

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

ALINE DE OLIVEIRA SILVA

**Efeito do tratamento com metotrexato associado à nanopartícula lipídica,
LDE, sobre as alterações cardiovasculares em ratos com hipertensão
arterial sistêmica espontânea**

São Paulo
2026

ALINE DE OLIVEIRA SILVA

**Efeito do tratamento com metotrexato associado à nanopartícula lipídica,
LDE, sobre as alterações cardiovasculares em ratos com hipertensão
arterial sistêmica espontânea**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção de Título de
Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Raul
Cavalcante Maranhão

São Paulo

2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Aline de Oliveira

Efeito do tratamento com metotrexato associado à nanopartícula lipídica, LDE, sobre as alterações cardiovasculares em ratos com hipertensão arterial sistêmica espontânea / Aline de Oliveira Silva; Raul Cavalcante Maranhão, orientador. – São Paulo, 2026.

Tese (Doutorado) -- Programa de Cardiologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2026.

1.Hipertensão arterial sistêmica 2.Nanopartículas 3.Metotrexato
4.Fibrose 5.Angiogênese 6.Adenosina I.Maranhão, Raul Cavalcante,
orient. II.Título

USP/FM/DBD-320/26

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Nome: SILVA, Aline de Oliveira

Título: Efeito do tratamento com metotrexato associado à nanopartícula lipídica, LDE, sobre as alterações cardiovasculares em ratos com hipertensão arterial sistêmica espontânea

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de Título
de Doutor em Ciências

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico este doutorado aos meus pais, Josué e Claudia, que, apesar de não terem tido a oportunidade de cursar uma faculdade, nunca deixaram de incentivar e apoiar meus estudos. Cada conquista ao longo desta trajetória carrega o esforço, o amor e a dedicação de vocês. Esta conquista é de vocês.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus, por me conceder força em momentos de fraqueza, sabedoria e perseverança em momentos difíceis, permitindo que eu superasse os desafios e chegasse até a conclusão dessa etapa.

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, meu orientador, expresso minha profunda gratidão pela confiança depositada em mim e neste trabalho, pelos ensinamentos, orientação, incentivo e oportunidade de crescimento científico e profissional.

À Dra. Maria Carolina Guido, agradeço por toda a ajuda, apoio e orientação oferecidos no início deste trabalho, fundamentais para o seu desenvolvimento.

A todos os funcionários e colaboradores do Laboratório de Metabolismo de Lípidos, Wanderlei Santos, Josefa, Débora de Deus, Priscila Carvalho e Elaine Tavares agradeço pelo aprendizado, apoio, disponibilidade e auxílio prestados durante a realização deste estudo.

À Dra. Fátima Freitas, agradeço profundamente pelo carinho, pelas palavras de incentivo, pelo apoio, amizade e pelos abraços acolhedores. Isso foi fundamental para que eu chegasse até a conclusão desta etapa tão importante da minha vida.

Aos amigos que compartilharam comigo a caminhada do doutorado, Maurício Tavares, Carolina Graziani, Fabiana Juliani e Priscilla Griffó, obrigada pela amizade, apoio, companheirismo e pelos momentos de descontração que tornaram essa trajetória mais leve e agradável. Que a nossa amizade construída se perpetue por muitos anos.

Aos funcionários da Divisão de Pesquisa e Experimentação Animal do InCor, pela ajuda com o manuseio e cuidado com os animais.

Aos funcionários da Pós-Graduação, Sidnei Silva, Cintia Gomes, Mônica Souto, Val Ferreira e Luana Guedes, agradeço pela atenção, pelos esclarecimentos de dúvidas e suporte oferecidos ao longo de todo o curso.

Ao meu marido, Bruno, pelo amor, compreensão, paciência e apoio incondicional em todos os momentos, especialmente nos períodos mais desafiadores e estressantes desta jornada. Sem seu apoio, eu não conseguiria ter chegado aqui. Te amo muito. Você é o melhor companheiro que eu poderia ter.

Aos meus pais, Claudia e Josué, por todo amor, incentivo e pelos valores que me ensinaram ao longo da vida. Esta conquista é de vocês.

À minha irmã Natalia pelo carinho, apoio e por sempre estar ao meu lado, torcendo por minhas conquistas, juntamente com seu esposo Wellington. Agradeço principalmente por terem me dado o maior presente, o Bernardo.

Ao meu irmão Matheus, por todo o apoio, carinho e incentivo ao longo desta jornada, ao lado da sua esposa Elisa.

A todos os familiares, tios, sogros, cunhados e amigos que estiveram ao meu lado, agradeço pelas palavras de incentivo, pelas orações e pela torcida constante. O carinho e o apoio de cada um de vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui e concluísse este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, cujo suporte foi fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa.

*“Por isso eu pergunto
A você no mundo:
É mais inteligente
O livro ou a sabedoria?”*

*O mundo é uma escola,
A vida é o circo.
Amor: palavra que liberta,
Já dizia o Profeta”*

Marisa Monte, em Gentileza.

NORMATIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:
Referencias: adaptado de International Committe of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver). Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro... [et al.]. --3.ed. rev. ampl. mod. - - São Paulo: SIBi/USP, 2016.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

RESUMO

Silva AO. Efeito do tratamento com metotrexato associado à nanopartícula lipídica, LDE, sobre as alterações cardiovasculares em ratos com hipertensão arterial sistêmica espontânea [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2026.

Introdução: A hipertensão arterial sistêmica (HAS) está associada com a hipertrofia e a fibrose no ventrículo esquerdo que são fundamentais na gênese da disfunção ventricular. A incorporação do quimioterápico metotrexato (MTX), um inibidor do ácido fólico, em nanopartículas lipídicas (LDE) aumenta acentuadamente a captação celular e diminui a toxicidade do MTX. A associação LDEMTX mostrou potente efeito anti-inflamatório e anti-proliferativo em modelos experimentais de coelhos com aterosclerose e de artrite. Em ratos com indução de infarto agudo do miocárdio, a LDEMTX reduziu o tamanho do infarto e a disfunção do ventrículo esquerdo. Assim, o tratamento com a LDEMTX pode ser promissor na prevenção do remodelamento cardíaco que ocorre na HAS. **Objetivo:** Avaliar se a LDEMTX pode prevenir o surgimento de alterações cardíacas da HAS no modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). **Métodos:** Ratos machos com 6 semanas de idade foram estudados em 4 grupos (n=67): Controle (CT): ratos Wistar-Kyoto que receberam injeções com solução salina; SHR-LDE: SHR tratados apenas com LDE; SHR-MTX: SHR tratados com MTX comercial (0,63mg/Kg/semana) e SHR-LDEMTX: SHR tratados com LDEMTX (1mg/Kg/semana, I.P.). A medição indireta da pressão arterial (PA) foi realizada antes e após as 20 semanas do início do tratamento. Após o tratamento, foi realizada a avaliação da hemodinâmica, bem como, a ecocardiografia, morfometria, expressão proteica e gênica no ventrículo esquerdo. **Resultados:** Em comparação ao grupo CT, todos os grupos SHR apresentaram valores mais elevados de pressão arterial sistólica (PAS) no período basal, demonstrando homogeneidade entre os grupos hipertensos. Após 20 semanas, os animais SHR-LDE apresentaram aumento da PAS, diastólica (PAD) e média (PAM), em comparação ao CT. Os tratamentos com LDEMTX ou com MTX não modificaram esses parâmetros. Na avaliação autonômica, o grupo SHR-LDE apresentou aumento da modulação simpática cardíaca ($\uparrow$ BF-IP em unidades normalizadas), redução da modulação parassimpática cardíaca ($\downarrow$ AF-IP em unidades normalizadas) e aumento da modulação simpática vascular ($\uparrow$ BF-PAS) em relação ao CT. O tratamento com LDEMTX não alterou esses parâmetros, enquanto o MTX comercial manteve os componentes AF-IP e BF-IP semelhantes aos do grupo CT, apesar da persistência da hipertensão. A ecocardiografia mostrou que os animais SHR-LDE apresentaram dilatação ventricular (aumento dos diâmetros sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo) e disfunção sistólica (redução das frações de ejeção e de encurtamento) em comparação ao CT, sem efeito dos tratamentos com LDEMTX ou MTX. Na avaliação da fibrose ventricular, os animais SHR-LDE apresentaram maior fração de volume de colágeno (FVC) nas regiões intersticiais do ventrículo esquerdo, acompanhada de maior expressão de colágeno tipo I. Tratamento com LDEMTX reduziu a FVC na região intersticial, possivelmente pela redução da expressão de colágeno do tipo I, ao passo que o tratamento com MTX aumentou a FVC nas regiões subendocárdica e intersticial. Além disso, o grupo SHR-LDE apresentou presença de hipóxia miocárdica, caracterizada por aumento da expressão de HIF-3 α e redução da expressão de ECA2. O tratamento com LDEMTX reduziu a hipóxia ventricular ($\downarrow$ HIF-3 α), promoveu angiogênese ($\uparrow$ VEGF), aumentou a expressão de ECA2 e elevou a biodisponibilidade intracelular de adenosina por meio do aumento da expressão do receptor A2B de

adenosina. Observou-se correlação positiva entre a expressão de HIF-3 α e a fibrose intersticial ($r=0,470$; $p=0,021$), bem como entre as expressões proteicas de VEGF e ECA2 ($r=0,952$; $p<0,0001$). Além disso, foi identificada correlação negativa entre as expressões de VEGF e HIF-3 α ($r=-0,580$; $p=0,04$). **Conclusão:** O tratamento com LDEMTX não alterou a PAS, a modulação autonômica cardíaca e vascular, a dilatação ventricular ou a disfunção sistólica. No entanto, o tratamento com LDEMTX apresentou efeito antifibrótico no ventrículo esquerdo, associado à modulação da expressão de ECA2 e VEGF e à redução da hipóxia miocárdica, sugerindo potencial proteção contra a insuficiência cardíaca. Além disso, demonstrou boa tolerabilidade, segurança e ausência de toxicidade, indicando potencial para futuras aplicações terapêuticas.

Palavras-chaves: Hipertensão arterial sistêmica. Nanopartículas. Metotrexato. Fibrose. Angiogênese. Adenosina.

ABSTRACT

Silva AO. Effect of treatment with methotrexate associated with the lipid nanoparticle, LDE, on cardiovascular alterations in rats with spontaneous systemic arterial hypertension [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2026.

Introduction: Systemic arterial hypertension (SAH) is associated with left ventricular hypertrophy and fibrosis, which are key contributors to the development of ventricular dysfunction. Incorporation of the chemotherapeutic agent methotrexate (MTX), a folic acid inhibitor, into lipid nanoparticles (LDE) markedly enhances cellular uptake while reducing MTX toxicity. LDEMTX has demonstrated potent anti-inflammatory and antiproliferative effects in experimental models of atherosclerosis and arthritis. In rats with experimentally induced acute myocardial infarction, LDEMTX reduced infarct size and improved left ventricular function. Therefore, LDEMTX treatment may represent a promising strategy to prevent cardiac remodeling associated with SAH. **Objective:** To evaluate whether LDEMTX prevents the development of cardiac alterations in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods:** Six-week-old male rats were allocated into four groups (n = 67): Control (CT), Wistar-Kyoto rats receiving saline injections; SHR-LDE, SHR treated with LDE alone; SHR-MTX, SHR treated with commercial MTX (0.63 mg/kg/week); and SHR-LDEMTX, SHR treated with LDEMTX (1 mg/kg/week, intraperitoneally). Indirect blood pressure (BP) was measured before treatment and after 20 weeks. At the end of the protocol, hemodynamic, echocardiographic, morphometric, protein, and gene expression analyses were performed in the left ventricle. **Results:** At baseline, all SHR groups exhibited higher systolic blood pressure than the CT group, confirming homogeneity among hypertensive animals. After 20 weeks, SHR-LDE rats showed increased systolic, diastolic, and mean arterial pressure, compared with CT. Neither LDEMTX nor MTX affected these parameters. Autonomic evaluation showed increased cardiac sympathetic modulation ($\uparrow$ LF-PI, normalized units), reduced cardiac parasympathetic modulation ($\downarrow$ HF-PI, normalized units), and increased vascular sympathetic modulation ($\uparrow$ LF-SAP) in SHR-LDE animals compared with CT. LDEMTX did not modify these parameters, whereas commercial MTX preserved HF-PI and LF-PI values similar to CT despite persistent hypertension. Echocardiography demonstrated left ventricular dilation (increased systolic and diastolic diameters) and systolic dysfunction (reduced ejection fraction and fractional shortening) in SHR-LDE animals, with no improvement following MTX or LDEMTX treatment. SHR-LDE rats also exhibited increased interstitial collagen volume fraction and higher type I collagen expression. LDEMTX reduced interstitial collagen volume fraction, likely through decreased type I collagen expression, whereas MTX increased collagen deposition in both the subendocardial and interstitial regions. In addition, SHR-LDE animals showed evidence of myocardial hypoxia, characterized by increased HIF-3 α expression and reduced ACE2 expression. LDEMTX attenuated ventricular hypoxia ($\downarrow$ HIF-3 α), promoted angiogenesis ($\uparrow$ VEGF), increased ACE2 expression, and enhanced intracellular adenosine bioavailability by upregulating the A2B adenosine receptor. A positive correlation was observed between HIF-3 α expression and interstitial fibrosis ($r = 0.470$; $p = 0.021$), as well as between VEGF and ACE2 protein expression ($r = 0.952$; $p < 0.0001$). A negative correlation was also found between VEGF and HIF-3 α expression (r

= -0.580; $p = 0.04$). **Conclusion:** LDEMTX treatment did not affect systolic blood pressure, cardiac and vascular autonomic modulation, ventricular dilation, or systolic dysfunction. However, it exerted a marked antifibrotic effect in the left ventricle, associated with modulation of ACE2 and VEGF expression and attenuation of myocardial hypoxia, suggesting a potential protective role against the development of heart failure. Furthermore, LDEMTX demonstrated good tolerability, safety, and no detectable toxicity, supporting its potential for future therapeutic applications.

Keywords: Hypertension. Lipid nanoparticles. Methotrexate. Fibrosis. Angiogenesis. Adenosine.

LISTA DE ABREVIATURAS

AF-IP	Alta frequência do intervalo de pulso
AICAR	Enzima 5-aminoimidazol-4-carboxamidaribonucleotídeo
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
ANP	Peptídeo natriurético atrial
Apo	Apolipoproteína
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AT1	Receptor de angiotensina II do tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina II do tipo 2
BF-IP	Baixa frequência do intervalo de pulso
BF-PAS	Baixa frequência da pressão arterial sistólica
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
BRA	Bloqueador do receptor AT1
CDC	Centros de controle e prevenção de doenças
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CT	Controle
DCVs	Doenças cardiovasculares
DD	Diâmetro diastólico
DS	Diâmetro sistólico
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK1/2	Quinase 1/2 regulada por sinal extracelular
ET-1	Endotelina – 1
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de Ejeção
FEnc	Fração de Encurtamento
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FVC	Fração de volume de colágeno
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica

HDL- C	Colesterol da lipoproteína de alta intensidade
HE	Hematoxilina-eosina
HIF	Fator induzível por hipóxia
IECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IL	Interleucinas
I.P	Intraperitoneal
IP	Intervalo de pulso
LD/EMTX	Nanoemulsão lipídica associada ao metotrexato
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MBF	Muito baixa frequência
MMP	Metaloproteinase
MTX	Metotrexato
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOX-1	NADPH Oxidase 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PAM	Pressão arterial média
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SIV	Espessura do septo interventricular
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SNS	Sistema nervoso simpático
SOD	Superóxido Dismutase 1
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TG	Triglicerídeos
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TH17	Células T pró-inflamatórias
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRIV	Tempo de relaxamento isovolumétrico

UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
VAR-IP	Variância do intervalo de pulso
VAR-PAS	Variância da pressão arterial sistólica
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo da fisiopatologia da HAS.....	24
Figura 2. Mecanismo de ação da LDEMTX.....	40
Figura 3. Parâmetros da Hemodinâmica.....	56
Figura 4. Parâmetros de modulação autonômica cardíaca no domínio da frequência.....	57
Figura 5. Parâmetros da PAS.....	58
Figura 6. Fibrose cardíaca.....	60
Figura 7. Hipertrofia cardíaca.....	61
Figura 8. Colágenos.....	62
Figura 9. Angiotensina.....	63
Figura 10. Receptor β -adrenérgico.....	65
Figura 11. TGF- β e MMPs.....	66
Figura 12. Marcadores Inflamatórios	67
Figura 13. Hipóxia e Angiogênese.....	68
Figura 14. Estresse Oxidativo.....	69
Figura 15. Adenosina.....	70
Figura 16. Correlações.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos anticorpos primários utilizados para os ensaios de expressão proteica por Western blot.....	51
Tabela 2. Descrição das identificações das TaqMan utilizadas para expressão gênica por qRT-PCR.....	53
Tabela 3. PAS e FC por plestismografia basal e final.....	55
Tabela 4. Ecocardiografia.....	59
Tabela 5. Toxicidade e perfil lipídico	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Definição e Epidemiologia da Hipertensão Arterial Sistêmica	22
1.2 Fisiopatologia	23
1.2.1 Sistema Nervoso Simpático	24
1.2.2 Regulação da homeostase de sódio	25
1.2.3 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	26
1.2.4 Peptídeos natriuréticos	28
1.2.5 Endotélio	29
1.2.6 Inflamação e Sistema Imune	30
1.3 Lesões de Órgão Alvo na HAS	31
1.3.1 HAS e as alterações cardíacas	32
1.4 Tratamentos da HAS	36
1.5 Nanopartícula lipídica, a LDE	37
1.6 Metotrexato	38
2. JUSTIFICATIVA	42
3. OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral	42
3.1 Objetivos específicos	42
4 MATERIAIS e MÉTODOS	42
4.1 Modelo animal	42
4.2 Descrição do modelo experimental	43
4.3 Protocolo experimental	44
4.4 Preparação da LDEMTX	45
4.5 Pletismografia de cauda	45

4.6 Ecocardiografia.....	46
4.7 Medições hemodinâmicas e avaliação da modulação autonômica cardiovascular.....	47
4.8 Eutanásia.....	48
4.9 Toxicidade e Perfil lipídico.....	48
4.10 Peso Relativo do Coração.....	49
4.11 Morfometria.....	49
4.12 Expressão proteica por Western Blot.....	50
4.13 Expressão gênica por qRT-PCR.....	52
4.14 Análise Estatística.....	54
5. RESULTADOS.....	55
5.1 Pletismografia PAS e FC basal e final.....	55
5.2 Hemodinâmica.....	56
5.3 Modulação autonômica cardíaca no domínio da frequência.....	57
5.4 Modulação da PAS.....	58
5.5 Ecocardiografia.....	59
5.6 Fibrose cardíaca.....	60
5.7 Hipertrofia cardíaca.....	61
5.8 Colágenos.....	62
5.9 Angiotensina.....	63
5.10 Receptor $\beta 1$ adrenérgico.....	65
5.11 TGF- β e MMPs.....	66
5.12 Marcadores Inflamatórios.....	67
5.13 Hipóxia e Angiogênese.....	68
5.14 Estresse oxidativo.....	69
5.15 Adenosina.....	70

5.12 Toxicidade e perfil lipídico.....	72
5.11 Correlações.....	73
6. DISCUSSÃO.....	74
7. CONCLUSÃO.....	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definição e Epidemiologia da Hipertensão Arterial Sistêmica

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma doença crônica não transmissível definida por níveis elevados da pressão arterial (PA), em que os benefícios do tratamento, seja ele não medicamentoso ou medicamentoso, superam os riscos associados (McEvoy JW et al., 2024). Segundo as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, a HAS é caracterizada pela presença da pressão arterial sistólica (PAS) igual ou superior a 140 mmHg e/ou uma pressão arterial diastólica (PAD) igual ou superior a 90 mmHg, desde que esses valores sejam obtidos com a técnica correta e na ausência de medicação anti-hipertensiva (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2025).

Nos últimos 30 anos, o número de adultos com HAS, entre 30 e 79 anos, duplicou passando de 650 milhões para 1,3 bilhões no mundo, de acordo com a primeira análise global abrangente das tendências na prevalência, detecção, tratamento e controle da hipertensão (NCD Risk Factor Collaboration, 2021). Nos Estados Unidos, a HAS provoca cerca de 500.000 mortes anualmente e gera um custo de por volta de US\$ 131 a 198 bilhões por ano ao país, segundo os Centros de Controle e Prevenção de Doenças Norteamericano, (CDC, 2022). No Brasil, segundo o relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), a prevalência de HAS é de 45% na população adulta, o que equivale a um alarmante contingente de 51 milhões de pacientes, sendo que 67% são diagnosticados e apenas 33% estão controlados (OMS, 2023). A taxa de mortalidade por HAS atingiu o maior valor dos últimos dez anos no Brasil, com a ocorrência de 18,7 óbitos por 100 mil habitantes em 2021 e um custo anual de mais de R\$ 2 bilhões ao Sistema Único de Saúde (Nilson et al., 2018; Brasil, 2023).

1.2 Fisiopatologia

As causas da HAS ainda não são completamente compreendidas. Na maioria dos casos, não se atribuem a uma única causa, caracterizando, assim, a hipertensão primária ou essencial que é responsável por aproximadamente 95% dos casos (Reuter e Jordan, 2019). A HAS primária é o resultado de interações complexas entre fatores genéticos, ambientais e comportamentais, tais como histórico familiar, ingestão excessiva de sódio, sedentarismo e influências emocionais (Goodfriend e Lysterly, 2009). Se a HAS for causada por uma condição conhecida como, por exemplo, aldosteronismo primário, feocromocitoma ou estenose da artéria renal, ela é denominada hipertensão secundária (Rimoldi; Scherrer; Messerli, 2014).

A pressão arterial (PA) é determinada pelo produto do débito cardíaco e da resistência vascular periférica (Elliott, 2007). A regulação dos níveis fisiológicos da PA é um processo complexo que engloba uma interação multifacetada entre diversos componentes de um sistema neuro-humoral integrado. Esse sistema envolve o sistema nervoso simpático (SNS), o funcionamento da regulação da homeostase do sódio, do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), a função dos peptídeos natriuréticos e pelo endotélio, além do papel importante do sistema imunológico. Qualquer disfunção ou desequilíbrio em um desses sistemas pode provocar, direta ou indiretamente, aumento na PA média, na sua variabilidade, ou em ambos, ao longo do tempo (Figura 1). Tais alterações podem culminar em danos aos órgãos-alvo, como a insuficiência ventricular esquerda e a doença renal crônica, contribuindo para desfechos adversos em doenças cardiovasculares (DCVs) (Oparil et al., 2018).

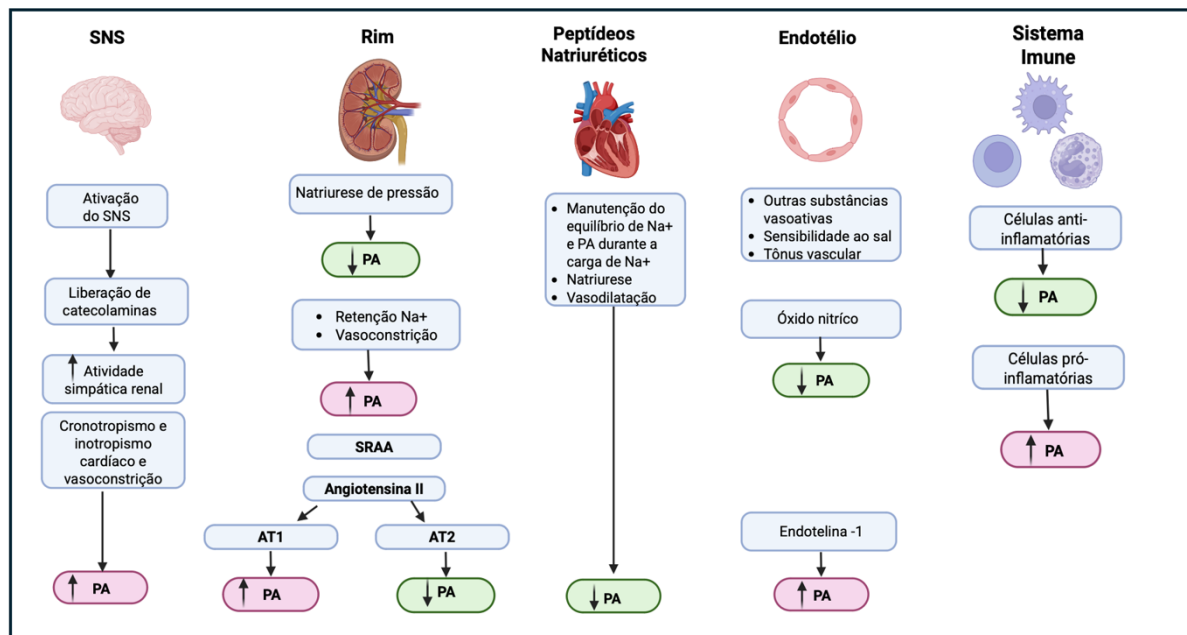


Figura 1: Mecanismos da fisiopatologia da HAS. SRAA: Sistema Renina - Angiotensina - Aldosterona, PA: Pressão Arterial. SNS: Sistema Nervoso Simpático. **Fonte:** Adaptado de Oparil et al., 2018.

1.2.1 Sistema Nervoso Simpático

Na HAS, ocorre comprometimento do controle autonômico cardiovascular, caracterizado pela redução da atividade parassimpática e pelo aumento da influência simpática sobre o coração e a circulação periférica. Essa hiperatividade simpática resulta da interação de diversos mecanismos reflexos e não reflexos, contribuindo para o desenvolvimento e a progressão da HAS em diferentes estágios da doença, desde formas limítrofes até casos moderados, graves e resistentes ao tratamento. Além disso, a ativação adrenérgica exacerbada está envolvida na fisiopatologia das alterações cardiometabólicas associadas à HAS, favorecendo o surgimento de lesões em órgãos-alvo ao longo da evolução clínica da doença (Grassi e Ram, 2016).

O sistema nervoso simpático regula a PA influenciando funcionalmente a vasculatura, os rins e o coração. A função simpática alterada está firmemente estabelecida no desenvolvimento, manutenção e fisiopatologia de numerosas doenças cardiovasculares, incluindo a HAS (Brody et al., 1991; Esler, 2000; Grassi; Bertoli; Seravalle, 2012). O aumento na atividade do SNS também é observado em pessoas com obesidade, especialmente em

homens em comparação com mulheres, em indivíduos mais jovens em relação aos idosos, e em pacientes com doença renal avançada (Augustyniak et al., 2002; Augustyniak et al., 2010).

