

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CARVACROL (2-METIL-5-(1-METILETIL)-FENOL) SOBRE AS ALTERAÇÕES
CARDÍACAS E RENAIIS EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

VIVIANE SILVA LIMA

JOÃO PESSOA

2022

VIVIANE SILVA LIMA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CARVACROL (2-METIL-5-(1-METILETIL)-FENOL) SOBRE AS ALTERAÇÕES CARDÍACAS E RENAIIS EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde

da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em produtos naturais e sintéticos bioativos.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

João Pessoa

2022




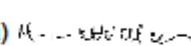
PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos


Ata da 463ª (quadringentésima sexagésima terceira) Dissertação de Mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos Viviane Silva Lima, candidata ao Título de "Mestre" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às nove horas (09h00) do dia vinte e nove de agosto do ano de dois mil e vinte e dois (29/08/2022), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <https://meet.google.com/paa-gexr-xcz>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Viviane Silva Lima**, candidata ao Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Enéas Ricardo de Moraes Gomes, Ph.D em Fisiologia, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, Ph.D em Farmacologia, e Isac Almeida de Medeiros, Ph.D em Farmacologia dos Medicamentos Cardiovasculares. Sendo todos, integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o Presidente da Comissão, professor Isac Almeida de Medeiros, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Viviane Silva Lima**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Avaliação do efeito do carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil)-fenol) sobre as alterações cardíacas e renais em ratos espontaneamente hipertensos". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, a candidata foi arguida pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADA. Em face da aprovação, declarou o Presidente achar-se a examinada **Viviane Silva Lima** legalmente habilitada a receber o Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros (Orientador) 

Prof.ª Dr.ª Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz (Examinadora) 

Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes (Examinador) 

Viviane Silva Lima (Discente) 



Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732a Lima, Viviane Silva.
Avaliação do efeito do carvedilol
(2-metil-5-(1-metiletil)-fenol) sobre as alterações
cardíacas e renais em ratos espontaneamente hipertensos
/ Viviane Silva Lima. - João Pessoa, 2022.
100 f. : il.

Orientação: Isac Almeida de Medeiros.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Hipertensão. 2. Ratos espontaneamente
hipertensos. 3. Danos em órgãos-alvo. 4. Estresse
oxidativo. 5. Carvedilol. I. Medeiros, Isac Almeida de.
II. Título.

UFPB/BC CDU 616.12-008.331.1(043)

Elaborado por WALQUELINE DA SILVA ARAUJO - CRB-15/514

Dedicatória

***Aos meus pais, Maria da Penha e Sérgio, que
foram os principais responsáveis por me fazerem
chegar até aqui, por toda doação e exemplo.***

Agradecimientos

AGADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por todas as bênçãos alcançadas, por me dar forças e coragem para lutar pelo que eu acredito, por me permitir viver meus sonhos todos os dias.

À minha família, pela torcida e admiração, por serem meus exemplos de dignidade e luta, por serem o reflexo do amor de Deus na minha casa, pelo incentivo em minhas escolhas, pela compreensão nos momentos que eu precisei estar ausente e seu infinito amor.

Ao meu melhor amigo e companheiro, Pablo Luiz, por ser um porto seguro nos meus momentos de dúvida, por todo amor, carinho, paciência no decorrer dessa jornada. Obrigada pelo companheirismo e compreensão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros, pelos ensinamentos acadêmicos, por ter me concedido a oportunidade de compartilhar de seus valiosos conhecimentos; pelos anos de orientação e por ser um exemplo de profissional. Minha gratidão será eterna.

Aos professores Dr. Robson Veras e Dr^a. Islânia Giselia, pela disposição em sempre ajudar, pelos conselhos para o aperfeiçoamento da pesquisa e do amadurecimento acadêmico e profissional.

As minhas companheiras de laboratório, Ana Caroline, Tays Amanda e Alinne Villar, nesses anos compartilhamos nossos momentos felizes e complicados, mas sempre houve apoio, disponibilidade, atenção e carinho.

Ao Prof. Dr. Adriano Francisco Alves, pela colaboração no processamento das amostras para análise histológica que foi fundamental para o trabalho.

Ao professor Enéas Ricardo, a Valério Vasconcelos por toda disponibilidade na realização dos experimentos de ecocardiografia.

A todos os integrantes que estão ou passaram pelo laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Tays Amanda, Alinne Vilar, Ana Caroline Meneses, Arthur Pontes, Mathania Almeida, Júlio César, Javanyr Frederico, Larisse Virgolino, Evyllen Myllena, Thays Trajano, Adhonias Correia e Maria Eduarda, por estarem sempre dispostos a ajudar e tirar dúvidas, pessoas admiro e tenho um enorme carinho.

Aos amigos da pós-graduação: Ana Caroline e Francisco Júnior, os meus agradecimentos pela torcida, amizade e momentos de descontração.

Aos colegas das turmas de mestrado do PgPNSB, pelos momentos compartilhados.

Aos professores do PgPNSB, com os quais tive a oportunidade de aprender, agradeço os conhecimentos compartilhados.

À Caroline Manguiera e Nilmar Nincia, secretárias do programa de PgPNSB, pelo auxílio e por sempre estarem dispostas a nos receber, agradeço pela paciência e dedicação na condução do trabalho.

À José Crispim Duarte e à Roberta Nunes Parentoni, pela condução da Unidade de Produção Assnimal (UPA) do Ipefarm.

Aos funcionários Luís C. Silva e Lindenberg, pelo trabalho na UPA e no Lapen, respectivamente. Agradeço a dedicação no trabalho no Biotério e no cuidado aos animais.

À Mônica Rodrigues da Silva, pela disponibilidade e dedicação em nos ajudar sempre que necessário, desempenhando sua função de forma excelente, mantendo a limpeza e organização do nosso local de trabalho.

Aos meus amigos, Aline Matilde, Ana Caroline, David Henrique e Jessielly Tuane, por estarem sempre presentes durante esta trajetória, dividindo cada momento, seja ele bom ou ruim, tornando os dias mais fáceis e os problemas menos pesados, obrigada pelo amor e pela cumplicidade.

Aos professores Margareth de Fátima, Enéas Ricardo, por terem aceitado participar da banca examinadora e contribuir com este trabalho. Agradeço também as professoras Marcia Regina e Fabíola Fialho, por terem aceitado compor a banca como membros suplentes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico-científico por meio do portal Periódicos Capes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

À Universidade Federal da Paraíba, pelo apoio institucional.

À todos que, direta ou indiretamente contribuíram nessa caminhada para a realização deste trabalho como base para conquista desse sonho.

Obrigada

Oliviane Silva Lima

**“Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor,
o seu Deus, estará com você por onde você andar”
(Josué 1:6-9)**

Resumo

LIMA, V. S. **Avaliação do efeito do carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil)-fenol) sobre as alterações cardíacas e renais em ratos espontaneamente hipertensos.** 2022. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). PgPNSB/CCS/UFPB. 2022.

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica, é uma doença cardiovascular crônica, caracterizada por um aumento sustentado da pressão arterial e está associada a prejuízos progressivos na função e estrutura de órgãos-alvo, como o coração e o rim, que sofrem alterações estruturais e funcionais. O desenvolvimento da hipertensão tem sido associado, com o estresse oxidativo, um mecanismo que causa lesão tecidual em múltiplos sistemas e órgãos, afetando também os órgãos-alvo da hipertensão. Dessa forma, buscar alternativas de substâncias que possuam atividade anti-hipertensiva e antioxidantes, e que melhorem os danos nos órgãos-alvo da hipertensão, devem ser exploradas. Neste contexto, o carvacrol, um monoterpene fenólico, presente em algumas plantas aromáticas, apresenta dentre as suas propriedades importantes a atividade vasorelaxante, anti-hipertensiva e antioxidante. Diante disto, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com carvacrol nas alterações cardíacas e renais em ratos espontaneamente hipertensos. Os animais foram divididos em cinco grupos: controle normotenso wistar kyoto (WKY-CTL) e hipertenso (SHR-CTL); e hipertensos tratados com carvacrol 50 mg/kg (SHR-C50), carvacrol 100 mg/kg (SHR-C100) e resveratrol 10 mg/kg (SHR-RE10). Todos os ratos foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante vinte e oito dias. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo CEUA-UFPB nº 6638150621. O tratamento não afetou o peso dos animais ao longo dos vinte e oito dias. No ensaio de medida indireta de pressão arterial, os grupos SHR-C50, SHR-C100 e SHR-RE10 tiveram as pressões arteriais sistólicas reduzidas em relação ao início do tratamento, quando comparados ao SHR-CTL. O carvacrol (50 mg/kg) conseguiu reduzir índice de massa do coração, quando comparado ao SHR-CTL. Através do ecocardiograma foi possível observar que o carvacrol não induziu modificações estruturais no coração. O eletrocardiograma, demonstrou que a duração do intervalo QRS do grupo SHR-CTL foi superior em relação ao WKY, e o carvacrol não foi capaz de reverter a duração do intervalo QRS. A duração do intervalo QT não demonstrou diferença entre os grupos estudados. O grupo SHR-CTL apresentou um aumento no índice de massa renal quando comparado ao WKY-CTL. Entretanto, o tratamento com carvacrol não conseguiu reduzir esse índice. Nos ensaios de ureia e creatinina plasmática, os animais dos grupos avaliados não apresentaram diferenças de creatinina. Contudo, a ureia foi aumentada no grupo SHR-CTL quando comparado ao WKY-CTL, e o carvacrol conseguiu reduzir este parâmetro, quando comparados ao SHR-CTL. Entretanto, o tratamento com resveratrol diminuiu as concentrações de ureia plasmática em comparação ao SHR-CTL. Os grupos hipertensos apresentaram maior deposição de colágeno no tecido cardíaco e no rim. O tratamento do carvacrol e resveratrol conseguiu reduzir a deposição de colágeno em relação ao SHR-CTL. Em cortes do tecido cardíaco e do rim, o carvacrol reduziu significativamente a fluorescência basal da sonda DHE, quando comparados ao SHR-CTL. Desta forma, estes resultados demonstram que o tratamento com carvacrol foi eficiente em reduzir a pressão arterial, além de melhorar a fibrose cardíaca e renal, a função renal, e o estresse oxidativo.

Palavras-chave: Hipertensão. Danos em órgãos-alvo. Ratos espontaneamente hipertensos. Estresse oxidativo. Carvacrol.

Abstract

LIMA, V. S. **Evaluation of the effect of carvacrol (2-methyl-5-(1-methylethyl)-phenol) on cardiac and renal changes in spontaneously hypertensive rats.** 2022. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). PgPNSB/CCS/UFPB. 2022.

ABSTRACT

Systemic arterial hypertension is a chronic cardiovascular disease characterized by a sustained increase in blood pressure and is associated with progressive damage to the function and structure of target organs, such as the heart and kidney, which undergo structural and functional changes. The development of hypertension has been associated with oxidative stress, a mechanism that causes tissue damage in multiple systems and organs, also affecting the target organs of hypertension. Thus, seeking alternatives for substances that have antihypertensive and antioxidant activity, and that improve the damage to the target organs of hypertension, should be explored. In this context, carvacrol, a phenolic monoterpene, present in some aromatic plants, presents among its important properties the vasorelaxant, antihypertensive and antioxidant activity. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of treatment with carvacrol on cardiac and renal changes in spontaneously hypertensive rats. The animals were divided into five groups: normotensive control wistar kyoto (WKY-CTL) and hypertensive (SHR-CTL); and hypertensive patients treated with carvacrol 50 mg/kg (SHR-C50), carvacrol 100 mg/kg (SHR-C100) and resveratrol 10 mg/kg (SHR-RE10). All rats were treated orally once a day for twenty-eight days. The experimental protocols were approved by CEUA-UFPB nº 6638150621. The treatment did not affect the weight of the animals during the twenty-eight days. In the indirect blood pressure measurement trial, the SHR-C50, SHR-C100 and SHR-RE10 groups had reduced systolic blood pressures compared to the start of treatment, when compared to the SHR-CTL. Carvacrol (50 mg/kg) was able to reduce the heart mass index when compared to SHR-CTL. Through the echocardiogram, it was possible to observe that carvacrol did not induce structural changes in the heart. The electrocardiogram showed that the duration of the QRS interval in the SHR-CTL group was longer than in the WKY group, and carvacrol was not able to reverse the duration of the QRS interval. The duration of the QT interval showed no difference between the studied groups. The SHR-CTL group showed an increase in renal mass index when compared to the WKY-CTL. However, treatment with carvacrol failed to reduce this index. In the urea and plasma creatinine assays, the animals of the evaluated groups did not show differences in creatinine. However, urea was increased in the SHR-CTL group when compared to the WKY-CTL, and carvacrol was able to reduce this parameter when compared to the SHR-CTL. However, treatment with resveratrol decreased plasma urea concentrations compared to SHR-CTL. The hypertensive groups showed higher collagen deposition in cardiac tissue and kidney. Carvacrol and resveratrol treatment was able to reduce collagen deposition compared to SHR-CTL. In heart and kidney tissue sections, carvacrol significantly reduced the basal fluorescence of the DHE probe when compared to SHR-CTL. Thus, these results demonstrate that treatment with carvacrol was efficient in reducing blood pressure, in addition to improving cardiac and renal fibrosis, renal function, and oxidative stress.

Keywords: Hypertension. Target organ damage. Spontaneously hypertensive rats. Oxidative stress. Carvacrol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Plantas que possuem carvacrol em seu óleo essencial.....	39
Figura 2 - Estrutura molecular do carvacrol.	40
Figura 3 - Esquema dos grupos utilizados para a avaliação do efeito do carvacrol sobre as alterações cardíacas e renais.	47
Figura 4 - Delineamento experimental do tratamento.	48
Figura 5 - Representação esquemática do eletrocardiograma.	50
Figura 6 - Representação da imagem gerada durante a avaliação ecocardiográfica.....	51
Figura 7 - Medida da pressão arterial sistólica em relação início e final de tratamento.....	56
Figura 8 - Peso corporal dos diferentes grupos experimentais no início e final do tratamento.....	57
Figura 9 - Efeito do carvacrol sobre a hipertrofia cardíaca.....	58
Figura 10 - Efeito do carvacrol sobre a hipertrofia renal.	59
Figura 11 - Efeito do carvacrol sobre a frequência cardíaca.	60
Figura 12 - Efeito do carvacrol sobre parâmetros eletrocardiográficos.	61
Figura 13 - Efeito do carvacrol sobre níveis séricos de ureia.....	64
Figura 14 - Efeito do carvacrol sobre níveis séricos de creatinina.	65
Figura 15 - Efeitos do carvacrol no coração em HE.....	66
Figura 16 - Imagens representativas da deposição de matriz extracelular no coração.	66
Figura 17 – Área de deposição de matriz extracelular.....	67
Figura 18 - Efeitos do carvacrol no rim em HE.	68
Figura 19 - Imagens representativas da área de deposição da matriz extracelular no rim.....	69
Figura 20 – Área de deposição da matriz extracelular renal.	69
Figura 21 - Efeito do carvacrol sobre a intensidade de fluorescência do DHE no coração.	71
Figura 22 - Efeito do carvacrol sobre a intensidade de fluorescência do DHE no rim.....	73
Figura 23 - Efeito do carvacrol sobre parâmetros ecocardiográficos.	99
Figura 24 - Índice de massa ventricular esquerda.	101

Figura 25 - Efeito do carvacrol sobre a fração de ejeção e fração de encurtamento.....	101
---	-----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição da solução salina fisiológica.....	46
Quadro 2 - Composição da solução PBS.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPM	Batimento por minuto
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
DC	Débito cardíaco
DCV	Doenças cardiovasculares
DHE	Di-hidroetídio
DIVED	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole
DIVES	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole
E. P. M.	Erro padrão da média
ECG	Eletrocardiograma
EO	Estresse oxidativo
EPPD	Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESIVD	Espessura do septo interventricular na diástole
FC	Frequência cardíaca
GSH	Glutathione redutase
GST	Glutathione S-transferase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCIO	Ácido hipocloroso
HE	Hematoxilina e eosina
HO•	Radical hidroxila
HO₂	Radical peridroxila
HVE	Hipertrofia do ventrículo esquerdo
IC	Índice de confiança
IPeFarm	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
MEC	Matriz extracelular
MVE	Massa ventricular esquerda
NaCl	Cloreto de sódio

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida
NaH₂PO₄ H₂O	Fosfato de sódio monobásico
NaHPO₄ 2H₂O	Fosfato de sódio bibásico
NAM	nicotinamida
NO⁺	Nitrosil
NO₂[·]	Dióxido nítrico de radical livre
O₂^{·-}	Ânion superóxido
O₂	Oxigênio singlete
O₃	Ozônio
OCT	Optimal Cutting Temperature, meio de inclusão
OE	Óleo essencial
ONOOH	Ácido peroxinitroso
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PgPNSB	Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
RE10	Ratos espontaneamente hipertensos tratados com 10 mg/kg/dia de resveratrol
ROONO	Alquilperoxinitrito
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SHR-C100	Ratos espontaneamente hipertensos tratados com 100 mg/kg/dia de carvacrol
SHR-C50	Ratos espontaneamente hipertensos tratados com 50 mg/kg/dia de carvacrol
SHR-CTL	Ratos espontaneamente hipertensos tratados com o veículo
SOD	Superóxido dismutase
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TM	Tricômio de Masson
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UPA	Unidade de produção animal
VDF	Volume diastólico final
VE	Ventrículo esquerdo
VS	Volume sistólico

VSF	Volume sistólico final
WKY	Ratos <i>Wistar Kyoto</i>
WKY-CTL	Ratos <i>Wistar Kyoto</i> tratados com o veículo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1 Hipertensão arterial sistêmica	27
2.2 Ratos espontaneamente hipertensos.....	29
2.3 Hipertensão e alterações cardíacas	30
2.4 Hipertensão e remodelamento renal	32
2.5 Estresse oxidativo	34
2.6 Estresse oxidativo e alterações cardíacas e renais	36
2.7 Carvacrol	38
3. OBJETIVOS	43
3.1 Geral	43
3.2 Específicos	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Tipo de estudo e considerações éticas.....	45
4.3 Substâncias utilizadas.....	45
4.4 Obtenção e preparação das soluções de carvacrol	46
4.5 Soluções.....	46
4.6 Delineamento experimental.....	47
4.7 Medida indireta da pressão arterial sistólica	48
4.8 Eletrocardiograma	49
4.9 Ecocardiograma transtorácico	50
4.10 Avaliação dos indicadores plasmáticos de função renal	52
4.11 Isolamento de órgãos	52
4.12 Histologia de órgãos.....	53
4.13 Avaliação da produção de ânions superóxidos (O_2^-) <i>in situ</i>	53
4.14 Análise estatística.....	54
5. RESULTADOS	56
5.1 Efeito do carvacrol sobre a pressão arterial sistólica em ratos espontaneamente hipertensos	56
5.2 Avaliação do peso corporal dos animais durante o tratamento com carvacrol.....	57

5.3 Efeito do carvedilol na hipertrofia cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos	58
5.4 Efeito do carvedilol na hipertrofia renal em ratos espontaneamente hipertensos	59
5.5 Eletrocardiograma	60
5.2 Efeito do carvedilol sobre a função ventricular esquerda	61
5.3 Efeito do carvedilol sobre os níveis de ureia e creatinina séricos....	64
5.4 Avaliação do remodelamento do tecido cardíaco	65
5.5 Avaliação do remodelamento do rim de rato espontaneamente hipertensos	67
5.10 Efeito do carvedilol sobre o estresse oxidativo no coração	70
5.11 Efeito do carvedilol sobre o estresse oxidativo no rim	72
6. DISCUSSÃO.....	75
7. CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXOS.....	97

1 Introdução

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica de etiologia variada, caracterizada por um aumento sustentado da pressão arterial (BARROSO *et al.*, 2021). A hipertensão é um fator de risco importante para o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares e possui altas taxas de morbidade e mortalidade (FRYAR *et al.*, 2017; WHELTON, 2019)

Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da hipertensão essencial são complexos e na maioria dos casos a doença não possui causa aparente. Uma pequena porcentagem apresenta causa identificável, e pode ser classificada como hipertensão secundária (MILLS; STEFANESCU; HE, J., 2020; RIMOLDI; SCHERRER; MESSERLI, 2014).

A hipertensão está associada a danos progressivos na função e estrutura de órgãos-alvo, dentre os principais afetados são o cérebro, coração e rim (MESSERLI; RIMOLDI; BANGALORE, 2017; WU *et al.*, 2017). Apesar do controle da pressão arterial ser importante, estudos demonstram que apenas o controle da pressão arterial não é suficiente para proteger os órgãos-alvo dos danos provenientes da hipertensão. Dessa forma, devem ser direcionado esforços para à proteção de órgãos-alvo e reduzir a morbidade e mortalidade das complicações associadas a sobrecarga de pressão (XIONG *et al.*, 2021).

A hipertensão está associada a prejuízos progressivos na função e estrutura de diversos órgãos, como o cérebro, o coração e o rim (MESSERLI; RIMOLDI; BANGALORE, 2017).

O coração sofre um processo de remodelamento estrutural e funcional em resposta a sobrecarga de pressão. Inicialmente, as alterações são uma resposta adaptativa do coração para diminuir o estresse hemodinâmico. Entretanto, a elevação crônica de pressão leva ao remodelamento cardíaco patológico. Dentre as alterações associadas a hipertensão, há o aumento da massa do coração, característico da hipertrofia cardíaca, e a deposição de matriz extracelular, proliferação de constituintes fibroblastos e células inflamatórias, estimulando a heterogeneidade tecidual desorganizada e prejuízos funcionais (GOLDSMITH; BORG, 2002; PORTER; TURNER, 2009; SOUDERS *et al.*, 2012; WORONIECKI *et al.*, 2017).

O rim, órgão importante no controle da pressão arterial, também sofre prejuízos estruturais e funcionais em resposta aos níveis elevados de pressão arterial. Dentre as alterações renais relacionadas à hipertensão, há perdas progressivas nas propriedades autorreguladoras da microcirculação renal, inflamação renal, hipertrofia tubular, além de alteração dos componentes da matriz extracelular e fibrose renal (LIU, W. *et al.*, 2017; MENNUNI *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2021).

