que os animais castrados apresentam SOD aumentada apenas no 3º dia, nos levando a concluir que o aumento do superóxido com a castração é menor, e que a SOD é ativada rapidamente para diminuir o superóxido, mantendo seus níveis inalterados com a evolução do tratamento. A SOD medida em tecido renal não apresentou diferença com a hipertensão.

Foi observado também um aumento da catalase com a hipertensão em tecido cardíaco e em todos os tempos avaliados. Este resultado corrobora os dados já encontrados na literatura, onde estudos realizados em humanos demonstraram que os níveis de peróxido de hidrogênio são maiores em pacientes hipertensos do que em normotensos (TOUYS & SCHIFFRIN, 1999). Da mesma forma, em pacientes normotensos com risco genético de hipertensão, os níveis desta EAO também são maiores em relação aos normotensos sem este fator genético (LACY et al., 1998). Swei e colaboradores também verificaram um aumento na concentração plasmática de peróxido de hidrogênio em ratos hipertensos Dahl sal-sensíveis (SWEI et al., 1997). Touys e colaboradores citam que uma das principais fontes de peróxido de hidrogênio seria a NADH/NADPH oxidase que vai gerar ânion superóxido que é convertido pela SOD a peróxido de hidrogênio (TOUYS & SCHIFFRIN, 1999). Como a catalase é uma enzima específica para peróxido de hidrogênio, supõe-se que ela está aumentada para diminuir os danos causados por esta EAO. Observamos que houve também um aumento da atividade da catalase com a castração nos tecidos cardíacos e renal. Sendo, esta enzima a única aumentada nos tecidos de animais castrados, o dano oxidativo (grande aumento da LPO) pode estar relacionada ao peróxido de hidrogênio. Já no sangue os grupos

castrados não apresentaram a atividade da catalase aumentada, mas como no sangue encontramos outras defesas antioxidantes não enzimáticas como as vitaminas e o ácido úrico, é possível que não seja necessário um aumento da atividade da catalase para compensar o dano oxidativo.

Segundo Massafra e colaboradores e Dantas e colaboradores, a glutathione peroxidase apresenta um aumento quando se tem níveis de estrogênios aumentados (MASSAFRA et al., 1998 e DANTAS & CARVALHO, 2000). No entanto, nestes trabalhos tem-se a administração de  $17\beta$ -estradiol de origem exógena. Nesta dissertação, foi observado que houve um aumento da glutathione peroxidase em tecido cardíaco com a hipertensão. Como já foi visto, tem-se um maior dano oxidativo na hipertensão com aumento de superóxido e peróxido de hidrogênio. Sendo esta enzima uma peroxidase, vai reduzir hidroperóxidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio, concluindo-se que esta enzima está aumentada na hipertensão para compensar a produção das EAO. No entanto, observou-se também um aumento no grupo controle hipertenso em relação ao grupo castrado hipertenso. Isso mostra que nos animais hipertensos que já apresentam um dano maior, o fato de não terem níveis fisiológicos de estrogênios piora a resposta antioxidante, diminuindo a glutathione peroxidase. Estes resultados comprovam, como foi visto nos trabalhos citados, que os estrogênios favorecem a atividade da glutathione peroxidase. Os tecidos renais não apresentaram diferenças significativas na atividade da glutathione peroxidases nos grupos hipertensos.

Este estudo apresentou outro resultado interessante, quando comparamos os rins direito e esquerdo dos animais hipertensos, observamos que o rim esquerdo dos animais castrados apresentaram menores níveis de lipoperoxidação e menor atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase do que o direito. Isso

nos mostra que estes animais castrados, provavelmente, têm uma diminuição no seu metabolismo, uma vez que estes apresentaram uma área atrófica no rim esquerdo maior que os animais hipertensos não castrados. Estudos relatam que uma dieta com isoflavonas, que são fitoestrógenos que apresentam estrutura similar ao estrogênio endógeno, apresentam um papel protetor na doença renal crônica (RANICH et al., 2001). É visto que o consumo de isoflavonas retarda o desenvolvimento e a progressão da doença renal crônica. Em modelos animais de doença renal, a isoflavona têm apresentado redução da proteinúria e diminuição da lesão patológica renal associada ao progresso da insuficiência renal (VELASQUEZ & BHATHENA, 2001). Visto que uma das ações biológicas da isoflavona é a sua ação antioxidante (RANICH et al., 2001), sugere-se que o grupo hipertenso controle, apesar de não apresentar diferença na lipoperoxidação, tem o seu rim esquerdo protegido pelo efeito antioxidante dos estrogênios, uma vez que apresenta menos danos renais e maior atividade das enzimas antioxidantes.