Estudos clínicos identificaram marcadores dessa hiperatividade simpática, como o aumento na liberação de catecolaminas e a atividade do nervo sural, avaliada por microneurografia, até mesmo em indivíduos normotensos com histórico familiar de HAS (Grassi et al., 1998; Smith et al., 2004). O estudo realizado por Mancia e colaboradores evidenciou um aumento na atividade simpática neural durante os estágios iniciais do desenvolvimento da HAS (Mancia et al., 1993).

As catecolaminas interagem com os receptores adrenérgicos alfa (α) e beta (β). No sistema cardiovascular, os receptores α_1 -adrenérgicos são importantes mediadores das respostas do SNS, particularmente aqueles envolvidos na homeostase cardiovascular, como a constrição do músculo liso arteriolar (Graham et al., 1996). Já os receptores β -adrenérgicos promovem cronotropismo e inotropismo positivo cardíaco (β_1) e no rim a liberação de renina nas células justaglomerulares (β_2) no rim (Neto; Rascado; Bendhack, 2006; Bortolotto e Consolim-Colombo, 2009). Esses efeitos contribuem significativamente para o desenvolvimento e a manutenção da doença (Fujita, 2014).

1.2.2 Regulação da homeostase de sódio

O sódio desempenha um papel essencial na regulação do volume sanguíneo: concentrações elevadas de sódio plasmático promovem a retenção de líquidos, o que resulta no aumento do volume sanguíneo e, consequentemente, da PA.

O consumo excessivo de sódio contribui para o desenvolvimento da HAS por aumentar a retenção de líquidos, resultando em expansão do volume intravascular e elevação da pré-carga, o que leva ao aumento do débito cardíaco. Além disso, a retenção renal de sódio reforça esse mecanismo ao favorecer a manutenção da expansão volêmica e do aumento do débito cardíaco. Paralelamente, mecanismos independentes do volume também desempenham papel importante na elevação da pressão arterial, incluindo os efeitos da angiotensina II sobre o sistema nervoso central, que estimulam respostas pressoras, e o aumento da atividade do SNS, contribuindo para a manutenção da HAS (Khoury e Ratchford, 2018).

Em indivíduos normotensos, o aumento de sódio na dieta desencadeia ajustes hemodinâmicos compensatórios para manter a PA estável. Essas adaptações incluem a diminuição da resistência vascular renal e periférica, juntamente com um aumento na produção de óxido nítrico (NO), um composto vasodilatador, pelo endotélio vascular. Contudo, a ausência ou a limitação dos efeitos do NO, como na disfunção endotelial, podem levar ao aumento da PA (Feng; Italia; Sander, 2017).

A disfunção endotelial representa um fator de risco no desenvolvimento da sensibilidade ao sódio e, conseqüentemente, no surgimento da HAS. A sensibilidade ao sal refere-se a um considerável aumento na PA após a ingestão de uma carga de sódio superior a 5g (Rust e Kmekcioglu, 2017). Essa sensibilidade é marcada por um aumento na PAS de, pelo menos, 10 mmHg algumas horas após o consumo. Indivíduos sensíveis ao sal muitas vezes apresentam disfunção endotelial subjacente, influenciada por fatores genéticos ou ambientais (MacGregor, 2001).

Diante de uma elevada carga de sal, esses indivíduos costumam demonstrar um aumento na produção do fator transformador de crescimento β (TGF- β), o que amplia o risco de fibrose, estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade do NO. Mesmo em indivíduos considerados resistentes ao sal, a ingestão crônica elevada de sal pode levar à disfunção endotelial (He et al., 2020).

1.2.3 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

O SRAA é encontrado em nível celular em vários órgãos e desempenha um papel fundamental na regulação da PA, influenciando diversos processos fisiológicos. A renina junto com seu precursor pró-renina são sintetizados e armazenados nas células justaglomerulares do rim, sendo liberados em resposta a diversos estímulos (Varagic et al., 2014). A função primordial da renina é clivar o angiotensinogênio para formar a angiotensina I. Posteriormente, a enzima conversora de angiotensina 1 (ECA1) converte a angiotensina I em angiotensina II (Dandona et al., 2007). A angiotensina II interage com os receptores do tipo 1 (AT1), que desempenha um papel central no desenvolvimento da HAS, e do tipo 2 (AT2), que possui ações opostas ao receptor AT1 (Riet et al., 2015).

O receptor AT1 está amplamente distribuído em diversos tipos de células incluindo coração, rins, vasos, glândulas adrenais e pituitárias (Allen e Mendelsohn, 2000). No coração a interação da angiotensina II com o receptor AT1 está associada com aumento do inotropismo e cronotropismo (Wollert e Drexler, 2000); nos rins com o aumento da reabsorção de sódio no túbulo proximal (Hiranyachattada et al., 1996); no sistema nervoso central estimula a área rostral ventrolateral do bulbo (área pressora) (Andreatta et al., 1988) e facilita a liberação de noradrenalina pelas terminações nervosas simpáticas exercendo uma comunicação de feedback positivo entre sistema nervoso simpático e sistema renina-angiotensina, sendo que estas ações se reforçam mutuamente (Fagard et al., 1995). Já nos vasos promove a proliferação de células musculares lisas promovendo a vasoconstrição. Além disso, essa interação da angiotensina II com o receptor AT1 induz a síntese e liberação de aldosterona pela glândula adrenal (Campell; Brooks; Pettinger, 2015). Em estados patogênicos a ativação do receptor AT1 está associada à disfunção endotelial, além de ter efeitos pró-fibróticos e pró-inflamatórios, principalmente devido ao aumento do estresse oxidativo. Esse quadro resulta em lesões renais, cardíacas e vasculares, estando intimamente ligado aos danos nos órgãos-alvo na HAS (Dandona et al., 2007).

O receptor AT2 é expresso principalmente em tecidos fetais e a expressão diminui na idade adulta (Carey et al., 2000). Em adultos, é distribuído no coração, nos rins, nas glândulas adrenais e no cérebro (Tsutsumi e Saavedra et al., 1991; Ozono et al., 1997; Wang et al., 1998). O receptor AT2 medeia os efeitos opostos e protetores da angiotensina II através do receptor AT1. Essas ações inibem a inflamação, a fibrose e o fluxo simpático central e promovem a vasodilatação e a natriurese (Naito et al., 2010; Namsolleck et al., 2014).

A enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) surgiu como um modulador importante na fisiopatologia da HAS, doenças cardiovasculares e renais, devido à sua função na metabolização da angiotensina II em angiotensina-(1-7) (Gurley et al., 2003). Esta última induz vasodilatação sistêmica e regional, diurese e natriurese, e exerce efeitos antiproliferativos e anti-inflamatórios em várias células (Santos et al., 2003). Além disso, apresenta efeitos protetores para o coração e os rins, mediados pelo receptor Mas do proto-oncogene, por meio da inibição de diversas vias de sinalização, incluindo proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), fosfatidilinositol-3-quinase – proteína quinase B (PI3K - AKT), NADPH oxidase, TGF- β , o receptor do fator de crescimento epidérmico e atividade do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Varagic et al., 2003; Ferrario, 2011; Zimmerman e Burns, 2012).

A aldosterona desempenha um papel importante na hipertensão ao ligar-se ao receptor mineralocorticoide que incluem a ativação do canal de sódio sensível à amilorida, conhecido como canal de sódio epitelial e resultam na estimulação da reabsorção renal de Na^+ no ducto coletor cortical (Zhou e Bubien, 2001). Ademais, a aldosterona promove a proliferação de células musculares lisas vasculares, deposição de matriz extracelular vascular, fibrose e aumento do estresse oxidativo que contribuem para a disfunção endotelial, vasoconstrição e hipertensão arterial (McCurley e Jaffe, 2012).

1.2.4 Peptídeos natriuréticos

Os peptídeos natriuréticos, como o peptídeo natriurético atrial (ANP) e o peptídeo natriurético cerebral (BNP), atuam na regulação da sensibilidade ao sódio. Eles exibem propriedades significativas de eliminação de sódio e vasodilatação, contribuindo para a manutenção do equilíbrio de sódio e na PA durante a exposição a cargas de sódio (Kerkela et al., 2015). Após a sobrecarga de sódio, o estiramento dos átrios e ventrículos desencadeia a liberação do ANP e BNP, respectivamente, resultando em vasodilatação sistêmica e na redução do volume plasmático (transferência de fluido do compartimento intravascular para o intersticial), levando à diminuição da PA (Curry, 2005). Esses peptídeos natriuréticos aumentam a taxa de filtração glomerular, modulando o tônus arteriolar eferente em estados de volume aumentado, e inibem a reabsorção de sódio nos rins por meio de efeitos diretos e indiretos. Os efeitos diretos incluem a redução da atividade da Na^+/K^+ -ATPase e do cotransportador sódio-glicose no túbulo proximal, além da inibição do canal epitelial de sódio no néfron distal. Enquanto os efeitos indiretos compreendem a inibição da liberação de renina e aldosterona (Woodard e Rosado, 2008).

A deficiência de corin, uma serina protease presente no coração que converte os precursores inativos (pró-ANP e pró-BNP) em suas formas ativas, foi associada à sobrecarga de volume, insuficiência cardíaca e hipertensão sensível ao sódio (Armaly et al., 2013). Além disso, foi mostrado também que os níveis de pró-ANP são significativamente reduzidos em pacientes hipertensos com síndrome metabólica (Rubatto et al., 2007).

1.2.5 Endotélio

O endotélio atua na regulação do tônus vascular e na sensibilidade ao sódio, principalmente por meio da liberação de NO. As células endoteliais são responsáveis pela produção de várias substâncias vasoativas, sendo o NO o principal na regulação da PA (Sandoo et al., 2013). Ele é continuamente liberado em resposta ao estresse de cisalhamento induzido pelo fluxo sanguíneo, promovendo o relaxamento do músculo liso vascular através da ativação da guanilato ciclase e da geração de monofosfato de guanosina cíclico intracelular. Qualquer interrupção na produção de NO, geralmente mediada pela inibição da NO sintase endotelial expressa constitutivamente, resulta na elevação da PA e no desenvolvimento da HAS, fenômeno observado tanto em modelos animais quanto em seres humanos (Vapaatalo; Mervaala; Nerminin, 2000; Spieker; Flammer; Lusher, 2006). Estudos em humanos têm evidenciado a redução da produção de NO em todo o corpo em pacientes hipertensos quando comparados a indivíduos normotensos (Panza et al., 1993; Ayub et al., 2011).

Além do NO, as células endoteliais também secretam uma gama de outras substâncias que regulam o tônus vascular, incluindo vasodilatadores como a prostaciclina e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio, assim como vasoconstritores como a endotelina-1 (ET-1), angiotensina II gerada localmente, tromboxano A₂ e prostaglandina A₂. A ET-1, um potente vasoconstritor, ativa seus receptores ET-A no músculo liso vascular (Kohan et al., 2014). Outras substâncias vasodilatadoras, provenientes de diferentes tipos celulares, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, a adrenomedulina e a substância P, agem principalmente aumentando a liberação de NO pelas células endoteliais (Serrano-Ponz et al., 2016). O equilíbrio entre esses diferentes fatores, juntamente com o NO e a ET-1, determina o efeito global do endotélio no tônus vascular. Embora os níveis circulantes de ET-1 não apresentem um aumento consistente na HAS, existe uma tendência à amplificação da sensibilidade aos efeitos vasoconstritores e hipertensivos da ET-1 em indivíduos hipertensos (Lazich e Bakris, 2011). Os antagonistas dos receptores ET-A têm demonstrado reduzir ou anular a hipertensão em modelos experimentais e mostraram-se eficazes na redução da PA em seres humanos (Guo et al., 2018).

1.2.6 Inflamação e Sistema Imune

Diversos estudos recentes têm mostrado um papel importante da inflamação e do sistema imune na patogênese da HAS (Didion, 2017; Zhang et al., 2023; Xu et al., 2023). As citocinas desempenham um papel central na formação de uma camada arterial neoíntima reduzindo o diâmetro dos vasos de resistência, como as pequenas artérias e arteríolas essenciais na regulação da PA. Elas também estimulam a fibrose vascular, aumentando a resistência dos vasos e sua rigidez (De Ciuceis et al., 2005). Ademais, Xu e colaboradores mostraram uma correlação positiva entre o índice de inflamação imunológica sistêmica e a HAS (Xu et al., 2023)

As respostas imunes adaptativas através de células T também têm sido associadas à gênese da HAS e aos danos aos órgãos-alvo (Rodriguez, 2016; Harrision e Berstein, 2018). As células T expressam receptores AT1 e medeiam a HAS dependente de angiotensina II (Rodriguez, 2016). Foi demonstrado que a depleção de linfócitos maduros melhorou a hipertensão e a lesão renal resultante de uma dieta rica em sal em ratos Dahl salt-sensitive (Mattson et al., 2013). Anormalidades tanto nas células T pró-inflamatórias (TH17) quanto nas células T reguladoras estão implicadas em danos a órgãos-alvo induzidos pela HAS, pois regulam os processos inflamatórios no rim e na vasculatura que estão subjacentes à doença renal induzida pela hipertensão (Harrison e Berstein, 2018).

As células T reguladoras liberam fatores solúveis, como IL-10 e IL-35, que exibem propriedades anti-inflamatórias e estudos mostraram que essas células, tem um papel na redução da PA (Shevach, 2009, Schiffrin, 2014, Taylor et al., 2019). O aumento da PA induzido pela aldosterona em camundongos, a disfunção endotelial, o estresse oxidativo e a infiltração da aorta e do rim com células imunes foram atenuados pela transferência adotiva de células T reguladoras (Kasal, et al., 2012). Além disso, a transferência dessas células isoladas de camundongos normotensos para camundongos hipertensos reduziu significativamente a PA e melhorou o relaxamento dependente do endotélio nas arteríolas coronárias (Kassan et al., 2011). Um estudo identificou que monócitos de pacientes com HAS essencial são pré-ativados, produzindo maiores quantidades de interleucinas-1 β (IL-1 β), TNF- α e interleucinas-6 (IL-6) após estimulação *ex vivo* com angiotensina II ou lipopolissacarídeo do que monócitos de controles saudáveis (Dörffel et al., 1999).

1.3 Lesões de Órgão Alvo na HAS

A elevação da PA pode afetar um grupo específico de órgãos, denominado “lesões de órgão-alvo” que inclui lesões em vasos, vasculopatia; cérebro; lesões cerebrovasculares e demência; olho, retinopatia; rim, insuficiência renal; e coração, insuficiência cardíaca (Nadar et al., 2006). Lesão em órgão-alvo caracteriza-se pela presença de alterações estruturais e/ou funcionais em artérias ou órgãos, causadas pela elevação da PA.

A vasculopatia hipertensiva é caracterizada por disfunção do endotélio e o espessamento das camadas musculares e proliferação da camada íntima de grandes e pequenas artérias (Mancia et al., 2009). Além disso, há aumento da produção de agentes pró-coagulantes e inflamatórios, o que conduz à uma reduzida capacidade de vasodilatação (Carvalho et al., 2001). Essas alterações se manifestam clinicamente como entre outras coisas, angina resultante da reserva coronariana reduzida, formação de placas de aterosclerose, estenoses e aneurismas, especialmente na aorta (Schmieder et al., 2010).

A HAS representa o fator de risco mais significativo para o acidente vascular cerebral, sendo responsável por 80% dos casos (Queresh et al., 2007). Além disso, a HAS não tratada ou tratada de forma inadequada muitas vezes está associada ao desenvolvimento de demência. Uma correlação inversa entre pressão arterial e deficiência cognitiva tem sido evidenciada em diversos estudos epidemiológicos e de intervenção. O Framingham Heart Study foi pioneiro ao revelar que os níveis de PA e a duração da HAS apresentam uma relação inversamente proporcional com as medidas de atenção e memória (Elias et al., 1998). Em um extenso estudo conduzido em Uppsala, Suécia, envolvendo 999 homens com idades entre 50 e 70 anos, mostrou que a HAS e as alterações metabólicas associadas podem aumentar o risco de comprometimento cognitivo, destacando a importância de intervenções precoces antes do desenvolvimento da demência (Kilander et al., 1998). A HAS surge como um fator de risco para condições como aterosclerose, acidente vascular cerebral e infarto cerebral, os quais, por sua vez, podem desencadear um declínio cognitivo. Mesmo na ausência de eventos vasculares cerebrais óbvios, o comprometimento cognitivo pode ser atribuído à obstrução da microvasculatura (Stranburger et al., 1997).

A retinopatia hipertensiva é geralmente observada em olhos de pacientes com HAS não controlada de longa data (Chatterjee et al., 2002). Em situações normais, a vasculatura da retina é protegida dos aumentos da PA por fatores metabólicos e mecanismos miogênicos. Alteração na função endotelial na HAS contribui para o fracasso da autorregulação. Sinais de retinopatia hipertensiva podem ser amplamente agrupados em alterações da parede arteriolar da retina, tais como áreas generalizadas e focais de estreitamento arteriolar, alterações de cruzamento arteriovenoso ou corte, esclerose e opacificação da parede arteriolar, e lesões microvasculares da retina que refletem danos teciduais mais avançados com a ruptura da barreira hematorretiniana, como hemorragias, microaneurismas, exsudados duros e manchas algodonsas (Cheung et al., 2022).

Pressões de perfusão elevadas no rim por um tempo prolongado podem levar a vasoconstrição significativa, que pode então provocar danos ao glomérulo (Bianchi; Bigazzi; Campese, 1999). A microalbuminúria é resultante de alterações estruturais e funcionais nos glomérulos, envolvendo o endotélio, a membrana basal glomerular e os podócitos, o que está correlacionado ao aumento da permeabilidade. É notável que esse distúrbio na permeabilidade não se restrinja aos vasos renais, estendendo-se por todo o sistema vascular. Essa observação justifica por que a albuminúria não apenas prediz o desenvolvimento de insuficiência renal crônica, mas também se mostra como um indicador de complicações cardiovasculares (Schmieder et al., 2006).

1.3.1 HAS e as alterações cardíacas

A HAS é reconhecida como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Evidências provenientes do Framingham Heart Study, que acompanhou 5.143 indivíduos por até 20 anos (média de 14,1 anos), mostraram que a HAS precedeu o surgimento da insuficiência cardíaca em 91% dos casos recém-diagnosticados (Levy et al., 1996). Após ajuste para idade e outros fatores de risco cardiovasculares, indivíduos hipertensos apresentaram risco aproximadamente duas vezes maior de desenvolver insuficiência cardíaca quando comparados aos normotensos, sendo esse aumento de risco ainda mais expressivo em mulheres, nas quais foi cerca de três vezes superior. Além disso, a HAS apresentou elevada fração atribuível populacional para insuficiência cardíaca, sendo responsável por aproximadamente 39% dos casos em homens e 59% em mulheres. Entre os

indivíduos hipertensos, a ocorrência de infarto do miocárdio, diabetes mellitus, hipertrofia ventricular esquerda e valvopatias foi associada a um risco adicional para o desenvolvimento para a doença. Dados da mesma coorte também evidenciaram que, aos 80 anos de idade, o risco vitalício de insuficiência cardíaca era de aproximadamente 20%, dobrando em indivíduos com níveis pressóricos de 160/100 mmHg quando comparados àqueles com PA de 140/90 mmHg. Esses achados reforçam a relevância da HAS como um dos principais determinantes da incidência e progressão da insuficiência cardíaca (Lloyd-Jones et al., 2002)

A principal função do coração é manter a perfusão dos órgãos periféricos atendendo sua demanda durante condições normais e de estresse. Para realizar essa tarefa na presença de aumento da PA os cardiomiócitos respondem a essas alterações, modificando suas estruturas moleculares e celulares. Esse fenômeno é conhecido como remodelamento cardíaco (Nakamura e Sadoshima, 2018). O remodelamento cardíaco abrange um conjunto de alterações genéticas, moleculares, neuro-humorais, celulares e intersticiais cardíacas, manifestadas clinicamente como modificações de tamanho, massa, geometria e função do coração, em resposta a injúria ou sobrecarga crônica de pressão ou de volume (Pontes e Leães, 2004).

A princípio o remodelamento cardíaco na HAS permite que o miocárdio se adapte às novas condições de funcionamento, envolvendo diversos mediadores, que incluem estresse parietal, neuro-hormônios (SNS, SRAA, ET-1), citocinas, estresse oxidativo e isquemia. Esses mediadores se potencializam mutuamente, agindo de forma inter-relacionada. A longo prazo, isso leva a um ciclo vicioso que leva a hipertrofia e hiperplasia dos cardiomiócitos, dilatação do ventrículo esquerdo, alterações de contratilidade e relaxamento e aumento do volume sistólico e diastólico final. Essas alterações são progressivas, sempre deletérias e associadas ao mau prognóstico, e fornecem a base para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Schmidt, 2001).

Um dos principais processos do remodelamento ventricular na HAS é a hipertrofia ventricular esquerda. Como resposta ao aumento do estresse na parede do ventrículo esquerdo, ocorre um processo de espessamento dessa parede, impulsionado pelo crescimento dos cardiomiócitos através da adição de sarcômeros. Esse fenômeno resulta em um acréscimo na massa do ventrículo esquerdo. O desdobramento desse processo culmina na normalização do estresse na parede e na manifestação de um padrão estrutural denominado hipertrofia concêntrica (Nadruz, 2015). Os dados do Estudo de Framingham foram pioneiros ao demonstrar

claramente a relação entre a hipertrofia ventricular esquerda e prognósticos futuros (Kannel e Cobb, 1992). Desde então, diversos estudos confirmaram essa ligação direta entre a hipertrofia ventricular esquerda identificada no exame inicial e o aumento do risco de eventos adversos graves ou morte em populações clínicas e epidemiológicas (Bikkina et al., 1994; Okin et al., 2004). Além disso, a hipertrofia ventricular esquerda leva a um risco elevado de arritmias, disfunção diastólica, redução da contratilidade e comprometimento da reserva coronariana, contribuindo para um aumento da mortalidade e morbidade (Frohlich, 2001). A regressão da hipertrofia com tratamento parece reduzir as chances de morbidade e mortalidade cardiovascular, além de melhorar a função diastólica do ventrículo esquerdo (Devereux e Roman, 1999).

Outra característica importante observada quanto ao remodelamento estrutural do ventrículo esquerdo na cardiopatia hipertensiva é a presença da fibrose, caracterizada por um acúmulo intensificado de tecido fibroso visto como um aumento difuso nas fibras (fibrose intersticial) e como uma deposição localizada (fibrose perivascular e cicatrizes microscópicas). Diversos estudos feitos em espécimes pós-morte de coração humano e endomiocárdio em amostras de biópsia humana mostraram que a fração de volume de colágeno (FVC) é significativamente aumentada nos corações de pacientes com HAS em comparação com os participantes normotensos (Tanaka et al., 1986).

O aumento de fibrose ventricular pode ser provocado tanto por fatores hemodinâmicos como não-hemodinâmicos (Díez, 2007). Conforme evidenciado por experimentos *in vivo*, a sobrecarga de pressão no ventrículo esquerdo está correlacionada com um aumento da síntese de colágeno e uma diminuição de collagenases (Bishop et al., 1999; López et al., 2004). Estudos *in vitro* mostraram que fibroblastos cardíacos submetidos à carga mecânica aumentaram a síntese de colágeno tipo I e houve também a inibição da expressão de collagenases (López et al., 2004). Esse estudo mostrou que o estiramento dos fibroblastos *in vitro* ativa diversas vias de sinalização, incluindo aquelas mediadas por proteína quinase B e quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2) que promovem a ativação e proliferação de fibroblastos. Desta forma, a sobrecarga hemodinâmica do ventrículo esquerdo pode contribuir com a fibrose ventricular.

Além dos fatores hemodinâmicos, estudos sugerem que outros fatores podem contribuir para a fibrose ventricular na HAS. Brilla e colaboradores mostraram que a capacidade do

tratamento anti-hipertensivo de regredir a fibrose em pacientes hipertensos independe de sua eficácia anti-hipertensiva (Brilla et al., 2000). Além disso, hormônios do SRAA são relevantes para o processo de fibrose. Descobertas experimentais indicam que a interação da angiotensina com o receptor AT1 exerce vários efeitos pró-fibróticos no coração, estes efeitos incluem indução de hiperplasia dos fibroblastos, ativação das vias de biossíntese de colágeno e inibição das vias degradativas de colágeno (Ehanire et al., 2015). Adicionalmente, a fibrose pode representar uma resposta reparadora à inflamação e ao estresse oxidativo induzidos pela interação da angiotensina II com receptor AT1 (Gurantz et al., 2005).

Extensas evidências sugerem que a aldosterona pode também desempenhar um papel importante na ativação dos fibroblastos. Estudos mostraram que em fibroblastos a aldosterona desencadeia uma resposta proliferativa, estimula a migração e promove a síntese de matriz extracelular pelo menos em parte por meio da ativação de cascatas de MAPK (Neumann et al., 2002). Além disso, a estimulação adrenérgica pode também ativar fibroblastos e induzir a fibrose cardíaca. Benjamim e colaboradores mostraram *in vivo* que a infusão de agonista não seletivo do receptor β adrenérgico promove fibrose miocárdica (Benjamim et al., 1989). A ativação *in vitro* dos receptores β adrenérgicos mostrou estimular a proliferação de fibroblastos cardíacos ativando a via de sinalização MAPK1 (Molkentin et al., 2017).

Além disso, na HAS ocorrem alterações estruturais na microcirculação coronariana, incluindo rarefação capilar, remodelamento vascular, desequilíbrio entre os fatores pró e anti angiogenico e disfunção endotelial, que reduzem a oferta de oxigênio ao miocárdio e leva à instalação de hipóxia tecidual crônica (Durante et al., 2024). Esse ambiente hipóxico ativam fatores de transcrição como o HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α que induz a expressão de diversos mediadores pró-fibróticos, como TGF- β (Sabbah et al., 1995). Esses mediadores atuam diretamente sobre os fibroblastos cardíacos, promovendo a sua ativação e a diferenciação em miofibroblastos, ademais, estimulando o recrutamento e a ativação de macrófagos fibrogênicos e linfócitos, esses processos desencadeiam um programa fibrogênico nos cardiomiócitos e nas células vasculares desempenhando um papel significativo na patogênese da fibrose cardíaca (Koyanagi et al., 2000). Além disso, a hipóxia potencializa o estresse oxidativo e a inflamação, amplificando vias de sinalização associadas ao remodelamento cardíaco e à rigidez miocárdica. Dessa forma, a hipóxia atua como um importante elo entre a HAS e a progressão da fibrose ventricular, contribuindo para disfunção diastólica e pior prognóstico cardiovascular (Sugihara et al., 1988; McLenaehan e Dargie, 1990; Querejeta et al., 2004)

1.4 Tratamento da HAS

O manejo de pacientes com HAS inclui tratamento não medicamentoso e medicamentoso. A terapia não medicamentosa abrange a promoção de atividades físicas, perda de peso, reeducação alimentar com ênfase na redução da ingestão de sódio, eliminação do consumo de álcool e tabaco, além de outras modificações no estilo de vida. Já a terapia medicamentosa inclui fármacos anti-hipertensivos, sendo as cinco principais classes: os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), os bloqueadores dos receptores da angiotensina II (BRAs), os bloqueadores dos canais de cálcio, os diuréticos tiazídicos e os betabloqueadores. IECAs, BRAs, bloqueadores dos canais de cálcio e diuréticos são recomendados como tratamento de primeira linha para a maioria dos pacientes hipertensos, enquanto os betabloqueadores podem ser adicionados preferencialmente em condições específicas, como angina, insuficiência cardíaca, pós-infarto do miocárdio e controle da frequência cardíaca. Entretanto, os betabloqueadores apresentam menor eficácia na prevenção do acidente vascular cerebral e maior incidência de efeitos adversos quando comparados às demais classes. (Mancia et al., 2023; McEvoy JW et al., 2024). A escolha do tratamento medicamentoso deve ser individualizada, levando em consideração as características clínicas do paciente e sua resposta ao tratamento.