A hipertensão, já tem sido associada com o estresse oxidativo (KATTOOR *et al.*, 2017; SAMMAN TAHHAN *et al.*, 2017; SENONER; DICHTL, 2019). As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, são produzidas por processos fisiológicos normais e desempenham papéis importantes na sinalização celular e na homeostase tecidual. No entanto, a geração excessiva pode causar danos a múltiplos órgãos e sistemas (SU *et al.*, 2019). Estudos já demonstram efeitos benéficos no coração e nos rins, da diminuição do estresse oxidativo, como a diminuição da inflamação e fibrose, melhorando a funcionalidade desses órgãos (SCHNEIDER *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2020).

Dessa forma, buscar alternativas de substâncias que possuam atividade anti-hipertensiva, e paralelamente, melhorem os danos nos órgãos-alvo da hipertensão, como substâncias antioxidantes, devem ser exploradas. Neste sentido, o carvacrol, um monoterpene fenólico, presente em algumas plantas aromáticas, apresenta dentre as suas propriedades importantes a atividade vasorelaxante (DANTAS, 2014), anti-hipertensiva (DIAS *et al.*, 2022) e antioxidante (LEE *et al.*, 2015). Diante disto, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com carvacrol nas alterações cardíacas e renais em ratos espontaneamente hipertensos.

2 Fundamentação Teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Hipertensão arterial sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica crônica não transmissível, cuja as características são definidas pelo aumento sustentado da pressão arterial (PA). com níveis de PA sistólica superior ou igual a 140 mmHg e/ou PA diastólica maior ou igual a 90 mmHg (BARROSO *et al.*, 2021).

As taxas de morbidade e mortalidade são elevadas, afetando cerca de 1,2 bilhão de indivíduos em todo mundo, desses apenas 14% a têm sob controle, e a prevalência aumenta significativamente com a idade, causando a morte prematura de milhões de pessoas por ano (WHO, 2022). No Brasil, cerca de 21,4% (IC 95% 20,8-22,0) dos adultos possuem hipertensão (IBGE, 2015).

A pressão arterial pode ser definida como a pressão que o sangue exerce contra as paredes dos vasos arteriais, a partir de cada ciclo de contração cardíaco, onde há o impulso de sangue para o sistema arterial sistêmico. Essa propulsão confere pressão na parede vascular (LIFTON; GHARAVI; GELLER, 2001; OPARIL *et al.*, 2019).

A pressão máxima mensurada durante um ciclo cardíaco é a pressão arterial sistólica (PAS), que corresponde à pressão nas artérias durante sístole ventricular esquerda, gerada através da pressão que o sangue exerce nas paredes arteriais quando o coração se contrai. Enquanto, valor mínimo de pressão arterial é a pressão arterial diastólica (PAD), que corresponde à pressão nas artérias durante a diástole ventricular esquerda, gerada através do relaxamento do músculo cardíaco (LIFTON; GHARAVI; GELLER, 2001; OPARIL *et al.*, 2019).

A diferença entre a PAS e PAD é definida como pressão de pulso (PP) (HOMAN; BORDES; CICHOWSKI, 2022). Por ser pulsátil, a PA é representada por um valor estimado a partir da soma da PAD mais um terço da PP, o que leva à pressão arterial média (PAM) (PORTH, 2011).

A conservação de níveis normais de PA, depende de variações do DC e/ou da resistência vascular periférica total. As Alterações no débito cardíaco (DC) resultam de modificações da frequência cardíaca e/ou do volume de ejeção

durante a sístole. A resistência vascular periférica, resulta de alterações no tônus vascular. (LIFTON; GHARAV; GELLER; 2001; OPRAIL *et al*, 2019).

A manutenção dos níveis fisiológicos da PA envolve uma interação complexa de vários elementos de um sistema neuro-humoral e parácrinos integrados. No controle de curto prazo da PA, os principais mecanismos de controle envolvem reflexos neurais, originados nos barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares, mediando respostas do sistema nervoso autônomo para promover ajustes rápidos da PA. Por outro lado, o controle em longo prazo é em grande parte atribuído aos rins, por meio da ação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (HALL; HALL, 2018)

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela hipertensão são complexos. Existem muitos fatores de risco potencialmente modificáveis para HAS, como o sobrepeso, sedentarismo, elevada ingestão de sódio e tabagismo. Porém, não são apenas os fatores de risco que são importantes no desenvolvimento da HAS. Vários fatores fisiopatológicos são cruciais, como a ativação inadequada do SRAA, estresse oxidativo, inflamação de baixo grau, vasodilatação mediada por insulina, ativação excessiva do sistema nervoso simpático e manipulação anormal de sódio pelo rim (KUĆMIERZ *et al.*, 2021; MANRIQUE *et al.*, 2009).

Apesar de serem diversos fatores etiogênicos que leva ao desenvolvimento e estabelecimento da HAS, em 5-10% dos casos, a hipertensão apresenta causa identificável, sendo denominada de hipertensão secundária ou adquirida. Enquanto 90-95% dos casos, a doença não possui causa aparente, designada de hipertensão primária ou essencial (BARROSO *et al.*, 2021; MILLS; STEFANESCU; HE, J., 2020; RIMOLDI; SCHERRER; MESSERLI, 2014).

Dentre as causas da hipertensão adquirida destacam-se: apnéia obstrutiva do sono, excesso de mineralocorticoides (aldoesteronismo primário), excesso de glicocorticoides (síndrome de Cushing), excesso de catecolaminas (feocromocitoma), doença do parênquima renal e estenose da artéria renal (JORDAN; KURSCHAT; REUTER, 2018; RIMOLDI; SCHERRER; MESSERLI, 2014).

A hipertensão arterial essencial (idiopática ou primária), a qual caracteriza-se por uma elevação da pressão sanguínea, sem causa aparente, e

está associada a vários fatores de risco como: predisposição genética, sedentarismo, obesidade, com uma etiologia multifatorial de ambiente genético (KUĆMIERZ *et al.*, 2021; RIMOLDI; SCHERRER; MESSERLI, 2014)

Essa condição prevalente em todo o mundo, é o fator de risco evitável mais comum para doenças cardiovasculares (DCV), incluindo doença coronariana, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, fibrilação atrial e doença arterial periférica, doença renal crônica e comprometimento cognitivo. Dessa forma, os pacientes com hipertensão devem realizar o controle adequado da PA (OPRAIL *et al.*, 2019).

A HA já é associada a danos crônicos a diversos órgãos, como o cérebro, olhos e rins (SIEVERS; ECKARDT, 2019; WILLIAMS *et al.*, 2018). A estrutura e função desses órgãos torna-se prejudicada com a hipertensão de longa data (MESSERLI; RIMOLDI; BANGALORE, 2017).

Modelos experimentais de hipertensão foram desenvolvidos com o objetivo de elucidar os mecanismos fisiopatológicos do desenvolvimento e manutenção da hipertensão. Os animais podem ser submetidos a indução da hipertensão por meio de procedimentos cirúrgicos ou de tratamento com substâncias específicas. Além disso, linhagens de animais geneticamente hipertensos foram planejadas para mimetizar a hipertensão essencial humana. Neste contexto, destacam-se os animais espontaneamente hipertensos (SHR), que compartilham características comuns à hipertensão essencial humana (PINTÉROVÁ; KUNES; ZICHA, 2011).

2.2 Ratos espontaneamente hipertensos

Modelos animais destinados a pesquisa são ferramentas valiosas para entender a fisiopatologia e desenvolver intervenções terapêuticas para doenças que afligem humanos e animais. Neste sentido, sendo a hipertensão um importante problema de saúde pública, vários modelos de hipertensão experimental foram criados principalmente para imitar as respostas hipertensivas observadas em humanos. Dentre os diversos modelos, destaca-se os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (LEONG; NG; JAARIN, 2015).

O SHR é o modelo animal mais amplamente utilizado de hipertensão essencial humana, além de ser empregado para estudos de várias condições

como insuficiência cardíaca, hipertrofia cardíaca, déficit de atenção e hiperatividade, diabetes e obesidade (HOLJAK *et al.*, 2022). A cepa de SHR foi desenvolvida por Okamoto e Aoki (1963), pesquisadores da Universidade de Kyoto no Japão, sem nenhuma intervenção fisiológica, farmacológica ou cirúrgica. Os animais desta cepa foram provenientes do cruzamento entre ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY), que estivessem com níveis elevados de pressão, resultando na instalação natural da hipertensão (DORNAS; SILVA, 2011; OKAMOTO; AOKI, 1963).

As alterações na pressão arterial nos animais SHR começam e ser observadas em torno da quarta à sexta semana de idade, e após a décima segunda semana de idade a PAM está aproximadamente 180-200 mmHg em comparação com 115-130 mmHg em ratos Wistar-Kyoto (PINTÉROVÁ; KUNES; ZICHA, 2011). Além disso, com a progressão da hipertensão, alterações estruturais no coração, que se associam à hipertrofia cardíaca progressiva, em resposta a sobrecarga cardíaca (DORNAS; SILVA, 2011).

Com o avanço da hipertensão, os animais SHR desenvolvem progressivamente alterações funcionais, estruturais e mecânicas nas paredes dos vasos sanguíneos e do coração. As alterações nos vasos sanguíneos incluem diminuição da luz arteriolar, mudanças nas propriedades mecânicas que envolvem aumento da rigidez vascular; a contratilidade muscular aumentada e, principalmente, disfunção endotelial, enquanto as alterações cardíacas se associam à hipertrofia cardíaca progressiva, em resposta a sobrecarga cardíaca (DORNAS; SILVA, 2011; PINTÉROVÁ; KUNES; ZICHA, 2011; YU *et al.*, 2015).

2.3 Hipertensão e alterações cardíacas

A hipertensão está associada a prejuízos progressivos na função e estrutura do coração. (WU *et al.*, 2017). O coração sofre um remodelamento estrutural e funcional em resposta a uma variedade de sinais fisiológicos e patológicos. Tais alterações são classificadas patológicas quando são mediadas em resposta à hipertensão, inflamação, isquemia, lesão de isquemia/reperfusão, estresse biomecânico, excesso de ativação neuro-hormonal e excesso de pós-carga (WU, *et al.*, 2017).

O remodelamento cardíaco patológico é inicialmente invocado para reduzir o estresse da parede ventricular e preservar temporariamente a função da coração, eventualmente evoluindo para uma série de alterações desadaptativas que culminam em insuficiência cardíaca e morte (NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018).

Na maioria dos pacientes hipertensos, a hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE) e a disfunção ventricular, são as primeiras manifestações discerníveis de danos cardíacos (FU *et al.*, 2014; MESSERLI; RIMOLDI; BANGALORE, 2017).

A hipertrofia ventricular esquerda (HVE), é uma resposta típica à sobrecarga de pressão, ou a qualquer estado patológico que aumenta o estresse da parede cardíaca e marca uma resposta adaptativa para compensar as condições desfavoráveis (SOUDERS *et al.*, 2012). Quando a sobrecarga de pressão é mantida por longos períodos, a disfunção ventricular progredi, e o ventrículo esquerdo desenvolve um remodelamento concêntrico (aumento da massa cardíaca em detrimento do volume da câmara). A progressão da disfunção ventricular pode levar ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca hipertensiva (MESSERLI; RIMOLDI; BANGALORE, 2017a; NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018; SHIMIZU; MINAMINO, 2016).

O aumento da massa ventricular esquerda (MVE) é a principal característica da HVE, devido ao aumento da espessura da parede do VE ou a um aumento no tamanho do diâmetro da cavidade ou ambos. (WORONIECKI *et al.*, 2017). Na análise da MVE, utilizam-se as medidas da espessura diastólica da parede ventricular, do septo e da parede posterior, além das dimensões da cavidade do VE (KATZ *et al.*, 2010).

A fase de hipertrofia ventricular patológica, está relacionada a hipertrofia de cardiomiócitos, que normalmente está associado a um aumento da espessura mais do que em comprimento (WU *et al.*, 2017). Além disso, existe também uma alteração na expressão de genes, tais como os que codificam o peptídeo natriurético A e B, o gene da cadeia pesada de miosina, isoforma β do músculo cardíaco, α -actina do músculo esquelético, e genes que codificam proteínas de manipulação de Ca^{2+} (JCARRERO *et al.*, 2006; NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018).

A HVE também está associada a anormalidades de despolarização e repolarização ventricular, causando alterações no eletrocardiograma. As

principais alterações no ECG são o prolongamento na amplitude e duração do complexo QRS, além do prolongamento do intervalo QT (HANCOCK *et al.*, 2009). O complexo QRS no eletrocardiograma, refere-se despolarização ventricular, já o intervalo QT corresponde ao início do complexo QRS e o final da onda T (repolarização ventricular) (CHANG *et al.*, 2014; LI, S. *et al.*, 2022).

Ademais, as respostas hipertróficas, levam ao aumento da angiogênese, anormalidades da vasculatura coronariana, acúmulo progressivo da deposição de colágenos intersticial e perivascular (SOUDERS *et al.*, 2012). Outros fatores que estão associados ao remodelamento cardíaco, são a proliferação de constituintes não miócitos (fibroblastos, ativação de miofibroblastos, células endoteliais, células imunes e células musculares lisas), estimulando a heterogeneidade tecidual desorganizada e prejuízos funcionais (FAN *et al.*, 2012; GOLDSMITH; BORG, 2002; PORTER; TURNER, 2009; SOUDERS *et al.*, 2012).

2.4 Hipertensão e remodelamento renal

Tanto o coração quanto o rim são órgãos-alvo na hipertensão, e sua estrutura e função tornam-se gradualmente prejudicadas com a hipertensão de longa data (MESSERLI; RIMOLDI; BANGALORE, 2017a). O rim é um órgão importante para excretar resíduos e manter o equilíbrio de água e eletrólitos, desempenhando um importante papel essencial na regulação da PA (HAMM; HERING-SMITH, 2010; STOMPÓR; PERKOWSKA-PTASINSKA, 2020).

O controle da PA a longo prazo é em grande parte atribuído aos rins, por meio da ação do SRAA, e tem relação direta com a capacidade dos rins em realizar a excreção do sódio suficiente para manter um balanço deste íon em uma faixa normal. O sódio é um regulador crucial do volume sanguíneo e sua alta concentração sérica promove a retenção de líquidos, aumentando assim o volume sanguíneo, e, conseqüentemente a PA (MARTELLI, 2012; OPARIL, *et al.*, 2019).

Sob condições fisiológicas, a pressão intraglomerular é relativamente constante. Quando há um aumento de PA, a arteríola aferente faz a constrição adequada (mecanismo de autorregulação), protegendo o glomérulo da hipertensão e suavizando a diferença entre a PAS e PAD, protegendo o

glomérulo contra as alterações de PA (STOMPÓR; PERKOWSKA-PTASINSKA, 2020). A exposição do rim a níveis elevados de PA, causa perdas progressivas nas propriedades autorreguladoras da microcirculação renal, com consequente dilatação anormal da arteríola aferente e um aumento secundário da pressão intraglomerular em paralelo ao aumento de PA (MENNUNI *et al.*, 2014).

O aumento da pressão arterial nas estruturas glomerulares, causa estiramento e lesão endotelial, desenvolvendo lesões vasculares e glomerulares. Essas alterações hemodinâmicas ativam o sistema renina-angiotensina-aldosterona, a transcrição do fator nuclear κB (NFKB) e a síntese de fatores de crescimento profibróticos, sendo o principal deles o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (MENNUNI *et al.*, 2014; SIEVERS; ECKARDT, 2019).

A ativação do SRAA, promove a principalmente a produção de angiotensina II, e, além de efeitos positivos na regulação da pressão arterial, ela pode participar da progressão das lesões renais. As principais alterações mediadas pela angiotensina II envolvem a produção de MEC e fibrose renal, ativando muitas vias de sinalização intracelular, como cascatas mediadas por proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), TGF- β e pelo NFKB. Além disso, a angiotensina II estimula a migração de células inflamatórias e a produção de quimiocinas e induz a síntese de colágeno (SIEVERS; ECKARDT, 2019).

A síntese de fatores de crescimento profibróticos levam ao desenvolvimento de fibrose renal. A fibrose renal é caracterizada por ativação substancial de fibroblastos e produção associada a deposição excessiva da matriz extracelular no espaço intersticial, que se deve a um desequilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno. A fibrose renal, é um contribuinte comum para a progressão de várias doenças renais crônicas para insuficiência renal (LIU, W. *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2021).

Ademais, a hipertensão também pode provocar inflamação renal, hipertrofia tubular e alterações glomerulares, além de alteração dos componentes da MEC (HUANG, C. C. *et al.*, 2018; SUN, H. J., 2019). A hipertensão pode gradualmente levar à expansão glomerular, disfunção endotelial e alterações hemodinâmicas, como a perda da carga elétrica da membrana basal glomerular e seu espessamento e diminuição do número de

podócitos (NOGUEIRA; PIRES; OLIVEIRA, 2017). As alterações relacionadas a hipertensão leva à destruição do parênquima renal e perda progressiva da função renal (XIA; ENTMAN; WANG, Yanlin, 2013).

2.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é considerado o desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) com a capacidade antioxidante celular, promovendo lesão celular e dano tecidual (RAMACHANDRA *et al.*, 2021).

As EROs e as ERNs, são produzidas por processos fisiológicos normais e desempenham papéis importantes na sinalização celular e na homeostase tecidual. No entanto, a geração excessiva de EROs e ERNs produzem modificações nos componentes celulares, causando a morte celular, processo denominado de estresse oxidativo (SU *et al.*, 2019).

As EROs são, por definição, moléculas químicas contendo um átomo de oxigênio que, por meio de reações celulares e extracelulares, tornam-se mais reativas que o próprio oxigênio. As espécies reativas de oxigênio incluem não apenas a moléculas na forma radical centrados em oxigênio, mas também inclui derivados não radicais (POWERS; JACKSON, 2008). Os radicais livres de oxigênio, compreendem o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radicais hidroxila (OH^{\bullet}) e radicais peroxila (HO_2^{\bullet}), já os não radicais, compreendem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HClO$), ozônio (O_3) e o oxigênio singlete (O_2) (POUROVA *et al.*, 2010).

As ERNs, refere-se aos radicais de nitrogênio juntamente com outras moléculas reativas onde o centro reativo é nitrogênio. Eles são derivados da simples molécula de óxido nítrico (NO) sintetizada in vivo durante a conversão de L-arginina em L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase. As ERNs incluem dióxido nítrico de radical livre (NO_2^{\bullet}) e vários radicais não livres, como peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$) e sua forma protonada (ácido peroxinitroso, $ONOOH$), alquilperoxinitrito ($ROONO$) e nitrosil (NO^+) (ADAMS; FRANCO; ESTEVEZ, 2015; TAUFFENBERGER; MAGISTRETTI, 2021).

As fontes principais de espécies reativas são a cadeia respiratória mitocondrial e o complexo enzimático da nicotinamida adenina dinucleotídeo

fosfato reduzida (NADPH) (WEN, X. *et al.*, 2013). A produção dos radicais livres também pode ser realizada através de peroxissomos e enzimas, como a xantina oxidase, a citocromo P450 e lipoxigenases. Além disso, podem ser produzidas durante a resposta celular a xenobióticos ou citocinas liberadas como parte de um mecanismo de defesa (TAUFFENBERGER; MAGISTRETTI, 2021).

A produção de energia pela cadeia de transportadora de elétrons mitocondrial é responsável pela maioria das EROS na célula. Esse vazamento de prótons, oriundo da oxidação de NADH e FADH₂, nos complexos I (NADH desidrogenase) e III (coenzima Q e citocromo c oxidorreductase) da cadeia transportadora de elétrons, produz O₂^{•-} (TAUFFENBERGER; MAGISTRETTI, 2021). Enquanto o complexo enzimático NADPH oxidase, situado ligado à membrana, também é responsável pela produção de O₂^{•-} (WANG *et al.*, 2018).

O O₂^{•-} participa de várias reações produzindo uma variedade de EROs e ERNs, como peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, a partir do qual muitas espécies radicais secundárias adicionais podem ser geradas (WANG *et al.*, 2018). O O₂^{•-} tem vida curta, e pode ser convertido em H₂O₂, tanto por dismutação espontânea quanto pela atividade catalítica da superóxido dismutase (SOD). O peróxido de hidrogênio é uma forma mais estável de EROs que pode se difundir através das membranas (LIOCHEV, 2013).

O excesso de peróxido de hidrogênio é limitado principalmente pela atividade de outras enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase (GSH-Px) e as catalases (CAT), ativas no citoplasma e no peroxissomo, respectivamente. Os produtos finais dessas enzimas são água e oxigênio (SU *et al.*, 2019). O H₂O₂ pode ser convertido ao radical hidroxila (OH[•]), na presença de metais de transição reduzidos (Fe²⁺ e Cu²⁺), sendo extremamente ativo e oxidante para lipídios, proteínas e DNA (USHIO-FUKAI *et al.*, 2021).

Os antioxidantes podem neutralizar os radicais livres e neutralizar os oxidantes, e podem ser divididos em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os principais antioxidantes enzimáticos incluem a SOD, CAT, GSH-Px e a glutathione S-transferase, a glutathione redutase, glutathione sintetase, e a peroxirredoxina. Os antioxidantes não enzimáticos incluem a nicotinamida, vitaminas ou seus análogos (vitaminas A, C e E; coenzima Q10; e flavonóides), minerais (selênio e zinco) e metabólitos (bilirrubina e melatonina) (SU *et al.*, 2019).

A regulação é realizada de forma cuidadosa por vários antioxidantes, e o desequilíbrio entre a formação de EROs e ERNs com a capacidade antioxidante celular desencadeia-se o estresse oxidativo. (POUROVA *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo já tem sido amplamente estudado na hipertensão. Os danos provenientes do estresse oxidativo, como a oxidação de proteínas e sinalização celular desregulada, levando à inflamação, proliferação, apoptose, migração e fibrose, que são processos importantes que contribuem para função vascular prejudicada, remodelação cardiovascular, disfunção renal (CASE; TIAN, J.; ZIMMERMAN, 2017; HONG, Y. A.; PARK, 2021; TOUYZ *et al.*, 2020).

2.6 Estresse oxidativo e alterações cardíacas e renais

Uma variedade de doenças cardiovasculares, como a hipertensão, tem sido associada, pelo menos parcialmente, com um excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (KATTOOR *et al.*, 2017; SAMMAN TAHHAN *et al.*, 2017; SENONER; DICHTL, 2019). Dentre as doenças cardiovasculares, estudos envolvendo a hipertensão já tem demonstrado a sua associação com EROs e a redução da biodisponibilidade das enzimas antioxidantes (BARADARAN; NASRI; RAFI EIAN-KOPAEI, 2014).