Neste estudo, foi também avaliada a capacidade antioxidante total (TRAP) e observou-se que no tecido cardíaco o TRAP apresentou-se aumentado com a castração e diminuído com a hipertensão. Os resultados da hipertensão, para as outras análises, mostram um aumento da formação de EAO, aumentando o dano oxidativo e assim espera-se que o tecido apresente uma menor capacidade antioxidante, pois estes devem estar sendo consumidos para reverter o dano oxidativo. Já na castração viu-se que o dano oxidativo é revertido mais rapidamente. É possível que pela retirada de um antioxidante não enzimático, se tenha a estimulação de outros antioxidantes, como glutathiona e/ou vitaminas que são antioxidantes não enzimáticos e que vão aumentar a capacidade antioxidante da amostra. No tecido renal, os animais hipertensos não apresentaram diferenças significativas, no entanto, também neste tecido, a castração aumentou a capacidade antioxidante da amostra.

No sangue, pode haver ação de diferentes antioxidantes em relação aos tecidos, como por exemplo o ácido úrico. Visto isso, observamos um aumento de TRAP tanto com a castração quanto com a hipertensão. A castração, assim como no tecido, aumenta a capacidade antioxidante e mantém esta elevada até o final do tratamento. No entanto, nos animais hipertensos a capacidade antioxidante sistêmica está elevada no 3° dia após a cirurgia, quando a hipertensão ainda não atingiu o seu platô, e diminui com o desenvolvimento da hipertensão. Mostrando que o dano oxidativo causado pela hipertensão não é revertido neste tempo de tratamento.

Os estrogênios estimulam a síntese de NO em diversos tecidos em animais normotensos e em humanos. Já em ratas hipertensas, os estrogênios afetam a liberação e a ação do NO derivado do endotélio. Estudos demonstraram recentemente que os estrogênios aumentam a atividade da NO sintase em microvasos mesentéricos em ratas SHR ovariectomizadas (DANTAS et al., 1999). Outro estudo mostra que o aumento da expressão da NO sintase está correlacionado com um aumento na produção de NO (MILLER, 1999). O NO derivado do endotélio é inativado por superóxido, que por sua vez está aumentado na hipertensão (DANTAS et al., 1999). Vê-se ainda que o estrogênio em doses próximas às fisiológicas atua liberando NO, através de receptores na membrana celular (STEFANO et al., 2000).

No nosso estudo, encontramos que a avaliação sistêmica de nitratos no 3° dia apresentou uma diminuição com a hipertensão e com a castração. O que condiz com a literatura, uma vez que tanto com a retirada dos estrogênios quanto com a hipertensão os níveis de NO tendem a estarem menores que o controle. No entanto, os níveis de nitrato nos grupos tratados aumentam na avaliação feita no 10° e no 20° dia após a cirurgia. Por isso, acreditamos que esta

resposta à deficiência de estrogênio é bastante rápida, por adaptação e/ou pelo fato dos estrogênios atuarem liberando NO via receptor de membrana, que costumam apresentar respostas mais rápidas. É possível que a hipertensão reverta os níveis de nitratos sistêmicos por algum mecanismo de adaptação, uma vez que o modelo de hipertensão utilizado não inibe a síntese do óxido nítrico. Já o grupo controle apresentou níveis de nitratos altos no 3º dia o que era esperado, pois estes animais apresentavam maiores níveis endógenos de estrogênios, que os grupos castrados. No entanto, com o passar do tempo estes níveis baixaram e se aproximaram dos valores dos demais grupos. Isso, provavelmente ocorreu devido ao estresse que os animais sofreram, como manipulação e cirurgia. Como seus níveis estavam bastante elevados, em relação aos demais, eles apresentaram uma pequena queda nos níveis de nitrato, enquanto os animais hipertensos e castrados tinham níveis ainda inferiores aos obtidos pelo estresse do tratamento. Já o tecido cardíaco apresentou níveis diminuídos na hipertensão, mas como foi visto anteriormente, a hipertensão pode diminuir NO pelo aumento de superóxido que vai levar à formação do peroxinitrito. Os animais castrados apresentam um pequeno aumento nos níveis de nitrato, mas como também já foi discutido, o mecanismo pelo qual o NO responde ao estrogênio é rápido, então após a queda dos níveis de nitratos outros mecanismos antioxidantes podem estar fazendo com que os níveis de NO aumentem, uma vez que vimos que as ratas castradas têm maior capacidade antioxidante total no tecido cardíaco. Os níveis de nitratos em tecido renal não apresentaram diferenças significativas. Pelos resultados encontrados para rim, vimos que este tecido também não apresentou variações na atividade da SOD. Já vimos que a hipertensão pode diminuir NO pelo aumento de superóxido, é possível que no tecido renal tenha aumento de outras EAO que não o superóxido, por isso não altera os níveis de NO.