O uso de IECAs, BRAs e de diuréticos têm mostrado efeitos benéficos na regressão da hipertrofia e fibrose podendo reverter o processo de insuficiência cardíaca causada pela HAS. Brilla e colaboradores mostraram que o tratamento com IECA, lisinopril, por 12 semanas em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com 14 semanas de idade normalizou a hipertrofia e a FVC do ventrículo esquerdo (Brilla et al., 1991). Resultados similares foram obtidos em um estudo em que o tratamento de animais SHR de 78 semanas de idade com lisinopril por 32 semanas e obtiveram aumento da atividade da MMP-1, com redução fibrose ventricular (Brilla et al., 1992). Outro estudo mostrou que o tratamento com losartana, medicamento que pertence à classe dos BRAs, foi associado à inibição da síntese de colágeno tipo I e regressão da fibrose miocárdica em pacientes com hipertensão primária (López et al., 2001). Entretanto, em SHR o tratamento com verapamil, um bloqueador de cálcio, por 45 semanas, nem a concentração, nem a síntese de colágeno foram reduzidas, apesar da redução na hipertrofia ventricular associadas à normalização da PA (Ruskoaho e Savolainen, 1985). Em uma extensa metanálise, os bloqueadores dos canais de cálcio demonstraram uma eficácia aparentemente

inferior em comparação com outros regimes para a prevenção da insuficiência cardíaca em pacientes com HAS, ao passo que os diuréticos se destacaram na prevenção de insuficiência cardíaca (Sciarretta et al., 2011). Novas terapias têm sido estudadas para reverter a hipertrofia e fibrose provocada pela HAS.

Estudos com intervenções imunomoduladoras na HAS objetivando reduzir danos ao coração e risco cardiovascular têm sido proeminentes (Murray et al., 2021). Gazzoto Filho e colaboradores mostraram que a neutralização do TNF- α com infliximab reduziu a PAS e a hipertrofia do ventrículo esquerdo em SHR (Gazzoto Filho et al., 2012). A inibição do NF- κ B com ditiocarbamato de pirrolidina reduziu a hipertrofia e a fibrose do ventrículo esquerdo em SHR. O tratamento com platycodin D, uma saponina que possui relatos de efeitos biológicos anticancerígenos, anti-inflamatórios e antiobesidade, reduziu a hipertrofia e fibrose cardíaca em SHR (Lin et al., 2018).

1.5 Nanopartícula lipídica, a LDE

A partir de 1992, Maranhão e colaboradores apresentaram um projeto pioneiro que introduziu nanopartículas lipídicas artificiais, denominadas LDE, as quais reproduzem a estrutura e composição química das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) com exceção da porção proteica da lipoproteína, a apolipoproteína (apo) B-100. A LDE apesar de não ser produzida com a apo B-100, ao ser injetada na circulação sanguínea, entra em contato com as lipoproteínas plasmáticas e adquire a apo E. Essas nanopartículas têm a capacidade de se concentrar em células em proliferação, permitindo o transporte direcionado de quimioterápicos específicos para essas células, marcando assim a primeira demonstração de direcionamento de partículas sólidas artificiais para sítios específicos de ação (Maranhão et al., 1992; Maranhão et al., 1993; Maranhão et al., 1994)

A apo E, reconhecida pelos receptores da LDL, permite que a LDE seja captada pelas células por meio do mesmo processo de captação da LDL, ou seja, a endocitose mediada pelo receptor da LDL (Maranhão et al., 1993; Maranhão et al., 1997). Essa captação é particularmente pronunciada em células com caráter altamente proliferativo, como as neoplásicas e sob ação inflamatória (Ho et al., 1978; Maranhão et al., 1994). Este fenômeno é resultado da aceleração da mitose dessas células, que demanda lipídios para atender à síntese

de novas membranas necessárias para a duplicação celular, resultando em uma captação aumentada da LDL nativa e da LDE por essas células.

Ao associar quimioterápicos à LDE, os mesmos são captados junto com as nanopartículas após a injeção na corrente circulatória, concentrando-se assim em células dos tecidos-alvo (Maranhão et al., 1994). A alta captação dessas nanopartículas foi documentada em pacientes com carcinoma de mama e ovário, sendo cinco vezes maiores do que nos tecidos normais correspondentes, respectivamente (Ades et al., 2001; Graziani et al., 2002). Dados baseados em cinética plasmática estimam que a concentração da LDE em células de leucemia mielocítica aguda é cerca de 50 vezes maior (Maranhão et al., 1994).

No tocante a estabilidade da partícula, ensaios *in vitro* com linhagens celulares (Rodrigues et al., 2002; Valduga et al., 2003), estudos de farmacocinética em animais (Rodrigues et al., 2005) e em pacientes (Maranhão et al., 2002) mostraram que o fármaco transportado pelas nanopartículas não se dissociou delas na circulação, permanecendo na LDE até a entrada nas células. Isso é um fator indispensável para a obtenção do efeito "drug-targeting", garantindo assim a estabilidade das preparações LDE-quimioterápicos. Estudos experimentais revelaram que esse processo de veiculação reduziu drasticamente a toxicidade dos quimioterápicos, de cinco a dez vezes em ensaios de determinação de doses letais (Rodrigues et al., 2002; Valduga et al., 2003). Em modelos experimentais, a associação dos quimioterápicos com a LDE intensificou a ação terapêutica tumoral dos fármacos (Rodrigues et al., 2005; Lo Prete et al., 2006). Nos ensaios clínicos realizados em pacientes oncológicos, a segurança do uso desses fármacos em preparações com a LDE foi confirmada, mesmo em altas doses, confirmando a redução ou até a neutralização de seus efeitos tóxicos (Maranhão et al., 2002).

1.6 Metotrexato

Nosso grupo do Laboratório de Metabolismo e Lípidos do InCor - HCFMUSP tem acumulado experiência no uso do metotrexato (MTX) veiculado à LDE com objetivo de aumentar a captação celular do MTX e diminuir a toxicidade da droga (Figura 2). A associação do MTX a LDE foi utilizada no tratamento de animais com aterosclerose (Bulgarelli et al., 2012), artrite reumatoide (Mello et al., 2016), infarto agudo de miocárdio (Maranhão et al.,

2017), transplante cardíaco (Fiorelli et al., 2017) e síndrome de Marfan (Guido et al., 2022). O MTX é um quimioterápico com ação anti-inflamatória e antiproliferativa utilizado no tratamento da artrite reumatoide, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças inflamatórias crônicas (Kempen et al., 2009; Khan et al., 2011; Machado et al., 2014). O MTX atua como antagonista ao ácido fólico, que desempenha a função de potente inibidor da dihidrofolato redutase que catalisa a redução da dihidrofolato à sua forma ativa tetrahidrofolato. Este é precursor da forma ativa do ácido fólico, que atua como cofator na síntese de purinas e pirimidinas. A diminuição do ácido fólico, consequentemente diminui a síntese e replicação do DNA durante a proliferação celular (Cronstein, 2010).

Ainda há um segundo mecanismo de ação atribuído ao uso do MTX. Como consequência da quebra do ciclo de duplicação do DNA, ocorre o acúmulo da enzima 5-aminoimidazol-4-carboxamidaribonucleotídeo (AICAR), que via ativação MAPK resulta na liberação de adenosina para o meio extracelular via seus receptores e enzimas catabólicas. A adenosina é um anti-inflamatório endógeno que é liberado em importantes sítios inflamatórios e é produzida pela degradação dos nucleotídeos purinérgicos liberados pela ação da enzima 5-nucleotidase ou pelo catabolismo extracelular da adenosina pelas enzimas adenosina deaminase e adenosina quinase (Haskó et al., 1996; Belviranli et al., 2015). Após sua liberação a adenosina se liga a receptores específicos de adenosina (A1, A2a, A2b e A3) que entre outros efeitos, age como potente vasodilatador (Fredholm et al., 2001). A adenosina tem sido associada a efeitos cardioprotetores como redução de hipertrofia e fibrose na HAS, na fase aguda e crônica do infarto do miocárdio e durante a progressão da insuficiência cardíaca (Puhl et al., 2015).

Estudos desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que a incorporação do MTX à LDE aumentou em mais de 90 vezes a captação da droga em linhagens celulares leucêmicas (Moura et al., 2011). Em estudo realizado em coelhos com aterosclerose mostrou-se que o tratamento com LDEMTX reduz de maneira marcante a área de lesões ateroscleróticas, diminui a espessura de parede da aorta, reduz a expressão gênica de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ e aumenta a expressão da IL-10 (Bulgarelli et al., 2013). O tratamento com LDEMTX em um modelo de transplante cardíaco foi observado menor expressão gênica de fatores pró-inflamatórios enquanto a expressão de anti-inflamatórios foi maior, promovendo a melhora da vasculopatia e a inflamação no transplante cardíaco (Fiorelli et al., 2017). Em ratos submetidos ao infarto agudo do miocárdio o tratamento com LDEMTX resultou em diminuição do processo inflamatório e aumento da angiogênese que contribuiu para a redução do tamanho do infarto e

em melhora da função cardíaca. Isto se deu, provavelmente pelo aumento da biodisponibilidade da adenosina intracelular induzida pelo tratamento com LDEMTX (Maranhão et al., 2017). Em camundongos com síndrome de Marfan, a LDEMTX preveniu a dilatação e dissecção da aorta. Essa ação terapêutica foi resultado da redução da inflamação, apoptose e fibrose na aorta através do aumento da biodisponibilidade de adenosina intracelular (Guido et al., 2022). Já em um modelo experimental de sepse induzida por LPS o tratamento com LDEMTX foi efetivo na prevenção do desenvolvimento da disfunção diastólica e promoveu o desenvolvimento de hipertrofia compensatória, bem como estimulou angiogênese e diminuiu hipóxia celular, respostas que não foram observadas no tratamento com MTX comercial (Lopes et al., 2026).

Em um estudo clínico recente mostramos que o tratamento com LDEMTX reduziu o tamanho de infarto e não mostrou toxicidade em pacientes com infarto agudo do miocárdio com supradesnívelamento do segmento ST (Ferrari et al., 2025).

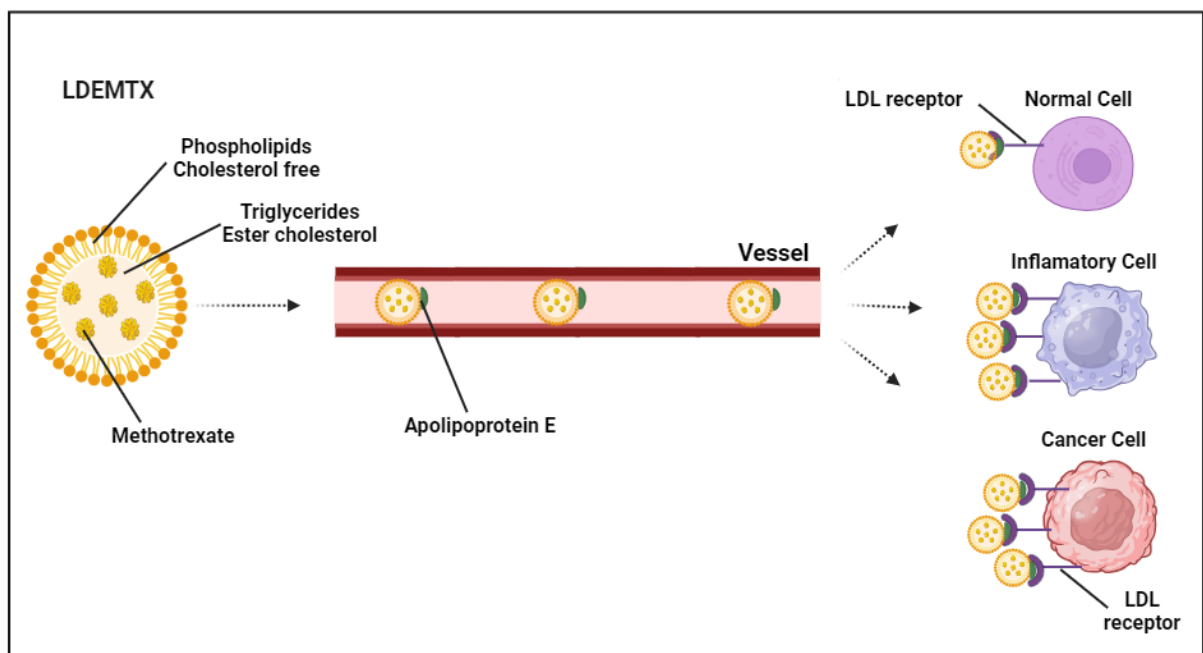


Figura 2: Mecanismo de ação da LDEMTX. A LDE é uma nanopartícula lipídica semelhante à LDL, porém sem sua porção proteica (ApoB-100). Após entrar na circulação, adquire apolipoproteínas, dentre elas, a apoE, tornando-se reconhecida pelos receptores de LDL (LDLR). Em tecidos com alta atividade proliferativa, como nos processos inflamatórios e neoplásicos, há maior expressão de LDLR. Dessa forma, a LDE atua como veículo para direcionar o fármaco para esses tecidos, aumentando sua captação celular, a eficácia terapêutica e reduzindo a toxicidade do fármaco.

Há poucos estudos na literatura que descrevem potenciais benefícios do tratamento com MTX na HAS. Estudos observacionais mostraram que o tratamento com MTX está associado a uma PA clínica mais baixa, um menor risco de DCVs e uma menor mortalidade cardiovascular em pacientes com artrite reumatoide, o que foi atribuído à qualidade anti-inflamatória do MTX (Choi et al., 2002; Van Halm et al., 2006; Mangoni et al., 2017). Contudo, é importante ressaltar que o uso crônico do MTX é limitado devido aos potenciais eventos adversos e ao risco cumulativo de toxicidade. Para aumentar a concentração intracelular do MTX e potencializar seu efeito anti-inflamatório e reduzir a toxicidade, alguns pesquisadores tem associado esse medicamento com lipossomas ou nanopartículas para que esta associação seja mais captada pelas células-alvo e tenha efeito inibitório maior que sua formulação comercial (Maranhão et al., 1993; Williams et al., 1995; Pignatello et al., 2000).

2. JUSTIFICATIVA

Como vimos a HAS é acompanhada por alterações estruturais como aumento de fibrose e hipertrofia cardíaca que contribuem à disfunção ventricular. O uso do MTX associado à nanopartícula LDE, que tem a capacidade de aumentar a eficácia terapêutica e neutralizar a toxicidade do MTX pode constituir-se em abordagem promissora para diminuir as complicações cardiovasculares da HAS.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar se a LDEMTX pode prevenir o surgimento de alterações cardíacas da HAS em SHR.

3.2 Objetivos específicos

Investigar em SHR o efeito do tratamento com LDEMTX sobre alterações cardiovasculares na disfunção ventricular cardíaca, com ênfase no desenvolvimento da hipertrofia e fibrose cardíaca, no processo inflamatório e na ativação do sistema humoral.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo animal

Para a realização deste projeto foram utilizados 17 ratos machos das linhagens Wistar Kyoto e 50 ratos machos SHR provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério da Divisão Experimental do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e receberam ração balanceada e água *ad libitum*.

O protocolo do projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP nº 1350/2019. Este estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e pelo The Universities Federation for Animal Welfare.

O protocolo experimental foi conduzido em dois momentos distintos, com a segunda etapa realizada para complementar a coleta de variáveis não avaliadas inicialmente, garantindo maior abrangência da análise.

4.2 Descrição do modelo experimental

O modelo SHR foi desenvolvido por Okamoto e Aoki no ano de 1963 e consiste no cruzamento entre ratos Wistar com hipertensão espontânea detectada e pelo cruzamento entre suas proles (irmãos x irmãs) durante várias gerações, resultando em 100% dos descendentes manifestando a doença hipertensiva (Okamoto e Aoki, 1963). Desde então, o SHR é reconhecido como um excelente modelo de hipertensão experimental e como modelo de estudos clínicos da hipertensão primária humana. Esse modelo apresenta vantagens com relação a outros modelos de HAS pela similaridade com as fases de progressão da hipertensão humana e igual resposta a tratamentos (Doggrell e Brown, 1998).

Foi estabelecido que o principal critério determinante para diagnóstico da HAS no SHR é a PAS igual ou superior a 150 mmHg por um período superior a um mês sem intervenção externa (Doggrell e Brown, 1998; Pinto et al., 1998). Em estágios iniciais (fase de pré-hipertensão entre a 6ª e a 8ª semana de vida) o SHR apresenta um aumento na frequência cardíaca (FC), aumento do débito cardíaco com resistência vascular periférica normal o que corrobora no desenvolvimento da hipertensão (Dickhout et al., 1998).

Com a progressão da hipertensão para estágios mais estáveis (entre 12ª semana e 15ª semana) o débito cardíaco retorna ao normal, há presença de hipertrofia dos vasos sanguíneos aumentando a resistência vascular periférica, no entanto, sem alteração marcante na função e na morfologia dos cardiomiócitos (Doggrell e Brown, 1998; LeGrice et al., 2012). Porém, entre a 24ª e a 28ª semanas de idade os animais SHR apresentam hipertrofia dos cardiomiócitos, nesta idade estabelece-se a hipertrofia compensada com aumento de deposição de colágenos do tipo

I, que se estabiliza entre 48^a e 72^a semanas, quando ocorre a transição para insuficiência cardíaca entre 72^a e 96^a semana de idade (Teles et al., 2023). Com base nesses dados, o estudo terá como objetivo verificar o efeito do tratamento da LDEMTX sobre as alterações ventriculares em SHR entre a 6^a semana de vida até a 26^a semana dos animais.

4.3 Protocolo experimental

Com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento da LDEMTX nas manifestações cardiovasculares dos ratos, foram estudados 4 grupos experimentais.

- Grupo Controle (CT, n=17): Ratos normotensos, Wistar Kyoto, que receberam injeções com solução fisiológica, intraperitoneal (IP.);
- Grupo SHR-LDE (n=16): Ratos hipertensos, SHR, que foram tratados somente com a nanopartícula LDE (IP.);
- Grupo SHR-MTX (n=17): Ratos hipertensos, SHR, que receberam somente o metrotexato na sua formulação comercial na dose de 0,63 mg/Kg (IP);
- Grupo SHR-LDEMTX (n=17): Ratos hipertensos, SHR, que foram tratados com a associação LDEMTX na dose de 1 mg/Kg (IP).

O tratamento foi iniciado na 6^o semana de vida dos animais, com duração de 20 doses semanais. No início e ao final do tratamento, foi realizada a pletismografia de cauda. Ao final do tratamento, após uma semana da última dose, foram realizadas as medidas do ecocardiograma, da hemodinâmica e da avaliação da modulação autonômica cardiovascular. Posteriormente, os animais foram eutanasiados, foi coletado uma amostra de sangue, para análise de toxicidade e realizada a retirada do coração para análise da morfometria e análise da expressão proteica e gênicas de marcadores relacionados a HAS, no ventrículo esquerdo, como descrito adiante.

4.4 Preparação da LDEMTX

O MTX em sua formulação comercial (Fagron, Rotterdam, Holanda) foi submetido à reação de derivatização de modo a aumentar seu potencial lipofílico e melhorar sua associação com a LDE (Moura et al., 2011). Para isso, o MTX foi diluído em dimetilsulfoxido e foram adicionados carbonato de cézio e brometo de dodecila. Após 24 horas de agitação em temperatura ambiente, a reação foi monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência (UHPLC) (Nexera X2 Shimadzu, Nexera X2, Shimadzu, Tóquio, Japão) para a determinação da taxa de conversão do MTX. Em seguida, adicionou-se água à reação e o produto foi extraído por clorofórmio. A fase orgânica foi submetida a sucessivas lavagens com solução saturada de cloreto de sódio e foi seca com sulfato de magnésio. O produto foi filtrado e concentrado por rota evaporador (Rotavapor R-300, Buchi, Suíça). Finalmente, o derivado do MTX foi precipitado em metanol, filtrado e seco em dessecador à vácuo (Moura et al, 2011).

A LDE foi preparada a partir de uma mistura de lípides constituída por fosfatidilcolina (Lipoid, Ludwigshafen, Alemanha), colesterol esterificado (Aesar, MA, EUA), colesterol não esterificado (Fabrichem, Connecticut, EUA) e triglicérides (Sasol Germany GmbH, Hamburg, Alemanha) (Maranhão et al, 1993). A emulsificação dos lípides, com ou sem o derivado do MTX, foi realizada adicionando-se Tris-HCl em um homogeneizador de alta pressão Emulsiflex C5 (Avestin Inc., Ottawa, Canada). O tamanho da partícula (50-70nm) foi analisado por espalhamento de luz dinâmico a 90° usando o equipamento ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern, Malvern, Reino Unido). A porcentagem de associação do derivado do MTX com a LDE foi analisada novamente por UHPLC (Nexera X2, Shimadzu, Tóquio, Japão) utilizando o método isocrático de coluna de sílica C18 e acetonitrila (90:10 v/v), a 254nm. As nanopartículas (apenas LDE e LDEMTX) foram esterilizadas em filtro de polycarbonato 0,22 µm (Merck Millipore, MA, EUA) em fluxo laminar e armazenada a 4°C em frascos de vidro estéreis.

4.5 Pletismografia de cauda

Antes do início do tratamento, quando os animais apresentavam 6 semanas de idade, e após as 20 semanas de tratamento, a PAS e a FC foram registradas em todos os grupos por meio de pletismografia de cauda, utilizando o sistema BP-2000 (BP-2000 Blood Pressure Analysis

System, Visitech Systems, Apex, NC, EUA). Este é um sistema de registro indireto da PA em que os ratos são acondicionados em um contensor, no qual são aquecidos e ventilados de maneira adequada para a realização da medição da PAS e da FC.

Os ratos tiveram acoplados na região proximal da cauda um manguito de borracha que possuía a função de insuflar e desinflar automaticamente em intervalos fixos de 15 segundos. Próximo ao manguito foi acoplado um transdutor de pulso (sensor) que captava os sinais que eram enviados e registrados em sistema de computador. Todos os animais passaram por um período de adaptação ao experimento através de 5 medidas que não foram consideradas na análise. Em seguida 15 novas medidas foram realizadas, e assim, PA foi considerada como a média de no mínimo de dez medidas.

4.6 Ecocardiografia

Ao final do protocolo, após as 20 semanas de tratamento, para a avaliação ecocardiográfica todos os animais foram submetidos à anestesia por isoflurano (1mL/mL, Cristália, Itapira, Brasil) e à tricotomia de tórax. Para obtenção das imagens ecocardiográficas, os animais foram posicionados em decúbito dorsal. O aparelho utilizado foi o Sequóia 512 (Mountain View, CA), com transdutor linear de 14MHz.

Foram adquiridas imagens bidimensionais, Doppler colorido e pulsátil. Os registros dos traçados do modo - M e do Doppler tiveram velocidade de 100 mm/s. As imagens foram gravadas para análise posterior, sendo o resultado final oriundo da média obtida de três ciclos cardíacos diferentes. Em todos os exames foram seguidas as normas preconizadas pela American Society of Echocardiography (Salemi, et al., 2005; Sirvente et al., 2014).

Foram avaliados fração de ejeção (FE) e de encurtamento (FEnc), o diâmetro diastólico (DD) e sistólico (DS) do ventrículo esquerdo, espessura do septo interventricular (SIV) e da parede posterior (PP), ondas E e A da valva mitral, tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e tempo de desaceleração do ventrículo esquerdo (DT).

4.7 Medições hemodinâmicas e avaliação da modulação autonômica cardiovascular

Em 35 animais (CT n=9, LDE n=8, MTX n=9 e LDEMTX n=9), após o tratamento, os animais foram anestesiados com uma mistura de 0,5% a 2% de isoflurano em 98% de O₂, administrada a um fluxo de 1,5 L/min. Em seguida, foram implantadas cânulas de Tygon com extremidade de polietileno, previamente preenchidas com solução salina heparinizada, na artéria femoral para a mensuração direta da PA. Após 24 horas da cirurgia, as avaliações hemodinâmicas foram realizadas com os animais conscientes e livres para se movimentar em suas gaiolas.

A cânula foi conectada a um transdutor de pressão (Blood Pressure XDCR, Kent Scientific, Litchfield, CT, EUA) para o registro contínuo dos sinais de pressão arterial por 30 minutos. Os dados foram adquiridos por meio de um conversor digital (Windaq DI720, Dataq Instruments), com frequência de amostragem de 4 kHz. Posteriormente, os registros foram analisados batimento a batimento, permitindo a quantificação das variações na pressão arterial média (PAM).

A variabilidade da frequência cardíaca foi determinada a partir do sinal pulsátil da PA, sendo o intervalo de pulso (IP) definido pelo intervalo entre picos sistólicos consecutivos (Moraes, 2018). A análise espectral do IP no domínio da frequência foi realizada pela Transformada Rápida de Fourier, permitindo a decomposição do sinal em suas diferentes bandas espectrais. Foram obtidas as potências de baixa frequência (BF-IP: 0,40–1,50 Hz) e alta frequência (AF-IP: 1,50–5,0 Hz) (Thireau e Zhang, 2008; Pelat et al., 2003). Também foi calculada a potência total, correspondente à soma das potências absolutas de todas as bandas espectrais (MBF-IP + BF-IP + AF-IP), considerada um índice global da modulação autonômica cardíaca. As bandas de baixa e alta frequência do intervalo de pulso foram expressas em unidades normalizadas (u.n.), sendo os valores da banda de MBF excluídos do cálculo. As fórmulas utilizadas foram: BF-IP u.n. = $\text{BF-IP abs} / (\text{Potência Total} - \text{MBF-IP abs}) \times 100$ e AF-IP u.n. = $\text{AF-IP abs} / (\text{Potência Total} - \text{MBF-IP abs}) \times 100$.