O estresse oxidativo é um mecanismo que causa lesão tecidual em múltiplos sistemas e órgãos, além dos órgãos que são relacionados fisiopatologia da hipertensão, e os órgãos-alvo associados ao dano em decorrência da hipertensão (GRIENDLING *et al.*, 2021).

Em estudos com hipertrofia cardíaca, descobriu-se que o estresse oxidativo ativa as cascatas de sinalização pró-hipertróficas e de remodelamento sensíveis a EROS e, de forma consistente, o tratamento com antioxidantes demonstrou atenuar a resposta hipertrófica, como evidenciado pela redução na remodelamento cardíaco e melhorias na função cardíaca em vários modelos animais (POL, VAN DER *et al.*, 2019; SEDDON; LOOI; SHAH, 2007).

Outro estudo, demonstrou que a hipertrofia cardíaca, tem associação da regulação positiva da NOX5 (NADPH oxidase 5). Experimentos com camundongos expressando NOX5 humano, foi observado que a hipertrofia ventricular esquerda, fibrose intersticial e disfunção contrátil, foi induzida de forma exagerada, em animais com sobrecarga de pressão e em animais com

infusão de angiotensina II em comparação com camundongos do tipo selvagem (ZHAO *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de fibrose intersticial é uma característica importante do remodelamento cardíaco, e estudos já demonstraram a associação da fibrose com EO. A fibrose cardíaca intersticial induzida pela infusão de angiotensina II foi associada ao aumento da expressão de NOX2 (NADPH oxidase 2) e conseguiu ser quase completamente abolida em camundongos knockout para NOX2 (JOHAR *et al.*, 2006).

O ânion superóxido e seu sucessor metabólico imediato peróxido de hidrogênio se destacaram como agentes de sinalização autócrinos e parácrinos capazes de efetuar hipertrofia e proliferação vascular e cardíaca em doenças cardiovasculares (CIFUENTES; PAGANO, 2006).

O estresse oxidativo, além de estar associado a alterações cardíacas, também está associado a alterações renais. O rim é um órgão altamente metabólico com altos níveis de oxidação. Os rins têm uma grande demanda de energia, principalmente dentro das células tubulares proximais; isso está relacionado ao seu papel na reabsorção de nutrientes críticos após a filtração glomerular. Como tal, o rim é particularmente vulnerável a danos causados pelo estresse oxidativo (KITADA *et al.*, 2020).

O papel de EROs e ERNs é considerado um fator crítico envolvido no início e progressão de várias doenças e lesões renais de mamíferos, incluindo nefropatia diabética, lesão de isquemia-reperfusão, lesão renal relacionada à hipertensão e várias formas de síndromes inflamatórias (ARAUJO, M.; WILCOX, 2014; RATLIFF *et al.*, 2016).

As EROs têm efeitos funcionais no rim, e vários mecanismos celulares renais, incluindo transporte tubular de sódio, feedback tubuloglomerular, migração e crescimento celular, hipertrofia, expressão de genes inflamatórios e da matriz extracelular, além da apoptose. Os efeitos das EROs geradas em vários componentes do rim dependem, em última análise, das concentrações geradas localmente e do equilíbrio das vias pró e antioxidantes (ARAUJO, M.; WILCOX, 2014; RATLIFF *et al.*, 2016).

Estudos já demonstraram a associação de antioxidantes com a diminuição de alterações renais em diversas doenças. Tan e colaboradores (2015) demonstraram que a SOD3 consegue proteger o rim de alterações não

benéficas, como o aumento da proteinúria e fibrose renal, bem como a lesão de podócitos (TAN *et al.*, 2015). Além disso, em outro estudo foi demonstrado que deleção de SOD3 diminuiu a recuperação do fluxo sanguíneo renal após isquemia renal e aumentou significativamente a necrose tubular e a formação de cilindros tubulares após a reperfusão (SCHNEIDER *et al.*, 2010).

Outros estudos, envolvendo a deficiência de enzimas antioxidantes, demonstraram causar alterações renais. A deficiência de CAT, foi relatada para aumentar a fibrose túbulo intersticial e os produtos de peroxidação lipídica de lesões túbulo intersticiais (SUNAMI *et al.*, 2004). Brezniceanu e colaboradores (2008) demonstraram que na nefropatia diabética, a super expressão específica no túbulo proximal de CAT conseguiu inibir a produção de ROS renais e fibrose túbulo intersticial (BREZNICEANU *et al.*, 2008).

Dessa forma, buscar alternativas de substâncias que possuam atividade anti-hipertensiva, e paralelamente, melhorem os danos nos órgãos-alvo da hipertensão, como substâncias antioxidantes, devem ser exploradas.

2.7 Carvacrol

O uso medicinal de fitoquímicos vem desde a criação humana, e ao longo dos anos, os produtos naturais constituem uma alternativa no estudo de moléculas potencialmente terapêuticas e têm contribuído significativamente na descoberta e desenvolvimento de importantes e modernas drogas terapêuticas (RAJPUT *et al.*, 2018).

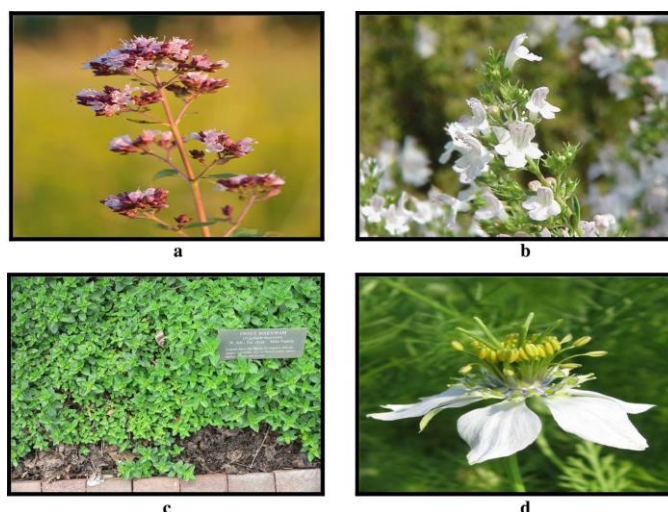
A literatura vem mostrando que os monoterpenos apresentam diversas atividades farmacológicas, estas substâncias são hidrocarbonetos extraídos de óleos essenciais (OE), formados a partir de uma unidade básica, o isopreno [CH₃C(CH₂)CH₂CH₂], sendo constituídos de duas unidades isoprênicas (10 átomos de carbono).

Dentre os monoterpenos, temos o carvacrol, um monoterpeno fenólico líquido, associado a diversas propriedades farmacológicas que já foram descritas anteriormente na literatura. Encontrado em vários óleos essenciais que são comumente usados na medicina tradicional. Os OE são misturas naturais complexas, sintetizadas pelas plantas aromáticas, e possuem de 20-60

componentes em diferentes concentrações, englobando substâncias de diferentes grupos químicos (SILVA *et al.*, 2018)

Dentre as diversas plantas aromáticas que possuem carvacrol como componente de seu OE, podemos destacar a *Origanum dictamnus* (dittany de creta), *Origanum vulgare* (orégano) , *Origanum majorana* (manjerona), *Thymbra capitata* (orégano espanhol), *Thymus vulgaris* e *Thymus zygis* (tomilho), *Thymus serpyllum* (tomilho banco), *Satureja montana* (salgado de inverno) e *Nigella sativa* (Figura 1) (SHARIFI-RAD *et al.*, 2018; SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015).

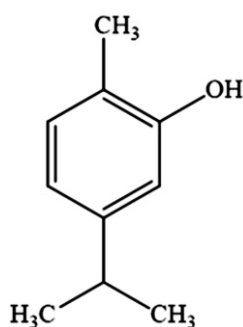
Figura 1 - Plantas que possuem carvacrol em seu óleo essencial.



Plantas que possuem carvacrol na composição do seu óleo essencial. a) *Origanum vulgare* (óregano), b) *Satureja montana* (salgado de inverno), c) *Origanum majorana* (manjerona), d) *Nigella sativa*. Fonte: RAJPUT *et al.*, 2018.

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol), com fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$ (Figura 2) e peso de 150,22 g/mol, possui propriedades lipofílicas e densidade de 0,976 g/ml à temperatura ambiente (25°C), é insolúvel em água e tem ponto de fusão de 2°C e de ebulição 234-236°C. Além disso, possui característica pungente e odor aromático, semelhante ao orégano (MARCHESE *et al.*, 2018; SHARIFI-RAD *et al.*, 2018).

Figura 2 - Estrutura molecular do carvacrol.



Fonte: MARCHESE *et al.*, 2018.

As informações sobre toxicologia são bem estabelecidas na literatura, já foi relatado que a DL₅₀ em ratos é de 810 mg/kg de peso corporal quando administrado por via oral (HAGAN *et al.*, 1967; SUNTRES, COCCIMIGLIO, ALIPOUR, 2015). O carvacrol mostrou uma atividade fraca nos estudos de mutagenecidade. Estudos do metabolismo, mostrou que o carvacrol é excretado na urina pós 24 horas inalterado ou como conjugados de glucoronideo e sulfato (VINCENZI *et al.*, 2004).

A toxicidade pré-clínica do óleo essencial *Origanum vulgare*, que possui o carvacrol como um dos componentes, já foi determinada utilizando ratas *Wistar*, onde foi demonstrado que a administração de 3% por via oral e intra-vaginal do óleo essencial do *Origanum vulgare* por um período de 30 dias, não causou efeitos tóxicos, levando em conta a ausência de alterações na massa de órgãos, da massa corporal e da ausência de alterações de hemograma (CLEFF *et al.*, 2008).

O carvacrol apresenta uma ampla atividade farmacológica, compreende desde a sua atividade antibacteriana, como efeitos sobre as diferentes gêneros de bactérias, como *Streptococcus* (WIJESUNDARA *et al.*, 2021) e *Staphylococcus* (ABED *et al.*, 2021; SILVEIRA *et al.*, 2020), além de apresentar atividade antifúngica, como os efeitos relatos contra fungo da espécie *Candida albicans* (MIRANDA-CADENA *et al.*, 2021), atividade antiviral (WANG *et al.*, 2020), anti-inflamatória (LIMA *et al.*, 2013), antioxidante (LEE *et al.*, 2015) e anticarcinogênicas (ARUNASREE, 2010) também são bem exploradas.

O carvacrol possui efeitos antioxidantes bem conhecidos, sendo capaz de melhorar a atividade de enzimas antioxidantes celulares, como a superóxido

dismutase, catalase, glutatona, peroxidase e os níveis antioxidantes não enzimáticos, como a glutatona reduzida (SHARIFI-RAD, M. *et al.*, 2018). Entretanto, quando utilizado em concentrações elevadas, o carvacrol induz um efeito pró-oxidante (LLANA-RUIZ-CABELLO *et al.*, 2015).

Estudos anteriores, desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que o carvacrol consegue induzir um efeito vasorelaxante em aorta por agir sobre TRPV1, TRPV4, TRPM7, TRPM8 e TRPC1. O carvacrol provavelmente induziu um efeito hipotensor por ação sobre os canais TRPV1 e TRPV4 (DANTAS, 2014). Ademais, o carvacrol apresentou efeitos importantes sobre a pressão arterial pulmonar, hipertrofia ventricular direita e remodelamento vascular pulmonar (ALVES, 2019).

Estudos recentes também demonstraram que o carvacrol possui efeito anti-hipertensivo (COSTA *et al.*, 2021; DIAS *et al.*, 2022). Além disso, alguns achados relatam que o carvacrol tem efeito anti-hipertrofico sobre cardiomiócitos, em modelos de ratos com bandagem aórtica, e ainda consegue diminuir a deposição de colágeno sobre o tecido cardíaco em camundongos diabéticos (HOU *et al.*, 2019; JAMHIRI *et al.*, 2019). No entanto, não há relatos sobre os possíveis efeitos protetores do carvacrol sobre as alterações cardíacas e renais em ratos espontaneamente hipertensos.

Logo, devido à ampla atividade biológica do carvacrol relatada na literatura, tendo como destaque sua atividade antioxidante e sua baixa toxicidade, torna-se importante ampliar o conhecimento acerca das propriedades do carvacrol, principalmente aos danos relacionados a hipertensão. Portanto, o presente estudo visa investigar os efeitos do tratamento com carvacrol sobre os efeitos do tratamento do carvacrol sobre as alterações cardíacas e renais de ratos espontaneamente hipertensos.

3 Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito do tratamento com carvacrol sobre as alterações cardíacas e renais em ratos espontaneamente hipertensos.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito do tratamento do carvacrol, sobre pressão arterial sistólica de ratos espontaneamente hipertensos;
- Avaliar o efeito do tratamento do carvacrol, sobre a função cardíaca;
- Investigar o efeito do tratamento do carvacrol, sobre a hipertrofia cardíaca e renal;
- Descrever o efeito do tratamento do carvacrol, sobre as alterações histopatológicas no tecido cardíaco e no rim;
- Descrever a ação do carvacrol sobre indicadores plasmáticos de função renal;
- Descrever a ação do carvacrol sobre espécies reativas de oxigênio, em específico os ânions superóxido no tecido cardíaco e no rim;

4 Material e métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo e considerações éticas

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa. Tratou-se de um estudo experimental com ensaios farmacológicos e moleculares utilizando técnicas *in vivo* e *in vitro*. Para execução da referida pesquisa, o projeto foi submetido à análise e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da UFPB, sob protocolo nº 6638150621 (Anexo A).

4.2 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar Kyoto (WKY) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR), com 11 semanas de idade. Os animais foram provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarm/UFPB, e foram mantidos durante todo o tratamento no Laboratório de Avaliação pré-clínico da UFPB. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C), em ciclo claro-escuro de 12 horas, e umidade, além de livre acesso à água e ração (ração tipo “pallets” Irradiada, Quintia®).

4.3 Substâncias utilizadas

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes substâncias: di-hidroetídio (DHE) e cremophor® obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo-SP, Brasil). O cloreto de sódio (NaCl) foi obtido da Dinâmica Química Contemporânea Ltda (Indaiatuba-SP, Brasil). O Cloridrato de xilazina foi obtido da Ceva (Paulínia-SP, Brasil) e cloridrato de cetamina obtido da Syntec (Hrtolândia-SP, Brasil). O resveratrol foi obtido da VTD comércio farmacêutico LTDA (João Pessoa-PB, Brasil).

Todas as substâncias foram solubilizadas em água de osmose reversa e foram mantidas entre 0 a 4°C e somente retiradas no momento de cada experimento, já o carvacrol que foi solubilizado com cremophor® e o di-hidroetídeo foi solubilizado em PBS (tampão fosfato salino).

4.4 Obtenção e preparação das soluções de carvacrol

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) utilizado foi o da Sigma-Aldrich Brasil LTDA, com 98% de pureza, referência: 282197-10g, com fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$, massa molecular de 150,217 g/mol e densidade 0,98 g/ml.

A solução estoque de carvacrol foi preparada solubilizando o carvacrol em cremophor®. As concentrações utilizadas para o tratamento dos animais experimentais foram obtidas a partir da diluição da solução estoque em solução salina até a obtenção das concentrações necessárias. As diluições foram feitas para uso em até 24 horas. As concentrações de cremophor® em solução não excedeu 0,03%.

4.5 Soluções

As soluções fisiológicas foram preparadas a partir do uso das substâncias: cloreto de sódio (NaCl), o fosfato de sódio monobásico ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) e fosfato de sódio bibásico ($NaHPO_4 \cdot 2H_2O$). Os quadros a seguir mostram as concentrações utilizadas de cada substância para as soluções nutritivas de solução salina fisiológica (quadro 1) e PBS (quadro 2), que será utilizada durante a limpeza dos órgãos e das lâminas, respectivamente.

Quadro 1 - Composição da solução salina fisiológica.

Substância	Concentração (mmol/L)
NaCl	161,0

Quadro 2 - Composição da solução PBS.

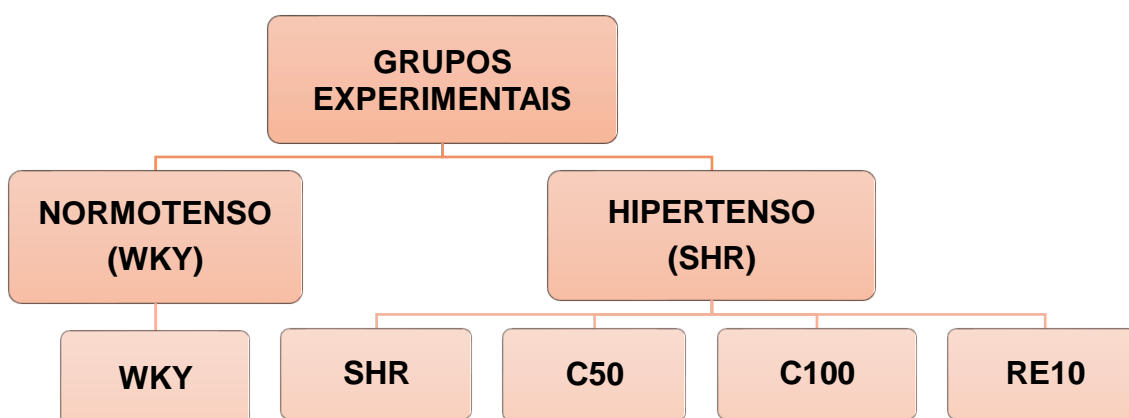
Substância	Concentração (mmol/L)
NaCl	161,0
NaH ₂ PO ₄	1,8
NaHPO ₄	15,8

Fonte: FOLDVARI et al., 1998

4.6 Delineamento experimental

Para atingir os objetivos do trabalho, os ratos Wistar Kyoto representaram o grupo normotenso controle (WKY-controle) e foram tratados apenas com o veículo cremophor. Os animais SHR, por sua vez, foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos de animais cada: (1) hipertenso controle (SHR-CTL); (2) hipertenso tratado com o Carvacrol na dose de 50 mg/kg/dia (SHR-C50); (3) hipertenso tratado com Carvacrol na dose de 100 mg/kg/dia (SHR-C100) e (4) hipertenso tratado com Resveratrol (SHR-RE10) (Figura 3).

Figura 3 - Esquema dos grupos utilizados para a avaliação do efeito do carvacrol sobre as alterações cardíacas e renais.

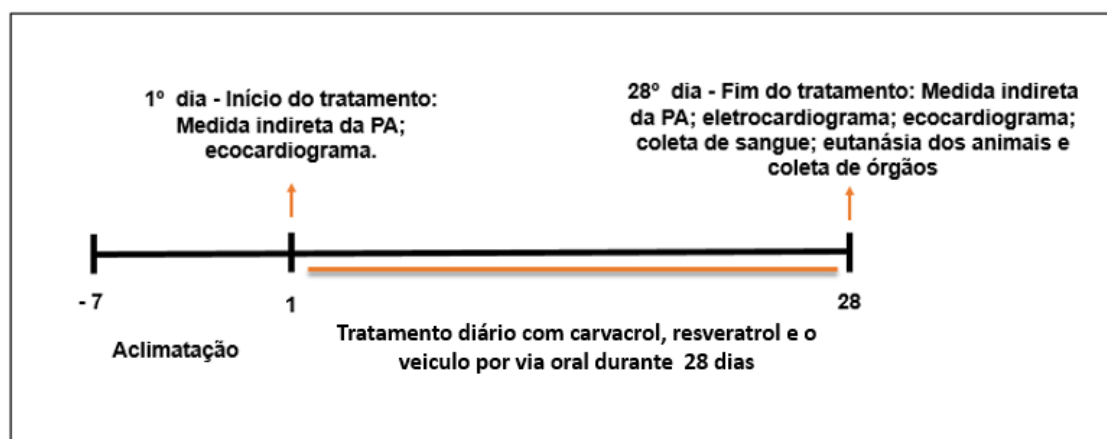


WKY: Ratos Wistar Kyoto tratados com veículo; SHR: Ratos espontaneamente hipertensos; SHR: Ratos espontaneamente hipertensos tratados com salina; C50: Ratos espontaneamente hipertensos tratados com 50 mg/kg/dia de carvacrol; C100: Ratos espontaneamente hipertensos tratados com 100 mg/kg/dia de carvacrol. RE10: Ratos espontaneamente hipertensos tratados com 10 mg/kg/dia de resveratrol.

Fonte: LIMA, 2022.

Todos os animais foram tratados por meio da administração diária, por via oral (v. o.), durante 28 dias. Os grupos controles, tanto normotenso como hipertenso, receberam apenas solução salina com veículo, enquanto os grupos hipertensos SHR-C50 e SHR-C100, foram tratados com concentrações diluídas de carvedilol, 50 mg/kg/dia e 100 mg/kg/dia, respectivamente. Os animais do grupo RE10, receberam resveratrol 10 mg/kg/dia. Os animais tiveram o peso monitorado semanalmente, além disso, no início e final do tratamento a pressão arterial foi monitorada e o ecocardiograma foi realizado, enquanto o eletrocardiograma, análises bioquímicas e avaliação histopatológica foram realizadas apenas no final do tratamento (Figura 4).

Figura 4 - Delineamento experimental do tratamento.



Representação esquemática do desenho experimental do estudo. Os animais foram tratados durante 28 dias com carvedilol, resveratrol ou veículo.

Fonte: LIMA, 2022.

4.7 Medida indireta da pressão arterial sistólica

Para monitorar a pressão arterial antes do início e ao final do tratamento, foi utilizado o método de pletismografia de cauda. Inicialmente, os animais foram previamente aclimatados ao procedimento de aferição da PAS, durante sete dias antes da mensuração do período experimental, os animais foram condicionados a entrarem em um cilindro de acrílico de contenção, para que houvesse uma adaptação ao equipamento e, desta forma, prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal frente ao procedimento.