Com este estudo, procuramos averiguar alguns dos mecanismos oxidativos envolvidos na hipertensão e relacioná-los com os estrogênios de origem endógena. Procuramos, ainda, analisar o perfil oxidativo no desenvolvimento temporal da hipertensão. Para dar continuidade a este estudo, seria de extrema relevância avaliar a expressão das enzimas antioxidantes e medir a produção de ânion superóxido no leito vascular, além de avaliar o desenvolvimento da hipertensão por um tempo mais prolongado.



## 5. CONCLUSÕES

Neste estudo, foi verificado que o estresse oxidativo tecidual não aumentou em função da elevação da pressão arterial nas fêmeas com níveis estrogênicos fisiológicos, ao contrário do que havia sido previamente constatado em machos. Este resultado, poderia ser devido à adaptação do sistema enzimático antioxidante observada, assim como, à proteção antioxidante não enzimática oferecida pelo estrogênio.

Esta possibilidade é reforçada, ao observarmos que a LPO foi muito significativamente aumentada nos tecidos cardíaco e renal após a castração. A elevação da LPO nas fêmeas castradas, tornadas hipertensas, também reforça o potencial antioxidante do estrogênio.

Em termos de estresse oxidativo sistêmico, constatou-se que tanto a hipertensão quanto a castração, isoladamente, aumentaram a LPO progressivamente com o passar do tempo, produzindo adaptações seletivas das enzimas antioxidantes e levando ao consumo dos antioxidantes não enzimáticos. Da mesma forma que nos tecidos, o efeito somatório da castração e da hipertensão levou a um aumento mais pronunciado do estresse oxidativo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKAY, T.; DINCER, Y.; KAYALI, R.; COLGAR, U.; ORAL, E.; CAKATAY, U. Effects of hormone replacement therapy on lipid peroxides and oxidation system in postmenopausal women. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, 59(1):1-5, 2000.
- ARNAL, J.F.; CLAMENS, S.; PECHET, C. Ethinylestradiol does not enhance expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:4108-4113, 1996.
- ARUOMA, O.I.; EVANS, P.J.; KAUR, H.; SUTCLIFFE, L.; HALLIWELL, B. An evaluation of the antioxidant and potential pro-oxidant properties of food additives and trolox C, vitamin E and probucol. *Free Rad. Res. Comms.* 10(3):143-157, 1990.
- BABIKER, F.A.; DE WINDT, L.J.; VAN EICKELS, M.; GROHÉ, C.; MEYER, R.; DOEVENDANS, P.A. Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovascular Research*, 53(3):709-719, 2002.
- BARP, J.; ARAÚJO, A.S.R.; FERNANDES, T.R.G.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A.; SINGAL, P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Brazilian Journal Medical and Biological Research* (in press, 2002).
- BOCK, P.M.; FERNANDES, T.R.G.; ARAÚJO, A.S.R.; SEVERINO, L.; BELLÓ-KLEIN, A.; BELLÓ, A.A. Efeito do enalapril na hipertensão induzida por L-NAME: Avaliação hemodinâmica e estresse oxidativo. *XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE)*, 1998.
- BOVERIS, A. & CHANCE, B. The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. *Biochem. J.* 134:707-716, 1973.