A variabilidade da PAS foi determinada a partir dos valores médios da PAS, sendo calculados a variância da PAS (VAR-PAS), utilizando a fórmula $\text{VAR-PAS} = \text{Desvio Padrão-PAS}^2$. Já a análise espectral da PAS no domínio da frequência foi realizada pela Transformada

Rápida de Fourier, sendo obtida a banda de baixa frequência da PAS (BF-PAS: 0,40–1,50 Hz), parâmetro considerado marcador indireto da modulação simpática vascular (Thireau e Zhang, 2008; Pelat et al., 2003).

4.8 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados após a realização das medições da hemodinâmica utilizando-se uma dose letal tiopental (10mg/Kg endovenoso, Cristália). Após a eutanásia foram devidamente classificados e alocados para recolhimento pela empresa Logística Ambiental de São Paulo, onde foram transportados para o crematório para serem incinerados de acordo com as normas vigentes de descarte dos resíduos de serviço de saúde

4.9 Toxicidade e perfil lipídico

Logo após a eutanásia amostras de sangue foram coletadas da veia cava inferior dos animais para análise do perfil hematológico e lipídico, função hepática e renal. Foram avaliados os seguintes parâmetros: hemograma, colesterol total, colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C), colesterol não HDL-C, triglicérides, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina. As amostras foram enviadas para o laboratório – LIM03 (Laboratório de Investigação Médica) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para os ensaios laboratoriais.

Para o hemograma, as amostras de sangue total (tubo EDTA) foram analisadas pelo método automatizado Poch 100iV Diff (Symex Europe GmbH, Hamburg, Alemanha), obtendo os parâmetros: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Para análise de marcadores de função hepática e renal e perfil lipídico, o sangue foi coletado em tubo seco. O soro foi obtido por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. Pelo método enzimático colorimétrico automatizado foram determinados os parâmetros: creatinina, colesterol total, HDL-C e triglicérides e foi calculado a concentração de colesterol não-HDL (Colesterol total – HDL-C). Os parâmetros: ALT, AST e ureia foram determinadas pelo método cinético ultravioleta.

4.10 Peso relativo do coração

Após a eutanásia dos animais o coração foi retirado e coletado. O peso relativo do coração foi obtido pelo peso do órgão normalizado pelo peso corporal final dos animais.

4.11 Morfometria

Uma fatia transversal do coração foi processada em parafina e dela obtidos cortes histológicos de 5 μ m de espessura. Após a microtomia e desparafinização das lâminas, os cortes histológicos foram corados com a técnica de hematoxilina-eosina (HE) e de Tricrômico de Masson.

Para a avaliação da hipertrofia cardíaca, foram utilizados cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE), sob aumento de 400x. A hipertrofia do ventrículo esquerdo foi medida pelo diâmetro dos cardiomiócitos em torno do núcleo (μ m). Foram selecionados apenas cardiomiócitos com disposição longitudinal, núcleos ovalados e centralizados.

Para a avaliação da fibrose miocárdica foram utilizados cortes histológicos corados com Tricrômico de Masson, sob aumento 400x. A fibrose foi estimada pela FVC (%), calculada pela razão percentual entre a área de tecido corado positivamente para colágeno, em azul, e a área total do miocárdio. As regiões estudadas foram subendocárdica e intersticial.

As medidas morfométricas foram realizadas utilizando-se um sistema computadorizado de imagens (Leica Q500 iW e Leica DMLS, Leica Imaging Systems LTDA, Cambridge, Reino Unido) (Guido et al., 2007; Koike MK et al., 2007; Guido et al., 2018).

4.12 Expressão proteica por Western Blot

Fragmentos de 1mg de tecido, dos ápices do ventrículo esquerdo, foram colocados em 1mL de tampão RIPA (Tris base pH 8,0, NaCl, NP-40 e glicerol) com os inibidores de proteínas: aprotinina, leupeptina e fluoreto-fenil-metil-sulfonil (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e em seguida foram homogeneizados. As amostras foram agitadas por 2 horas, centrifugadas a 12.000 rpm, por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado. A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA). Após a obtenção das concentrações das amostras, foi calculado o volume necessário das amostras para obter uma concentração proteica de 30-50ug. Após esse cálculo, foi acrescentado 1/3 do volume de tampão de amostra (sample buffer, Tris HCl pH 6,8, 2-mercaptoetanol, SDS, bromofenol e glicerol).

Para separação proteica (eletroforese), utilizamos gel de poliacrilamida. As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e aplicadas no gel. Após a corrida, foi realizada a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose. Com o término da transferência a membrana foi corada com Ponceau S (ácido acético 5% e Ponceau S 0,1%) para verificar a transferência das proteínas para a membrana. O bloqueio das proteínas transferidas para a membrana foi em 5% de leite desnatado diluído em tampão TBS-T (pH 7,6, tris base, NaCl e Tween 1x) por no mínimo 60 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário, diluído em tampão TBS-T, sob agitação, por 12 horas a 4°C. A concentração do anticorpo foi determinada de acordo com a bula do fabricante do anticorpo utilizado. Após incubação do anticorpo primário, a membrana foi incubada com anticorpo secundário, também diluído em tampão TBS-T por 120 minutos em temperatura ambiente. Para a revelação por quimioluminescência, utilizamos revelador quimioluminescente (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA) por 5 minutos. As bandas foram identificadas em fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE Health Care Bio-Sciences, Björkgatan, Suécia). Utilizamos como normalizador o GAPDH e para a análise dos resultados obtidos utilizamos o programa Image J (National Institutes of Health, Maryland, EUA).

Foram estudadas as seguintes proteínas:

- Metaloproteinases: MMP2 e MMP9;
- Fibrose miocárdica: colágenos I e III;
- Receptores de adenosina: A1, A2a, A2b e A3;
- Receptor β 1 adrenérgico
- Atividade neurohumoral: enzima conversora angiotensina ECA1 e ECA2, receptor AT1 e AT2.
- VEGF
- TGF- β

Tabela 1: Descrição dos anticorpos primários utilizados para os ensaios de expressão proteica por Western blot.

Anticorpo primário	Marca do anticorpo	Número de catálogo	Peso molecular (KDa)	Diluição
Anti-colágeno tipo I	Abcam	Ab90395	139	1:1.000
Anti-colágeno tipo III	Abcam	Ab7778	138	1:500
Anti-ECA1	Abcam	Ab254222	180	1:1.000
Anti-ECA2	Abcam	Ab15348	125	1:500
Anti-GAPDH	Millipore	CB1001	36	1:10.000
Anti-MMP-2	Abcam	Ab37150	72	1:1.000
Anti-MMP-9	Abcam	Ab38898	82	1:1.000
Anti-receptor AT1	Abcam	Ab124505	41	1:1.000
Anti-receptor AT2	Abcam	Ab92445	42	1:1.000
Anti-receptor de adenosina A1	Abcam	Ab82477	36	1:1.000
Anti-receptor de adenosina A2a	Abcam	Ab3461	36	1:1.000
Anti-receptor de adenosina A2b	Abcam	Ab135865	37	1:1.000
Anti-receptor de adenosina A3	Abcam	Ab197650	36	1:1.000
Anti-receptor β1-adrenérgico	Abcam	Ab3442	50	1:1.000
Anti-TGF-β	Abcam	Ab92486	44	1:1.000
Anti-VEGF	Abcam	Ab1316	25	1:500

ECA, enzima conversora de angiotensina; GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; MMP, metaloproteinases; TGF- β , fator de crescimento transformador beta; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular.

4.13 Expressão gênica por qRT-PCR

Em 35 animais (CT n=9, LDE n=8, MTX n=9 e LDEMTX n=9), após a retirada da fatia equatorial do miocárdio, fragmento (~1 mg de tecido) do ápice dos ventrículos esquerdos foram retirados e conservados em solução de RNAlater® (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), conforme instruções do fabricante. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese e sua concentração determinada por espectrofotômetro através do aparelho NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Uma alíquota de RNA foi utilizada para a transcrição reversa.

Para a reação de transcrição reversa do RNA e obtenção do DNA complementar (cDNA) adicionou-se o mix de SuperScript® VILO™ (SuperScript® VILO™ MasterMix, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ao RNA que foram homogeneizadas e incubadas por 10 minutos a 25°C, por 60 minutos a 42°C e, por fim, por 5 minutos a 85°C. No final, os cDNAs sintetizados foram diluídos em tampão Tris-EDTA e armazenados a -20°C.

A expressão gênica foi analisada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) e o sistema de emissão de luz selecionado para o estudo foi o sistema TaqMan (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) (Tabela 2)

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Todas as reações foram realizadas em duplicata e foram consideradas aceitáveis quando apresentaram desvio padrão menor que 0,4 ou quando apresentaram diferença de Ct < 1. Em cada reação utilizou-se o reagente TaqMan Gene Expression Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), o reagente TaqMan Gene Expression Assays 20x (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) específico para cada gene alvo a ser analisado, e o cDNA. As condições de termociclagem da reação seguiram os parâmetros de fábrica do aparelho ajustados para um pré-aquecimento a 50°C, denaturação a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos de denaturação e 60°C por 1 minuto de anelamento dos primers e extensão.

A quantificação da expressão gênica bruta foi calculada através do método Ct comparativo demonstrado pelo algoritmo $2^{-\Delta Ct}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001). O valor de ΔCt foi calculado pela diferença entre o Ct do gene de interesse e o Ct do gene normalizador. O gene normalizador utilizado foi o GAPDH.

As expressões gênicas no VE de ratos SHR foram analisadas pelo:

- Processo inflamatório: IL-1 β , IL-6 e IL-10, TNF- α ;
- Angiogênese e Hipóxia: VEGF HIF-1, HIF-3
- Processo oxidativo: SOD1 e NOX1

Tabela 2: Descrição das identificações das TaqMan utilizadas para expressão gênica por qRT-PCR.

Gene	Identificação da TaqMan (Assay ID)
GAPDH	Rn01775763_g1
HIF-1α	Rn00577560_m1
HIF-3α	Rn01420147_m1
IL-1β	Rn00580432_m1
IL-6	Rn01410330_m1
IL-10	Rn00563409_m1
NOX1	Rn00586652_m1
SOD1	Rn00566938_m1
TNF-α	Rn99999017_m1

GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; HIF, fator induzível por hipóxia, IL, interleucina, NOX - NADPH Oxidase; SOD, superóxido dismutase 1, TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular.

4.14 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. O tipo de distribuição das variáveis e a hipótese de igualdade das variâncias foram testadas em todos os casos. Para variáveis de distribuição normal, utilizamos o teste ANOVA com pós-teste de Tukey para a realização de comparações múltiplas. Para variáveis de distribuição não normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O teste de correlação foi utilizado para avaliar a associação entre potenciais variáveis. Para variáveis com distribuição normal, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson, enquanto, para variáveis com distribuição não normal, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância estatística foi estabelecido pelo valor de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, California, EUA) versão 5.0.

5.0 RESULTADOS

5.1 Pletismografia PAS e FC basal e final

A Tabela 3 mostra os valores de PAS e FC por pletismografia, método indireto da medição da PA, no período basal e após as 20 semanas de tratamento.

Comparado ao grupo CT, foi observado maior valor de PAS e da FC no período basal em todos os grupos experimentais hipertensos e não foram observadas diferenças significativas destes parâmetros entre os grupos, indicando homogeneidade inicial das condições avaliadas.

Após as 20 semanas, quando comparado ao grupo CT, verificou-se um aumento significativo da PAS e da FC no grupo SHR-LDE. Os tratamentos com MTX e com a formulação LDEMTX não promoveram alterações na PAS e FC.

Tabela 3: PAS e FC por pletismografia basal e final

	CT		SHR-LDE		SHR-MTX		SHR-LDEMTX	
	Basal	Pós	Basal	Pós	Basal	Pós	Basal	Pós
PAS (mmHg)	134 ± 11	146 ± 6	149 ± 8 ^a	176 ± 13 ^c	154 ± 11 ^b	173 ± 8 ^c	150 ± 13 ^a	177 ± 11 ^c
FC (bpm)	388 ± 14	350 ± 35	468 ± 28 ^c	429 ± 13 ^c	495 ± 15 ^c	431 ± 21 ^c	482 ± 31 ^c	408 ± 17 ^c

PAS, pressão arterial sistólica. FC, frequência cardíaca. a $p < 0,05$ vs CT; b $p < 0,01$ vs CT; c $p < 0,001$ vs CT.

5.2 Hemodinâmica

A Figura 3 mostra os resultados da hemodinâmica. Os animais SHR-LDE apresentaram valores mais elevados de PAS, PAD e PAM em comparação aos observados no grupo CT, conforme esperado, confirmando a validade do modelo animal utilizado para HAS.

Os grupos LDEMTX e MTX apresentaram valores de PAS, PAD, PAM e FC semelhantes aos observados no grupo SHR-LDE, indicando que ambos os tratamentos, administrados durante 20 semanas, não promoveram alterações nesses parâmetros relacionados à HAS (Figura 3).

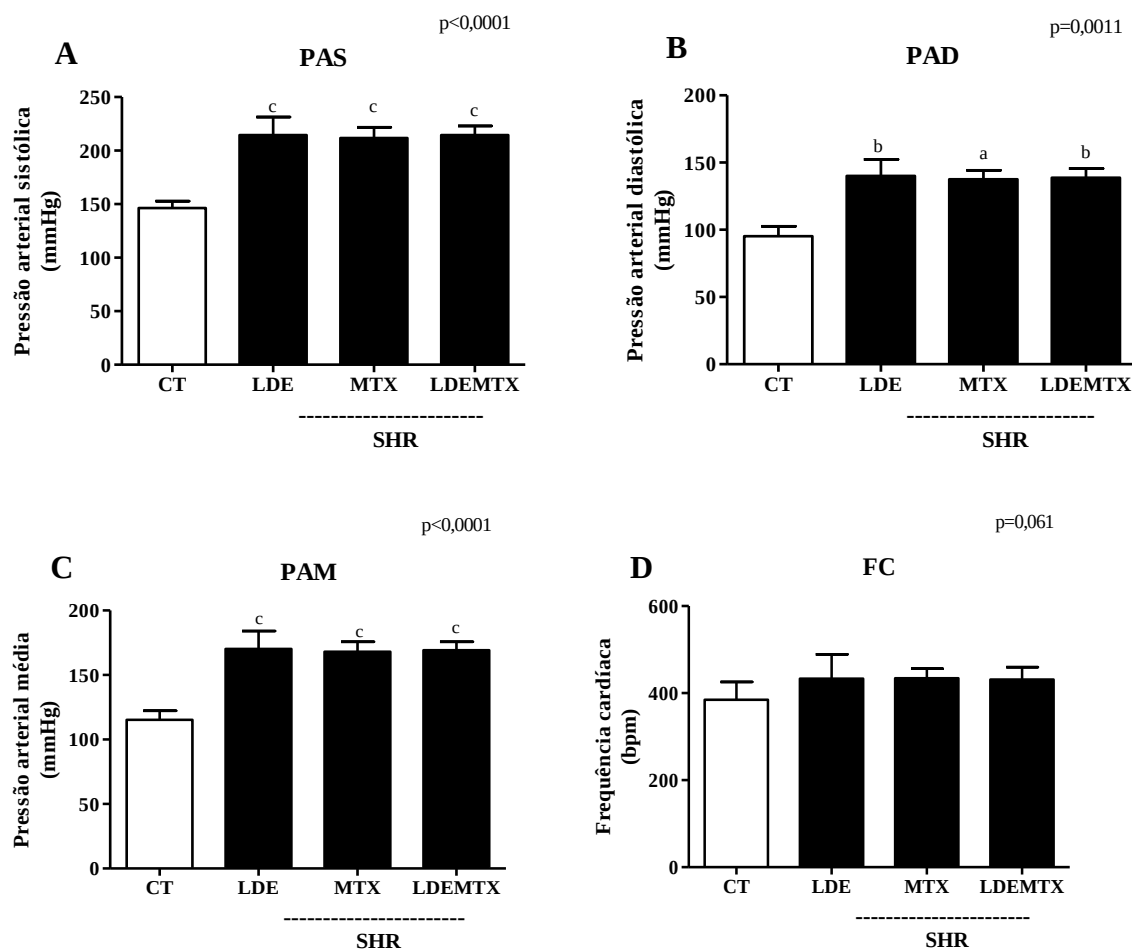


Figura 3: Parâmetros da hemodinâmica nos grupos CT, SHR-LDE, SHR-MTX e SHR-LDEMTX. (A) Pressão Arterial Sistólica, (B) Pressão Arterial Diastólica, (C) Pressão Arterial Média, (D) Frequência Cardíaca. PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca. a $p < 0,05$ vs CT; b $p < 0,01$ vs CT; c $p < 0,001$ vs CT.

5.3 Modulação autonômica cardíaca no domínio da frequência

A Figura 4 mostra os resultados da modulação autonômica cardíaca no domínio da frequência. Os animais SHR-LDE apresentaram maior componente de BF-IP e menor componente de AF-PI em comparação ao grupo CT, indicando aumento da modulação simpática cardíaca e redução da modulação parassimpática.

Entretanto, o grupo LDEMTX não diferiu do grupo SHR-LDE, indicando que o tratamento não modificou as alterações dos parâmetros de modulação autonômica cardíaca observadas nos animais SHR-LDE. Não foram observados aumento do componente BF-IP e diminuição do componente AF-IP no grupo SHR-MTX em comparação ao grupo CT. Não foram observadas diferenças significativas na variância do intervalo de pulso (VAR-PI) e nem na potência total entre os grupos experimentais.

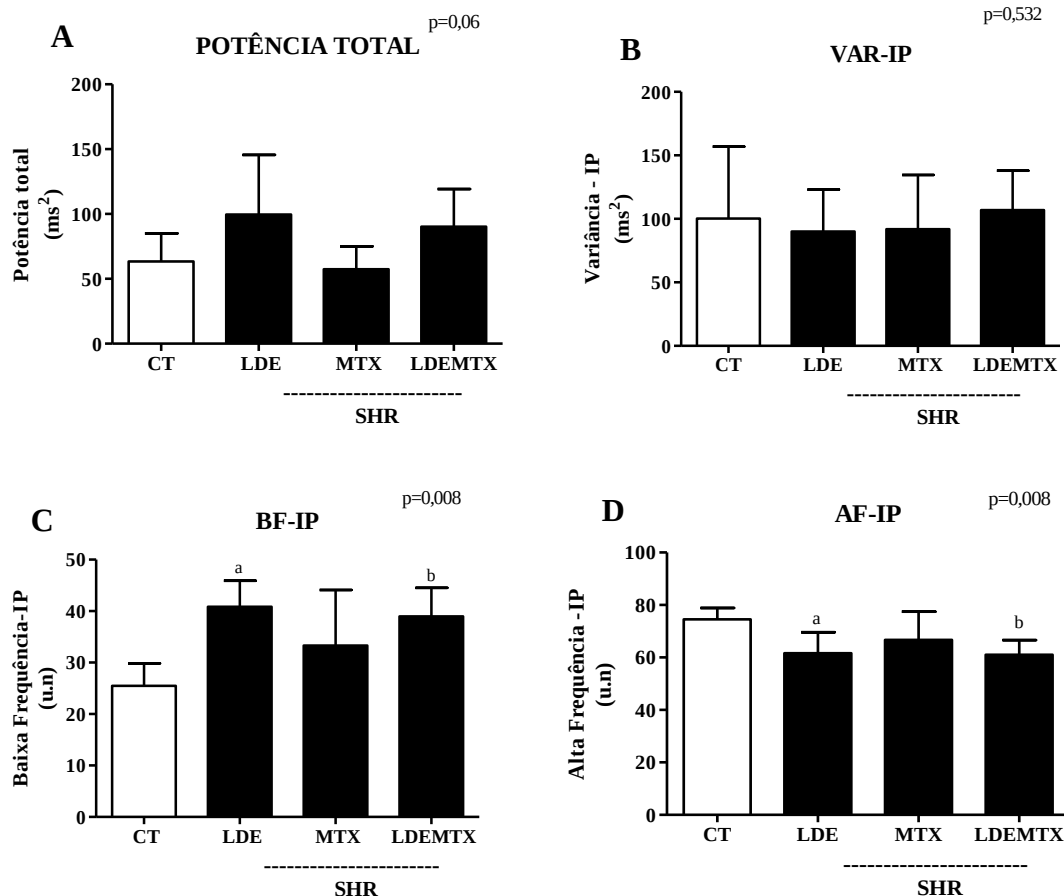


Figura 4: Parâmetros de modulação autonômica cardíaca no domínio da frequência nos grupos CT, SHR-LDE, SHR-MTX e SHR-LDEMTX. (A) Potência total, (B) VAR IP, (C) BF-IP, (D) AF-IP BF, baixa frequência; AF, alta frequência; IP, intervalo de pulso; VAR, variância. a p<0,05 vs CT; b p<0,01 vs CT.

5.4 Modulação da PAS

Como mostrado na figura 5, a análise da modulação da PA revelou aumento do componente de BF-PAS no grupo SHR-LDE em comparação ao grupo CT, indicando aumento da modulação simpática vascular nesses animais.

O tratamento com LDEMTX ou MTX não alterou os valores de BF-PAS, demonstrando que ambos os tratamentos não modificaram os parâmetros de modulação simpática vascular nos animais SHR.

Também não foram observadas diferenças na variabilidade da pressão arterial sistólica nos grupos estudados.

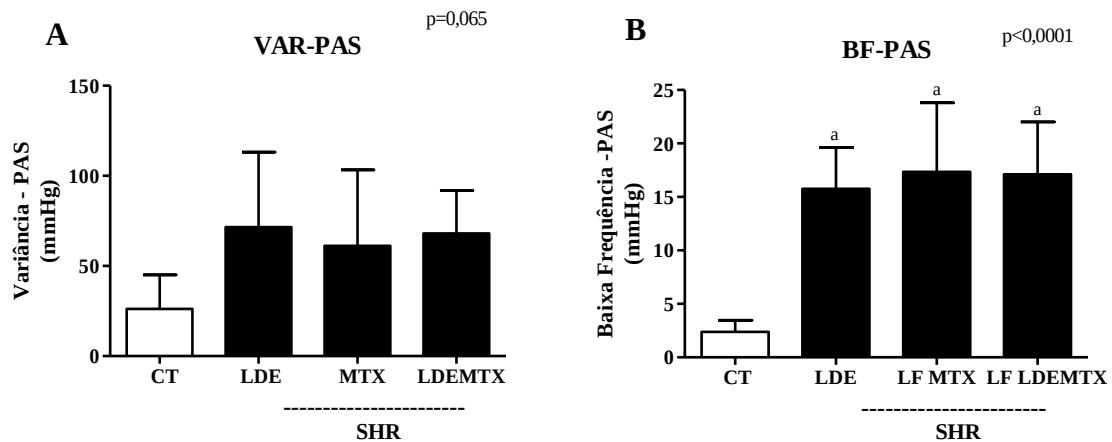


Figura 5: Parâmetros da PAS nos grupos CT, SHR-LDE, SHR-MTX e SHR-LDEMTX. (A) VAR-PAS, (B) BF-PAS. BF, baixa frequência; PAS, pressão arterial sistólica; VAR, variância. ^a $p<0,001$ vs CT.

5.5 Ecocardiografia

A Tabela 4 mostra os parâmetros ecocardiográficos analisados ao final do tratamento. Em comparação com o grupo CT, o grupo SHR-LDE apresentou dilatação cardíaca, maior diâmetro sistólico e diastólico e disfunção sistólica do ventrículo esquerdo e uma disfunção sistólica, representada pela menor fração de ejeção e de encurtamento. O tratamento com MTX ou LDEMTX não alteram esses parâmetros.

Não houve diferença na espessura do septo intraventricular, na espessura da parede posterior e nos parâmetros da função diastólica (Onda E/A; tempo de relaxamento isovolumétrico; e tempo de desaceleração da onda E) nos grupos estudados.

Tabela 4: Ecocardiografia transtorácica após 20 semanas do tratamento

	CT	SHR-LDE	SHR-MTX	SHR-LDEMTX	Valor
	n=17	n=16	n=17	n=17	de p
DD (mm/mg)	23,8 ± 1,7	27,6 ± 1,1 ^c	26,2 ± 1,8 ^b	28,0 ± 2,1 ^c	p<0,0001
DS (mm/mg)	16,3 ± 1,8	21,7 ± 1,4 ^c	19,8 ± 2,3 ^c	22,3 ± 2,8 ^c	p<0,0001
SIV (mm/mg)	3,4 ± 0,4	3,4 ± 0,6	3,8 ± 0,7	3,5 ± 0,6	p=0,153
PP (mm/mg)	3,7 ± 0,4	4,2 ± 0,7	4,4 ± 0,8	4,1 ± 0,6	p=0,095
FE (%)	57,0 ± 5,2	41,2 ± 6,1 ^c	46,6 ± 6,6 ^b	40,3 ± 8,7 ^c	p<0,0001
FEnc (%)	31,6 ± 3,6	21,3 ± 3,5 ^c	24,5 ± 4,0 ^c	20,9 ± 5,2 ^c	p<0,0001
Onda E/A	1,6 ± 0,4	1,6 ± 0,4	1,8 ± 0,6	1,9 ± 0,4	p=0,1780
TRIV (ms)	24,8 ± 6,9	25,8 ± 4,1	21,6 ± 4,5	23,0 ± 4,9	p=0,103
DT (ms)	25,0 ± 6,8	22,8 ± 6,4	24,7 ± 8,1	24,1 ± 7,0	p=0,896

DD, diâmetro diastólico; DS, diâmetro sistólico; SIV, espessura do septo intraventricular; PP, espessura da parede posterior; FE, fração de ejeção; FEnc, Fração de encurtamento; TRIV, tempo de relaxamento isovolumétrico; DT, tempo de desaceleração da onda E. a p<0,05 vs CT; b p<0,01 vs CT; c p<0,001 vs CT.

5.6 Fibrose cardíaca

Como mostrado na Figura 6, a coloração por tricrômico de Masson revelou aumento de FVC na região intersticial cardíaca do grupo SHR-LDE em comparação ao grupo CT. O tratamento com LDEMTX reduziu a FVC nessa região. Por outro lado, o tratamento com MTX produziu efeito oposto, promovendo aumento da FVC tanto nas regiões intersticial quanto subendocárdica do coração.