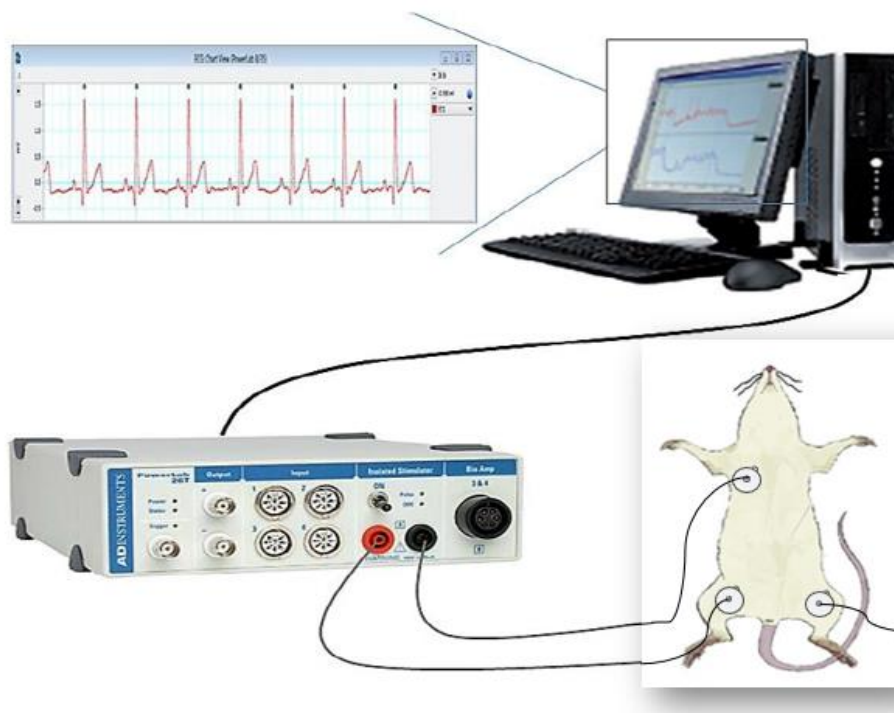
Durante o período experimental, os animais foram mantidos em uma caixa aquecida por 10 minutos para dilatação da artéria caudal. Posteriormente, os

animais foram transferidos para um restritor de acrílico, onde era possível manter a cauda do animal para fora do restritor. Um manguito foi inserido a cauda, conectado com uma bomba para a insuflação, além disso, um sensor de pulso para captação do pulso arterial. O sensor foi conectado ao amplificador e este ao computador, para obtenção dos dados pressóricos. Após a estabilização dos sinais de pulso e frequência cardíaca, o manguito foi insuflado para haver a oclusão do fluxo sanguíneo, e logo em seguida o manguito foi desinflado, para então haver o retorno do fluxo de sangue. O valor da PAS foi calculado a partir da média aritmética de três aferições consecutivas. O sistema para aquisição de dados que foi utilizado foi da ADInstruments e os sinais de pressão e de pulso foram amplificados e registrados pelo software Labchart 7[®].

4.8 Eletrocardiograma

Para realização do eletrocardiograma (ECG) foi utilizando a derivação DII, para isso, os animais foram anestesiados e tiveram eletrodos implantados subcutaneamente, nos membros inferiores do animal, e foram conectados a um amplificador BIOMAP (ADInstruments[®], Austrália). Em seguida, os dados foram digitalizados através de um conversor A/D PowerLab (ADInstruments[®], Austrália). A derivação DII foi selecionada por ser a que menos influenciada pela rotação do coração dos ratos, e poderia refletir a excitação cardíaca total (Figura 6). Cada gravação durou três minutos, com velocidade de 50 mm/s e tensão de 1 mv/cm. Os registros foram avaliados com a utilização de software Labchart (ADInstruments[®], Austrália).

Figura 5 - Representação esquemática do eletrocardiograma.



Representação esquemática do ECG na derivação DII. Fonte: Adaptado de VIEIRA, 2017.

4.9 Ecocardiograma transtorácico

O ecocardiograma transtorácico foi utilizado para avaliar o efeito do tratamento com o carvedilol sobre os parâmetros cardíacos. No total foram realizadas duas avaliações ecocardiográficas, em diferentes momentos do período experimental, onde a primeira foi realizada antes do início do tratamento e a segunda ao final do tratamento.

Para as análises ecocardiográficas, os animais foram pesados, e em seguida receberam anestesia via intraperitoneal com uma associação de cetamida e xilazina. Posteriormente, foi realizada a tricotomia da porção esquerda do tórax dos ratos, e então, foram posicionados em decúbito dorsal. Os animais, em seguida, passaram pela avaliação ecocardiográfica, onde foram avaliadas, nos modos mono e bidimensional, as variáveis: diâmetro sistólico, diâmetro diastólico, espessura do septo interventricular e espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo. O exame foi realizado com o auxílio do equipamento de ultrassom portátil modelo SonoSite M-Turbo (FUJIFILM SonoSite, Inc.), usando um transdutor de 6-13 MHz de frequência.

Os parâmetros foram calculados ao longo de três ciclos cardíacos consecutivos, utilizando as seguintes equações (AZAR *et al.*, 2014; BROWN *et al.*, 2002; QUINTANA-VILLAMANDOS *et al.*, 2017):

$$\text{Massa ventricular esquerda (g)} = 0.8 (1.04 (\text{DIVED} + \text{EPPD} + \text{ESIVD})^3 - \text{DIVED}^3) + 0.6 \text{ g}$$

$$\text{Volume diastólico final (mL)} = 1.047 (\text{LVIDd})^3$$

$$\text{Volume sistólico final (mL)} = 1.047 (\text{LVIDs})^3$$

$$\text{Volume sistólico (mL)} = \text{VDF} - \text{VSF}$$

$$\text{Fração de ejeção (\%)} = (\text{VS} / \text{VDF}) \times 100$$

$$\text{Fração de encurtamento (\%)} = (\text{LVEDD} - \text{LVESD}) / \text{LVEDD} \times 100$$

Onde:

DIVED: diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole

DIVES: diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sistóle

EPPD: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole

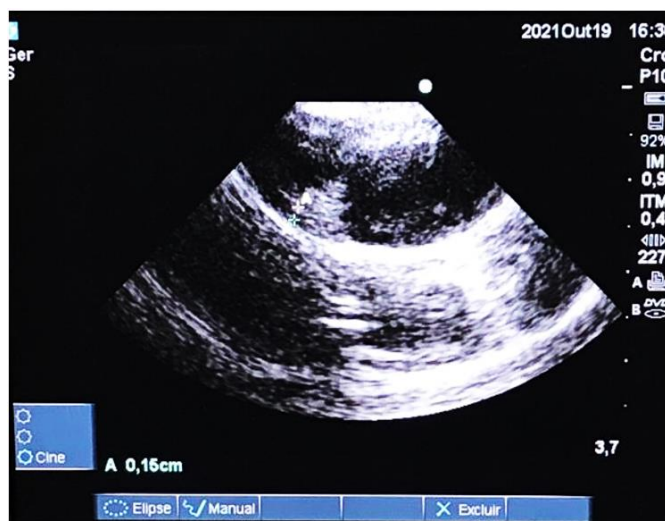
ESIVD: espessura do septo interventricular na diástole

VDF: volume diastólico final

VSF: volume sistólico final

VS: volume sistólico

Figura 6 - Representação da imagem gerada durante a avaliação ecocardiográfica.



Fonte: LIMA, 2021.

4.10 Avaliação dos indicadores plasmáticos de função renal

As análises bioquímicas foram realizadas a partir da coleta de amostras de sangue da veia cava inferior em tubos com gel ativador de coágulo. As amostras foram centrifugadas (2000 rpm por 10 min) para obtenção do soro. O soro foi então utilizado para determinar a atividade sérica da creatinina e da ureia. As análises bioquímicas foram determinadas através de leituras espectroscópicas automatizadas, com o auxílio do analisador bioquímico automático modelo HumaStar 200 (InVitro, SP, Brasil) por meio de reações com Kits comerciais (InVitro diagnostica LTDA).

4.11 Isolamento de órgãos

Os ratos WKY e os ratos SHR (tradados ou não) foram eutanasiados com três vezes a dose para anestesia, uma associação de um anestésico dissociativo (cetamina) com um agonista de adrenorreceptores alfa-2 (xilazina), administrados por via intraperitoneal. Em seguida, a morte dos animais foi confirmada para prosseguimento dos experimentos.

Os animais foram submetidos a um corte na região do abdômen para retirada dos rins (direito e esquerdo), e a abertura do tórax para retirada do coração. Posteriormente, os órgãos foram lavados com solução fisiológica e secos usando papel de filtro absorvente e o peso úmido do coração e do rim foi determinado. Os dados foram transcritos como o valor bruto da massa de cada órgão, como também foi realizada a relação da massa do órgão com a peso corporal do animal.

Os órgãos foram armazenados de acordo com protocolo a qual os tecidos foram submetidos, o armazenamento durou até a data do processamento da amostra. Para avaliação histológica o coração e os rins foram armazenados em solução de formalina a 10%. Para avaliar a produção de ânions superóxidos, o coração e os rins foram incluídos em meio de congelamento e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C.

4.12 Histologia de órgãos

Para averiguar a existência de desarranjos estruturais no miocárdio e no rim, os órgãos foram fixados em tampão de formalina a 10%. Em seguida, foram desidratados e incorporados a parafina, seccionado em 3 µm de espessura e posteriormente foram fixadas em lâminas e iniciado o processo de coloração com hematoxilina e eosina (HE) e ou tricômio de masson (TM).

Nas alterações patológicas identificadas no coração, através da coloração por HE, foram considerados o desarranjo miofibrilar, morte celular, alterações do crescimento celular não neoplásicos além de processos inflamatórios. Nas alterações patológicas identificadas no rim, através da coloração por HE, foram observadas alterações do crescimento celular não neoplásicos além de processos inflamatórios.

Enquanto as alterações identificadas por TM, no coração e rim, incluem as alterações na deposição de matriz extracelular, em especial o colágeno. As alterações relacionadas a deposição de matriz extracelular, em especial o colágeno, evidenciadas em azul. A porcentagem total da área de marcação para o colágeno no coração e no rim foi calculada como através de algoritmos presentes no software KS400, observando desta maneira a área total em micrometro quadrado.

Para captação e análise das imagens, as fotomicrografias foram realizadas em aumento total de 400× com o auxílio de um microscópio de luz, ligado a uma câmera de vídeo digital (Nikon DS-Ri2) e a um computador equipado com um software analisador de imagem.

4.13 Avaliação da produção de ânions superóxidos (O_2^-) *in situ*

A avaliação da produção *in situ* de O_2^- no tecido cardíaco e no rim dos ratos wistar kyoto e ratos espontaneamente hipertensos, os órgãos, após separados foram incluídos em OCT (Tissue-Tek®) e congelados em nitrogênio líquido, em seguida, foram armazenados a -80 °C até à microtomia. Os tecidos foram cortados em secções transversais de 10 µm com o auxílio de um criostato (Cryostat Leila, Nussloc, Alemanha).

Para a realização da medida de O_2^- , as lâminas com os cortes de tecidos foram lavadas com solução PBS (quadro 2). Posteriormente, foram incubadas com 5 μ M da sonda DHE, por 30 min à 37° C, em câmara úmida, ao abrigo da luz (WOJTALA *et al.*, 2014). Em seguida, os cortes foram lavados com PBS, a fim de remover o excesso da sonda fluorescente, e levado para análise no microscópio de fluorescência (NIKON Eclipse Ti-S, NIKON, Japão).

A intensidade de fluorescência do DHE foi utilizada para mensurar a concentração de O_2^- nos diferentes grupos experimentais. O DHE é oxidado pelos O_2^- presentes no citosol das células e forma um produto intermediário, o 2-hidroxietídio (2-OHEt⁺), que forma uma fluorescência vermelha. O 2-OHEt⁺ é excitado em 500 nm e possui uma emissão de 580 nm (SHEN *et al.*, 2016; WOJTALA *et al.*, 2014).

A obtenção das imagens dos grupos foi realizada utilizando o software NIS Elements versão 4.02 e a intensidade de fluorescência foi determinada utilizando o software ImageJ. Os dados foram expressos na forma de Δ de porcentagem de fluorescência, normalizados pela fluorescência emitida pelo DHE do grupo controle. A fluorescência obtida para os diferentes grupos de tratamento foi determinada de acordo com a seguinte equação: $\Delta\%$ Fluorescência = (TRATADO - CONTROLE) X 100/ CONTROLE

4.14 Análise estatística

Todos os dados estão expressos em valores médios \pm E. P. M. (erro padrão da média). As análises estatísticas para comparação entre grupos foram feitas usando “one-way” ou “two-way”, seguido do pelo pós-teste de Turkey. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Todas as análises realizadas serão calculadas pelo programa estatístico Graph Pad Prism versão 6.0[®].

5 Resultados

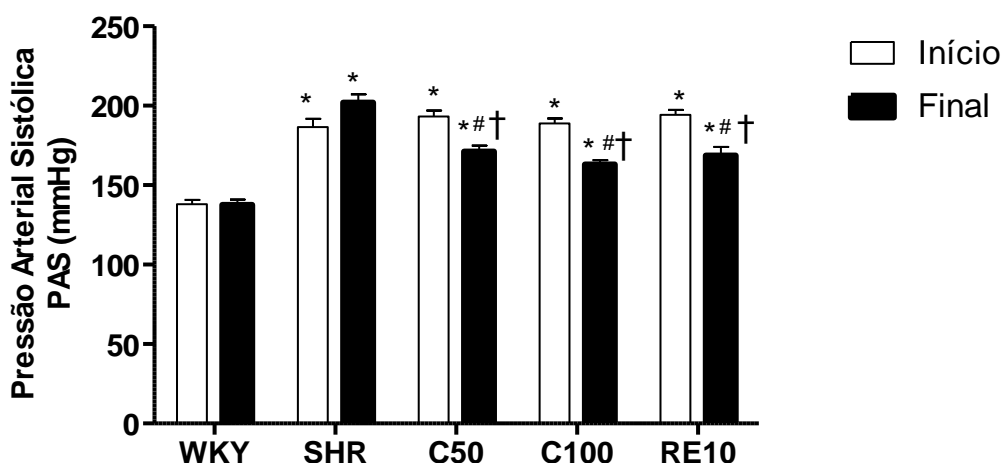
5. RESULTADOS

5.1 Efeito do carvacrol sobre a pressão arterial sistólica em ratos espontaneamente hipertensos

No início do tratamento, a PAS do grupo WKY ($138 \pm 2,8$ mmHg, $n=6$), foi significativamente inferior aos grupos SHR ($186,6 \pm 5,1$ mmHg, $n=7$), C50 ($193,3 \pm 3,7$ mmHg, $n=5$), C100 ($188,7 \pm 3,2$ mmHg, $n=9$), e RE10 ($194,2 \pm 3,2$ mmHg, $n=5$) ($p > 0,05$). Após o final do tratamento, os níveis pressóricos entre o grupo WKY ($137 \pm 3,5$ mmHg, $n=6$) e os demais grupos, continuou sendo significativamente inferior (Figura 7).

Quando os níveis de PAS foram mensurados ao final das quatro semanas de tratamento, os grupos C50 ($171 \pm 3,8$ mmHg, $n=5$) e C100 ($163,7 \pm 2,7$ mmHg, $n=9$), que foram tratados com carvacrol, e o grupo RE10 ($168,7 \pm 5,2$ mmHg, $n=5$) ($p > 0,05$), tratado com resveratrol, apresentaram níveis de PAS significativamente inferiores quando comparados com o grupo SHR ($202,04 \pm 5,1$ mmHg ($n=7$).

Figura 7 - Medida da pressão arterial sistólica em relação início e final de tratamento.



Valores médios da pressão arterial sistólica (mmHg) em relação ao início e final do tratamento dos diferentes grupos experimentais, tratados durante vinte e oito dias. Grupos: WKY, controle normotenso ($n = 6$); SHR, controle hipertenso ($n = 7$); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol ($n = 5$); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol ($n = 7$); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol ($n = 5$). Os resultados estão expressos como média \pm E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico

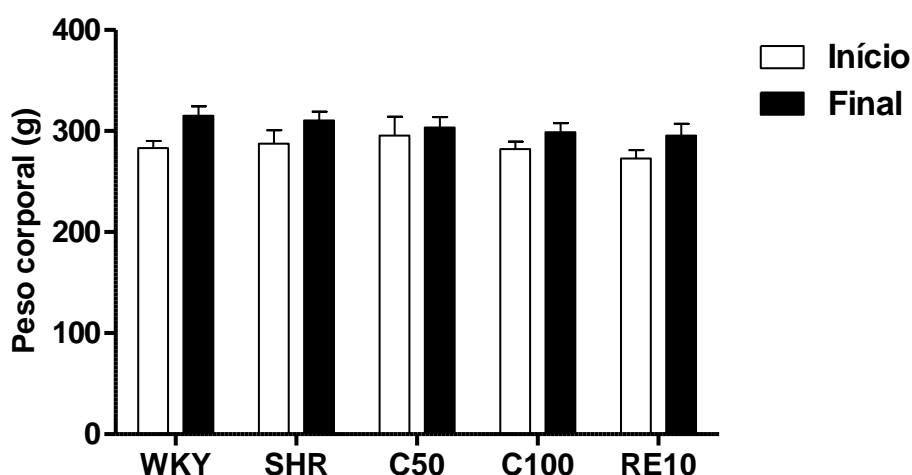
ANOVA two way, seguido de pós-teste de Turkey. *p < 0,05 vs WKY-CTL; #p < 0,05 vs SHR-CTL final; †p < 0,05 vs início de tratamento. Fonte: AUTOR, 2022.

Os grupos C50 e C100, que possuíam a PAS no início do tratamento de $193,3 \pm 3,7$ mmHg e $188,7 \pm 3,2$ mmHg, respectivamente, apresentaram uma redução significativa da PAS após o tratamento com carvacrol, reduzindo a PAS para $171 \pm 3,8$ mmHg (C50) e $163,7 \pm 2,7$ mmHg (C100). Além disso, o tratamento com o resveratrol conseguiu reduzir a PAS do grupo RE10, de $194,2 \pm 3,2$ mmHg para $168,7 \pm 5,2$ mmHg (Figura 1).

5.2 Avaliação do peso corporal dos animais durante o tratamento com carvacrol

Ao longo dos vinte oito dias de tratamento, não foi constatada diferença estatística entre o peso corporal dos diferentes grupos experimentais. No início do tratamento, os animais apresentaram médias de peso corporal semelhantes, sendo o grupo WKY com média de $283 \pm 2,85$ g (n= 6), o grupo SHR com $287,4 \pm 13,3$ g (n=6), C50 com 296 ± 18 g (n= 5), C100 com $282 \pm 7,5$ g (n= 6), enquanto o grupo RE10 $272 \pm 8,5$ g (n= 6) (Figura 8)

Figura 8 - Peso corporal dos diferentes grupos experimentais no início e final do tratamento.



Valores médios do peso corporal (g) em relação ao início e ao final do tratamento dos diferentes grupos experimentais, tratados por vinte oito dias (4 semanas). Grupos: WKY, controle normotenso (n=6); SHR, controle hipertenso (n=6); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol (n=6); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol (n=6); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol (n=6). Os resultados estão

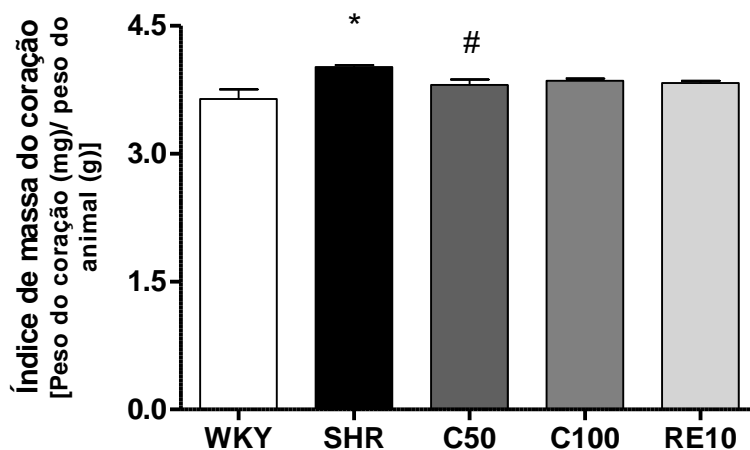
expressos como média \pm E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. Fonte: AUTOR, 2022.

O tratamento diário com o carvacrol (C50: 303 ± 10 g; C100 298 ± 9 g) e resveratrol (RE10: 296 ± 11 g) não alterou o peso corporal dos grupos de animais quando foram comparados entre si, sendo o grupo WKY com média de 315 ± 8 g (n= 6) e o grupo SHR $312,4 \pm 10,5$ g (n=6) (Figura 8).

5.3 Efeito do carvacrol na hipertrofia cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos

Ao final do tratamento, foi avaliado a hipertrofia cardíaca dos animais nos diferentes grupos experimentais, através do índice de massa do coração. Os animais do grupo SHR, controle hipertenso, apresentaram um aumento significativo do índice de massa do coração ($4,03 \pm 0,02$ mg/g, n=6) ($p > 0,05$), quando comparados ao grupo WKY, controle normotenso ($3,6 \pm 0,1$ mg/g, n=6).

Figura 9 - Efeito do carvacrol sobre a hipertrofia cardíaca.



Valores médios do índice de massa do coração [Peso do coração (mg)/ peso do animal (g)] dos diferentes grupos experimentais, tratados por vinte oito dias (4 semanas). Grupos: WKY, controle normotenso (n=6); SHR, controle hipertenso (n=6); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol (n=6); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol (n=6); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol (n=6). Os resultados estão expressos como média \pm E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. * $p < 0,05$ vs WKY; # $p < 0,05$ vs SHR. Fonte: AUTOR, 2022.