- BRANN, D.W.; HENDRY, L.B.; MAHESH, V.B. Emerging diversities in the mechanisms of action of steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 52(2):113-133, 1995.
- BUEGE, J.Á.; AUST, S.D. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymology*, 52:302-309, 1978.
- CARRETERO, O.A.; OPARIL, S. Essential Hypertension: Definition and Etiology. *Circulation*, 101:329-335, 2000.
- CARRETERO, O.A.; OPARIL, S. Essential Hypertension: Treatment. *Circulation*, 101:446-453, 2000.
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59(3):527-625, 1979.
- COLLINS, P.; BEALE, C.M.; ROSANO, G.M.C. Oestrogen as a calcium channel blocker. *European Heart Journal*, 17(suppl D):27-31, 1996.
- DANTAS, A.P.V.; CARVALHO, M.H.C. Efecto protector de los estrógenos en el sistema cardiovascular. *Antioxidantes y calidad de vida*, pag.6-11, mayo, 2000.
- DANTAS, A.P.V.; SCIVOLETTO, R.; FORTES, Z.B.; NIGRO, D.; CARVALHO, M.H.C. Influence of sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*, 34(2):914-919, 1999.
- DEL MAESTRO, R.F. An Approach to Free Radicals in Medicine and Biology. *Acta Physiol Scand.* 40(7):153-168, 1980.
- DENICOLA, A.; SOUZA, J.M.; GATTI, R.M.; AUGUSTO, O.; RADI, R. Desferrioxamine Inhibition of the Hydroxyl Radical-Like Reactivity of Peroxynitrite: Role of the Hydroxamic Groups. *Free Radicals Biology & Medicine*, vol.19, n°1:11-19, 1995.
- DI, T.; SULLIVAN, J.A.; RUPNOW, H.L.; MAGNESS, R.R.; BIRD, I.M. Pregnancy induces expression of cPLA<sub>2</sub> in ovine uterine artery but not systemic artery endothelium. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 6(6):301-306, 1999.

- EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S.; LISSI, E.A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):261-266, 2001.
- EVORA, P.R.B.; PEARSON, P.J.; DISCIGIL, B.; SECCOMBE, J.F.; SCHAFF, H.V. Endotélio e Óxido Nítrico: História, Fisiologia e as Primeiras Observações Relacionadas com a Hipertensão Arterial. *Hiper Ativo*, vol.2, n°2, 1995.
- FARHAT, M.Y.; LAVIGNE, M.C.; RAMWELL, P.W. The vascular protective effect of estrogen. *FASEB Journal*, 10: 615-624, 1996.
- FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assay of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymology*, 105:114-121, 1984.
- FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutases. *Annal Review of Biochemistry*. 44:147-157, 1975.
- GANONG, W.F. *Fisiologia Médica*. 17ªed. Rio de Janeiro: editora Prentice – Hall do Brasil LTDA, 1995.
- GARDNER, P.R.; RAINIERI, I.; EPSTEIN, L.B.; WHITE, C.W. Superoxide Radical and Iron Modulate Aconitase Activity in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.270 - n°22:13399-13405, 1995.
- GENUTH, M.S. O Sistema Endócrino. In: BERNE, R. M. & LEVY, M. N. (ed) *Fisiologia*. 3º ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1996.
- GOLDBLATT, H.; LYNCH, J.; HANZAL, R.F., SUMERVILLE, W.W. Studies on Experimental Hypertension. I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia. *Journal of Experimental Medicine*. 59:347-379,1934.
- GOLDSTEIN, S.; CZAPSKI, G. Superoxide Dismutase. In PUNCHARD, N.A. & KELLY, F.J. (ed) *Free Radicals: A Practical Approach*. Oxford University Press, 1996.
- GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated Chemiluminescence: an Assay for Oxidative Stress in