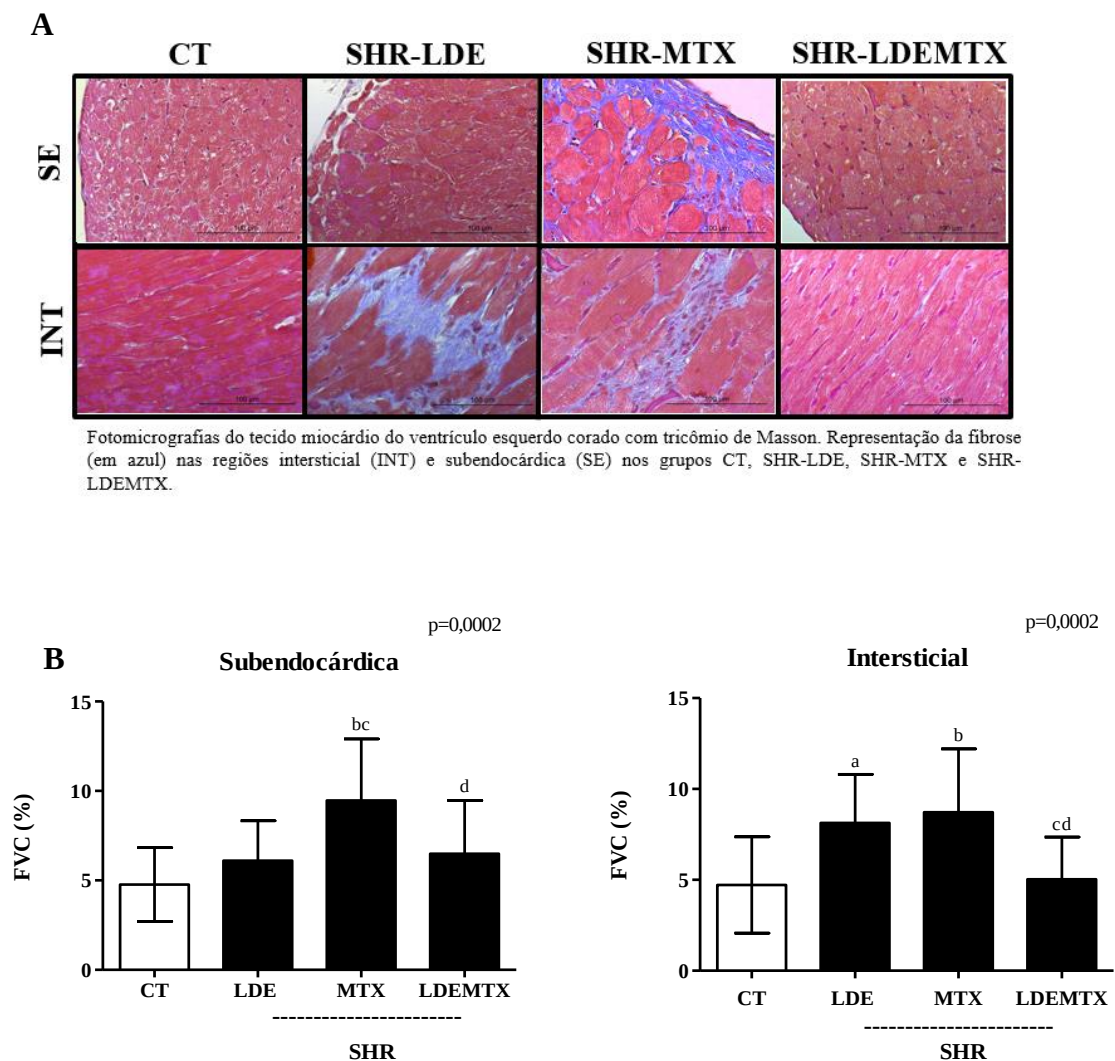


Figura 6. Fibrose cardíaca nos grupos CT, SHR-LDE, SHR-MTX e SHR-LDEMTX. **(A)** Fotomicrografias representativas das regiões subendocárdica e intersticial do tecido miocárdio do ventrículo esquerdo corado com tricômico de Masson. **(B)** Gráficos representativos da FVC (%) nas regiões subendocárdica e intersticial. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão. a $p < 0,05$ vs CT; b $p < 0,01$ vs CT, c $p < 0,05$ vs SHR-LDE, d $p < 0,05$ vs SHR-MTX.

5.7 Hipertrofia cardíaca

A figura 7 mostra que os animais do grupo SHR-LDE apresentaram maior peso relativo do coração em comparação ao grupo CT. O tratamento com MTX ou LDEMTX não promoveu alterações nesse parâmetro. Em relação ao diâmetro dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

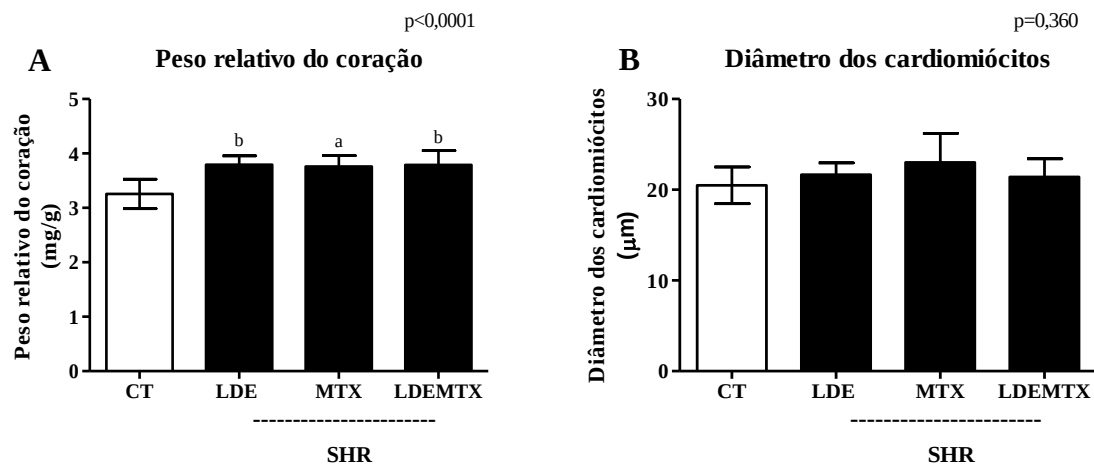


Figura 7: Hipertrofia cardíaca nos grupos CT, SHR-LDE, SHR-MTX e SHR-LDEMTX. (A): Peso relativo do coração. (B) Diâmetro dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão. a $p < 0,01$ vs CT; b $p < 0,0001$ vs CT.

5.8 Colágenos

Como mostrado na Figura 8, o grupo SHR-LDE apresentou maior expressão de colágeno tipo I em comparação ao grupo CT. Por outro lado, no grupo SHR-LDEMTX, observou-se menor expressão de colágeno tipo I em relação ao grupo SHR-LDE (Fig. B).

Nos animais SHR, a expressão de colágeno tipo III foi menor quando comparada ao grupo CT. Nos grupos SHR-LDEMTX e SHR-MTX, a expressão de colágeno tipo III também foi inferior à observada no grupo CT e semelhante à encontrada no grupo SHR.

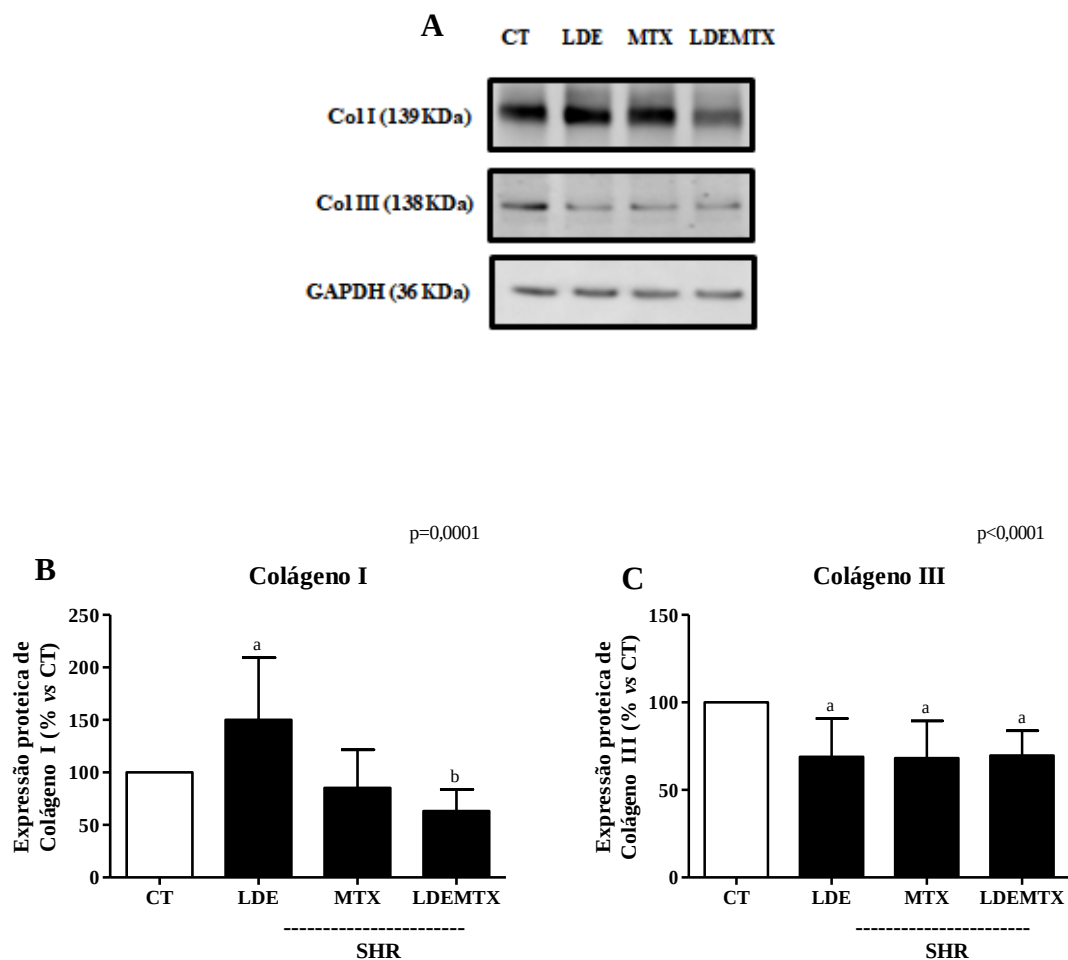
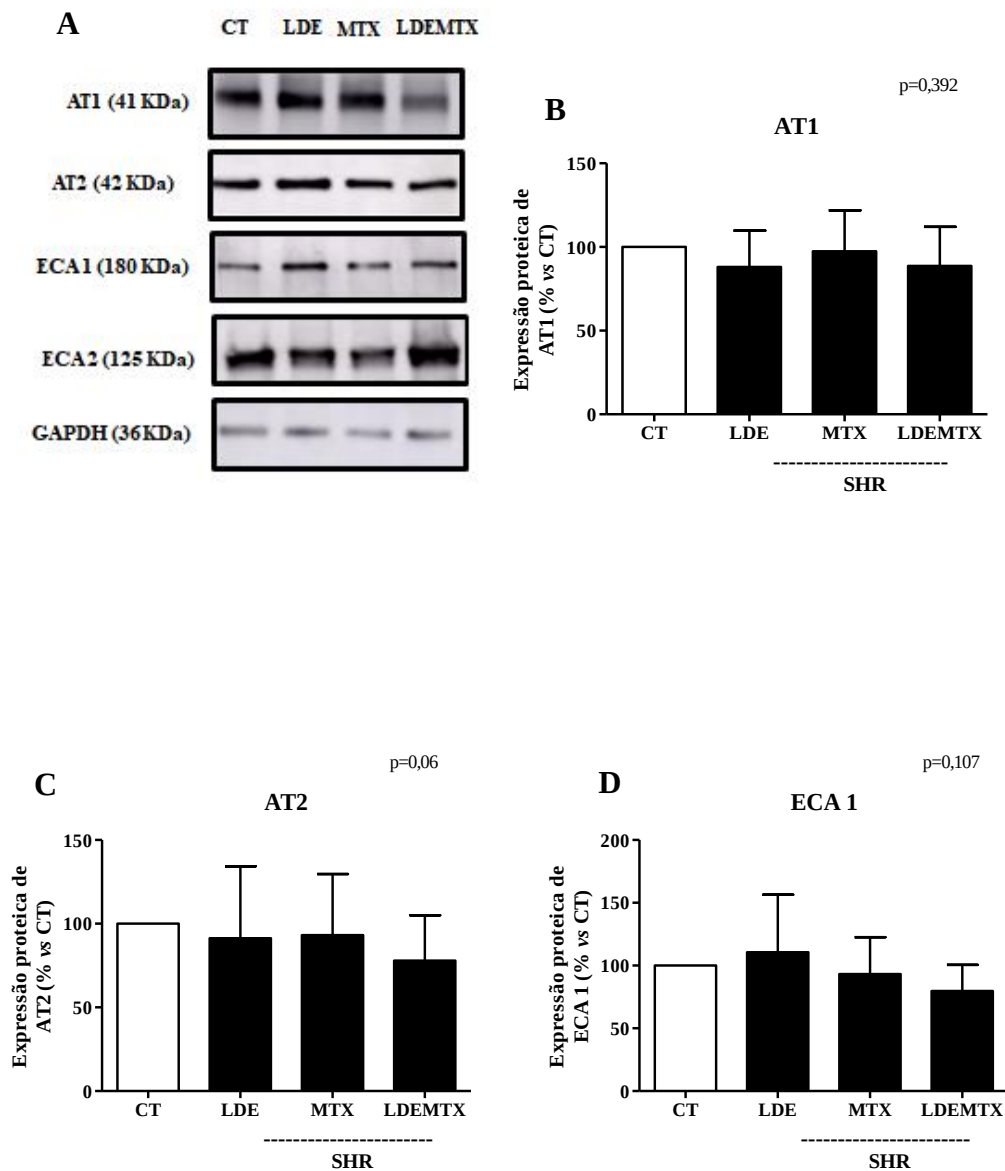


Figura 8: Expressão proteica dos colágenos I e III nos grupos CT, SHR-LDE, SHR-MTX e SHR-LDEMTX. Bandas representativas (A) e gráficos de expressão proteica por Western Blot de colágeno do tipo I (B) e de colágeno do tipo III (C) no ventrículo esquerdo. Os valores foram normalizados em relação à expressão de GAPDH, e os resultados foram apresentados como uma porcentagem das médias do grupo controle CT. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão. a $p < 0,05$ vs CT; b $p < 0,0001$ vs SHR-LDE.

5.9 Angiotensina

A Figura 9 mostra a expressão proteica de fatores relacionados a angiotensina. Não foram observadas diferenças significativas na expressão proteica dos receptores AT1 e AT2. Da mesma forma, a expressão proteica de ECA1 foi semelhante entre os quatro grupos experimentais.

Por outro lado, a expressão proteica de ECA2 foi menor no grupo SHR-LDE em comparação ao grupo CT. Em relação ao grupo SHR-LDE, o tratamento com LDEMTX, mas não com MTX, aumentou a expressão proteica de ECA2.



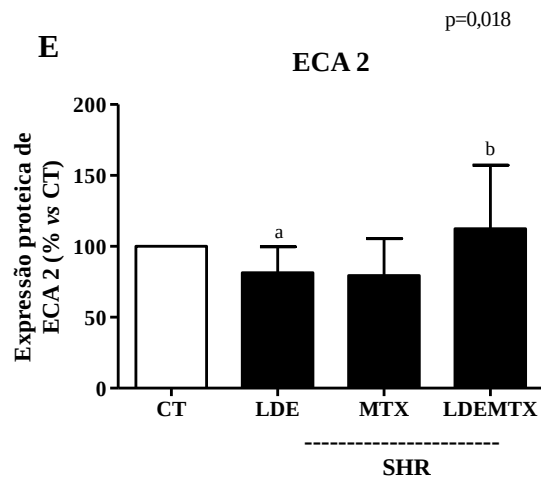


Figura 9: Expressão proteica dos fatores do sistema renina-angiotensina-aldosterona nos grupos CT, SHR-LDE, SHR-MTX e SHR-LDEMTX. Bandas representativas (A) e gráficos de expressão proteica por Western Blot do receptor AT1 (B), receptor AT2 (C), ECA1 (D) e ECA2 (E) no ventrículo esquerdo. Os valores foram normalizados em relação à expressão de GAPDH, e os resultados foram apresentados como uma porcentagem das médias do grupo CT. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão. a $p<0,05$ vs CT e b $p<0,05$ vs LDE.

5.10 Receptor β_1 adrenérgico

Não houve diferença na expressão do receptor β adrenérgico no ventrículo esquerdo de animais SHR após o tratamento com MTX ou LDEMTX.

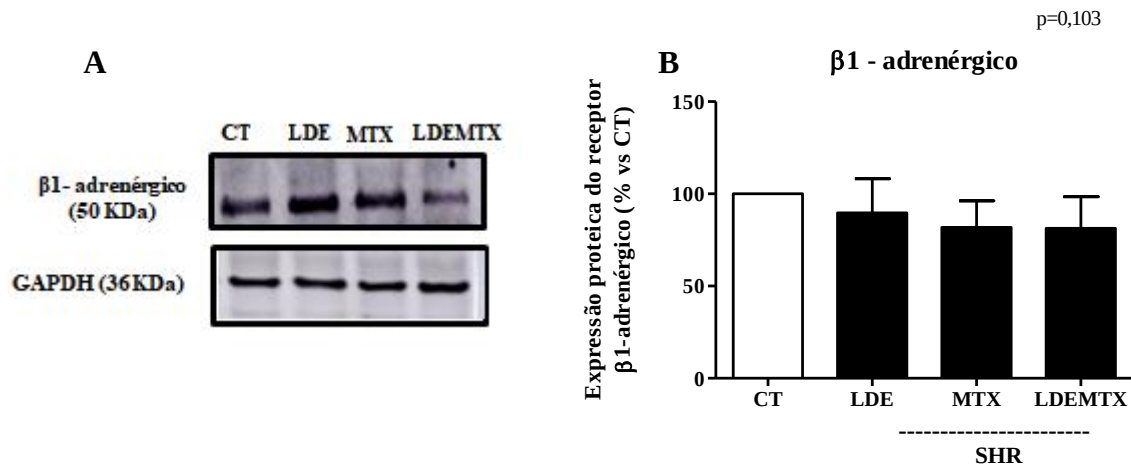


Figura 10: Expressão proteica dos receptores β -adrenérgicos nos grupos CT, SHR-LDE, SHR-MTX e SHR-LDEMTX. Bandas representativas (A) e gráficos de expressão proteica por Western Blot do receptor β_1 adrenérgico (B) no ventrículo esquerdo. Os valores foram normalizados em relação à expressão de GAPDH, e os resultados foram apresentados como uma porcentagem das médias do grupo CT. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão.

5.11 TGF- β e MMPs

Como mostrado na figura 11, não houve diferença na expressão das metaloproteinases, MMP-2 e MMP-9, e nem do TGF- β no ventrículo esquerdo dos 4 grupos estudados.

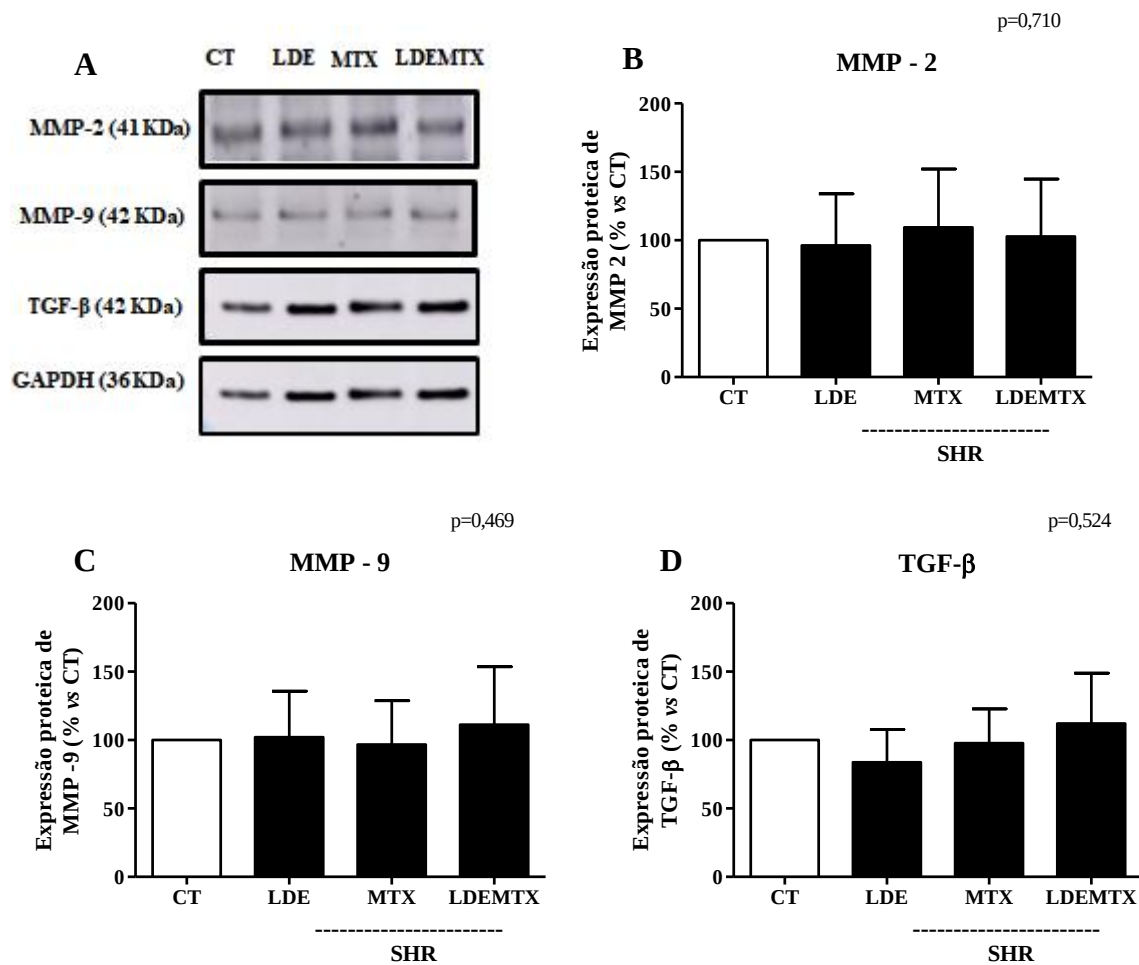


Figura 11: Expressão proteica das metaloproteinases e TGF- β nos grupos CT, SHR-LDE, SHR-MTX e SHR-LDEMTX. Bandas representativas (A) e gráficos de expressão proteica por Western Blot de MMP-2 (B), MMP-9 (C), TGF- β (D) no ventrículo esquerdo. Os valores foram normalizados em relação à expressão de GAPDH, e os resultados foram apresentados como uma porcentagem das médias do grupo CT. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão.

5.12 Marcadores Inflamatórios

Como mostrado na Figura 12, a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α , bem como da citocina anti-inflamatória IL-10, não diferiu entre os quatro grupos experimentais.

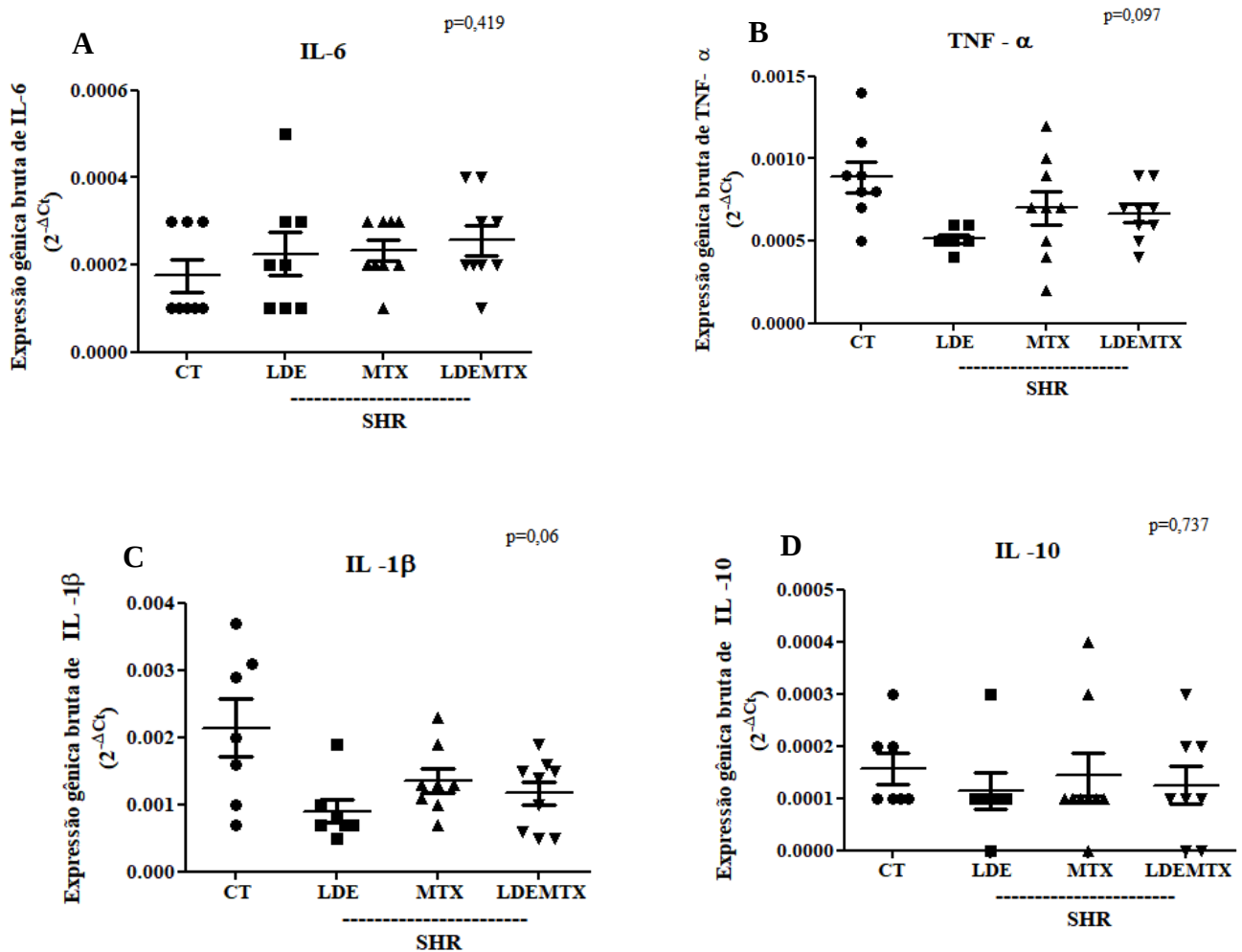


Figura 12: Expressão gênica de fatores inflamatórios nos grupos CT, SHR-LDE, SHR-MTX e SHR-LDEMTX. Gráficos de expressão gênica por qRT-PCR de IL-6 (A), TNF- α (B), IL-1 β (C) e IL-10 (D) no ventrículo esquerdo. Os valores foram normalizados em relação à expressão de GAPDH, e resultados foram expressos pelos valores de $2^{-\Delta C_t}$. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão.