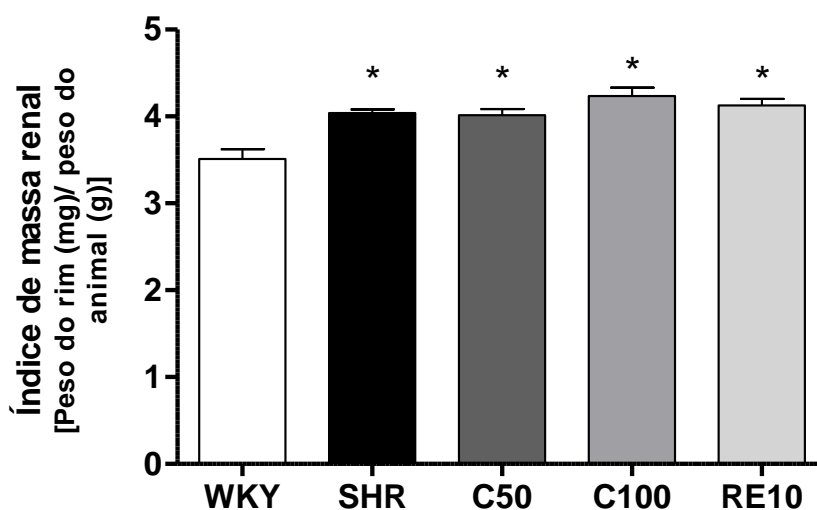
O tratamento com 100 mg/kg do carvacrol ($3,9 \pm 0,03$ mg/g, n=6), assim como o tratamento com 10 mg/kg de resveratrol ($3,8 \pm 0,02$ mg/g, n=6), não

causou modificação no índice de massa do coração quando comparados com o grupo SHR. Entretanto, após as quatro semanas de tratamento com 50 mg/kg do carvacrol ($3,7 \pm 0,05$ mg/g, $n=6$) ($p > 0,05$), reduziu significativamente o índice de massa do coração quando comparados com o grupo SHR (Figura 9).

5.4 Efeito do carvacrol na hipertrofia renal em ratos espontaneamente hipertensos

Para avaliar a hipertrofia renal, foi mensurado do índice renal. Os animais do grupo WKY, controle normotenso ($3,6 \pm 0,1$ mg/g, $n=6$), apresentaram um índice de massa renal inferior aos grupos SHR, controle hipertenso ($4,03 \pm 0,04$ mg/g, $n=6$), C50 ($4,01 \pm 0,07$ mg/g, $n=6$), C100 ($4,23 \pm 0,07$ mg/g, $n=6$) e RE10 ($4,13 \pm 0,06$ mg/g, $n=6$) ($p > 0,05$). O tratamento não foi capaz de diminuir o índice de massa renal em relação ao grupo SHR (Figura 10).

Figura 10 - Efeito do carvacrol sobre a hipertrofia renal.

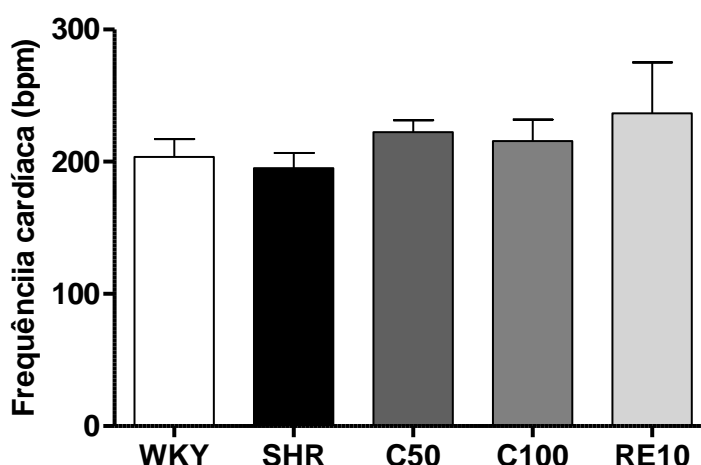


Valores médios do índice de massa renal [Peso do rim (mg)/ peso do animal (g)] dos diferentes grupos experimentais, tratados por vinte oito dias (4 semanas). Grupos: WKY, controle normotenso ($n=6$); SHR, controle hipertenso ($n=6$); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol ($n=6$); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol ($n=6$); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol ($n=6$). Os resultados estão expressos como média \pm E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. * $p < 0,05$ vs WKY. Fonte: AUTOR, 2022.

5.5 Eletrocardiograma

A avaliação da frequência cardíaca, da duração do intervalo QRS e a duração do intervalo QT, foi realizado a partir do eletrocardiograma. Após quatro semanas de tratamento, não houve diferença estatística entre a frequência cardíaca dos animais do grupo WKY ($203,5 \pm 13,5$ bpm, $n=4$) e SHR ($195 \pm 11,7$ bpm, $n=5$). Além disso, não foi observado alteração significativa na FC após o tratamento do grupo C50 ($222,25 \pm 9,1$ bpm, $n=4$), C100 ($215,5 \pm 16,4$ bpm, $n=4$) e RE10 ($236,7 \pm 38,4$ bpm, $n=4$) (Figura 11).

Figura 11 - Efeito do carvacrol sobre a frequência cardíaca.

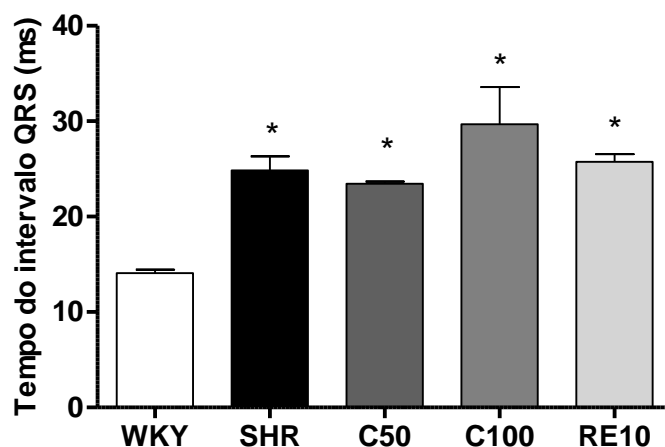


Valores médios de frequência cardíaca dos diferentes grupos experimentais, tratados por vinte oito dias (4 semanas). Grupos: WKY, controle normotenso ($n=6$); SHR, controle hipertenso ($n=6$); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol ($n=6$); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol ($n=6$); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol ($n=6$). Os resultados estão expressos como média \pm E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. Fonte: AUTOR, 2022.

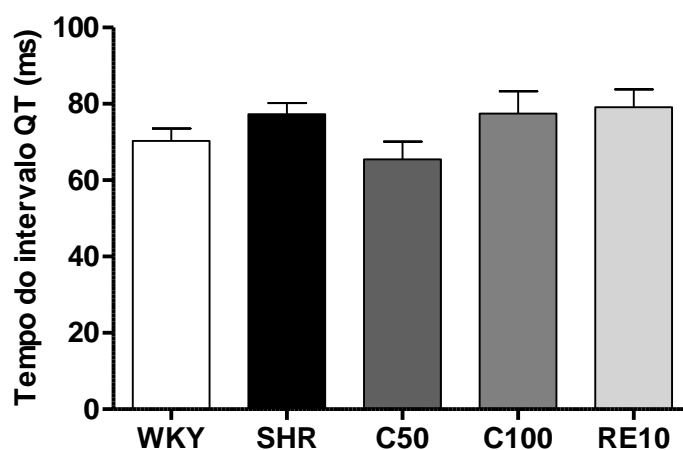
Na figura 12 verificamos que a duração do intervalo QRS, dos grupos SHR ($24,8 \pm 1,4$ ms, $n=3$), C50 ($23,4 \pm 0,2$ ms, $n=3$), C100 ($29,7 \pm 3,8$ ms, $n=3$) e RE10 ($25,7 \pm 0,8$ ms, $n=3$), foi estatisticamente ($p > 0,05$) maior em relação ao grupo WKY ($14 \pm 0,3$ ms, $n=4$). Demonstrando que o tratamento realizado durante quatro semanas com o carvacrol não conseguiu reverter o aumento da duração do intervalo QRS (Figura 12 A). Quando analisamos a duração do intervalo QT, os grupos não apresentaram diferenças significativas (Gráfico 12 B).

Figura 12 - Efeito do carvacrol sobre parâmetros eletrocardiográficos.

A



B



Valores médios dos parâmetros eletrocardiográficos. A) Efeito do carvacrol sobre a duração do intervalo QRS. B) Efeito do carvacrol sobre a duração QT. Dados obtidos após o tratamento por vinte oito dias (4 semanas). Grupos: WKY, controle normotenso (n=6); SHR, controle hipertenso (n=6); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol (n=6); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol (n=6); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol (n=6). Os resultados estão expressos como média \pm E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. *p < 0,05 vs WKY-CTL. Fonte: AUTOR, 2022.

5.2 Efeito do carvacrol sobre a função ventricular esquerda

No início e ao final do tratamento, os animais foram submetidos ao exame de ecocardiograma transtorácico, e os resultados foram analisados entre os

diferentes grupos e dentro do mesmo grupo, comparando os resultados obtidos antes do início do tratamento e ao final do período experimental (Tabela 1).

Dessa forma, podemos observar que não houve diferença estatística entre a espessura do septo intraventricular quando comparamos todos os grupos no início e ao final do tratamento. Além disso, não foi observado modificação significativa no diâmetro do ventrículo esquerdo ao final da diástole e ao final da sístole, entre os grupos tanto no início do tratamento como após o final do tratamento. A espessura da parede posterior foi avaliada e não houve diferença estatística entre a espessura quando comparamos todos os grupos no início e ao final do tratamento.

O índice de massa ventricular esquerda foi calculado a partir da divisão da massa do ventrículo esquerdo pelo peso corporal do animal. A massa do ventrículo esquerdo foi mensurada através do ecocardiograma antes de iniciar e ao final do tratamento. O grupo SHR não apresentou diferença quando comparado ao WKY, e quando os animais foram tratados com carvacrol ou resveratrol, também não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao controle SHR e WKY, assim como comparados aos resultados do próprio grupo antes do início do tratamento.

A fração de ejeção (%) e a fração de encurtamento (%) foram calculadas a partir dos parâmetros mensurados através do ecocardiograma. O grupo SHR não apresentou diferença quando comparado ao WKY, e quando os animais foram tratados com carvacrol ou resveratrol, também não apresentaram diferenças estatísticas, quando comparamos todos os grupos no início e ao final do tratamento.

Tabela 1 – Efeito do carvacrol sobre os parâmetros ecocardiográficos.

	WKY		SHR		C50		C100		RE10	
	Início	Final	Início	Final	Início	Final	Início	Final	Início	Final
ESIV	0,138 ± 0,008	0,13 ± 0,005	0,128 ± 0,007	0,136 ± 0,004	0,135 ± 0,006	0,14 ± 0,008	0,125 ± 0,008	0,135 ± 0,003	0,125 ± 0,006	0,135 ± 0,004
DVED	0,577 ± 0,016	0,585 ± 0,007	0,572 ± 0,021	0,580 ± 0,015	0,582 ± 0,015	0,528 ± 0,017	0,575 ± 0,020	0,558 ± 0,014	0,588 ± 0,017	0,543 ± 0,016
DVES	0,323 ± 0,004	0,313 ± 0,012	0,335 ± 0,013	0,320 ± 0,024	0,317 ± 0,017	0,288 ± 0,010	0,305 ± 0,018	0,318 ± 0,007	0,315 ± 0,013	0,330 ± 0,005
EPPD	0,138 ± 0,008	0,13 ± 0,005	0,128 ± 0,007	0,136 ± 0,004	0,135 ± 0,006	0,14 ± 0,008	0,125 ± 0,008	0,135 ± 0,003	0,125 ± 0,006	0,135 ± 0,004
I. M. V.	0,168 ± 0,017	0,177 ± 0,007	0,159 ± 0,020	0,169 ± 0,009	0,173 ± 0,016	0,131 ± 0,016	0,171 ± 0,020	0,150 ± 0,013	0,183 ± 0,016	0,114 ± 0,022
F. Enc.	43,713 ± 1,760	46,426 ± 1,989	41,138 ± 2,584	45,101 ± 2,929	45,371 ± 3,304	45,292 ± 2,109	46,812 ± 3,080	42,883 ± 1,389	46,502 ± 1,210	38,918 ± 2,420
F. E.	82,070 ± 1,764	84,308 ± 1,668	79,003 ± 2,822	82,878 ± 2,706	82,798 ± 2,992	83,334 ± 1,836	84,217 ± 2,443	81,200 ± 1,353	84,570 ± 1,081	76,680 ± 2,570

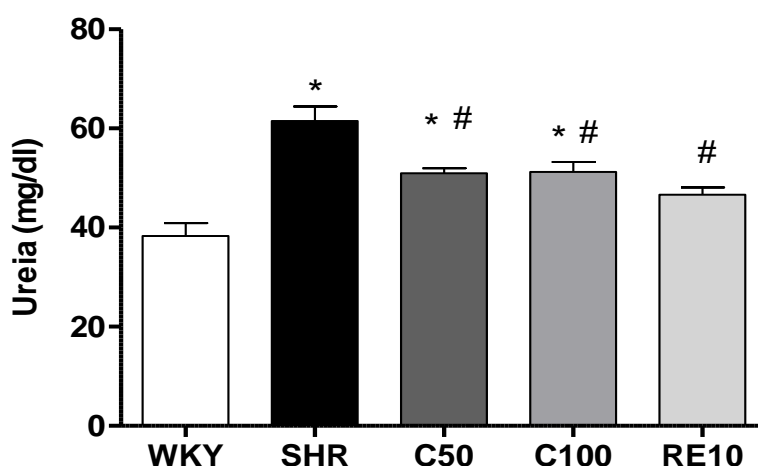
Valores médios dos parâmetros ecocardiográficos. ESIV: espessura do septo intraventricular. DVED: diâmetro do ventrículo esquerdo ao final da diástole. DVES: diâmetro do ventrículo esquerdo ao final da sístole. EPPD: espessura da parede posterior ao final da diástole. I. M. V.: Índice de massa ventricular esquerda. F. Enc.: Fração de encurtamento. F. E.: Fração de ejeção. Dados obtidos antes e após o tratamento por vinte oito dias (4 semanas). Grupos: WKY, controle normotenso (n=6); SHR, controle hipertenso (n=5); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol (n=5); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol (n=6); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol (n=6). Os resultados estão expressos como média ± E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. Fonte: AUTOR, 2022.

5.3 Efeito do carvacrol sobre os níveis de ureia e creatinina séricos

O grupo SHR ($61,6 \pm 2,24$ mg/dl, $n=6$) apresentou uma concentração significativamente mais elevada de ureia plasmática, quando comparado ao grupo WKY, controle normotenso ($37,77 \pm 2,17$ mg/dl, $n=5$) ($p > 0,05$). Após quatro semanas de tratamento com carvacrol e resveratrol, os grupos C50 ($51,47 \pm 2,32$ mg/dl, $n=6$), C100 ($50,96 \pm 3,55$ mg/dl, $n=5$) e RE10 ($46,72 \pm 2,47$ mg/dl, $n=5$), obtiveram uma concentração de ureia plasmática inferior ao grupo SHR, e em relação ao grupo WKY, apenas os grupos C50 e C100 demonstraram ter uma concentração significativamente diferente. Dentre os grupos tratados, C50, C100 e o RE10, não houve diferenças estatísticas entre eles, obtendo médias de concentração de ureia plasmática semelhantes (Figura 13).

Figura 13 - Efeito do carvacrol sobre níveis séricos de ureia.

A

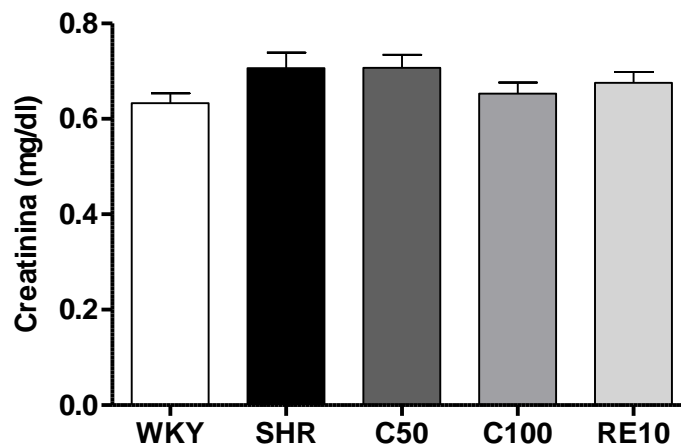


Valores médios do efeito do carvacrol sobre os níveis séricos de ureia. Dados obtidos após o tratamento por vinte oito dias (4 semanas). Grupos: WKY, controle normotenso ($n=5$); SHR, controle hipertenso ($n=4$); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol ($n=5$); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol ($n=4$); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol ($n=4$). Os resultados estão expressos como média \pm E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. * $p < 0,05$ vs WKY; # $p < 0,05$ vs SHR. Fonte: LIMA, 2022.

Em relação as concentrações plasmáticas de creatinina, o tratamento com carvacrol não apresentou alterações em relação aos grupos controles, assim

como não houve diferenças estatísticas entre os grupos que receberam o tratamento com carvacrol e com resveratrol (Figura 14).

Figura 14 - Efeito do carvacrol sobre níveis séricos de creatinina.

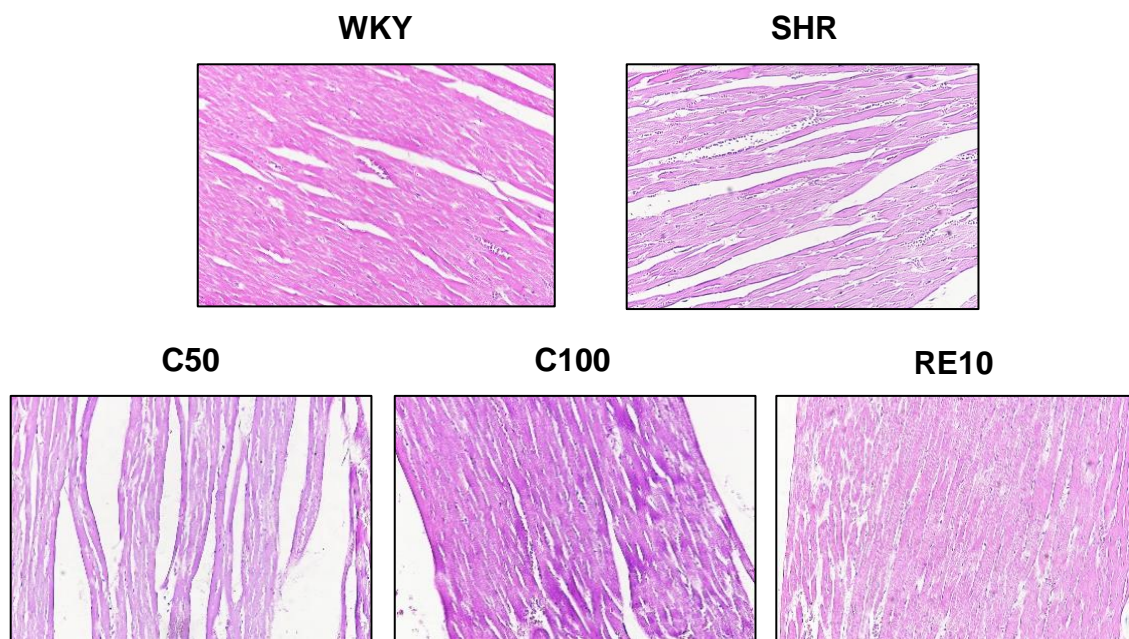


Valores médios do efeito do carvacrol sobre os níveis séricos de creatinina. Dados obtidos após o tratamento por vinte oito dias (4 semanas). Grupos: WKY, controle normotenso (n=5); SHR, controle hipertenso (n=4); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol (n=5); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol (n=4); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol (n=4). Os resultados estão expressos como média \pm E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. Fonte: LIMA, 2022.

5.4 Avaliação do remodelamento do tecido cardíaco

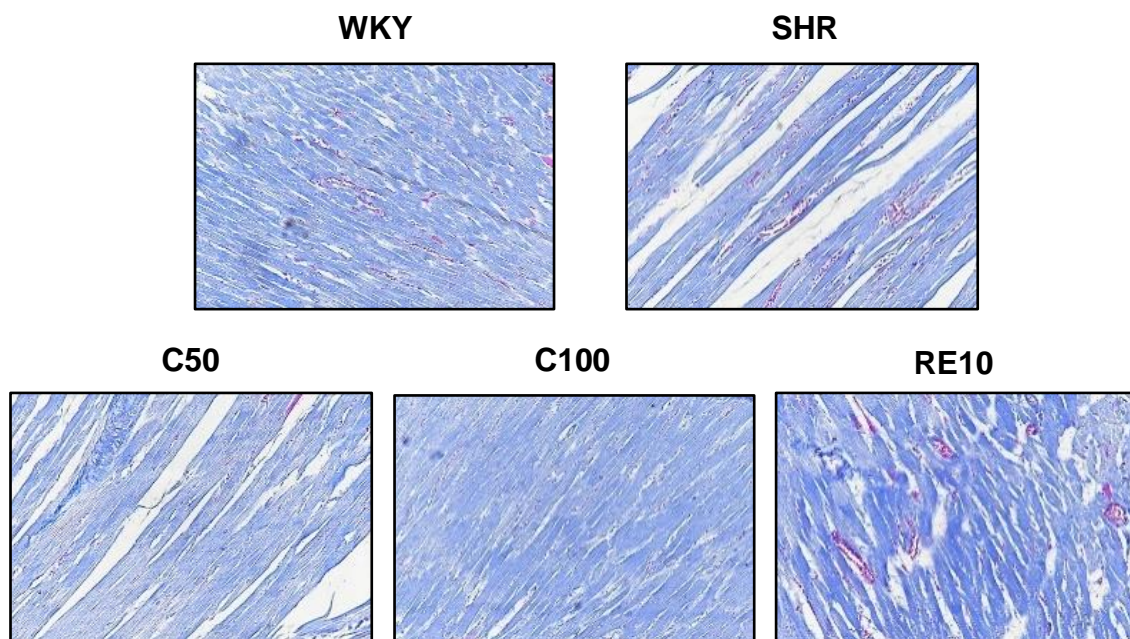
Para investigar as alterações no tecido cardíaco após o tratamento com carvacrol, realizamos uma análise histológica do coração, com coloração de hematoxilina-eosina e tricrômio de masson. Os resultados da coloração de hematoxilina e eosina mostraram existiu um desarranjo das fibras cardíacas nos animais hipertensos (SHR, C50 e C100), caracterizado pela presença de citoplasma amplo, núcleo central e espaço entre o endomísio quando comparados ao grupo WKY. Entretanto, os animais hipertensos tratados com resveratrol, apresentaram um menor desarranjo quando comparados ao grupo SHR-CTL (Figura 15).

Figura 15 - Efeitos do carvacrol no coração em HE.



Imagens representativas da organização celular do coração, corada com hematoxilina-eosina dos diferentes grupos experimentais, WKY controle, SHR controle, C50, C100 e RE10. As imagens foram obtidas através de microscópio óptico em aumento total de 400x.