- Biopsies of Liver, Heart and Muscle. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 10:41-47 , 1991.
- GRANGER, D.L.; ANSTEY, N.M.; MILLER, W.C.; WEINBERG, J.B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in Enzimology*, 301:58-61, 1999.
- GROHÉ, C.; KAHLERT, S.; LOEBBERT, K.; STIMPEL, M.; KARAS, R.H.; VETTER, H.; NEYSES, L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Letters*, 416:107-112, 1997.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Textbook of Medical Physiology*. 9<sup>o</sup>ed. Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 1996.
- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBI, W.B. Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.249 - n<sup>o</sup>22:7130-7139, 1974.
- HALLIWELL, B. Antioxidants: The Basis What They Are and How to Evaluate Them. In SIES, H. (ed) *Antioxidants in diseases: Mecanisms and Therapy*. (Advances in Pharmacology vol. 38) California: Academic Press, 1997.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C.M. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3th ed. Oxford University Press, 1999.
- HALPERN, B.N.; PACAUD, A. Technique de prélèvement d'échantillons de sang chez les petits animaux de laboratoire par ponction du plexus ophtalmique. *Comptes Rendu de la Société du Biologie*. 145:1465-1466, 1951.
- HARRIS, E.D. Regulation of Antioxidant Enzymes. *FASEB Journal*, 6:2675-2683, 1992.
- HOUSSAY, B.A. *Fisiologia Humana*. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1984.
- JOVER, B.; HERIZI, A.; VENTRE, F.; DUPONT, M.; MIMRAM, A. Sodium and Angiotensin in Hypertension Induced by Long Term Nitric Oxide Blockade. *Hypertension*, 21:944-948, 1993.

- KEELE, B.B.; McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase from *Escherichia coli*: A New Manganese-Containing Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.245 - n°22:6176-6181, 1970.
- KRISHNAMURTHI, K.; VERBALIS, J.G.; ZHENG, W. Estrogen regulates angiotensin AT<sub>1</sub> receptor expression via cytosolic proteins that bind to the 5' leader sequence of receptor mRNA. *Endocrinology*, 140(11): 5435-5438, 1999.
- KUHL, H. Cardiovascular effects and estrogen / gestagen substitution therapy. *Ther – Umsch.* 51(11):748-754, 1994.
- KUMAR, K.V.; DAS, U.N. Are Free Radicals Involved in the Pathobiology of Human Essential Hypertension? *Free Radical Research Communication*, 19(1):59-66, 1993.
- KUO, P.C.; SCHROEDER, R.A. The Emerging Multifaceted Roles of Nitric Oxide. *Annals of Surgery* vol.221(3):220-235, 1995.
- LACY, F.; GOUGH, D.A.; SCHMID-SCHONBEIN, G.W. Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production. *Free Radical in Biology and Medicine*, 25(6):720-727, 1998.
- LACY, F.; O'CONNOR, D.T.; SCHMID-SCHONBEIN, G.W. Plasma hydrogen peroxide in hypertensive and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *Journal of Hypertension*, 16:291-303, 1998.
- LAURINDO, F.R.M.; LUZ, P.L. Espécies Ativas de Oxigênio Podem Contribuir para Aumento da Resistência Vascular Periférica na Hipertensão: Uma Hipótese. *Hiper Ativo*, vol.2, n°2, 1995.
- LEMBO, G.; VECCHIONE, C.; IZZO, R.; FRATTA, L.; FONTANA, D.; MARINO, G.; PILATO, G.; TRIMARCO, B. Noradrenergic vascular hyper-responsiveness in human hypertension is dependent on oxygen free radical impairment of nitric oxide activity. *Circulation*, 102:552-557, 2000.
- LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azobis (2-amidino-propane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comms.* 17:299-311, 1992.

- LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A.; MILEI, S. Comparison of Lipid Peroxidation and Myocardial Damage Induced by Adriamycin and 4'-epiadrimicin in Mice. *Tumori*, 71:241-249, 1985.
- LOPES-ONGIL, S.; TORRECILAS, G.; PERAM-SALA, D.; GONZALEZ-SANTIAGO, L.; RODRIGUEZ-PUYOL, M.; RODRIGUEZ-PUYOL, D. Mechanisms Involved in the Contraction of Endothelial Cells by Hydrogen Peroxide. *Free Radical Biology & Medicine*, vol.26, n°5/6:501-510, 1999.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.; FARR, A.L.; RANDALL, R. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
- LUOMA, J.S.; STRALIN, P.; MARKLUND, S.L.; HILTUNEN, T.P.; SARKIOJA, T.; YIÄ-HERTTUALA, S. Expression of Extracellular SOD and iNOS in Macrophages and Smooth Muscle Cells in Human and Rabbit Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18:157-167, 1998.
- MANNERVIK, B.; GLUTHENBERG, C. Glutathione Transferase. *Methods in Enzymology*, 77:231-235, 1981.
- MARKLUND, S. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton. CRC Press. 243-247, 1985.
- MASSAFRA, C.; DE FELICE, C.; GIOIA, D.; BUONOCORE, G. Variations in erythrocyte antioxidant glutathione peroxidase activity during the menstrual cycle. *Clinical Endocrinology.*, 49:63-67, 1998.
- Mc CORD, J.M. Oxygen – Derived Radicals: a Link Between Reperfusion Injury and Inflammation. *Federation Proc.* 46:2402-2406, 1987.
- Mc CORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: An Enzymic Function for Erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22):6049-6055, 1969.