5.13 Hipóxia e Angiogênese

Como mostrado na Figura 13, a expressão gênica de HIF-3 α foi maior no grupo SHR-LDE em comparação ao grupo CT. O tratamento com LDEMTX reduziu a expressão de HIF-3 α , enquanto o tratamento com MTX não alterou essa expressão em relação ao grupo SHR-LDE.

Além disso, a expressão de VEGF foi reduzida no grupo SHR-LDE em comparação ao grupo CT. O tratamento com LDEMTX aumentou a expressão de VEGF, enquanto o tratamento com MTX não modificou esse parâmetro. Não foram observadas diferenças na expressão de HIF-1 α entre os quatro grupos experimentais.

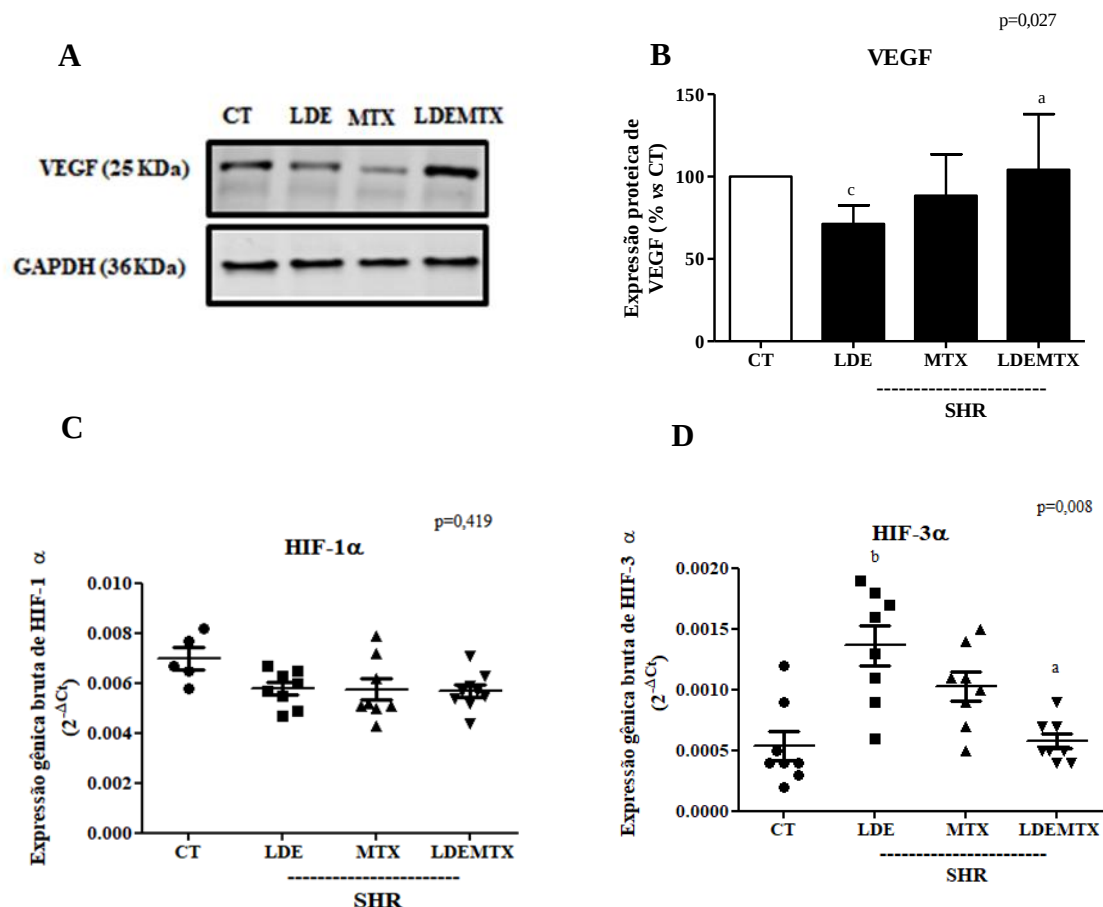


Figura 13: Expressão gênica e proteica de fatores relacionados à hipóxia e angiogênese nos grupos CT, SHR-LDE, SHR-MTX e SHR-LDEMTX. Bandas representativas (A) e gráficos de expressão proteica por Western blot de VEGF (B) e de expressão gênica por qRT-PCR de HIF-1 α (C), HIF-3 α (D). Os valores foram normalizados pela expressão do GAPDH. Os resultados proteicos foram apresentados como uma porcentagem das médias do grupo CT e os resultados gênicos foram expressos pelos valores de $2^{-\Delta C_t}$. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão. a $p < 0,05$ vs SHR-LDE e b $p < 0,01$ vs CT c $p < 0,05$ vs CT.

5.14 Estresse oxidativo

Não foram observadas diferenças significativas na expressão dos marcadores de estresse oxidativo NOX1 e Superoxide dismutase 1 (SOD-1) entre os grupos experimentais, como mostrado na Figura 14.

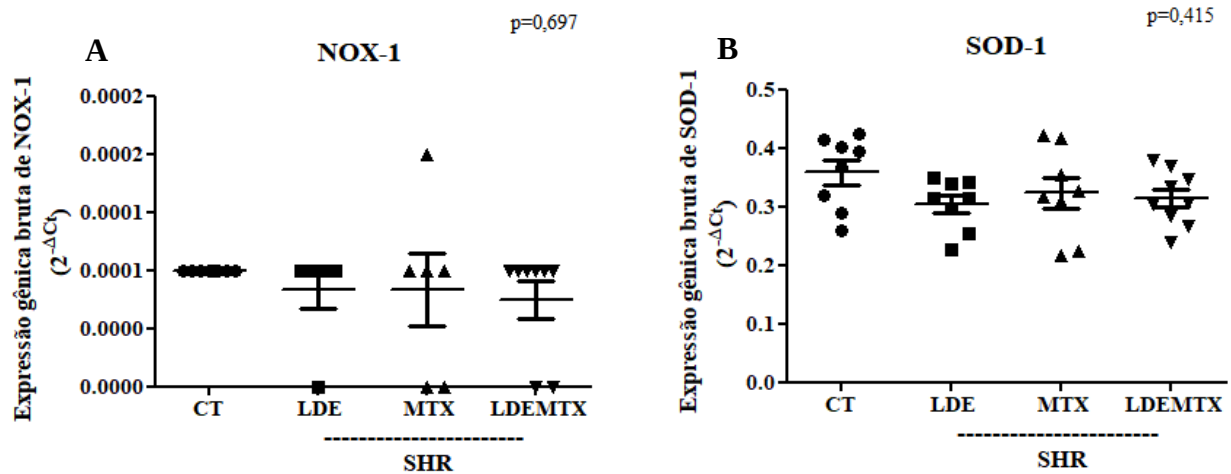
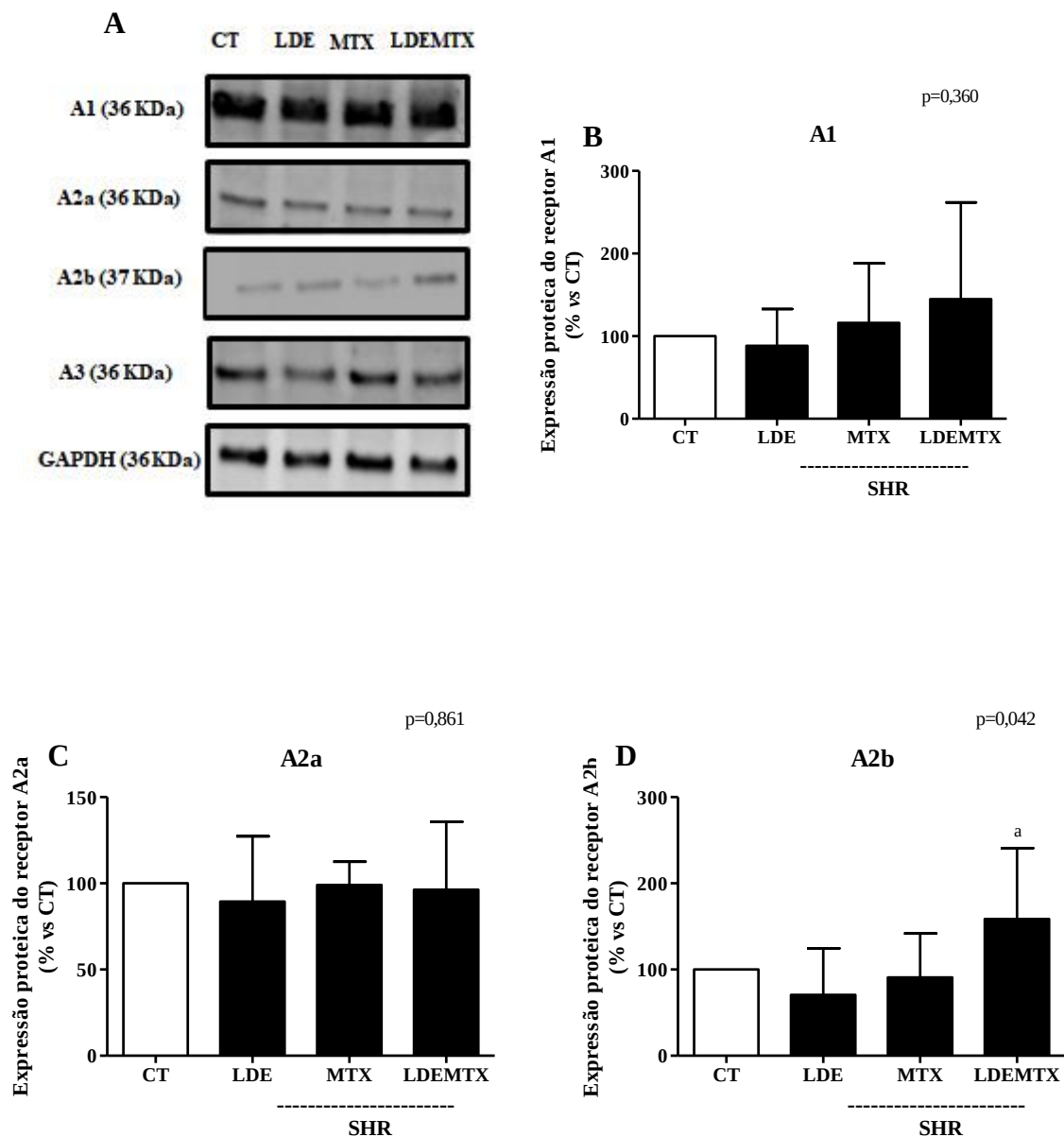


Figura 14: Expressão gênica de fatores relacionados ao estresse oxidativo nos grupos CT, SHR-LDE, SHR-MTX e SHR-LDEMTX. Gráficos de expressão gênica por qRT-PCR de NOX-1 (A), SOD-1 (B) no ventrículo esquerdo. Os valores foram normalizados em relação à expressão de GAPDH, e resultados foram expressos pelos valores de $2^{-\Delta C_t}$. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão.

5.15 Adenosina

Um dos principais mecanismos de ação do MTX é o aumento da biodisponibilidade intracelular de adenosina, que pode ser avaliado indiretamente por meio da expressão dos receptores de adenosina A1, A2A, A2B e A3.

Como mostrado na Figura 15, não foram observadas diferenças na expressão dos receptores A1, A2A e A3 entre os quatro grupos experimentais. Entretanto, a expressão do receptor de adenosina A2B no ventrículo esquerdo foi maior nos animais tratados com LDEMTX em comparação ao grupo SHR-LDE.



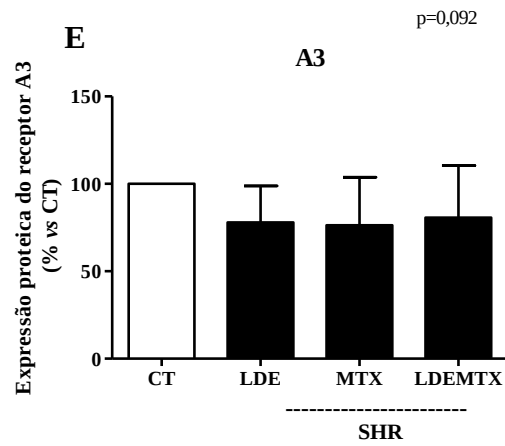


Figura 15: Expressão proteica de fatores relacionados à adenosina nos grupos CT, SHR-LDE, SHR-MTX e SHR-LDEMTX. Bandas representativas (**A**) e gráficos de expressão proteica por Western Blot dos receptores de adenosina A1 (**B**), A2a (**C**), A2b (**D**) e A3 (**E**) no ventrículo esquerdo. Os valores foram normalizados em relação à expressão de GAPDH, e os resultados foram apresentados como uma porcentagem das médias do grupo CT. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão. a $p < 0,05$ vs SHR-LDE.

5.17 Toxicidade e perfil lipídico

A Tabela 5 mostra o perfil hematológico, marcadores da função hepática e renal e o perfil lipídico. Observou-se que os grupos hipertensos apresentaram maior valor na contagem de eritrócitos, de plaquetas e no colesterol total em comparação ao grupo CT. Por outro lado, não foram identificadas diferenças nos marcadores de função hepática e renal, após o tratamento com MTX ou LDEMTX.

Tabela 5: Perfil hematológico, marcadores de função hepática e renal e perfil lipídico

	CT	SHR-LDE	SHR-MTX	SHR-LDEMTX	Valor de p
Eritrócitos (10^6 mm^3)	8,5 $\pm$ 0,9	9,7 $\pm$ 1,5 ^a	9,7 $\pm$ 0,8 ^b	10,0 $\pm$ 1,0 ^a	p $\leq$ 0,0001
Leucócitos (10^3 mm^3)	4,5 $\pm$ 2,2	4,1 $\pm$ 2,1	5,2 $\pm$ 2,8	5,9 $\pm$ 1,5	0,133
Plaquetas (10^3 mm^3)	455 $\pm$ 250	832 $\pm$ 165 ^a	933 $\pm$ 194 ^a	872 $\pm$ 114 ^a	p $\leq$ 0,0001
ALT (U/L)	78 $\pm$ 13	60 $\pm$ 27	67 $\pm$ 22	65 $\pm$ 11	0,104
AST (U/L)	175 $\pm$ 70	159 $\pm$ 104	181 $\pm$ 97	159 $\pm$ 50	0,908
Ureia (mg/dL)	38 $\pm$ 15	40 $\pm$ 11	42 $\pm$ 14	43 $\pm$ 9	0,237
Creatinina (mg/dL)	0,36 $\pm$ 0,13	0,33 $\pm$ 0,1	0,33 $\pm$ 0,11	0,31 $\pm$ 0,11	0,759
CT (mg/dL)	87 $\pm$ 25	56 $\pm$ 20 ^a	60 $\pm$ 17 ^b	48 $\pm$ 9 ^c	p $\leq$ 0,0001
HDL-C (mg/dL)	45 $\pm$ 31	34 $\pm$ 26	32 $\pm$ 26	22 $\pm$ 16	0,083
Não HDL-C (mg/dL)	39 $\pm$ 22	22 $\pm$ 14	28 $\pm$ 14	27 $\pm$ 13	0,083
TG (mg/dL)	34 $\pm$ 12	28 $\pm$ 13	29 $\pm$ 8	30 $\pm$ 10	0,392

ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; CT, colesterol total; HDL -C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; TG, triglicérides. a p $<$ 0,001 vs CT; b p $<$ 0,05 vs CT; c p $<$ 0,0001 vs CT.

5.16 Correlações

Observou-se correlação positiva entre a expressão de HIF-3 α e a fibrose intersticial ($r = 0,470$; $p=0,021$), bem como entre a expressão proteica de VEGF e a expressão de ECA2 ($r = 0,952$; $p<0,0001$). Além disso, foi identificada correlação negativa entre a expressão proteica de VEGF e HIF-3 α ($r = -0,580$; $p=0,04$).

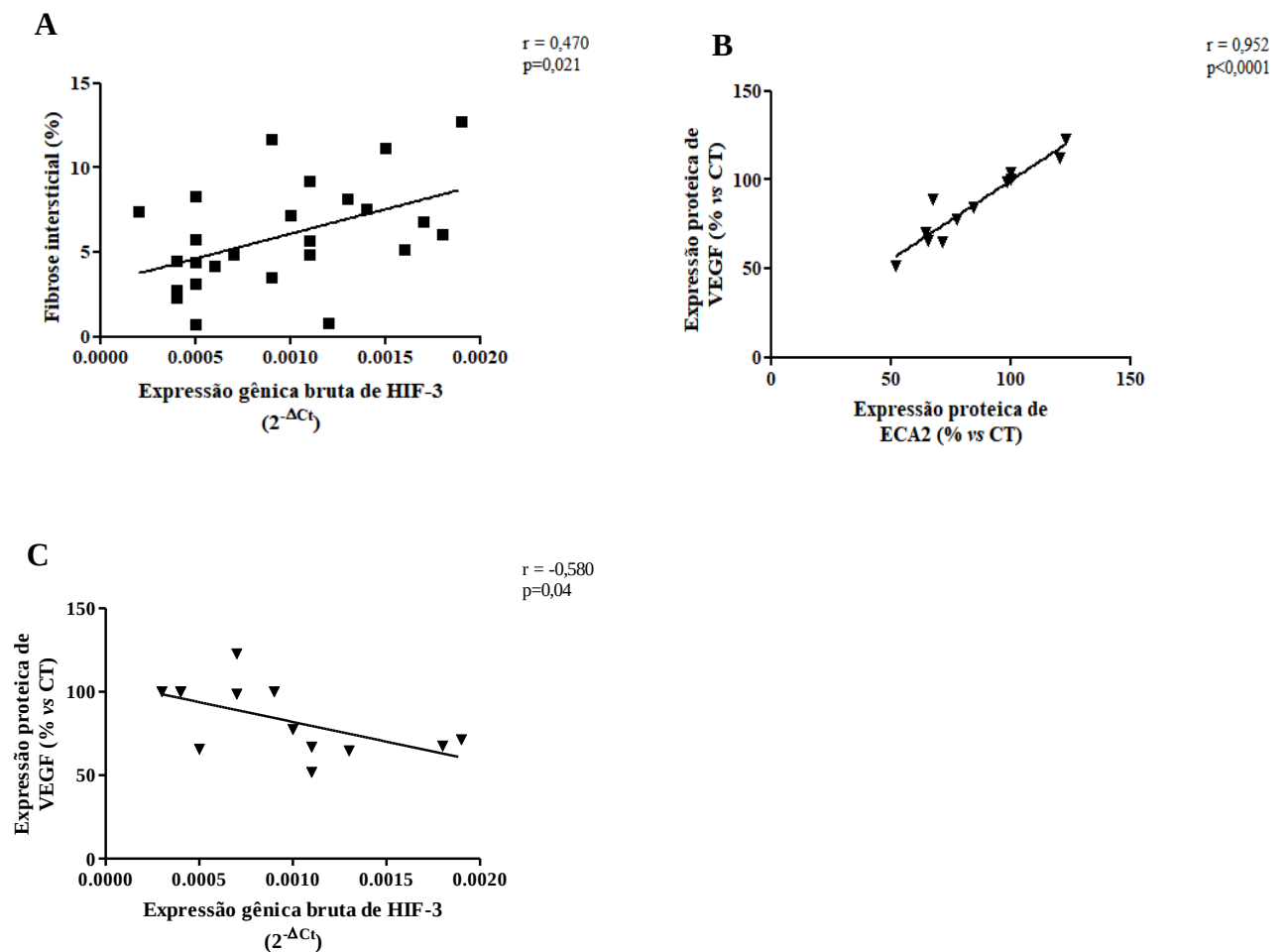


Figura 16: Gráficos de correlação entre a expressão gênica de HIF-3 e a FVC intersticial **(A)**, entre a expressão proteica de VEGF e expressão gênica de ECA2 **(B)**, e entre a expressão proteica de VEGF e expressão gênica de HIF-3 **(C)**.

6.0 DISCUSSÃO

O rato SHR é um modelo experimental amplamente estabelecido que reproduz de forma semelhante as principais características fisiopatológicas da HAS essencial humana (Pinto, 1998; Lerman et al., 2019). Nesse contexto, os animais do grupo SHR-LDE apresentaram elevação sustentada da PA, aumento da atividade simpática cardíaca e vascular, dilatação ventricular, disfunção sistólica, aumento do peso relativo do coração, hipóxia cardíaca e maior deposição de colágeno ventricular. Essas são características típicas desse modelo animal de HAS, corroborando a validade dos experimentos realizados.

Neste estudo, o tratamento com LDEMTX promoveu uma redução expressiva da fibrose cardíaca observada nos ratos SHR controle. A redução da fibrose foi evidenciada pela diminuição da fração de volume de colágeno, um componente fundamental do remodelamento do ventrículo esquerdo associado à HAS, acompanhada pela redução da expressão de colágeno tipo I. Além disso, o tratamento com LDEMTX diminuiu a hipóxia celular no ventrículo esquerdo e aumentou a angiogênese.

Na análise espectral do IP no domínio da frequência evidenciou aumento do componente BF-IP em valores normalizados nos grupos SHR-LDE e SHR-LDEMTX, associado à redução do componente AF-IP normalizado. Adicionalmente, todos os grupos SHR apresentaram aumento da BF-PAS. Em conjunto, esses achados refletem predominância da modulação simpática cardíaca e vascular nesses animais. De fato, já é bem estabelecido que na fisiopatologia da HAS há presença da hiperatividade simpática sustentada associada à redução da modulação parassimpática, mecanismos considerados centrais na doença e que também contribuem para aumento do risco cardiovascular (Brook e Julius, 2000; Shecaira et al., 2026). O aumento da BF-IP também pode estar relacionado ao comprometimento da modulação barorreflexa, uma vez que a sensibilidade do barorreflexo encontra-se reduzida nesses animais, favorecendo maiores oscilações em baixa frequência. Em contrapartida, a diminuição da AF-IP reforça a redução do tônus vagal cardíaco, indicando prejuízo da modulação autonômica cardíaca (Lanfranchi e Somers, 2002).

Por outro lado, não foram observadas alterações significativas nos componentes BF-IP e AF-IP no grupo tratado com MTX isoladamente, sugerindo que o tratamento não promoveu

modificações detectáveis na modulação autonômica cardíaca avaliada por esses parâmetros. A ausência dessas diferenças no grupo hipertenso tratado com MTX sugere uma menor capacidade de adaptação fisiológica nesses animais. Considerando que não houve redução da PAS, os animais permaneceram hipertensos, condição que naturalmente está associada ao predomínio da atividade simpática e à redução da modulação vagal cardíaca. Nesse contexto, um estudo demonstrou que o tratamento prolongado com MTX promoveu degeneração parcial de fibras nervosas cardíacas, incluindo redução de fibras adrenérgicas e colinérgicas no coração de porquinhos-da-índia. Esses achados sugerem que o MTX pode estar associado a alterações estruturais das fibras nervosas cardíacas capazes de influenciar a modulação autonômica cardiovascular (Quayum et al., 1988).

A diminuição da densidade capilar constitui um importante mecanismo envolvido na progressão da HAS para a disfunção cardíaca, uma vez que compromete a perfusão tecidual, favorece a instalação de hipóxia miocárdica e contribui para a morte de cardiomiócitos e para o remodelamento ventricular (Engelman et al., 1987). No presente estudo, os animais tratados com LDEMTX apresentaram menor expressão gênica de HIF-3 α , acompanhada por redução da fibrose ventricular e aumento da expressão proteica de VEGF, sugerindo modulação favorável de vias relacionadas ao remodelamento cardíaco e à adaptação ao estresse hipóxico. Embora o papel do HIF-3 α no sistema cardiovascular ainda não esteja completamente elucidado, evidências indicam que esse fator atua como modulador da resposta celular à hipóxia crônica, regulando a atividade transcricional de outros membros da família HIF (Janaszak-Jasiecka et al., 2016). Dessa forma, a redução de sua expressão no grupo LDEMTX pode refletir menor ativação de mecanismos associados à hipóxia sustentada e ao remodelamento patológico do miocárdio. Essa interpretação é reforçada pela redução da fibrose ventricular, um dos principais marcadores estruturais da progressão da lesão cardíaca na HAS. Além disso, o aumento da expressão de VEGF sugere preservação de mecanismos pró-angiogênicos potencialmente relacionados à manutenção da perfusão tecidual e da integridade vascular cardíaca. Em conjunto, esses achados indicam que o tratamento com LDEMTX pode ter contribuído para um ambiente miocárdico menos pró-fibrótico, associado à modulação da resposta hipóxica e ao favorecimento de mecanismos adaptativos vasculares.

Os animais SHR-LDE apresentaram maior expressão de colágeno tipo I, além disso foi observado menor expressão de colágeno tipo III no ventrículo esquerdo em todos os grupos SHR. Tanto o colágeno tipo I quanto o tipo III são produzidos predominantemente por

fibroblastos e células musculares lisas e, embora ambos sejam colágenos fibrilares envolvidos na manutenção da integridade estrutural do miocárdio, apresentam propriedades biomecânicas distintas. As fibrilas de colágeno tipo I são mais espessas e rígidas, conferindo maior resistência estrutural, estabilidade torsional e coordenação da distribuição de forças no tecido cardíaco, reduzindo, conseqüentemente, a complacência miocárdica. Além disso, o aumento da deposição de colágeno tipo I é frequentemente observado em condições cardiovasculares patológicas, como na hipertrofia e cardiomiopatia dilatada (Gelse et al., 2003; Marijianowski et al., 1995). Em contrapartida, as fibrilas de colágeno tipo III são mais finas e elásticas, proporcionando maior resiliência e distensibilidade tecidual, além de contribuírem para a manutenção da integridade estrutural durante a expansão ventricular (Linehan et al., 2001). Dessa forma, o perfil de remodelamento extracelular observado nos animais SHR caracteriza um miocárdio mais rígido, favorecendo o desenvolvimento de disfunções cardíacas e o tratamento com LDEMTX mostrou-se eficaz na redução da deposição de colágeno tipo I no ventrículo esquerdo, o que pode contribuir para a melhora das propriedades mecânicas do miocárdio e, conseqüentemente, da função cardíaca.