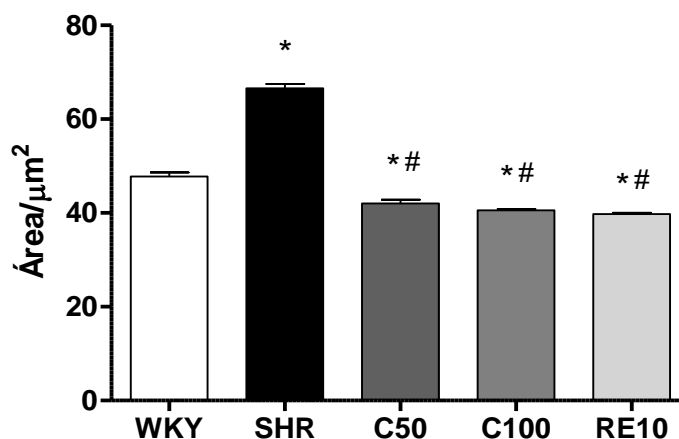
Figura 16 - Imagens representativas da deposição de matriz extracelular no coração.



Imagens representativas da área de deposição da matriz extracelular no coração, através da coloração tricrômio de Masson dos diferentes grupos experimentais, WKY controle, SHR controle, C50, C100 e RE10. As imagens foram obtidas através de microscópio óptico em uma ampliação de 200x.

Para investigar alterações na matriz intersticial cardíaca, após o tratamento com carvacrol, realizamos a análise histológica com coloração de tricrômio de Masson (Figura 16). O grupo SHR (66,6% \pm 0,9%, n=5) apresentaram área de deposição de matriz extracelular (colágeno) significativamente mais elevado sobre o tecido cardíaco, quando comparado ao grupo WKY, controle normotenso (47,8% \pm 0,8%, n=5) ($p > 0,05$). Após quatro semanas de tratamento com carvacrol e resveratrol, os grupos C50 (42% \pm 0,8%, n=5), C100 (40,6% \pm 0,2%, n=5) e RE10 (39,8% \pm 0,2%, n=5), obtiveram uma área de deposição de matriz extracelular inferior ao grupo WKY e SHR. Dentre os grupos tratados, C50, C100 e o RE10, não houve diferenças estatísticas entre eles, obtendo médias de deposição de matriz extracelular semelhantes (Figura 17).

Figura 17 – Área de deposição de matriz extracelular.



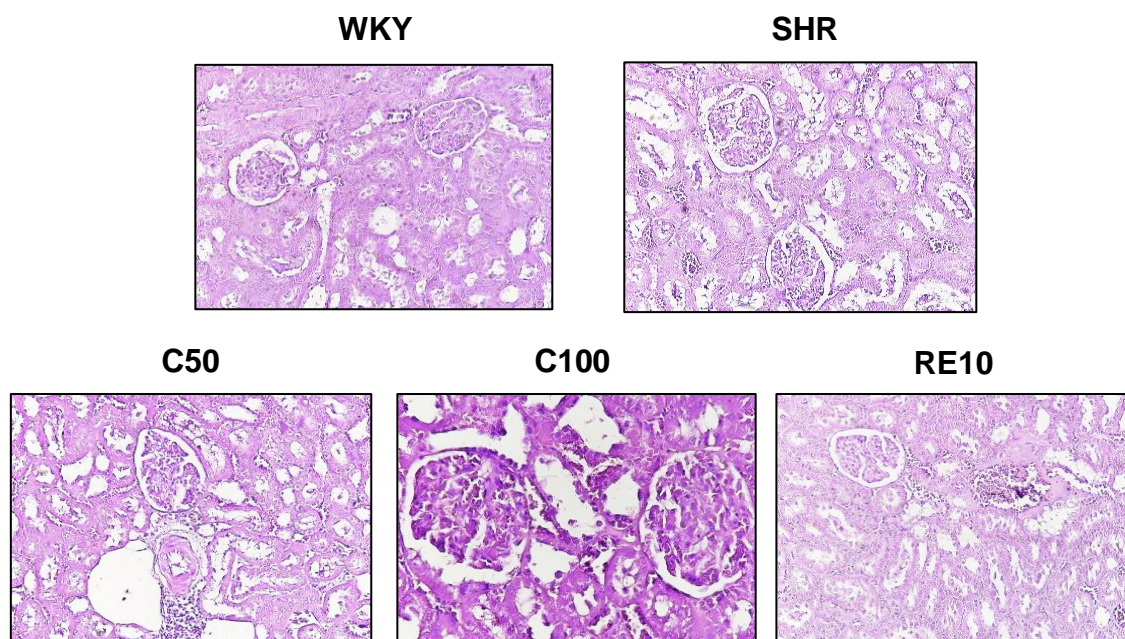
Valores médios da área de deposição da matriz extracelular no coração nos diferentes grupos experimentais, WKY, controle normotenso (n=5); SHR, controle hipertenso (n=5); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol (n=5); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol (n=5); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol (n=5). Os resultados estão expressos como média \pm E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. * $p < 0,05$ vs WKY; # $p < 0,05$ vs SHR. Fonte: AUTOR, 2022.

5.5 Avaliação do remodelamento do rim de rato espontaneamente hipertensos

Para investigar as alterações renais após o tratamento com carvacrol, realizamos a análise histológica dos rins com coloração de hematoxilina-eosina

e tricrômio de Masson. Os resultados da hematoxilina e eosina mostraram a presença de alterações degenerativas como a degeneração tubular no rim nos animais hipertensos (SHR, C50, C100 e RE10) (Figura 18).

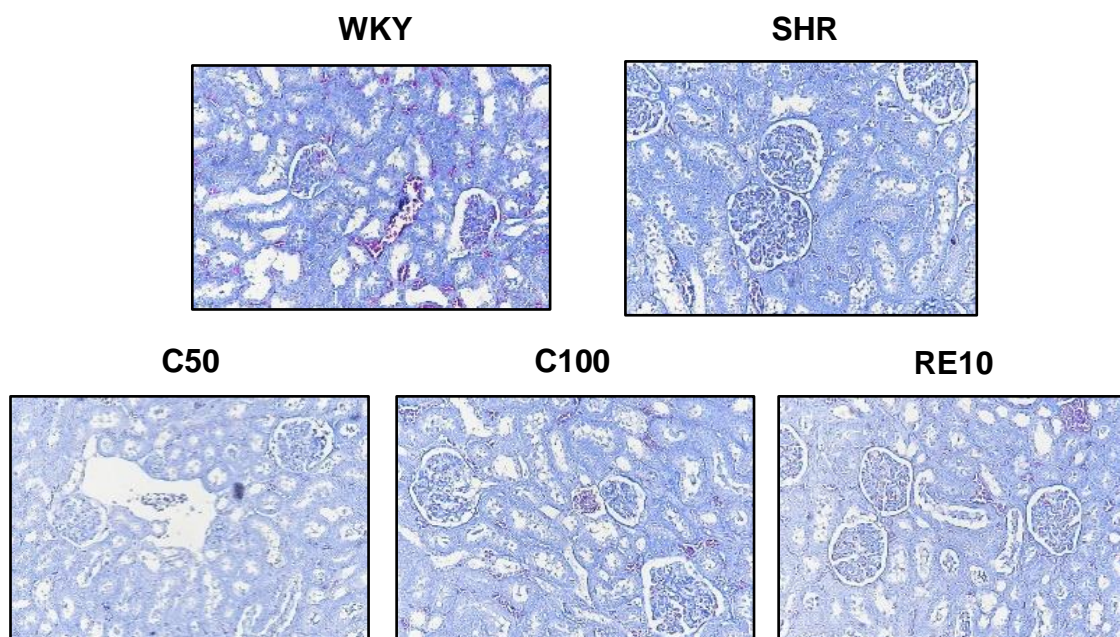
Figura 18 - Efeitos do carvacrol no rim em HE.



Imagens representativas da organização celular do rim, corada com hematoxilina-eosina dos diferentes grupos experimentais, WKY controle, SHR controle, C50, C100 e RE10. As imagens foram obtidas através de microscópio óptico em um aumento total de 400x.

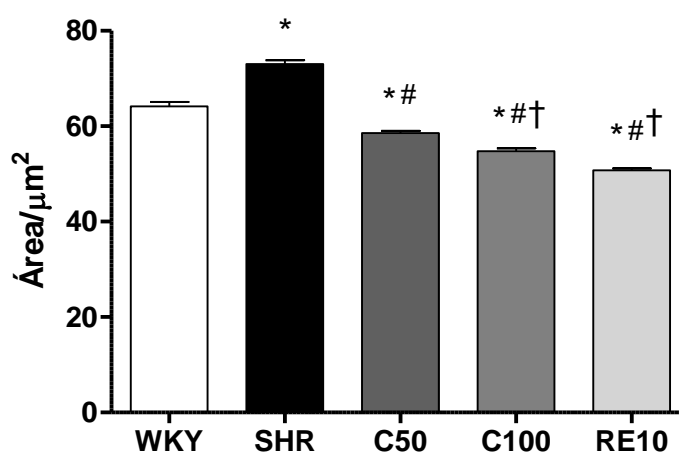
A deposição da matriz extracelular (colágeno) foi avaliada através da análise histológica renal com coloração de tricrômio de masson. O grupo SHR ($73\% \pm 0,8\%$, $n=5$) apresentou uma área de deposição matriz extracelular significativamente mais elevada sobre o parênquima renal, quando comparado ao grupo WKY, controle normotenso ($64,2\% \pm 0,9\%$, $n=5$) ($p > 0,05$). Após quatro semanas de tratamento com carvacrol e resveratrol, os grupos C50 ($58,6\% \pm 0,4\%$, $n=5$), C100 ($54,8\% \pm 0,6\%$, $n=5$) e RE10 ($50,8\% \pm 0,4\%$, $n=5$), obtiveram uma área de deposição matriz extracelular inferior ao grupo WKY e SHR. Dentre os grupos tratados, o grupo C100 apresentou menor deposição de matriz extracelular em comparação ao grupo C50, enquanto o RE10 apresentou deposição menor em relação ao C100 (Figura 19 e 20).

Figura 19 - Imagens representativas da área de deposição da matriz extracelular no rim.



Imagens representativas da área deposição matriz extracelular renal, através da coloração tricrômio de masson dos diferentes grupos experimentais, WKY controle, SHR controle, C50, C100 e RE10. As imagens foram obtidas através de microscópio óptico em aumento total de 400x.

Figura 20 – Área de deposição da matriz extracelular renal.

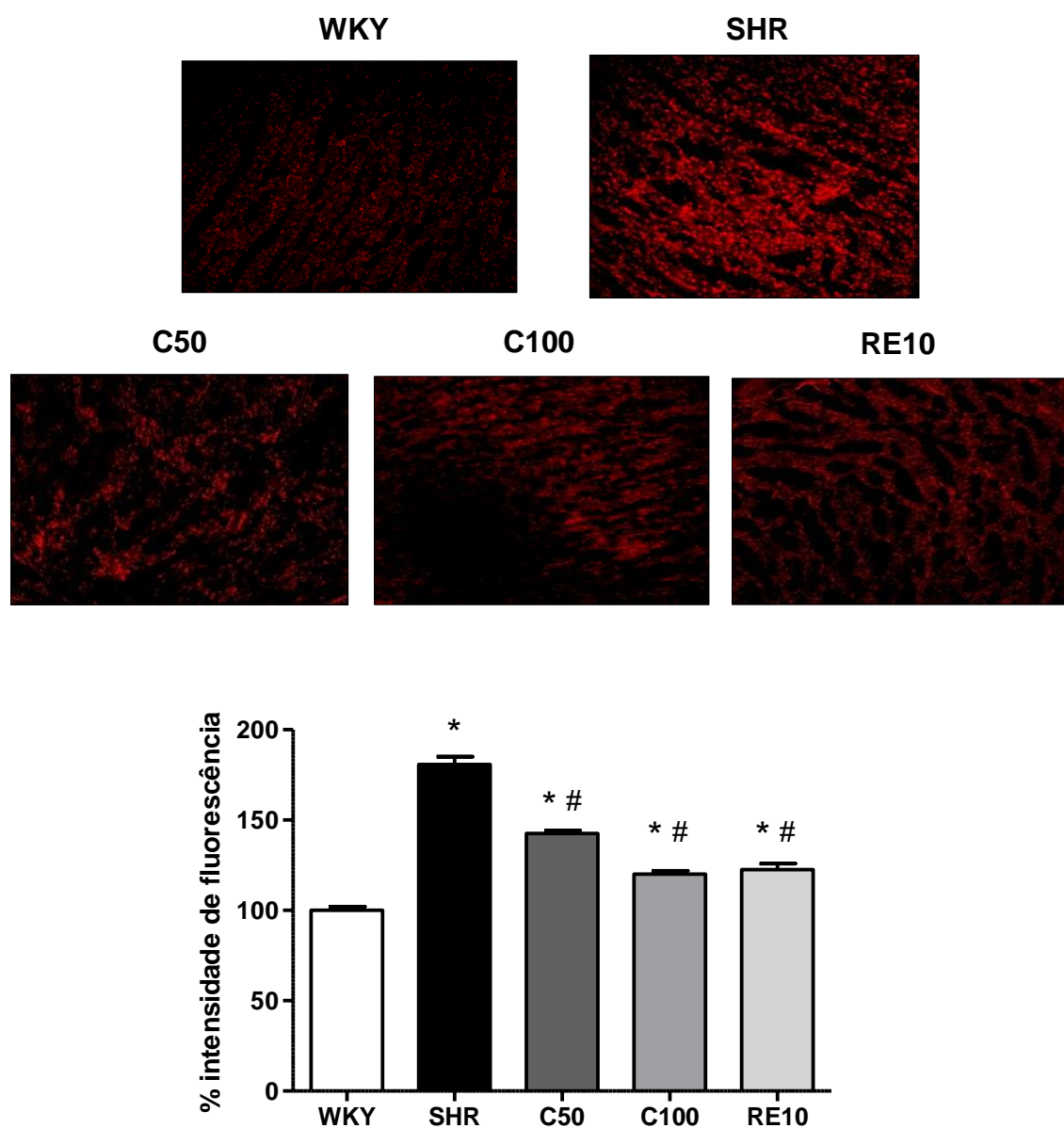


Valores médios da área de deposição da matriz extracelular renal nos diferentes grupos experimentais, WKY, controle normotenso (n=5); SHR, controle hipertenso (n=5); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol (n=5); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol (n=5); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol (n=5). Os resultados estão expressos como média ± E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. *p < 0,05 vs WKY; #p < 0,05 vs SHR; †p < 0,05 vs C50. Fonte: AUTOR, 2022.

5.10 Efeito do carvacrol sobre o estresse oxidativo no coração

O grupo SHR ($78,9 \pm 1,8 \%$, $n=4$) apresentou intensidade de fluorescência estatisticamente ($p > 0,05$) maior em relação do grupo WKY ($43 \pm 0,9 \%$, $n=5$). Os tratamentos com C50 ($62,28 \pm 0,6 \%$, $n=5$), C100 ($52,4 \pm 0,7 \%$, $n=5$) e RE10 ($53,4 \pm 1,5 \%$, $n=5$) foram capazes de reduzir a formação de ânions superóxidos quando comparados com o grupo SHR (Figura 21 A e B).

Figura 21 - Efeito do carvacrol sobre a intensidade de fluorescência do DHE no coração.

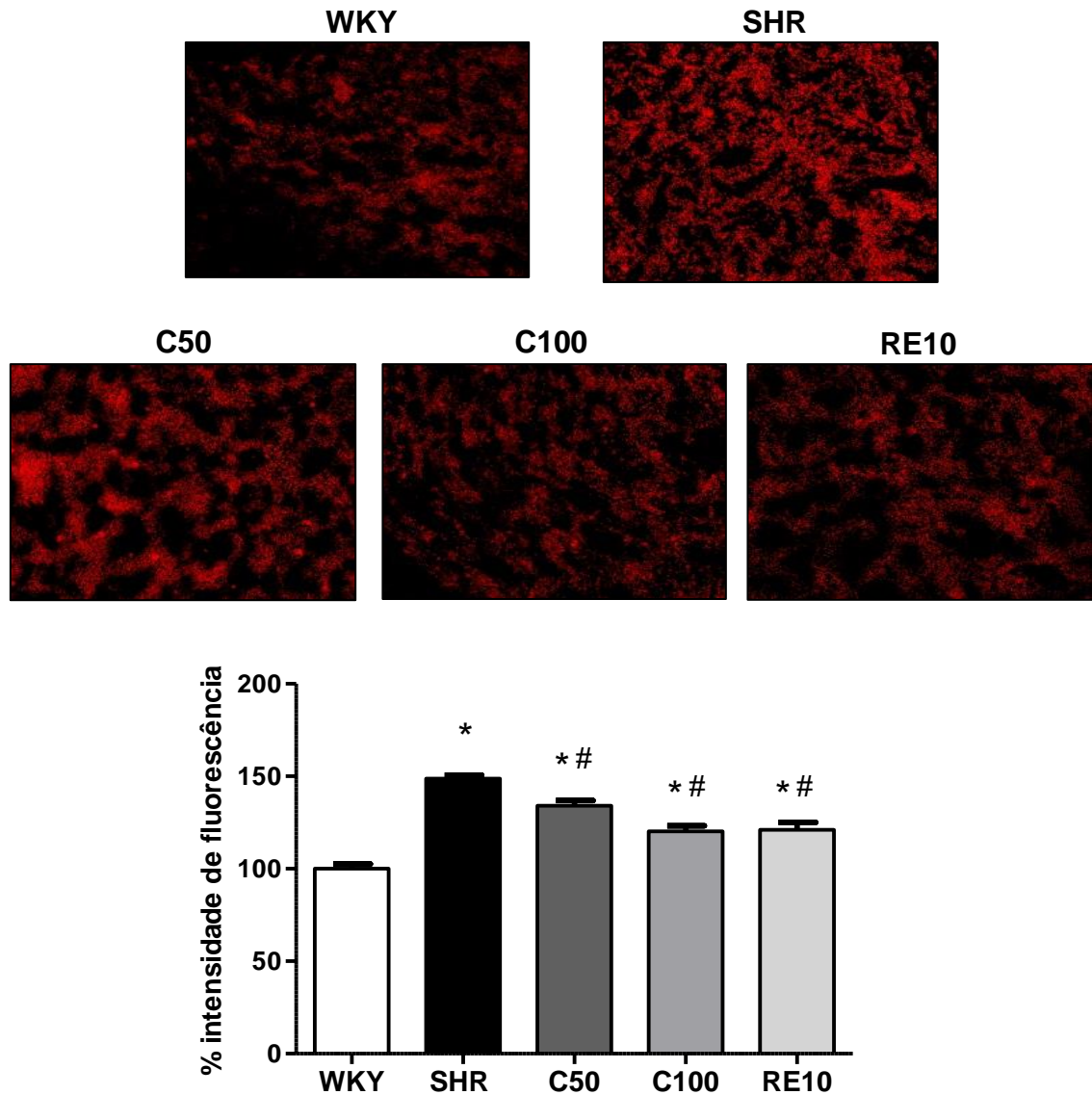


Valores médios da intensidade relativa de fluorescência basal (%) do DHE, em cortes histológicos do coração. Dados obtidos após o tratamento por vinte oito dias (4 semanas). Grupos: WKY, controle normotenso (n=5); SHR, controle hipertenso (n=4); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol (n=5); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol (n=5); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol (n=5). Os resultados estão expressos como média ± E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. *p < 0,05 vs WKY; #p < 0,05 vs SHR. Fonte: AUTOR, 2022.

5.11 Efeito do carvacrol sobre o estresse oxidativo no rim

O grupo SHR ($99,5 \pm 1,2$ %, $n=5$) apresentou intensidade de fluorescência estatisticamente ($p > 0,05$) maior em relação do grupo WKY ($66,9 \pm 1,68$ %, $n=4$). Os tratamentos com C50 ($89,7 \pm 1,8$ %, $n=5$), C100 ($80,4 \pm 2$ %, $n=4$) e RE10 ($81 \pm 2,6$ %, $n=4$) foram capazes de reduzir a formação de ânions superóxidos quando comparados com o grupo SHR (Figura 22 A e B).

Figura 22 - Efeito do carvacrol sobre a intensidade de fluorescência do DHE no rim.



Valores médios da intensidade relativa de fluorescência basal (%) do DHE, em cortes histológicos do rim. Dados obtidos após o tratamento por vinte oito dias (4 semanas). Grupos: WKY, controle normotenso (n=4); SHR, controle hipertenso (n=5); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol (n=5); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol (n=4); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol (n=4). Os resultados estão expressos como média ± E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. *p < 0,05 vs WKY; #p < 0,05 vs SHR. Fonte: AUTOR, 2022.

6 Discussão

6. DISCUSSÃO

Este trabalho foi realizado com a finalidade de avaliar os efeitos do carvacrol sobre as alterações cardíacas e renais provenientes da hipertensão, e os possíveis mecanismos envolvidos nesta resposta. O desenvolvimento deste estudo revelou que o tratamento oral com carvacrol consegue reduzir a fibrose no coração e no rim, e melhora a função renal, provavelmente essa resposta está associada a modulação do estresse oxidativo.

A hipertensão é uma condição com alta prevalência e um fator de risco bem conhecido para morbidade e mortalidade cardiovascular, e está associada a alterações funcionais e estruturais em órgãos do corpo, esses danos ou disfunções são comumente denominados como lesão hipertensiva de órgãos-alvo. A gravidade das complicações depende da magnitude da elevação da pressão arterial e de outros fatores de risco associados à lesão dos órgãos-alvo (NADAR, *et al.*, 2016; IRIGOYEN, *et al.*, 2016).

Quando o coração sofre danos em resposta à sobrecarga de pressão, pode ter sua função prejudicada e promover o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares, já quando o rim é o órgão afetado pelo aumento da PA, pode levar ao comprometimento da função renal (OPARIL *et al.*, 2019; SIEVERS; ECKARDT, 2019). Portanto, é importante a busca de substâncias que façam o controle dos níveis elevados de pressão arterial e reduzam os danos aos órgãos afetados.

O uso de produtos derivados de plantas vem demonstrando ser uma fonte importante de recursos terapêuticos para o tratamento de um amplo espectro de doenças nos últimos anos, portanto, se mostram como uma alternativa no tratamento da hipertensão e das suas consequências, como a lesão do órgão-alvo. Neste contexto, sobressaem na literatura os monoterpenos por demonstrar atividades sobre o sistema cardiovascular e renal (DIAS *et al.*, 2022; RAJPUT *et al.*, 2018).