- Mc HUGH, N.A.; MERRIL, G.F.; POWELL, S.R. Estrogen diminishes postischemic hydroxyl radical production. *Am. J. Physiol.*, 274 (Heart Circ. Physiol. 43):H1950-H1954, 1998.
- MENEGUINI, R. A Toxicidade do Oxigênio. *Ciência Hoje*, vol. 5 número 28, 1987.
- MILLER, V.M. Gender, Estrogen, and NOS: Cautions about generalizations. *Circulation Research*, 85:979-981, 1999.
- MILLER, V.M.; VANHOUTTE, P.M. 17 $\beta$ -estradiol augments endothelium-dependent contractions to arachidonic acid in rabbit aorta. *Am. J. Physiol.*, 258 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 27):R1502-R1507, 1990.
- MILLS, G.C. Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 86:1-5, 1960.
- MONCADA, S. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacol. Review*, 43:109-142, 1991.
- NICKENIG, G.; BÄUMER, AT.; GROHÉ, C.; KAHLERT, S.; STREHLOW, K.; ROSENKRANZ, S.; STÄBLEIN, A.; BECKERS, F.; SMITS, J.F.M.; DAEMEN, M.J.A.P.; VETTER, H.; BÖHM, M.; Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation*, 97:2197-2201, 1998.
- NIKI, E. & NAKANO, M. Estrogens as Antioxidants. *Meth. Enzymol.* 186:330-333, 1990.
- NUEDLING, S.; KAHLERT, S.; LOEBBERT, K.; DOEVENDANS, P.A.; MEYER, R.; VETTER, H.; GROHÉ, C. 17  $\beta$ -Estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. *Cardiovascular Research*, 43(3):666-674, 1999.
- OBERLEY, T.D.; SHULTZ, J.L.; OBERLEY, L.W. In vivo modulation of antioxidant enzyme levels in normal hamster kidney and estrogen-induced kidney tumor. *Free Radical Biol. Med.*, 16:741-751, 1994.
- OSKARSSON, H.J.; HEISTAD, D. Oxidative stress produced by angiotensin too: Implications for hypertensive and vascular injury. *Circulation*, 95:557-559, 1997.



- PALACE, V.P.; KHAPER,N.; QIN, Q.; SINGAL, P. Antioxidant Potentials of Vitamin A and Carotenoids and Relevance to Heart Disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(5/6):746-761, 1999.
- PELZER, T.; SHAMIM, A.; NEYSES, L. Estrogen Effects in the Heart. *Mol. Cell. Biochem.* 160-161: 307-313, 1996.
- RAJAGOPALAN, S.; KURZ, S.; MÚNZEL, T.; TARPEY, M.; FREEMAN, B.A.; GRIENDLING, K.K.; HARRISON, D.G. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.*, 97:1916-1923, 1996.
- RANICH, T.; BHATHENA, S.J.; VELASQUEZ, M.T. Protective effects of dietary phytoestrogens in chronic renal disease. *Journal of Renal Nutrition: The Official Journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*, 11(4):183-193, 2001.
- RIBEIRO, M.O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S.M.; ZATZ, R. Chronic Inhibition of Nitric Oxide Synthesis: A New Model of Arterial Hypertension. *Hypertension*, 20:298-303, 1992.
- ROMERO, J.C.; RECKELHOFF, J.F. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*, 34(2):943-949, 1999.
- RUSSEL, G.A. Deuterium – isotopo Effects in the Autoxidation of Aralkyl Hydrocarbons Mecanism of the Interaction of Peroxy Radicals, in: *J. Am. Chem. Soc.*, 79:3871-3880, 1957.
- RUSSO, C.; OLIVIERI, O.; GIRELLI, D.; FACCINI, G.; ZENARI, M.L.; LOMBARDI, S.; CORROCHER, R. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *Journal of Hypertension*, 16:1267-1271,1998.
- RUZICKA, M.; LEENEN, F.H.H. Experimental Renovascular Hypertension: Methodological Aspects and Role of the Renin-Angiotensin Sistem. In GANTEN, D.; JOND, W. (ed) *Handbook of Hypertension*, vol.16: Experimental and Genetic Models of Hypertension. Elsevier Science B V, 1994.