Adicionalmente o tratamento com LDEMTX aumentou a expressão proteica de ECA2. Intervenções farmacológicas em SHR, especialmente aquelas que modulam o sistema SRAA, são capazes de reduzir a deposição de colágeno tipo I e atenuar o remodelamento miocárdico (Díez et al., 1996; Varo et al., 1999). Em situações de sobrecarga de pressão e insuficiência cardíaca a ECA2 previne a fibrose cardíaca em parte devido ao aumento da sinalização de Ang 1-7 (Zhong et al., 2010). Grobe e colaboradores demonstraram que a superexpressão de ECA2 no miocárdio foi capaz de prevenir a fibrose miocárdica induzida por hipóxia, por meio da inibição da produção de colágeno por fibroblastos cardíacos. Esses achados sugerem que a ECA2 exerce importante efeito antifibrótico no remodelamento cardíaco, possivelmente atenuando os efeitos deletérios da hipóxia tecidual sobre a ativação fibroblástica e deposição de matriz extracelular (Grobe et al., 2007). Desta forma, o tratamento com LDEMTX aumentar a expressão de ECA2 reforça o potencial efeito protetor do tratamento sobre o remodelamento cardíaco em animais hipertensos. Apesar de o tratamento ter promovido aumento da expressão de ECA2, não foi observada redução da PAS. Esse achado pode ser explicado pelo fato de que os efeitos cardioprotetores da ECA2 parecem ocorrer predominantemente por mecanismos locais no miocárdio, modulando o remodelamento cardíaco independentemente de alterações hemodinâmicas sistêmicas. Nesse contexto, Zhong e colaboradores, mostraram que o aumento da expressão de ECA2 foi capaz de atenuar hipertrofia patológica, fibrose miocárdica e

disfunção cardíaca, mesmo sem redução significativa da PAS, sugerindo que os efeitos benéficos da ECA2 estão relacionados principalmente à modulação local do SRAA cardíaco (Zhong et al., 2010).

Como discutido anteriormente, uma das formas indiretas de avaliar o aumento da biodisponibilidade intracelular de adenosina, um dos principais mecanismos de ação do MTX, que pode ser analisada através da expressão de seus receptores. No presente estudo, o tratamento com LDEMTX promoveu aumento da expressão do receptor A2b, sugerindo maior biodisponibilidade de adenosina. O receptor A2b já foi identificado como importante mediador dos efeitos antifibróticos da adenosina, sendo capaz de inibir a proliferação de fibroblastos estimulada por soro fetal bovino, além de reduzir a síntese de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular (Dubey et al., 1997). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa, demonstrou que o silenciamento do receptor A2b em fibroblastos cardíacos promove aumento da proliferação celular e da síntese de colágeno, confirmando o papel desse receptor na sinalização antifibrótica mediada pela adenosina (Dubey et al., 2001b). Além disso, os efeitos antifibróticos da adenosina também estão diretamente relacionados à regulação da angiogênese, especialmente por meio da ativação dos receptores A2A e A2B, que estimulam a expressão de fatores pró-angiogênicos, como o VEGF. Em condições de hipóxia e inflamação, o aumento da biodisponibilidade de adenosina favorece a proliferação e migração de células endoteliais, promovendo formação de novos vasos sanguíneos e melhora da perfusão tecidual (Feoktistov et al., 2002; Adair, 2005). Assim, é possível que o aumento da biodisponibilidade de adenosina promovida pelo tratamento com LDEMTX observado neste estudo também tenha contribuído para a modulação da expressão de VEGF e para a redução da hipóxia miocárdica nos animais, que pode ter reduzido a fibrose ventricular nos animais tratados com LDEMTX.

O tratamento com MTX comercial promoveu cardiotoxicidade caracterizada pelo aumento da deposição de colágeno na região subendocárdica e intersticial ventricular. Esse acúmulo de matriz extracelular pode comprometer a complacência ventricular e favorecer alterações estruturais associadas à disfunção cardíaca (Kong e Frangogiannis, 2014). Apesar de não haver aumento da expressão de colágeno I, possa ser que o MTX aumente outros componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo IV, fibronectina ou proteoglicanos. Ademais, observou-se disfunção do sistema nervoso autonômico, indicando uma menor adaptação fisiológica na modulação autonômica cardíaca, sendo essa, condição frequentemente associada à progressão do remodelamento cardíaco e ao aumento do risco de arritmias e alterações

hemodinâmicas (Khan et al., 2018). Estudos demonstraram que a toxicidade induzida pelo MTX envolve mecanismos relacionados ao estresse oxidativo, inflamação e dano celular, culminando em alterações estruturais e funcionais do tecido cardíaco (Al-Abkal et al., 2022). Dessa forma, os achados sugerem que o MTX pode desencadear alterações cardíacas e fibróticas capazes de impactar negativamente a função cardiovascular. Ademais, esses achados sugerem que a associação do MTX à LDE é promissora, pois não promoveu nenhum tipo de cardiotoxicidade.

Embora a HAS seja reconhecida como uma condição associada à ativação de mecanismos inflamatórios e de estresse oxidativo ao remodelamento cardiovascular, não foram observadas essas alterações na expressão gênica dos marcadores, IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10, avaliados no ventrículo esquerdo dos animais SHR no presente estudo. Esses achados sugerem que, nas condições experimentais analisadas, na HAS estabelecida não foi acompanhada por alterações detectáveis no perfil transcricional dessas citocinas no tecido cardíaco. No entanto, a resposta inflamatória associada à HAS é complexa e envolve múltiplos níveis de regulação molecular. Dessa forma, a ausência de alterações na expressão gênica desses fatores inflamatórios e anti-inflamatório não exclui a possibilidade de modificações pós-transcricionais, translacionais ou pós-traducionais capazes de influenciar a síntese, a disponibilidade e a atividade biológica dessas proteínas (Maier et al., 2009; Vogel e Marcotte, 2012). Além disso, a inflamação e o estresse oxidativo cardiovascular pode manifestar-se de maneira tecido-específica e envolver mediadores distintos daqueles avaliados neste estudo. Assim, embora os resultados indiquem ausência de modulação transcricional dos marcadores analisados no ventrículo esquerdo, não se pode descartar a ocorrência de alterações em nível proteico ou em outras vias de sinalização relacionadas à fisiopatologia da HAS. Adicionalmente, a quantificação plasmática poderia contribuir para uma avaliação mais abrangente da resposta inflamatória e oxidativa, permitindo distinguir possíveis diferenças entre a inflamação e estresse oxidativo e sistêmica e a resposta local do tecido cardíaco.

Apesar das importantes alterações estruturais e moleculares promovidas pelo tratamento com LDEMTX, não foram observadas alterações na função sistólica e nem na dilatação ventricular. Esse achado pode ser explicado pela manutenção da sobrecarga mecânica imposta ao ventrículo, uma vez que o tratamento não foi capaz de reduzir a PAS nem o tônus simpático. A persistência desses estímulos hemodinâmicos mantém elevada a pós-carga cardíaca, favorecendo a continuidade do estresse parietal e da remodelação ventricular compensatória.

Nesse contexto, embora o LDEMTX tenha promovido efeitos benéficos sobre marcadores estruturais e mecanismos associados ao remodelamento cardíaco, a ausência de modulação dos principais fatores determinantes da sobrecarga cardiovascular pode ter limitado a recuperação funcional do ventrículo esquerdo.

No âmbito da avaliação de toxicidade, não foram observadas diferenças significativas nos marcadores de função hepática e renal entre os grupos tratados. Entretanto, foram identificadas alterações na contagem de eritrócitos e plaquetas nos grupos SHR em comparação ao grupo CT. Estudos prévios demonstraram que ratos SHR apresentam maior contagem de eritrócitos em comparação aos ratos Wistar-Kyoto e que a redução da PAS está associada à diminuição dessa contagem (Sen et al., 1972; Lominadze et al., 2002). A maior contagem de eritrócitos observada nos animais SHR pode estar relacionada ao aumento da produção de eritropoetina induzida por hipóxia tecidual relativa no rim, e a características genéticas inerentes ao modelo (Sen et al., 1972). Além disso, evidências apontam uma associação positiva entre o aumento da contagem de eritrócitos e plaquetas, a HAS e outras doenças cardiovasculares (Lassale et al., 2018; Rojo et al., 2025). Em conjunto, esses achados sugerem que a elevação da PA em ratos SHR está associada a alterações hematológicas, incluindo aumento da contagem de eritrócitos, maior volume plaquetário médio e trombocitose. Além disso, foi observado que em relação ao grupo CT os animais SHR apresentaram menores níveis de colesterol total, o que pode ser justificado por apresentarem menor HDL-C e menor n-HDL-C. A menor concentração de colesterol total observada nos animais SHR foi observada em estudos que mostraram redução dos níveis plasmáticos de colesterol nessa linhagem quando comparada aos ratos Wistar Kyoto. Esse achado tem sido atribuído a alterações intrínsecas do metabolismo lipídico dos SHR, incluindo redução da síntese hepática de colesterol e modificações no metabolismo das lipoproteínas (Iritani et al., 1977; Kitts et al., 1998)

7. CONCLUSÃO

No presente estudo, os animais SHR apresentaram aumento da PAS, PAD e PAM, associado a importantes alterações autonômicas, estruturais e funcionais cardíacas, confirmando o fenótipo deletério característico da HAS nesse modelo experimental. A análise autonômica demonstrou aumento da modulação simpática cardíaca e vascular, evidenciado pelo aumento dos componentes BF-IP e BF-PAS, concomitantemente à redução da modulação parassimpática, observada pela diminuição da AF-IP. Essas alterações refletem desequilíbrio autonômico cardiovascular, condição frequentemente associada à hiperatividade simpática sustentada e ao comprometimento da sensibilidade barorreflexa em animais SHR. Pela ecocardiografia, observou-se disfunção sistólica e dilatação do ventrículo esquerdo, acompanhadas por aumento do peso relativo do coração, indicando remodelamento cardíaco. Adicionalmente, os animais SHR-LDE apresentaram maior deposição de colágeno tipo I ventricular, proteína fibrilar associada ao aumento da rigidez miocárdica e prejuízo da complacência ventricular, contribuindo para a progressão da disfunção cardíaca. Paralelamente, a presença de hipóxia ventricular sugere comprometimento da perfusão tecidual e desequilíbrio entre oferta e demanda de oxigênio no miocárdio hipertrofiado, condição que pode estimular processos pró-fibróticos e favorecer a progressão do remodelamento cardíaco patológico.

O tratamento com LDEMTX foi capaz de atenuar a fibrose no ventrículo esquerdo, evidenciada pela diminuição da expressão de colágeno tipo I, principal componente da matriz extracelular associado ao aumento da rigidez ventricular. Esse efeito possivelmente está relacionado à modulação da expressão de ECA2 e VEGF, contribuindo para melhora da perfusão tecidual e redução da hipóxia miocárdica. Além disso, o aumento da biodisponibilidade intracelular de adenosina, potencialmente mediado pela ativação do receptor A2b de adenosina, pode ter contribuído para a redução da fibrose observada. Adicionalmente, o tratamento com LDEMTX apresentou perfil de segurança favorável, uma vez que não foram observadas evidências de toxicidade hematológica, renal ou hepática nos animais estudados. Dessa forma, o tratamento com LDEMTX se torna um importante cardioprotetor sobre o remodelamento deletério do miocárdico e de grande relevância para o retardamento da progressão da insuficiência cardíaca.

8. REFERÊNCIAS

Adair TH, Cotten R, Gu JW, Pryor JS, Bennett KR, McMullan MR, McDonnell P, Montani JP. Adenosine infusion increases plasma levels of VEGF in humans. *BMC Physiol.* 2005 Jun 20;5:10.

Al-Abkal F, Abdel-Wahab BA, El-Kareem HFA, Moustafa YM, Khodeer DM. Protective Effect of Pycnogenol against Methotrexate-Induced Hepatic, Renal, and Cardiac Toxicity: An In Vivo Study. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022 May 27;15(6):674.

Andreatta SH, Averill DB, Santos RA, Ferrario CM. The ventrolateral medulla. A new site of action of the renin-angiotensin system. *Hypertension.* 1988 Feb;11(2 Pt 2):I163-6.

Armaly Z, Assady S, Abassi Z. Corin: a new player in the regulation of salt-water balance and blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013 Nov;22(6):713-22.

Augustyniak RA, Picken MM, Leonard D, Zhou XJ, Zhang W, Victor RG. Sympathetic nerves and the progression of chronic kidney disease during 5/6 nephrectomy: studies in sympathectomized rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010 Jan;37(1):12-8.

Ayub T, Khan SN, Ayub SG, Dar R & Andrabi KI Reduced nitrate level in individuals with hypertension and diabetes. *J. Cardiovasc. Dis. Res* 2, 172–176 (2011).

Belviranlı, M.; Gokbel, H.; Okudan, N.; Buyukbas, S. Effects of grape seed extract on oxidative stress and antioxidant defense markers in streptozotocin- induced diabetics rats. *Turk J. Med. Sci.* 2015;45(3):489-95.

Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM. Microalbuminuria in essential hypertension: significance, pathophysiology, and therapeutic implications. *Am J Kidney Dis.* 1999 Dec;34(6):973-95.

Bikkina M, Levy D, Evans JC, Larson MG, Benjamin EJ, Wolf PA, Castelli WP. Left ventricular mass and risk of stroke in an elderly cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA.* 1994 Jul 6;272(1):33-6.

Bishop JE and Lindahl G. Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. (1999) *Cardiovasc Res* 42: 27–44.

Bortolotto LA, Consolim-Colombo FM. Betabloqueadores adrenérgicos Adrenergic betablockers. *Rev Bras Hipertens* vol.16 (4): 215-220, 2009.

Bostrom P, Mann N, Wu J, et al. C/EBP β controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell* 2010; 143: 1072–83.

Brandão AA, Rodrigues CIS, Bortolotto LA, Armstrong AC, Mulinari RA, Feitosa ADM, et al. Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial – 2025. *Arq Bras Cardiol.* 2025 Sep;122(9):e20250624

Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Taxa de mortalidade por hipertensão arterial atinge maior valor dos últimos dez anos. Brasília, 2023.

Brilla CG. Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res.* 2000 Jul;47(1):1-3.

Brody MJ, Varner KJ, Vasquez EC, Lewis SJ. Central nervous system and the pathogenesis of hypertension. Sites and mechanisms. *Hypertension.* 1991 Nov;18(5 Suppl):III7-12.

Brook RD, Julius S. Autonomic imbalance, hypertension, and cardiovascular risk. *Am J Hypertens.* 2000 Jun;13(6 Pt 2):112S-122S.

Bulgarelli A, Leite AC Jr, Dias AA, Maranhão RC. Anti-atherogenic effects of methotrexate carried by a lipid nanoemulsion that binds to LDL receptors in cholesterol-fed rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013 Dec;27(6):531-9.

Campbell WB, Brooks SN, Pettinger WA. Angiotensin II- and angiotensin 3-induced aldosterone release vivo in the rat. *Science.* 1974 May 31;184(4140):994-6.

Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension.* 2000 Jan;35(1 Pt 2):155-63.

Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation.* 2000 Jan 25;101(3):329-35.

Carvalho MH, Nigro D, Lemos VS, Tostes RCA, Fortes ZB. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Re Bras Hipertens.* V.8, p.76-88, 2001.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, outubro 2006. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/policy/polaris/healthtopics/highbloodpressure/index.html>. Acesso em: 12 de novembro 2023.

Chatterjee S, Chattopadhyay S, Hope-Ross M, Lip PL, Chattopadhyay HK, Hernan MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet*. 2002; 359:1173–1177.

Cheung CY, Biousse V, Keane PA, Schiffrin EL, Wong TY. Hypertensive eye disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2022 Mar 10;8(1):14.

Choi HK, Hernan MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet*. 2002; 359:1173–1177.

Cronstein, B. How does methotrexate suppress inflammation? *Clin Exp Rheumatol*, v.28, p.21-23, 2010.

Curry F-RE Atrial natriuretic peptide: an essential physiological regulator of transvascular fluid, protein transport, and plasma volume. *J. Clin. Invest* 115, 1458–1461 (2005).

Dandona P, Dhindsa S, Ghanim H, Chaudhuri A. Angiotensin II and inflammation: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade. *J Hum Hypertens*. 2007 Jan;21(1):20-7.

De Ciuceis, C. et al. Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II- infused macrophage colony- stimulating factor- deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 25, 2106–2113 (2005).

Devereux RB, Roman MJ. Left ventricular hypertrophy in hypertension: stimuli, patterns, and consequences. *Hypertens Res*. 1999 Mar;22(1):1-9.

DiBona GF Sympathetic Nervous System and Hypertension. *Hypertension* 61, 556–560 (2013).

Dickhout JG, Lee RM. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1998 Mar;274(3):H794-800

Didion SP. Unraveling the Role and Complexities of Inflammation in Hypertension. *Hypertension*. 2017 Oct;70(4):700-702.

Díez J, Frohlich ED. A translational approach to hypertensive heart disease. *Hypertension*. 2010 Jan;55(1):1-8.

Díez J, Panizo A, Gil MJ, Monreal I, Hernández M, Pardo Mindán J. Serum markers of collagen type I metabolism in spontaneously hypertensive rats: relation to myocardial fibrosis. *Circulation*. 1996 Mar 1;93(5):1026-32.

Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*. 1998 Jul;39(1):89-105.

Dörffel Y, Lätsch C, Stuhlmüller B, Schreiber S, Scholze S, Burmester GR, Scholze J. Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension*. 1999 Jul;34(1):113-7.

Drozd D, Kawecka-Jaszcz K. Cardiovascular changes during chronic hypertensive states. *Pediatr Nephrol*. 2014 Sep;29(9):1507-16.

Dubey RK, Gillespie DG, Mi Z, Jackson EK. Exogenous and endogenous adenosine inhibits fetal calf serum-induced growth of rat cardiac fibroblasts: role of A2B receptors. *Circulation*. 1997 Oct 21;96(8):2656-66.

Dubey, R. K., Gillespie, D. G., Zacharia, L. C., Mi, Z., and Jackson, E. K. (2001b). A2B receptors mediate the antimitogenic effects of adenosine in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 37, 716–721.

Durante A, Mazzapicchi A, Baiardo Redaelli M. Systemic and Cardiac Microvascular Dysfunction in Hypertension. *Int J Mol Sci*. 2024 Dec 11;25(24):13294.

Ehanire T, Ren L, Bond J, Medina M, Li G, Bashirov L, Chen L, Kokosis G, Ibrahim M, Selim A, Blobe GC, Levinson H. Angiotensin II stimulates canonical TGF- β signaling pathway through angiotensin type 1 receptor to induce granulation tissue contraction. *J Mol Med (Berl)*. 2015 Mar;93(3):289-302.

Elias MF, Wolf PA, D'Agostino RB, Cobb J, White LR. Untreated blood pressure level is inversely related to cognitive functioning: the Framingham Study. *Am J Epidemiol*. 1993 Sep 15;138(6):353-64

Elliott WJ. Systemic hypertension. *Curr Probl Cardiol*. 2007 Apr;32(4):201-59.

Engelmann GL, Vitullo JC, Gerrity RG. Morphometric analysis of cardiac hypertrophy during development, maturation, and senescence in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1987 Apr;60(4):487-94.

Esler M. The sympathetic system and hypertension. *Am J Hypertens*. 2000 Jun;13(6 Pt 2):99S-105S.

Fagard R, Brguljan J, Staessen J, Thijs L, Derom C, Thomis M, Vlietinck R. Heritability of conventional and ambulatory blood pressures. A study in twins. *Hypertension*. 1995 Dec;26(6 Pt 1):919-24.

Feng W, Dell'Italia LJ, Sanders PW. Novel Paradigms of Salt and Hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2017 May;28(5):1362-1369.

Feoktistov I, Ryzhov S, Goldstein AE, Biaggioni I. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors. *Circ Res*. 2003 Mar 21;92(5):485-92.

Ferrari AG, Maranhão RC, Salsoso R, Baldo VMGTF, Furtado RHM, Dalçóquio TF, Nakashima CAK, Baracioli LM, Lima FG, Morikawa AT, Liberato G, Rochitte CE, Nomura CH, Kalil Filho R, Ridker PM, Giugliano RP, Sabatine MS, Tavoni TM, Giraldez RRCV, Nicolau JC. Effect of intravenous methotrexate carried by lipid nanoemulsion in patients with anterior ST-elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol Heart Vasc*. 2025 Aug 13; 60:101771.

Ferrario CM ACE2: more of Ang-(1–7) or less Ang II? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 20, 1–6 (2011).

Filho AG, Kinote A, Pereira DJ, Rennó A, dos Santos RC, Ferreira-Melo SE, Velloso LA, Bordin S, Anhê GF, Moreno Junior H. Infliximab prevents increased systolic blood pressure and upregulates the AKT/eNOS pathway in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2013 Jan 30;700(1-3):201-9.

Fiorelli, A. L.; Lourenço- Filho, D. D.; Tavares, E. R.; Carvalho, P. O.; Marques, A. F.; Gutierrez, P. S.; Maranhão, R. C.; Stolf, N. A. G. Methotrexate associated to lipid core nanoparticles improves cardiac allograft vasculopathy and the inflammatory profile in a rabbit heart graft model. *Braz J Med Biol Res*. 2017 Aug 17;50(10): e 6225.

Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*. 2001 Dec; 53 (4): 527-52

Fujita T. Mechanism of salt-sensitive hypertension: focus on adrenal and sympathetic nervous systems. *J Am Soc Nephrol*. 2014 Jun;25(6):1148-55.

Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Nov 28;55(12):1531-46.

Goodfriend, L. T.; Lysterly, K. M. *Pathophysiology of Kidney Disease and Hypertension*. Dallas: W.B. Saunders Company, 2008. p. 179-193.

Graham RM, Perez DM, Hwa J, Piascik MT. alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res.* 1996 May;78(5):737-49.

Grassi G, Bertoli S, Seravalle G. Sympathetic nervous system: role in hypertension and in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2012 Jan;21(1):46-51.

Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, Lanfranchi A, Mancia G. Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension.* 1998 Jan;31(1):68-72

Grassi G, Ram VS. Evidence for a critical role of the sympathetic nervous system in hypertension. *J Am Soc Hypertens.* 2016 May;10(5):457-66.

Graziani SR, Igreja FA, Hegg R, Meneghetti C, Brandizzi LI, Barboza R, Amâncio RF, Pinotti JA, Maranhão RC. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol Oncol.* 2002 Jun;85(3):493-7.

Grobe JL, Der Sarkissian S, Stewart JM, Meszaros JG, Raizada MK, Katovich MJ. ACE2 overexpression inhibits hypoxia-induced collagen production by cardiac fibroblasts. *Clin Sci (Lond).* 2007 Oct;113(8):357-64.

Guido MC, de Carvalho Frimm C, Koike MK, Cordeiro FF, Moretti AI, Godoy LC. Low coronary driving pressure is associated with subendocardial remodelling and left ventricular dysfunction in aortocaval fistula. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007 Nov;34(11):1165-72.

Guido MC, Debbas V, Salemi VM, Tavares ER, Meirelles T, Araujo TLS, Nolasco P, Ferreira-Filho JCA, Takimura CK, Pereira LV, Laurindo FR. Effect of the Antioxidant Lipoic Acid in Aortic Phenotype in a Marfan Syndrome Mouse Model. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Mar 25;2018: 3967213.

Guido MC, Lopes NM, Albuquerque CI, Tavares ER, Jensen L, Carvalho PO, Tavoni TM, Dias RR, Pereira LDV, Laurindo FRM, Maranhão RC. Treatment With Methotrexate Associated With Lipid Core Nanoparticles Prevents Aortic Dilation in a Murine Model of Marfan Syndrome. *Front Cardiovasc Med.* 2022 Jun 10;9: 893774.

Guo X, Chen H, Han L, Haulon S, Kassab GS. Chronic ET_A antagonist reverses hypertension and impairment of structure and function of peripheral small arteries in aortic stiffening. *Sci Rep*. 2018 Feb 15;8(1):3076.

Gurantz D, Cowling RT, Varki N, Frikovsky E, Moore CD, Greenberg BH. IL-1beta and TNF-alpha upregulate angiotensin II type 1 (AT1) receptors on cardiac fibroblasts and are associated with increased AT1 density in the post-MI heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2005 Mar;38(3):505-15.

Guzzetti S, Borroni E, Garbelli PE, Ceriani E, Della Bella P, Montano N, Cogliati C, Somers VK, Malliani A, Porta A. Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation. *Circulation*. 2005 Jul 26;112(4):465-70

Harrison DG, Guzik TJ, Lob HE, Madhur MS, Marvar PJ, Thabet SR, Vinh A, Weyand CM. Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension*. 2011 Feb;57(2):132-40.

Haskó G.; Szabó, C.; Németh, Z. H.; Kvetan, V.; Pastores, S. M.; Vizi, E. S. Adenosine receptor agonist differentially regulate IL-10, TNF- alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J. Immunol*. 1996 Nov 15;157(10):4634-40.

He FJ, Tan M, Ma Y, MacGregor GA. Salt Reduction to Prevent Hypertension and Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Feb 18;75(6):632-647.

Hiranyachattada S, Harris PJ. Modulation by locally produced luminal angiotensin II of proximal tubular sodium reabsorption via an AT1 receptor. *Br J Pharmacol*. 1996 Oct;119(4):617-8.

Ho, Y. K.; Smith, R. G.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*. 1978; 52(6):1099-114.

Iritani N, Fukuda E, Nara Y, Yamori Y. Lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Atherosclerosis*. 1977 Nov;28(3):217-22.

James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Lackland DT, LeFevre ML, MacKenzie TD, Ogedegbe O, Smith SC Jr, Svetkey LP, Taler SJ, Townsend RR, Wright JT Jr, Narva AS, Ortiz E. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*. 2014 Feb 5;311(5):507-20.

Janaszak-Jasiecka A, Bartoszewska S, Kochan K, Piotrowski A, Kalinowski L, Kamysz W, Ochocka RJ, Bartoszewski R, Collawn JF. miR-429 regulates the transition between Hypoxia-Inducible Factor (HIF)1A and HIF3A expression in human endothelial cells. *Sci Rep*. 2016 Mar 8;6: 22775.

Ji Q, Cheng G, Ma N, Huang Y, Lin Y, Zhou Q, Que B, Dong J, Zhou Y, Nie S. Circulating Th1, Th2, and Th17 Levels in Hypertensive Patients. *Dis Markers*. 2017;2017:7146290.

Kannel WB, Cobb J. Left ventricular hypertrophy and mortality--results from the Framingham Study. *Cardiology*. 1992;81(4-5):291-8.

Kasal DA, Barhoumi T, Li MW, Yamamoto N, Zdanovich E, Rehman A, Neves MF, Laurant P, Paradis P, Schiffrin EL. T regulatory lymphocytes prevent aldosterone-induced vascular injury. *Hypertension*. 2012 Feb;59(2):324-30.