Atualmente o carvacrol, um monoterpeno fenólico, vem ganhando espaço na pesquisa científica por conter propriedades importantes para o tratamento de diversas patologias, este monoterpeno possui atividade antifúngica, anticancerígena, antibacteriana, ansiolítica, antiagregante plaquetário, antiviral, anticancerígena, antioxidante, anti-hipertensiva, entre outros (ABED *et al.*, 2021;

ARUNASREE, 2010; DIAS *et al.*, 2022; MIRANDA-CADENA *et al.*, 2021; SHARIFI-RAD *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2020; WIJESUNDARA *et al.*, 2021). Esses dados, fornecem suporte para a avaliação de suas possíveis ações benéficas nos danos aos órgãos-alvo da hipertensão.

O modelo de ratos escolhidos foram os ratos espontaneamente hipertensos, modelo experimental de hipertensão arterial essencial, pois as alterações fisiopatológicas encontradas nesses animais se assemelham às observadas na hipertensão humana essencial (RISLER; CRUZADO; MIATELLO, 2005). Nessa cepa de ratos há o desenvolvimento de complicações características da hipertensão, como as alterações funcionais, estruturais e o aumento do estresse oxidativo nos vasos sanguíneos, no coração, no rim entre outros órgãos (DU, X. *et al.*, 2021; MACHADO-CALZERRA, 2017; QUINTANA-VILLAMANDOS *et al.*, 2017).

Para esta avaliação, o tratamento com carvacrol foi realizado diariamente, por via oral, durante vinte e oito dias (quatro semanas), nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia, que corresponde a aproximadamente 6,17% e 12,34%, respectivamente, da DL₅₀ por via oral do carvacrol. O tempo de tratamento e doses foram definidas com base em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo nosso laboratório (GONÇALVES, 2018). Além do tratamento com carvacrol, um grupo de animais hipertensos, recebeu resveratrol, na dose de 10 mg/kg/dia, como controle positivo antioxidante, e por promover a diminuição de lesões renais e cardíacas em ratos espontaneamente hipertensos (THANDAPILLY *et al.*, 2009; XUE *et al.*, 2016).

Os níveis pressóricos, foram mensurados antes do início do tratamento, o que constatou que o grupo SHR-CTL apresentou níveis mais elevados quando comparados com o grupo WKY-CTL, confirmando o desenvolvimento da hipertensão neste grupo, de forma semelhante aos estudos encontrados na literatura (DIAS, C. J. *et al.*, 2022). Após o final do tratamento, foram observados a redução dos níveis de pressão dos animais tratados com carvacrol em comparação com o grupo SHR, e não foi observada diferença entre as doses (50 e 100 mg/kg) avaliadas. Além disso, os animais tratados com resveratrol apresentaram níveis mais baixos de pressão arterial sistólica em comparação ao início do tratamento. Desta forma, nosso estudo corrobora com dados presentes

na literatura que demonstram a atividade anti-hipertensiva do carvacrol(DIAS *et al.*, 2022).

A sobrecarga de pressão ou a qualquer estado de doença que aumenta o estresse da parede cardíaca, leva ao processo de remodelamento cardíaco que é responsável por alterações na morfologia e função cardíaca (SOUDERS *et al.*, 2012). A hipertrofia ventricular esquerda, é observada em resposta a uma variedade de sinais fisiopatológicos, como o aumento crônico de pressão arterial, e tem como característica o remodelamento hipertrófico com aumento da massa do cardíaca (MESSERLI; RIMOLDI; BANGALORE, 2017; OPARIL *et al.*, 2019).

Para verificar o aumento da massa cardíaca, característica da hipertrofia, foi realizado o índice de massa do coração, onde o peso do coração foi dividido pelo peso corporal do animal. A partir dessa avaliação, foi observado que o grupo SHR-CTL apresentou significativo aumento do índice de massa do coração, quando comparado ao grupo WKY-CTL. Os resultados foram semelhantes aos descritos na literatura para ratos SHR e WKY (BROWN *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2018).

O índice de massa do coração, dos grupos que foram submetidos a administração de carvacrol durante 28 dias ou de resveratrol, apenas a concentração de 50 mg/kg reduziu o índice de massa do coração quando comparado ao SHR-CTL. Entretanto, em estudos com animais não hipertensos, onde foi induzido a hipertrofia cardíaca, o carvacrol demonstrou ser capaz de diminuir este índice de massa do coração nas concentrações de 50 e 75 mg/kg/dia quando tratados por quatro semanas. (JAMHIRI *et al.*, 2019). Contudo, o nosso modelo de avaliação tem limitações, já que a hipertrofia ventricular esquerda, desenvolvida na hipertensão, tem como característica o aumento da massa ventricular esquerda, e o peso que foi considerado foi o peso total do coração e não apenas o do ventrículo esquerdo (ZHANG, T. *et al.*, 2019).

Em resposta a hipertensão crônica, pode haver um remodelamento cardíaco, que consiste predominantemente em hipertrofia concêntrica, como mudança na geometria do coração. Na hipertrofia concêntrica, o coração apresenta um fenótipo com redução da dimensão da câmara ventricular, aumento da espessura da parede ventricular e aumento da massa cardíaca (MESSERLI; RIMOLDI; BANGALORE, 2017). Além disso, a hipertrofia

patológica geralmente resulta em insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada ou reduzida (NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018).

Dessa forma, a mudança de geometria cardíaca, foi avaliada a partir das alterações no diâmetro da câmara ventricular, espessura da parede ventricular e espessura do septo, utilizando o ecocardiograma transtorácico, uma técnica imagiológica de rotina. A ecocardiografia é um dos principais métodos não invasivos utilizados para avaliação da morfologia e função do coração com excelentes valores diagnósticos e prognósticos em diversas doenças, como na hipertensão (SZTECHMAN *et al.*, 2020).

Os estudos ecocardiográficos foram realizados antes do início do tratamento e ao final do período experimental em todos os grupos de animais. O diâmetro ventricular esquerdo ao final da sístole e ao final da diástole, a espessura da parede posterior e a espessura do septo não evidenciaram diferenças entre o grupo SHR-CTL e WKY-CTL. Semelhante aos resultados anteriores não foi observado diferenças entre o grupo SHR e WKY. Esses resultados corroboram com dados presentes na literatura, onde não foram observado diferenças antes de vinte e um meses de idade (LOCH *et al.*, 2009).

Nos grupos tratados com carvacrol (50 e 100 mg/kg), não foi observado diferenças quando comparados aos grupos controles (SHR e WKY), na avaliação dos parâmetros ecocardiográficos. Esses resultados sugerem que o carvacrol não é capaz de alterar os parâmetros analisados. Entretanto, o tratamento com carvacrol em camundongos com diabetes melitus do tipo 2, conseguiu melhorar a função ventricular esquerda, evidenciando que o carvacrol consegue reverter a função cardíaca quando ela está alterada em modelo experimental de diabetes (HOU *et al.*, 2019).

A massa ventricular esquerda foi estimada antes e ao final do período experimental, e não foram evidenciadas diferenças significativas da MVE entre os grupos SHR-CTL e WKY-CTL ou os grupos que receberam tratamento com carvacrol ou resveratrol. Apesar de muitos estudos demonstrarem que os ratos SHR apresentam MVE aumentada em relação ao WKY-CTL, um estudo demonstrou que essa diferença só é evidenciada a partir dos cinco meses de idade (vinte semanas) (LI *et al.*, 2019). Entretanto, os animais usados durante o nosso protocolo experimental iniciaram o tratamento com três meses (doze semanas) e finalizaram com quatro meses (dezesseis semanas), visto que o

objetivo principal seria a prevenção do aumento da MVE desencadeada pela hipertensão.

O tratamento dos animais com carvacrol e com resveratrol, não demonstraram diferença de MVE, quando comparados com os dois grupos controles e entre si, o que sugere que o carvacrol não causa alterações na massa ventricular esquerda. Entretanto, um estudos com o tempol, um monoterpeno, usando ratos com seis meses de idade, quando a hipertrofia ventricular esquerda já está estabelecida, o tempol foi capaz de restaurar a massa ventricular esquerda para níveis próximos da controle normotenso (SAHEERA; POTNURI; NAIR, 2019).

Embora os avanços na tecnologia de imagem por ultrassom permitam um amplo espectro de medidas ecocardiográficas em ratos, a maioria dos estudos experimentais se concentra em alguns parâmetros básicos, como espessura da parede livre do ventrículo esquerdo, encurtamento fracional e fração de ejeção (SZTECHMAN *et al.*, 2020). Dessa forma, a função cardíaca, mas especificamente, a função sistólica foi avaliada a partir da fração de ejeção e da fração de encurtamento.

A função sistólica foi avaliada a partir da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e do encurtamento fracionado do ventrículo esquerdo. A partir dessa avaliação, foi observado que antes do início e ao final do tratamento, não existiu diferença entre os grupos SHR e WKY. Os resultados encontrados na literatura sobre a FE (%) e FEnc (%) dos ratos espontaneamente hipertensos em comparação com os wistar kyoto são controversos. Em estudos encontrados na literatura, ratos SHR e WKY monitorados ao longo de um a cinco meses de idade, apresentaram diferença na FE (%) a partir dos dois meses de idade (LI *et al.*, 2019). Entretanto, estudos com animais de dez meses de idade, não apresentaram diferença (QUINTANA-VILLAMANDOS *et al.*, 2017), já em estudos com animais de cinquenta semanas, foi observado diferenças tanto na FE (%), quanto na FEnc (%) (LIU *et al.*, 2018).

A avaliação da função sistólica dos grupos tratados com carvacrol, nas duas concentrações avaliadas, não demonstraram diferenças entre o início e final no tratamento, assim como entre ambas as concentrações. Esses dados evidenciam que o tratamento com carvacrol não altera a função sistólica dos ratos hipertensos.

O remodelamento patológico do tecido cardíaco está relacionado ao aumento da duração do complexo QRS e QT. Além disso o aumento do QT, está associado a presença de toxicidade cardíaca ou até mesmo a avaliação da segurança de medicamentos, podem ser observadas a partir da duração do intervalo QT. Em pacientes hipertensos, o aumento da duração do QT está associado ao risco de morte súbita, mesmo entre indivíduos sem doença cardíaca clinicamente reconhecida (KLIMAS; KRUZLIAK; RABKIN, 2015). A duração do intervalo QT foi medida através do ECG. Os grupos controles, assim como os grupos que foram tratados com carvacrol e com resveratrol, não apresentaram diferenças na duração do intervalo QT. Demonstrando que o carvacrol não apresenta toxicidade cardíaca nesta avaliação.

A duração do intervalo QRS também foi analisado, evidenciando que os animais hipertensos, tratados ou não, apresentaram um aumento da duração do intervalo QRS. Em estudos com uma população hipertensa, com HVE, identificada através de eletrocardiograma, o aumento da duração do QRS e do intervalo QT podem estratificar ainda mais o risco de mortalidade, mesmo no cenário de tratamento eficaz para redução da pressão arterial (OIKARINEN *et al.*, 2004). Dessa forma, os dados demonstraram que o carvacrol não foi capaz de reverter a duração do intervalo QRS, que é um dos indicadores de risco de mortalidade na população hipertensa com HVE.

A fibrose miocárdica é uma característica crucial na remodelação cardíaca patológica, que resulta em comprometimento da complacência cardíaca e declínio na função de bombeamento do coração (PENG *et al.*, 2020). A avaliação histológica do coração, demonstrou, o grupo SHR-CTL possui um desarranjo das fibras musculares cardíacas, em relação ao WKY-CTL. O tratamento com carvacrol não conseguiu reverter o desarranjo das fibras musculares cardíacas. Quando a deposição de colágeno foi avaliada, observamos que o grupo SHR-CTL apresentou maior deposição de colágeno em comparação ao grupo WKY-CTL. Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura onde ratos SHR, com quinze semanas, demonstraram ter maior deposição de colágeno em comparação com o grupo WKY-CTL (YANG *et al.*, 2016). O tratamento com carvacrol conseguiu diminuir a deposição de colágeno para níveis inferiores ao controle normotenso. Esse resultado demonstra que o carvacrol é capaz de diminuir a deposição de colágeno no tecido cardíaco.

A pressão arterial elevada pode levar ao comprometimento da função renal, e é um fator de risco crítico para o desenvolvimento de doença renal crônica, e pode contribuir para a progressão da fibrose renal e eventual insuficiência renal (BARRI, 2008; SIEVERS; ECKARDT, 2019)

Para verificar o aumento da massa renal, foi realizado o índice de massa renal, onde o peso do rim foi normalizado pelo peso corporal do animal. Dessa forma, foi observado que após o final do tratamento, o grupo SHR apresentou significativo aumento do índice de massa renal, quando comparado ao grupo WKY. Os resultados foram semelhantes aos descritos na literatura para ratos SHR e WKY (YUN *et al.*, 2017). Entretanto, o tratamento com carvacrol durante 28 dias não conseguiu reverter o índice de massa renal para níveis basais. Os dados sugerem que o carvacrol não impede o aumento do índice de massa renal causado pela hipertensão.

A lesão renal hipertensiva é acompanhada de fibrose intersticial, neste sentido, foi realizada a avaliação histopatológica renal. Os animais hipertensos (SHR, C50, C100 e RE10), apresentaram alterações degenerativas como a degeneração tubular e aglomerado celular quando comparado aos animais WKY. Além disso, os animais SHR-CTL, apresentaram maior deposição de colágeno renal em comparação com os animais do grupo WKY-CTL. Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura onde ratos SHR, com dezesseis semanas, demonstraram ter maior deposição de colágeno em comparação com o grupo WKY (DU *et al.*, 2021). O tratamento com carvacrol, nas duas doses avaliadas, conseguiu diminuir a deposição de colágeno para níveis inferiores ao controle normotenso. Além disso, foi evidenciado que a dose de 100 mg/kg obteve um resultado melhor quando comparado a dose de 50 mg/kg. Esses resultados demonstram o potencial do carvacrol em diminuir a fibrose renal.

Para avaliar a função renal, foram realizados testes bioquímicos para avaliar ureia e creatinina. A partir da avaliação da creatinina, observamos que grupo SHR-CTL não apresentou diferença em relação ao grupo WKY-CTL, assim como não houve diferenças entre grupos controles e os tratados com carvacrol e resveratrol. Resultados semelhantes já foram demonstrados na literatura, onde a creatinina plasmática de animais SHR não teve diferença em comparação com WKY, assim como com animais tratados com 20 mg/kg/dia de

carvacrol (DIAS *et al.*, 2022). A avaliação da ureia plasmática, evidenciou que o grupo SHR apresentou uma concentração maior em relação ao grupo WKY, entretanto, o tratamento com carvacrol conseguiu diminuir as concentrações de ureia. Neste sentido, o carvacrol apresenta um potencial em melhorar a função renal.

Vários processos estão envolvidos nos danos aos órgãos-alvo da hipertensão, e estes incluem ativação endotelial, ativação plaquetária, alterações de renovação colágeno, e das vias fibrinolíticas, hiperatividade simpática e remodelamento da MEC, bem como por vários sistemas hormonais, incluindo o SRAA. Comum a todos esses processos ocorre um aumento da biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio conhecido como estresse oxidativo. Além disso, estudos já demonstraram que o aumento do estresse oxidativo estava associado à fibrose renal (ZHAO *et al.*, 2008) e cardíaca (WANG *et al.*, 2021).

O carvacrol demonstrou ter uma ação antioxidante, exibindo uma atividade sequestrante de radicais, como o ânion superóxido e o óxido nítrico (JAMALI *et al.*, 2021). Dessa forma, buscamos avaliar a modulação antioxidante do carvacrol no tecido cardíaco e no rim.

Para verificar se o carvacrol possuía uma ação moduladora do estresse oxidativo, avaliamos se o tratamento com carvacrol modificaria os níveis basais de ânions superóxidos em cortes de coração e de rim de animais SHR, por meio da medida da intensidade de fluorescência da sonda DHE, considerada a sonda fluorescente mais específica para a detecção deste tipo de espécie reativa (WOJTALA *et al.*, 2014). Nestes experimentos, o grupo SHR-CTL, apresentaram um significativo aumento da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DHE no tecido do coração e do rim, quando comparado ao grupo WKY-CTL, demonstrando o aumento dos níveis basais do ânion superóxido e do estresse oxidativo nesses órgãos, dos animais hipertensos. Este resultado corrobora com os dados na literatura, que demonstram que animais SHR possuem aumento do estresse oxidativo cardíaco (RASO *et al.*, 2013).

O tratamento durante os vinte e oito dias com carvacrol, nas duas doses estudadas (50 e 100 mg/kg), atenuou de forma significativa os níveis de fluorescência basal da sonda DHE no tecido cardíaco e do rim quando comparados ao grupo SHR-CTL, apresentando níveis de ânions superóxidos

semelhantes ao grupo WKY-CTL. Os animais tratados com resveratrol, grupo RE10, também apresentaram redução na intensidade de fluorescência da sonda DHE. De forma semelhante, o tratamento com carvacrol nas duas doses estudadas, atenuou os níveis de ânion superóxido no rim, em comparação com o grupo SHR-CTL.

Sob condições fisiológicas, EROs desempenha um papel importante na sinalização celular implicada na proliferação, diferenciação, apoptose e defesa imunológica em várias linhagens celulares, incluindo células renais e cardíacas. Em certas condições patológicas, como na hipertensão, o aumento da geração de EROs e/ou depleção do sistema de defesa antioxidante leva ao aumento da atividade de espécies reativas, resultando em dano tecidual, afetando a estrutura e a função cardíaca e renal (GRIENDLING *et al.*, 2021; OZBEK, 2012).

Estudos na literatura já mostraram que o aumento da fibrose renal está associada a redução de NADPH no rim (KHODO *et al.*, 2012). Além disso, a redução da fibrose cardíaca já foi associada a regulação negativa da NADPH (WANG *et al.*, 2021). Como mencionado anteriormente, o carvacrol possui atividade antioxidante, estudos mostram que o carvacrol consegue reduzir a formação de EROs por meio da modulação sobre a expressão de NADPH (LEE *et al.*, 2015).

Dessa forma, sugerimos que a redução do estresse oxidativo modulado pelo carvacrol, provavelmente está associado a inibição da NADPH, e pode estar relacionada a redução da fibrose cardíaca e renal, e melhora da função renal. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

Em conjunto, os resultados mostrados neste estudo, mostram que o tratamento com o carvacrol melhora a hipertensão, não altera a função cardíaca, melhora a fibrose cardíaca e renal associada a hipertensão, através da modulação do estresse oxidativo no tecido cardíaco e do rim.

7 Conclusões

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo sugerem que a administração por via oral de carvacrol atenuou a pressão arterial sistólica de ratos com hipertensão essencial, melhora a função renal, diminui a fibrose cardíaca e renal e reduz o estresse oxidativo no tecido cardíaco e no rim.

Referências

REFERÊNCIAS

ABED, A. H. *et al.* Carvacrol essential oil: A natural antibiotic against zoonotic multidrug-resistant staphylococcus species isolated from diseased livestock and humans. **Antibiotics**, 2021. v. 10, n. 11.

ADAMS, L.; FRANCO, M. C.; ESTEVEZ, A. G. Reactive nitrogen species in cellular signaling. **Experimental Biology and Medicine** 2015; 2015. v. 240, p. 711–717.

ALVES, R. M. F. R. Efeito do Carvacrol em Ratos com Hipertensão Pulmonar Induzida por Monocrotalina Efeito do Carvacrol em Ratos com Hipertensão Pulmonar Induzida por Monocrotalina. 2019.

ARAUJO, M.; WILCOX, C. S. **Oxidative stress in hypertension: Role of the kidney. Antioxidants and Redox Signaling.**

ARUNASREE, K. M. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. **Phytomedicine**, 2010. v. 17, n. 8–9, p. 581–588. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.12.008>>.

AZAR, A. D. *et al.* Echocardiographic Evaluation of Cardiac Function in Ischemic Rats : Value of M-Mode Echocardiography. **Rajaie Cardiovascular Medical**, 2014. v. 3, n. 4, p. 1–5.

BARADARAN, A.; NASRI, H.; RAFI EIAN-KOPAEI, M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. **Journal of Research in Medical Sciences**, 2014. v. 358.

BARRI, Y. M. Hypertension and Kidney Disease : A Deadly Connection. **Current hypertension reports**, 2008. v. 10, p. 39–45.

BARROSO, W. K. S. *et al.* Brazilian guidelines of hypertension - 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2021. v. 116, n. 3, p. 516–658.

BREZNICEANU, M. L. *et al.* Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. **Diabetes**, fev. 2008. v. 57, n. 2, p. 451–459.

BROWN, L. *et al.* Echocardiographic Assessment of Cardiac Structure and Function in Rats. **Heart, Lung and Circulation**, 2002. v. 11, p. 167–173.

CARREÑO, J. E. *et al.* Cardiac Hypertrophy Molecular and Cellular Events. **Rev Esp Cardiol**, 2006. v. 59, n. 5, p. 473–86.

CASE, A. J.; TIAN, J.; ZIMMERMAN, M. C. Increased mitochondrial superoxide in the brain, but not periphery, sensitizes mice to angiotensin II-mediated hypertension. **Redox Biology**, 1 abr. 2017. v. 11, p. 82–90.

CHANG, K. *et al.* Association between C-reactive protein , corrected QT interval and presence of QT prolongation in hypertensive patients. **Kaohsiung Journal**

of Medical Sciences, 2014. v. 30, p. 310–315.

CIFUENTES, M. E.; PAGANO, P. J. Targeting reactive oxygen species in hypertension. **Pathophysiology of hypertension phenomenon**, 2006. v. 15, p. 179–186.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R.; SALLIS, E. S.; ANTUNES, T. A.; MATTEI, A.; RODRIGUES, M. R.; MEIRELES, M. C.A.; MELLO, J. R. B. Toxicidade Pré-Clinica em Doses Repetidas do Óleo Essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em Ratas *Wistar*. **Latin American Journal of Pharmacy**. 2008. v. 27, nº 5. p. 704-9.

COSTA, Herikson Araujo *et al.* Effect of treatment with carvacrol and aerobic training on cardiovascular function in spontaneously hypertensive rats. **Experimental Physiology**, 2021. v. 106, n. 4, p. 891–901.