- SCHIFFRIN, E.L. Endothelin and Endothelin antagonists in Hypertension. *Journal of Hypertension*, 16:1891-1895, 1998.
- SIES, H. & MURPHY, M.E. Role of Tocopherols in the Protection of Biological Against Oxidative Damage. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 8:211-224, 1991.
- SIES, H. (ed.) *Antioxidants in Diseases: Mecanisms and Therapy*. (Advances in Pharmacology vol 38) Califórnia: Academic Press, 1997.
- SIES, H. Glutathione and its Role in Cellular Functions. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(9/10):916-921, 1999.
- SOUTHORN, P. & POWIS, G. Free Radicals in Medicine. *I. Chemical Nature and Biologic Reaction*, in: Mayo Clin. Proc., 63:381-389, 1988.
- STEFANO, G.B.; PREVOT, V.; BEAUVILLAIN, J.C.; CADET, P.; FIMIANI, C.; WELTERS, I.; FRICCHIONE, G.L.; BRETON, C.; LASSALLE, P.; SALZET, M.; BILFINGER, T.V. Cell-surface estrogen receptor mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. *Circulation*, 101:1594-1597, 2000.
- SWEI, A.; LACY, F.; DELANO, F.A.; SCHMID-SCHONBEIN, G.W. Oxidative stress in the DAHL hypertensive rats. *Hypertension*, 30:1628-1633, 1997.
- THOMAS, C.E. Approaches and Rationale for the Design of Synthetic Antioxidants as Therapeutic Agents. In PACKER, L. (ed.) *Handbook of Synthetic Antioxidants*. New York: Marcel Dekker Inc., 1997.
- TOUYS, R.M.; SCHIFFRIN, E.L. AngII-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 34(2):976-982, 1999.
- USUI, M.; EGASHIRA, K.; KITAMOTO, S.; KOYANAGI, M.; KATOH, M.; KATAOKA, C.; SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A. Pathogenic role of oxidative stress in vascular angiotensin-converting enzyme activation in long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension*, 34:546-551, 1999.

- VELASQUEZ, M.T.; BHATHENA, S.J. Dietary phytoestrogens: a possible role in renal disease protection. *Am. J. Kidney Dis.*, 37(5):1056-1068, 2001.
- WARNHOLTZ, A.; NICKENIG, G.; SCHULZ, E.; MACHARZINA, R.; BRASEN, J.H.; SKATCHKOV, M.; HEITZER, T.; GRIENGLING, K.K.; HARRISON, D.; BÖHM, M.; MEINERTZ, T.; MUNZEL, T. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: Evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 99:2027-2033, 1999.
- WASSMANN, S.; BÄUMER, A.T.; STREHLOW, K.; VAN EICKELS, M.; GROHÉ, C.; AHLBORY, K.; RÖSEN, R.; BÖHM, M.; NICKENIG, G. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in Spontaneously Hypertensive Rats. *Circulation*, 103:435-441, 2001.
- WAYNFORTH, H.B.; FLECKNELL, P.A. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. Academic Press London, 1992.
- WILLIAMS, C.L.; STANCEL, G.M. Estrogênios e Progestogênios. In: GOODMAN E GILMAN (ed). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 9ªed., 1996.
- YOSHIE, Y.; OHSHIMA, H. Synergistic induction of DNA strand break age by catecol-estrogen and nitric oxide: implications for hormonal carcinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.*, 24(2):341-348, 1998.
- YOST, F.J.; FRIDOVICH, I. An Iron-Containing Superoxide Dismutase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.248 - n°14:4905-4908, 1973.
- YU, B.P. Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiological Reviews*. 74(1):139-162, 1994.
- ZAFARI, A.M.; USHIO-FUKAI, M.; AKERS, M.; YIN, Q.; SHAH, A.; HARRISON, D.G.; TAYLOR, W.R.; GRIENGLING, K.K. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*, 32:488-495, 1998.