Kassan M, Galan M, Partyka M, Trebak M, Matrougui K. Interleukin-10 released by CD4(+) CD25(+) natural regulatory T cells improves microvascular endothelial function through inhibition of NADPH oxidase activity in hypertensive mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Nov;31(11):2534-42.

Kempen, J. H.; Daniel, E.; Dunn, J. P.; Foster, C. S.; Gangaputra, S.; Hanish, A.; Helzlsouer, K. J.; Jabs, D. A.; Kaçmaz, R. O.; Levy-Charke, G. A.; Liesegang, T. L.; Newcomb, C. W.; Nussenblatt, R. B.; Pujari, S. S.; Rosenbaum, J. T.; Suhler, E. B.; Thorne, J. E. Overall and cancer related mortality among patients with ocular inflammation treated with immunosuppressive drugs: retrospective cohort study. *BMJ*, 2009 Jul 3;339: b2480.

Kerkelä R, Ulvila J, Magga J. Natriuretic Peptides in the Regulation of Cardiovascular Physiology and Metabolic Events. *J Am Heart Assoc*. 2015 Oct 27;4(10):e002423.

Khan, O. A.; Blann, A. D.; Payne, M. J.; Middleton, M. R.; Protheroe, A. S.; Talbot, D. C.; Taylor, M.; Kirichek, O.; Han, C.; Patil, M.; Harris, A. S. Continuous low-dose cyclophosphamide and methotrexate combined with celecoxib for patients with advanced cancer. *Br J Cancer*. 2011;104(12):1822-7.

Khoury SR, Ratchford EV. Hypertension. *Vasc Med*. 2018 Jun;23(3):293-297.

Kilander L, Nyman H, Boberg M, Hansson L, Lithell H. Hypertension is related to cognitive impairment: a 20-year follow-up of 999 men. *Hypertension*. 1998 Mar;31(3):780-6.

Kitts DD, Yuan YV, Godin DV. Plasma and lipoprotein lipid composition and hepatic antioxidant status in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 1998 Feb;76(2):202-9.

Kohan DE, Barton M. Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2014 Nov;86(5):896-904

Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Feb;71(4):549-74.

Koyanagi M, Egashira K, Kitamoto S, Ni W, Shimokawa H, Takeya M, Yoshimura T, Takeshita A. Role of monocyte chemoattractant protein-1 in cardiovascular remodeling induced by chronic blockade of nitric oxide synthesis. *Circulation* 2000;102: 2243–2248.

Lanfranchi PA, Somers VK. Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Oct;283(4):R815-26.

Lassale C, Curtis A, Abete I, van der Schouw YT, Verschuren WMM, Lu Y, Bueno-de-Mesquita HBA. Elements of the complete blood count associated with cardiovascular disease incidence: Findings from the EPIC-NL cohort study. *Sci Rep*. 2018 Feb 19;8(1):3290.

Laviades C, Varo N, Fernández J, Mayor G, Gil MJ, Monreal I, Díez J. Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation*. 1998 Aug 11;98(6):535-40.

Lazich I & Bakris GL Endothelin Antagonism in Patients with Resistant Hypertension and Hypertension Nephropathy. *Contributions to Nephrology* 223–234 (2011).

Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA*. 1996 May 22-29;275(20):1557-62.

LeGrice IJ, Pope AJ, Sands GB, Whalley G, Doughty RN, Smaill BH. Progression of myocardial remodeling and mechanical dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Dec 1;303(11):H1353-65.

Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, Ellison DH, Chade AR, Crowley SD, Mattson DL, Mullins JJ, Osborn J, Eirin A, Reckelhoff JF, Iadecola C, Coffman TM. Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension*. 2019 Jun;73(6):e87-e120.

Linehan KA, Seymour AM, Williams PE. Semiquantitative analysis of collagen types in the hypertrophied left ventricle. *J Anat.* 2001 Jan;198(Pt 1):83-92.

Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D; Framingham Heart Study. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2002 Dec 10;106(24):3068-72.

Lominadze D, Schuschke DA, Joshua IG, Dean WL. Increased ability of erythrocytes to aggregate in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 2002 Jul;24(5):397-406.

Lo Prete, A. C.; Maria, D. A.; Rodrigues, D. G.; Valduga, C. J.; Ibanez, O. C.; Maranhão, R. C. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nano-emulsion. *J. Pharm Pharmacol.* 2006, 58(6):801-8.

Lopes NM, Guido MC, Carvalho PO, Albuquerque CI, Jensen L, Debbas V, Hajjar LA, Maranhão RC. Use of methotrexate carried in lipid core nanoparticles in rats with endotoxemia: a possible new strategy for the treatment of the cardiac dysfunction in sepsis. *J Drug Target.* 2006 Jun;14(5):899-911.

López B, González A, Díez J. Role of matrix metalloproteinases in hypertension-associated cardiac fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2004 Mar;13(2):197-204.

López B, Querejeta R, Varo N, González A, Larman M, Martínez Ubago JL, et al. Usefulness of serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I in assessment of the cardioreparative ability of antihypertensive treatment in hypertensive patients. *Circulation* 2001; 104: 286 – 291

MacGregor GA. Blood pressure: importance of the kidney and the need to reduce salt intake. *Am J Kidney Dis.* 2001 Jan;37(1 Suppl 2):S34-8.

Machado, R. I. L.; Braz, A. S.; Freire, E. A. M. Incidência de neoplasias nas doenças reumatológicas autoimunes mais prevalentes: uma revisão sistemática. *Rev. Bras. Reumatol.* Vol.54 no.2, 2014.

Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 2009 Dec 17;583(24):3966-73.

Malachias, M. V. B; Franco, R. J. S; Forjaz, C. L. M.; Pierin, A. M. G.; Gowdak, M. M. G.; Klein, M. R. S. T.; Matsudo, V. Tratamento não medicamentoso. Cap.6, 7o Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016.

Mancia G, Grassi G, Parati G, Daffonchio A. Evaluating sympathetic activity in human hypertension. *J Hypertens* 1993; 11(Suppl): S13-S19.

Mancia G, Kreutz R, Brunström M, Burnier M, Grassi G, Januszewicz A, et al. 2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension: Endorsed by the International Society of Hypertension (ISH) and the European Renal Association (ERA). *J Hypertens*. 2023 Dec 1;41(12):1874-2071.

Mancia G, Laurent S, Agabiti-Rosei E, et al.: Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. *J Hypertens* 2009; 27: 2121–58.

Mangoni AA, Baghdadi LR, Shanahan EM, Wiese MD, Tommasi S, Elliot D, Woodman RJ. Methotrexate, blood pressure and markers of arterial function in patients with rheumatoid arthritis: a repeated cross-sectional study. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2017 Sep;9(9):213-229.

Maranhão, R. C.; Cesar, T.B.; Pedroso-Mariani, S. R.; Hirata, M. H.; Mesquita, C. H. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids*. 1993;28(8):691-6.

Maranhão, R. C.; Graziani, S. R.; Yamaguchi, N.; Melo, R. F.; Latrilha, M. C.;Rodrigues D. G.; Couto, R. D.; Schreier, S.; Buzaid, A. C. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer chemother pharmacol*. 2002;49(6):487-98.

Maranhão RC, Guido MC, de Lima AD, Tavares ER, Marques AF, Tavares de Melo MD, Nicolau JC, Salemi VM, Kalil-Filho R. Methotrexate carried in lipid core nanoparticles reduces myocardial infarction size and improves cardiac function in rats. *Int J Nanomedicine*. 2017 May 17;12:3767-3784.

Melo, M. D.; Nicolau, J. C.; Salemi, V. M.; Kalil- Filho, R. Methotrexate carried in lipid core nanoparticles reduces myocardial infarction size and improves cardiac function in rats. *Int. J. Nanomedicine*. 2017, 17;12:3767-3784.

Maranhão, R. C.; Roland, I. A.; Toffoletto, O.; Ramires, J. A.; Gonçalves, R. P.; Mesquita C. H.; Pileggi, F. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. *Lipids*. 1997;32(6):627-33.

Maranhão, R. C.; Tavares, E. R.; Padoveze, A. F.; Valduga, C. J.; Rodrigues, D. G.; Pereira, M. D. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions 34 promotes atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis*. 2008;197(2): 959-66.

Marijjanowski Mh, Teeling P, Mann J, Becker Ae (1995) Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I'III collagen ratio: a quantitative assessment. *Journal of the American College of Cardiology* 25, 1263–1272.

Mattson DL et al. Genetic mutation of recombination activating gene 1 in Dahl salt-sensitive rats attenuates hypertension and renal damage. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol* 304, R407–R414 (2013).

McCurley A & Jaffe IZ Mineralocorticoid receptors in vascular function and disease. *Mol. Cell. Endocrinol* 350, 256–265 (2012).

McEvoy JW, McCarthy CP, Bruno RM, Brouwers S, Canavan MD, Ceconi C, Christodorescu RM, Daskalopoulou SS, Ferro CJ, Gerds E, Hanssen H, Harris J, Lauder L, McManus RJ, Molloy GJ, Rahimi K, Regitz-Zagrosek V, Rossi GP, Sandset EC, Scheenaerts B, Staessen JA, Uchmanowicz I, Volterrani M, Touyz RM; ESC Scientific Document Group. Linee guida ESC 2024 per la gestione della pressione arteriosa elevata e dell'ipertensione [2024 ESC Guidelines for the management of elevated blood pressure and hypertension]. *G Ital Cardiol (Rome)*. 2024 Nov;25(11 Suppl 1):e1-e107.

McLenachan JM, Henderson E, Morris KI, Dargie HJ. Ventricular arrhythmias in patients with hypertensive left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med*. 1987 Sep 24;317(13):787-92.

Molkentin JD, Bugg D, Ghearing N, Dorn LE, Kim P, Sargent MA, Gunaje J, Otsu K, Davis J. Fibroblast-Specific Genetic Manipulation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase In Vivo Reveals Its Central Regulatory Role in Fibrosis. *Circulation*. 2017 Aug 8;136(6):549-561.

Moraes OA de. Infarto Agudo Do Miocárdio Em Modelos de Polimorfismo Da Enzima Conversora de Angiotensina.; 2018.

Moura JA, Valduga CJ, Tavares ER, Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Novel formulation of a methotrexate derivative with a lipid nanoemulsion. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2285-95.

Murphy SR, Dahly-Vernon AJ, Dunn KMJ, Chen CCA, Ledbetter SR, Williams JM, Roman RJ. Renoprotective effects of anti-TGF- β antibody and antihypertensive therapies in Dahl S rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012;303:R57–R69.

Murray EC, Nosalski R, MacRitchie N, Tomaszewski M, Maffia P, Harrison DG, Guzik TJ. Therapeutic targeting of inflammation in hypertension: from novel mechanisms to translational perspective. *Cardiovasc Res*. 2021 Nov 22;117(13):2589-2609.

Nadar SK, Tayebjee MH, Messerli F, Lip GY. Target organ damage in hypertension: pathophysiology and implications for drug therapy. *Curr Pharm Des*. 2006;12(13):1581-92. 1.

Nadruz W. Myocardial remodeling in hypertension. *J Hum Hypertens*. 2015 Jan; 29(1):1-6.

Naito T, Ma LJ, Yang H, Zuo Y, Tang Y, Han JY, Kon V, Fogo AB. Angiotensin type 2 receptor actions contribute to angiotensin type 1 receptor blocker effects on kidney fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Mar;298(3): F683-91.

Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol*. 2018 Jul;15(7):387-407.

Namsolleck P, Recarti C, Foulquier S, Steckelings UM, Unger T. AT (2) receptor and tissue injury: therapeutic implications. *Curr Hypertens Rep*. 2014 Feb;16(2):416.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *Lancet*. 2021 Sep 11;398(10304):957-980.

Neto MA, Rascado RR, Bendhack LM. Receptores β -adrenérgicos no sistema cardiovascular Medicina, Ribeirão Preto, x simpósio brasileiro de fisiologia cardiovascular 39 (1): 3-12, jan./mar. 2006.

Neumann S, Huse K, Semrau R, Diegeler A, Gebhardt R, Bunatian GH, Scholz GH. Aldosterone and D-glucose stimulate the proliferation of human cardiac myofibroblasts in vitro. *Hypertension* 2002; 39:756–76.

Nilson EAF, Andrade RDCS, de Brito DA, de Oliveira ML. Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2018 [Costs attributable to obesity, hypertension, and diabetes in the Unified Health System, Brazil, 2018. Costos atribuibles a la obesidad, la hipertensión y la diabetes en el Sistema Único de Salud de Brasil, 2018]. *Rev Panam Salud Publica*. 2020 Apr 10;44: e 32.

Okamoto, K.; Aoki, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ J.* 1963, 27:282-93.

Okin PM, Devereux RB, Jern S, Kjeldsen SE, Julius S, Nieminen MS, Snapinn S, Harris KE, Aurup P, Edelman JM, Wedel H, Lindholm LH, Dahlöf B; LIFE Study Investigators. Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy during antihypertensive treatment and the prediction of major cardiovascular events. *JAMA.* 2004 Nov 17;292(19):2343-9.

Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cífková R, Dominiczak AF, Grassi G, Jordan J, Poulter NR, Rodgers A, Whelton PK. Hypertension. *Nat Rev Dis Primers.* 2018 Mar 22;4: 18014.

Oparil S, Zaman MA, Calhoun DA. Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med.* 2003 Nov 4;139(9):761-76.

Organização Mundial da Saúde. Global report on hypertension: the race against a silent killer. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT₂) receptor protein in rat kidney. *Hypertension.* 1997 Nov;30(5):1238-46.

Panza JA, Casino PR, Badar DM & Quyyumi AA Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. *Circulation* 87, 1475–1481 (1993).

Pelat M, Dessy C, Massion P, Desager JP, Feron O, Balligand JL. Rosuvastatin decreases caveolin-1 and improves nitric oxide-dependent heart rate and blood pressure variability in apolipoprotein E^{-/-} mice in vivo. *Circulation.* 2003; 107:2480-2486.

Pignatello, R.; Spampinato, L.; Sorrenti, V.; Di Giacomo, G.; McGuire, J. J.; Russell, C. A.; Puglisi, G.; Toth, I. Lipophilic methotrexate conjugates with antitumor activity. *Eur J. Pharm. Sci.* 2000 May;10(3):237-45.

Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res.* 1998 Jul;39(1):77-88.

Pontes MRN, Leães PE. Remodelamento Ventricular: dos Mecanismos Moleculares e Celulares ao Tratamento. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul* (2004)

Qayyum MA, Fatani JA, el-Badawi MG. Partial degeneration of autonomic nerves of the heart of methotrexate-treated guinea pigs. *Acta Anat (Basel)*. 1988;131(1):52-5.

Querejeta R, López B, González A, Sánchez E, Larman M, Martínez Ubago JL, Díez J. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. *Circulation*. 2004 Sep 7;110(10):1263-8.

Quereshi AI, Ezzeddine MA, Nasar A, et al. Prevalence of elevated blood pressure in 563 704 adult patients with stroke presenting to the ED in the United States. *Am J Emerg Med*. 2007; 25:32–8.

Reuter H, Jordan J. Status of hypertension in Europe. *Curr Opin Cardiol*. 2019 Jul;34(4):342-349.

Reyes-Lagos JJ, Ledesma-Ramírez CI, Hadamitzky M, Peña-Castillo MÁ, Echeverría JC, Lückemann L, Schedlowski M, Berg K, Wessel N, Pacheco-López G. Symbolic analysis of heart rate fluctuations identifies cardiac autonomic modifications during LPS-induced endotoxemia. *Auton Neurosci*. 2019 Nov; 221: 102577.

Rimoldi SF, Scherrer U, Messerli FH. Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen? *Eur Heart J*. 2014 May 14;35(19):1245-54.

Rodrigues DG, Covolan CC, Coradi ST, Barboza R, Maranhão RC. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. *J Pharm Pharmacol*. 2002 Jun;54(6):765-72.

Rodrigues, D. G.; Maria, D. A.; Fernandes, D. C.; Valduga, C. J.; Couto, R. D.; Ibanez, O. C.; Maranhão, R. C. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005;55(6):565-76.

Rodriguez-Iturbe B Autoimmunity in the Pathogenesis of Hypertension. *Hypertens*. (Dallas, Tex. 1979) 67, 477–83 (2016).

Rojo I, Millán-Aldaco D, Rincón-Heredia R, Martínez-Vieyra I, Rosales-García V, Aztatzi-Aguilar G, Pérez-Hernández N, Hernández-Cruz A, Cerecedo D. Altered thrombopoiesis in spontaneously hypertensive rats. *Sci Rep*. 2025 Nov 18;15(1):40565.

Rubattu S, Sciarretta S, Ciavarella GM, Venturelli V, De Paolis P, Tocci G, De Biase L, Ferrucci A, Volpe M. Reduced levels of N-terminal-proatrial natriuretic peptide in hypertensive patients with metabolic syndrome and their relationship with left ventricular mass. *J Hypertens*. 2007 Apr;25(4):833-9.

Ruskoaho HJ, Savolainen ER. Effects of long-term verapamil treatment on blood pressure, cardiac hypertrophy and collagen metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 1985 Jun;19(6):355-62.

Rust P, Ekmekcioglu C. Impact of Salt Intake on the Pathogenesis and Treatment of Hypertension. *Adv Exp Med Biol*. 2017;956:61-84.

Sabbah HN, Sharov VG, Lesch M, Goldstein S. Progression of heart failure: a role for interstitial fibrosis. *Mol Cell Biochem*. 1995 Jun 7-21;147(1-2):29-34.

Salemi, V. M.; Bilate, A. M.; Ramires, F. J.; Picard, M. H.; Gregio, D. M.; Kalil, J.; Neto, E. C.; Mady, C. Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters. *Eur J. Echocardiogr*. 2005;6(1):41-6.

Schiffrin EL. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. *Clin Sci (Lond)*. 2014 Feb;126(4):267-74.

Sciarretta S, Palano F, Tocci G, Baldini R, Volpe M. Antihypertensive treatment and development of heart failure in hypertension: a Bayesian network meta-analysis of studies in patients with hypertension and high cardiovascular risk. *Arch Intern Med*. 2011 Mar 14;171(5):384-94.

Sandoo A, van Zanten JJCSV, Metsios GS, Carroll D & Kitas GD The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc. Med*. 2010. J 4, 302–12.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:8258–8263.

Schmidt A. Insuficiência cardíaca diastólica e sistólica em pacientes hipertensos: diagnóstico e tratamento diferenciais. *Rev Bras Hipertens*. 2001 Oct-Dec;8:440-444.
Schmieder RE, Schrader J, Zidek W, et al. Subclinical albuminuria, microalbuminuria and proteinuria-accepted cardiovascular risk markers? *Dtsch Med Wochenschr*. 2006;131:2665–2671.

Schmieder RE. End organ damage in hypertension. *Dtsch Arztebl Int.* 2010 Dec;107(49):866-73.

Sen S, Hoffman GC, Stowe NT, Smeby RR, Bumpus FM. Erythrocytosis in spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest.* 1972 Mar;51(3):710-4.

Serrano-Ponz M et al. Temporal profiles of blood pressure, circulating nitric oxide, and adrenomedullin as predictors of clinical outcome in acute ischemic stroke patients. *Mol. Med. Rep.* 2016. 13, 3724–34.

Shecaira TP, Araujo AA, Dutra MRH, Ferreira MJ, Irigoyen MC, Gomes GN, De Angelis K. Exercise training plus enalapril treatment in male hypertensive rats: beneficial effects on the blood pressure variability and kidneys. *J Hypertens.* 2026 Mar 1;44(3):433-445.

Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009 May;30(5):636-45.

Sharma M, Frishman WH, Gandhi K. RESPeRATE: nonpharmacological treatment of hypertension. *Cardiol Rev.* 2011 Mar-Apr;19(2):47-51.

Sirvente, R. A.; Irigoyen, M. C.; Souza, L. E.; Mostarda, C.; La Fuente, R.N.; Candido, G. O.; Souza, P. R.; Medeiros, A.; Mady, C.; Salem, V. M Cardiac impairment evaluated by transesophageal echocardiography and invasive measurements in rats undergoing sinoaortic denervation. *PLoS One.* 2014 May 14;9(5):e87935.

Smith PA; Graham LN; Mackintosh AF; Stoker JB; Mary D Relationship between central sympathetic activity and stages of human hypertension. *Am. J. Hypertens* 2004. 17, 217–222.

Spieker LE, Flammer AJ, Lüscher TF. The vascular endothelium in hypertension. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(176 Pt 2):249-83.

Strassburger TL, Lee HC, Daly EM, Szczepanik J, Krasuski JS, Mentis MJ, et al. Interactive effects of age and hypertension on volumes of brain structures. *Stroke* 1997; 28:1410-1417.

Sugihara N, Genda A, Shimizu M, Suematu T, Kita Y, Horita Y, Takeda R. Quantitation of myocardial fibrosis and its relation to function in essential hypertension and hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Cardiol.* 1988 Nov;11(11):771-8.

Tan LB, Brilla C, Weber KT. Prevention of structural changes in the heart in hypertension by angiotensin converting enzyme inhibition. *J Hypertens Suppl.* 1992 Apr;10(1):S31-4.

Tanaka M et al. (1986) Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normals, hypertensive hearts, and hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J* 55: 575–581.

Task Force of the Latin American Society of Hypertension. Guidelines on the management of arterial hypertension and related comorbidities in Latin America. *Journal of Hypertension.* 2017;35(8):1529–45.

Taylor EB, Sasser JM, Maeda KJ, Ryan MJ. Expansion of regulatory T cells using low-dose interleukin-2 attenuates hypertension in an experimental model of systemic lupus erythematosus. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2019 Nov 1;317(5):F1274-F1284.

Te Riet L, van Esch JH, Roks AJ, van den Meiracker AH, Danser AH. Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circ Res.* 2015 Mar 13;116(6):960-75.

Teles MC, Oliveira Portes AM, Campos Coelho BI, Resende LT, Isoldi MC. Cardiac changes in spontaneously hypertensive rats: Modulation by aerobic exercise. *Prog Biophys Mol Biol.* 2023 Jan;177:109-124.

Thireau J, Zhang BL, Poisson D, Babuty D. Heart rate variability in mice: A theoretical and practical guide. *Exp Physiol.* 2008;93:83-94.

Timms PM, Wright A, Maxwell P, Campbell S, Dawnay AB, Srikanthan V. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels are elevated in essential hypertension and related to left ventricular hypertrophy. *Am J Hypertens.* 2002 Mar;15(3):269-72.

Tsutsumi K, Saavedra JM. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *Am J Physiol.* 1991 Jul;261(1 Pt 2):R209-16.

Valduga CJ, Fernandes DC, Lo Prete AC, Azevedo CH, Rodrigues DG, Maranhão RC. Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. *J Pharm Pharmacol.* 2003 Dec;55(12):1615-22.

Van Halm VP, Nurmohamed MT, Twisk JW, Dijkmans BA, Voskuyl AE. Disease-modifying antirheumatic drugs are associated with a reduced risk for cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a case control study. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8(5):R151.

Vapaatalo H, Mervaala E, Nurminen ML. Role of endothelium and nitric oxide in experimental hypertension. *Physiol Res*. 2000;49(1):1-10.

Varagic J, Ahmad S, Nagata S, Ferrario CM. ACE2: angiotensin II/angiotensin-(1-7) balance in cardiac and renal injury. *Curr Hypertens Rep*. 2014 Mar;16(3):420.

Varo N, Etayo JC, Zalba G, Beaumont J, Iraburu MJ, Montiel C, Gil MJ, Monreal I, Díez J. Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1999 Jan;17(1):107-14.

Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2012 Mar 13;13(4):227-32.

Wang ZQ, Moore AF, Ozono R, Siragy HM, Carey RM. Immunolocalization of subtype 2 angiotensin II (AT₂) receptor protein in rat heart. *Hypertension*. 1998 Jul; 32(1):78-83.

Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol*. 2000 Jul;15(4):264-72.

Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE Jr, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, MacLaughlin EJ, Muntner P, Ovbiagele B, Smith SC Jr, Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA Sr, Williamson JD, Wright JT Jr. 2017ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*. 2018 Jun;71(6):1269-1324.

Wilck N, Matus MG, Kearney SM, Olesen SW, Forslund K, Bartolomaeus H, Haase S, Mähler A, Balogh A, Markó L, Vvedenskaya O, Kleiner FH, Tsvetkov D, Klug L, Costea PI, Sunagawa S, Maier L, Rakova N, Schatz V, Neubert P, Frätzer C, Krannich A, Gollasch M, Grohme DA, Côte-Real BF, Gerlach RG, Basic M, Typas A, Wu C, Titze JM, Jantsch J, Boschmann M, Dechend R, Kleinewietfeld M, Kempa S, Bork P, Linker RA, Alm EJ, Müller DN. Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. *Nature*. 2017 Nov 30;551(7682):585-589.

Williams A. S.; Pun, Y. L.; Amos, N.; Cooper, A. M.; Williams, B. D. The effect of liposomally conjugated methotrexate upon mediator release from human peripheral blood monocytes. *Br. J. Rheumatol*. 1995 Mar;34(3):241-5.

Wollert KC, Drexler H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999 Sep;43(4):838-49.

Woodard GE, Rosado JA. Natriuretic peptides in vascular physiology and pathology. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2008;268:59-93

Xu JP, Zeng RX, Zhang YZ, Lin SS, Tan JW, Zhu HY, Mai XY, Guo LH, Zhang MZ. Systemic inflammation markers and the prevalence of hypertension: A NHANES cross-sectional study. *Hypertens Res*. 2023 Apr;46(4):1009-1019.

Yu M et al. Antihypertensive effect of glucagon-like peptide 1 in Dahl salt-sensitive rats. *J. Hypertens* 2003. 21, 1125–1135.

Zervoudaki A, Economou E, Stefanadis C, Pitsavos C, Tsioufis K, Aggeli C, Vasiliadou K, Toutouza M, Toutouzas P. Plasma levels of active extracellular matrix metalloproteinases 2 and 9 in patients with essential hypertension before and after antihypertensive treatment. *J Hum Hypertens*. 2003 Feb;17(2):119-24.

Zhang Z, Zhao L, Zhou X, Meng X, Zhou X. Role of inflammation, immunity, and oxidative stress in hypertension: New insights and potential therapeutic targets. *Front Immunol*. 2023 Jan 10;13:1098725.

Zhong J, Basu R, Guo D, Chow FL, Byrns S, Schuster M, Loibner H, Wang XH, Penninger JM, Kassiri Z, Oudit GY. Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. *Circulation*. 2010 Aug 17;122(7):717-28, 18 p following 728.

Zhou ZH & Bubien JK Nongenomic regulation of ENaC by aldosterone. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 281, C1118–30 (2001).

Zimmerman D, Burns KD. Angiotensin-(1-7) in kidney disease: a review of the controversies. *Clin Sci (Lond)*. 2012 Sep;123(6):333-46..