DANTAS, B. P. V. O carvacrol reduz a pressão arterial via ativação de canais receptores de potencial transiente em ratos espontaneamente hipertensos O carvacrol reduz a pressão arterial via ativação de canais receptores de potencial transiente em ratos espontaneamente hip. 2014. p. 1–144.

DIAS, C. J. *et al.* Carvacrol reduces blood pressure, arterial responsiveness and increases expression of MAS receptors in spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, 2022. v. 917, n. December 2021.

DORNAS, W. C.; SILVA, M. E. Animal models for the study of arterial hypertension. *Journal of biosciences*, 2011. V. 36, n. 4, p. 731-737.

DU, X. *et al.* Tengdan Capsule Prevents Hypertensive Kidney Damage in SHR by Inhibiting Periostin-Mediated Renal Fibrosis. **Frontiers in Pharmacology**, 2021. v. 12, n. May, p. 1–19.

FAN, D. *et al.* Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. **Fibrogenesis and Tissue Repair**, 2012. v. 5, n. 1.

GOLDSMITH, E. C.; BORG, T. K. The dynamic interaction of the extracellular matrix in cardiac remodeling. **Journal of Cardiac Failure**, 2002. v. 8, n. 6 SUPPL.

GONÇALVES, T. A. F. Caracterização dos beneficios do carvacrol sobre a disfunção erétil de ratos hipertensos. 2018. p 93.

GRIENDLING, K. K. *et al.* Oxidative Stress and Hypertension. **Circulation Research**, 2021. p. 993–1020.

HAGAN, E. C. *et al.* Food flavourings and compounds of related structure. II. Subacute and chronic toxicity. **Food and Cosmetics Toxicology**, 1967. v. 5, n. C, p. 141–157.

HAMM, L. L.; HERING-SMITH, K. S. Pivotal role of the kidney in hypertension. [S.l.]: [s.n.], 2010. V. 340, p. 30–32.

- HANCOCK, E. W. *et al.* AHA/ACCF/HRS Recommendations for the Standardization and Interpretation of the Electrocardiogram. Part V: Electrocardiogram Changes Associated With Cardiac Chamber Hypertrophy A Scientific Statement From the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; the American College of Cardiology Foundation; and the Heart Rhythm Society. **Journal of the American College of Cardiology**, 2009. v. 53, n. 11, p. 992–1002.
- HOLJAK, E. J. B.; SAVINOVA, I.; NELSON, V. L.; OGILVIE, L. M.; NG, A. M.; EDGETT, B. A.; PLATT, M. J.; BRUNT, K. R.; ASK, K.; SIMPSON, J. A. Na Evaluation of Cardiac Health in the Spontaneously Hypertensive Rat Colony: Implications of Evolutionary Driven Increases in Concentric Hypertrophy. **American journal of hypertension**, 2022. V. 35, n. 3, p. 264–271.
- HONG, Y. A.; PARK, C. W. Catalytic antioxidants in the kidney. **Antioxidants**, 1 jan. 2021. v. 10, n. 1, p. 1–22.
- HOU, N. *et al.* Carvacrol attenuates diabetic cardiomyopathy by modulating the PI3K/Akt/GLUT4 pathway in diabetic mice. **Frontiers in Pharmacology**, 2019. v. 10, n. September, p. 1–15.
- HUANG, C. C. *et al.* Anti-renal fibrotic effect of exercise training in hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, 20 fev. 2018. v. 19, n. 2.
- JAMALI, T. *et al.* In - vitro , in - vivo , and in - silico assessment of radical scavenging and cytotoxic activities of Oliveria decumbens essential oil and its main components. **Scientific Reports**, 2021. n. 0123456789, p. 1–19.
- JAMHIRI, M. *et al.* Carvacrol ameliorates pathological cardiac hypertrophy in both in-vivo and in-vitro models. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, 2019. v. 18, n. 3, p. 1380–1394.
- JOHAR, S. *et al.* Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. **The FASEB Journal**, jul. 2006. v. 20, n. 9, p. 1546–1548.
- JORDAN, J.; KURSCHAT, C.; REUTER, H. Arterial hypertension-diagnosis and treatment. **Deutsches Arzteblatt International**, 20 ago. 2018. v. 115, n. 33–34, p. 557–558.
- KATTOOR, A. J.; POTHINENI, N. V. K.; PALAGIRI, D.; MEHTA, J. L. Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, 2017. V. 19, n. 42. DOI: 10.1007/s11883-017-0678-6.
- KATZ, T. L. *et al.* Cálculo da Massa Ventricular à Ecocardiografia : Análise Crítica Critical Analysis of Echocardiographic Measurements of Left Ventricular Mass. **Rev bras ecocardiogr imagem cardiovasc**, 2010. v. 23, n. 4, p. 95–100.
- KHODO, S. N. *et al.* NADPH-Oxidase 4 Protects against Kidney Fibrosis during Chronic Renal Injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, 2012. v. 23, n. 12, p. 1–10.

KITADA, M.; XU, J.; OGURA, Y.; MONNO, I.; KOYA, D. Manganese superoxide dismutase dysfunction and the pathogenesis of kidney disease. **Frontiers in Physiology**, 2020. V. 11, n. 755. DOI: 10.3389/fphys.2020.00755

KLIMAS, J.; KRUZLIAK, P.; RABKIN, S. W. Modulation of the QT interval duration in hypertension with antihypertensive treatment. **Hypertension Research**, 7 jul. 2015. v. 38, n. 7, p. 447–454.

KUĆMIERZ, J. *et al.* Molecular interactions of arterial hypertension in its target organs. **International Journal of Molecular Sciences**, 1 set. 2021. v. 22, n. 18.

LEE, K. P. *et al.* Carvacrol inhibits atherosclerotic neointima formation by downregulating reactive oxygen species production in vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, 2015. v. 240, n. 2, p. 367–373.

LEONG, X. F.; NG, C. Y.; JAARIN, K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. **BioMed research international**, 2015. v. 2015, n. 528757.

LI, Jie *et al.* Metabolic Changes in Spontaneously Hypertensive Rat Hearts Precede Cardiac Dysfunction and Left Ventricular Hypertrophy. **Journal of the American Heart Association**, 2019. v. 8, n. 4.

LI, S. *et al.* Drug-induced QT Prolongation Atlas (DIQTA) for enhancing cardiotoxicity management. **Drug Discovery Today**, 1 mar. 2022. v. 27, n. 3, p. 831–837.

LIFTON, R. P.; GHARAVI, A. G.; GELLER, D. S. Molecular Mechanisms Review of Human Hypertension demonstrate that the risk of cardiovascular diseases and death rises in graded fashion with increasing blood pressure (Mosterd *et al.* **Cell**, 2001. v. 104, p. 545–556.

LIMA, M. D. S. *et al.* Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, 2013. v. 699, n. 1–3, p. 112–117.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, 2013. v. 60, p. 1–4.

LIU, Chi *et al.* Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats. **Amino Acids**, 2018. v. 50, n. 8, p. 1071–1081.

LIU, W. *et al.* Qingxuan Jiangya Decoction Mitigates Renal Interstitial Fibrosis in Spontaneously Hypertensive Rats by Regulating Transforming Growth Factor- β 1/Smad Signaling Pathway. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2017. v. 2017.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M. *et al.* In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. **Toxicology in Vitro**, 2015. v. 29, n. 4, p. 647–656.

LOCH, D. *et al.* Rosuvastatin Attenuates Heart Failure and Cardiac Remodelling in the Ageing Spontaneously Hypertensive Rat. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2009. v. 105, p. 262–270.

MACHADO-CALZERRA, N. T. Liofilizado do vinho tinto do vale do rio são francisco reduz o estresse oxidativo e melhora as alterações vasculares, cardíacas e plaquetárias em modelo animal de hipertensão. 2017. p. 166.

MANRIQUE, C. *et al.* The Renin Angiotensin Aldosterone System in Hypertension: Roles of Insulin Resistance and Oxidative Stress. **Medical Clinics of North America**, maio. 2009. v. 93, n. 3, p. 569–582.

MARCHESE, A. *et al.* The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. **Biofouling**, 2018. v. 34, n. 6, p. 630–656.

MARTELLI, A. The Influence of the Renal System in the Long-term Control of Blood Pressure. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, 2013. v. 15, p. 75–80.

MENNUNI, S. *et al.* Hypertension and kidneys: Unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. **Journal of Human Hypertension**.

MESSERLI, F. H.; RIMOLDI, S. F.; BANGALORE, S. The Transition From Hypertension to Heart Failure Contemporary Update. **JACC: Heart Failure**, 2017a. v. 5, n. 8, p. 543–551.

MILLS, K. T.; STEFANESCU, A.; HE, J. The global epidemiology of hypertension. **Nature Reviews Nephrology**, 1 abr. 2020. v. 16, n. 4, p. 223–237.

MIRANDA-CADENA, K. *et al.* In vitro activities of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol against *Candida* biofilms. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2021. v. 143.

NAKAMURA, M.; SADOSHIMA, J. **Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy**. **Nature Reviews Cardiology**. Nature Publishing Group.

NOGUEIRA, A.; PIRES, M. J.; OLIVEIRA, P. A. Pathophysiological mechanisms of renal fibrosis: A review of animal models and therapeutic strategies. **In Vivo**. 2017. v. 31, n. 1, p. 1–22.

OIKARINEN, L. *et al.* QRS Duration and QT Interval Predict Mortality in Hypertensive Patients With Left Ventricular Hypertrophy The Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension Study. 2004.

OPARIL, S. *et al.* Hypertension. **Nat Rev Dis Primers**, 2019. v. 4, n. 1, p. 18014.

OZBEK, E. Induction of Oxidative Stress in Kidney. **International Journal of Nephrology**, 2012. v. 2012, p. 9.

PENG, S. *et al.* LCZ696 Ameliorates Oxidative Stress and Pressure Overload-Induced Pathological Cardiac Remodeling by Regulating the Sirt3 / MnSOD Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2020. v. 2020.

PINTÉROVÁ, M.; KUNEŠ, J.; ZICHA, J. Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. **Physiological research**, 2011. v. 60, n. 3, p. 381,.

POL, A. VAN DER *et al.* Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. **European Journal of Heart Failure**. 2019, 21(4), 425–435. DOI: <https://doi.org/10.1002/ejhf.1320>

PORTER, K. E.; TURNER, N. A. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. **Pharmacology and Therapeutics**. *Pharmacology & therapeutics*, 2009, 123(2), 255–278.

POUROVA, J. *et al.* Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. **Acta Physiologica**, jan. 2010. v. 198, n. 1, p. 15–35.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiological Reviews**. 2008, 88(4), 1243–1276.

QUINTANA-VILLAMANDOS, B. *et al.* Dronedarone produces early regression of myocardial remodelling in structural heart disease. **PLoS ONE**, 2017. v. 12, n. 11, p. 1–13.

RAJPUT, J. D. *et al.* Perspectives on medicinal properties of natural phenolic monoterpenoids and their hybrids. **Molecular Diversity**, 2018. v. 22, n. 1, p. 225–245.

RAMACHANDRA, C. J. A. *et al.* Free Radical Biology and Medicine Oxidative stress in cardiac hypertrophy : From molecular mechanisms to novel therapeutic targets. **Free Radical Biology and Medicine**, 2021. v. 166, n. December 2020, p. 297–312.

RASO, G. M. *et al.* N -Palmitoylethanolamide protects the kidney from hypertensive injury in spontaneously hypertensive rats via inhibition of oxidative stress. **Pharmacological Research**, 2013. v. 76, p. 67–76.

RATLIFF, B. B. *et al.* Oxidant mechanisms in renal injury and disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, 20 jul. 2016. v. 25, n. 3, p. 119–146.

RIMOLDI, S. F.; SCHERRER, U.; MESSERLI, F. H. Secondary arterial hypertension: When, who, and how to screen? **European Heart Journal**, 14 maio. 2014. v. 35, n. 19.

RISLER, N. R.; CRUZADO, M. C.; MIATELLO, R. M. Vascular Remodeling in Experimental Hypertension. **The Scientific World**, 2005. v. 5, p. 959–971.

SAHEERA, S.; POTNURI, A. G.; NAIR, R. R. Protective effect of antioxidant Tempol on cardiac stem cells in chronic pressure overload hypertrophy. **Life**

Sciences, 2019. v. 222, n. February, p. 88–93.

SAMMAN TAHHAN, A. *et al.* Association between oxidative stress and atrial fibrillation. **Heart Rhythm**, 1 dez. 2017. v. 14, n. 12, p. 1849–1855.

SCHNEIDER, M. P. *et al.* Protective role of extracellular superoxide dismutase in renal ischemia/reperfusion injury. **Kidney International**, 2010. v. 78, n. 4, p. 374–381.

SEDDON, M.; LOOI, Y. H.; SHAH, A. M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. **Heart**, ago. 2007. v. 93, n. 8, p. 903–907.

SENONER, T.; DICHTL, W. Oxidative stress in cardiovascular diseases: Still a therapeutic target? **Nutrients**, 1 set. 2019. v. 11, n. 9.

SHARIFI-RAD, M. *et al.* Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, 2018. v. 32, n. 9, p. 1675–1687.

SHEN, Y. *et al.* N-acetylcysteine alleviates angiotensin II-mediated renal fibrosis in mouse obstructed kidneys. **Acta Pharmacologica Sinica**, 2016. v. 37, n. 5, p. 637–644.

SHIMIZU, I.; MINAMINO, T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 1 ago. 2016. v. 97, p. 245–262.

SIEVERS, L. K.; ECKARDT, K. U. Molecular mechanisms of kidney injury and repair in arterial hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, 1 maio. 2019. v. 20, n. 9.

SILVA, E. R. *et al.* Pharmacological Effects of Carvacrol in In vitro Studies: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, 2018. v. 24, n. 29, p. 3454–3465.

SILVEIRA, Z. D. S. *et al.* Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Molecules**, 2020. v. 25, p. 1–10.

SOUDERS, C. A. *et al.* Pressure overload induces early morphological changes in the heart. **American Journal of Pathology**, out. 2012. v. 181, n. 4, p. 1226–1235.

STOMPÓR, T.; PERKOWSKA-PTASINSKA, A. Hypertensive kidney disease: A true epidemic or rare disease?. **Polish Archives of Internal Medicine**. 2020, 130(2), 130–139.

SU, L. J. *et al.* Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2019. v. 2019.

SUN, H. J. Current Opinion for Hypertension in Renal Fibrosis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 2019, V. 1165, p. 37–47.

- SUNAMI, R. *et al.* Acatalasemia sensitizes renal tubular epithelial cells to apoptosis and exacerbates renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. **J Physiol Renal Physiol**, 2004. v. 286.
- SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2015. v. 55, n. 3, p. 304–318.
- SZTECHMAN, D. *et al.* Transthoracic echocardiography : from guidelines for humans to cardiac ultrasound of the heart in rats Transthoracic echocardiography : from guidelines for humans to cardiac ultrasound of the heart in rats. **Physiological Measurement**, 2020. v. 41, p. 0–16.
- TAN, R. J. *et al.* Extracellular superoxide dismutase protects against proteinuric kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, 1 out. 2015. v. 26, n. 10, p. 2447–2459.
- TAUFFENBERGER, A.; MAGISTRETTI, P. J. Reactive Oxygen Species: Beyond Their Reactive Behavior. **Neurochemical Research**, 1 jan. 2021. v. 46, n. 1, p. 77–87.
- THANDAPILLY, S. J. *et al.* Resveratrol Prevents the Development of Pathological Cardiac Hypertrophy and Contractile Dysfunction in the SHR Without Lowering Blood Pressure. **American Journal of Hypertension**, 2009. v. 23, n. 2, p. 192–196.
- TOUYZ, R. M. *et al.* Oxidative Stress: A Unifying Paradigm in Hypertension. **The Canadian journal of cardiology**. 2020, 36(5), 659–670.
- USHIO-FUKAI, M. *et al.* Interplay between Reactive Oxygen/Reactive Nitrogen Species and Metabolism in Vascular Biology and Disease. **Antioxidants & redox signaling**. 2021, 34(16), 1319–1354.
- VINCENZI, M. DE *et al.* Constituents of aromatic plants: Carvacrol. **Fitoterapia**, 2004. v. 75, n. 7–8, p. 801–804.
- WANG, Li *et al.* Antiviral mechanism of carvacrol on HSV-2 infectivity through inhibition of RIP3-mediated programmed cell necrosis pathway and ubiquitin-proteasome system in BSC-1 cells. **BMC Infectious Diseases**, 2020. v. 20, n. 1, p. 1–16.
- WANG, Q. *et al.* Peptides Ghrelin ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction by regulating the Nrf2 / NADPH / ROS pathway. **Peptides**, 2021. v. 144, n. March, p. 170613.
- WANG, Ying *et al.* Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. **Journal of Cell Biology**, 1 jun. 2018. v. 217, n. 6, p. 1915–1928.
- WEN, X. *et al.* Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, 2013. v. 65, p. 402–410.

WIJESUNDARA, N. M. *et al.* Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against *Streptococcus pyogenes* through cell membrane damage. **Scientific Reports**, 2021. v. 11, n. 1, p. 1–14.

WILLIAMS, B. *et al.* **2018 practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European society of cardiology and the European society of hypertension ESC/ESH task force for the management of arterial hypertension**. [S.l.]: [s.n.], 2018. V. 36.

WOJTALA, A. *et al.* Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. **Methods in enzymology**. 2014, 542, 243–262.

WORONIECKI, R. P. *et al.* Left ventricular hypertrophy in pediatric hypertension: A mini review. **Frontiers in Pediatrics**. 2017, 101.

WU, Q. Q. *et al.* Mechanisms contributing to cardiac remodelling. *Clinical Science*. **Clinical science**. 2017, 131(18), 2319–2345.

XIA, Y.; ENTMAN, M. L.; WANG, Yanlin. Critical role of CXCL16 in hypertensive kidney injury and fibrosis. **Hypertension**, 2013. v. 62, n. 6, p. 1129–1137.

XIONG, Y. *et al.* Morphological study of the effect of aerobic exercise on organs and arteries in spontaneously hypertensive rats. **Healthcare (Switzerland)**, 1 ago. 2021. v. 9, n. 8.

XUE, Hai-Yan *et al.* Resveratrol ameliorates renal injury in spontaneously hypertensive rats by inhibiting renal micro-inflammation. **Bioscience reports**, 2016. v. 36, n. 3, p. 1–11.

YAN, H. *et al.* Defining therapeutic targets for renal fibrosis: Exploiting the biology of pathogenesis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. 2021, 143, 112115.

YANG, J. *et al.* Alteration of RhoA Prenylation Ameliorates Cardiac and Vascular Remodeling in Spontaneously Hypertensive Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 2016. n. 39, p. 229–241.

YU, J.; ZHANG, B.; SU, X. L.; TIE, R.; CHANG, P.; ZHANG, X. C.; WANG, J. B.; ZHAO, G.; MIAO-ZHANG, Z.; ZHANG, H. F. Natriuretic Peptide Resistance of Mesenteric Arteries in Spontaneous Hypertensive Rat Is Alleviated by Exercise. **Physiol. Res.**, 2015.

YUN, L. *et al.* The effects of single and combined application of ramipril and losartan on renal structure and function in hypertensive rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, 2017. p. 1–7.

ZHANG, T. *et al.* Calcimimetic R568 improved cardiac remodeling by classic and novel renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. **Experimental Biology and Medicine**, 2019. v. 244, n. 10, p. 789–801.

ZHAO, G. J. *et al.* Ca²⁺-Dependent NOX5 (NADPH Oxidase 5) Exaggerates Cardiac Hypertrophy through Reactive Oxygen Species Production.

Hypertension, 1 set. 2020. p. 827–838.

ZHAO, W. *et al.* Kidney fibrosis in hypertensive rats: Role of oxidative stress.
American Journal of Nephrology, 2008. v. 28, n. 4, p. 548–554.

Anexos

ANEXO A



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito do Carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil)-fenol) sobre o remodelamento cardíaco e renal de ratos espontaneamente hipertensos", protocolada sob o CEUA nº 6638150621 (ID 001487), sob a responsabilidade de **Isac Almeida de Medeiros e equipe; Viviane Silva Lima** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 13/10/2021.

We certify that the proposal "Evaluation of the effect of Carvacrol (2-methyl-5- (1-methylethyl) -phenol) on cardiac and renal remodeling of spontaneously hypertensive rats", utilizing 60 isogenic rats (60 males), protocol number CEUA 6638150621 (ID 001487), under the responsibility of **Isac Almeida de Medeiros and team; Viviane Silva Lima** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 10/13/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 10/2021 a 04/2022 Área: Ciências Farmacêuticas

Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM	sexo:	Machos	idade:	8 a 12 semanas	N:	12
Espécie:	Ratos isogênicos			Peso:	200 a 300 g		
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar Kyoto						
Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM	sexo:	Machos	idade:	8 a 12 semanas	N:	48
Espécie:	Ratos isogênicos			Peso:	200 a 300 g		
Linhagem:	Rattus Norvegicus - SHR						

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, IPeFarM, UFPB.

João Pessoa, 02 de dezembro de 2021

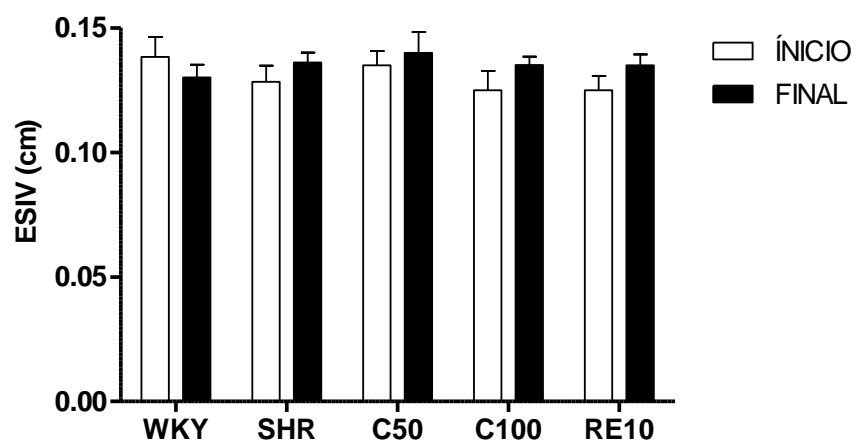
Prof. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivã Carmem Talleri
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

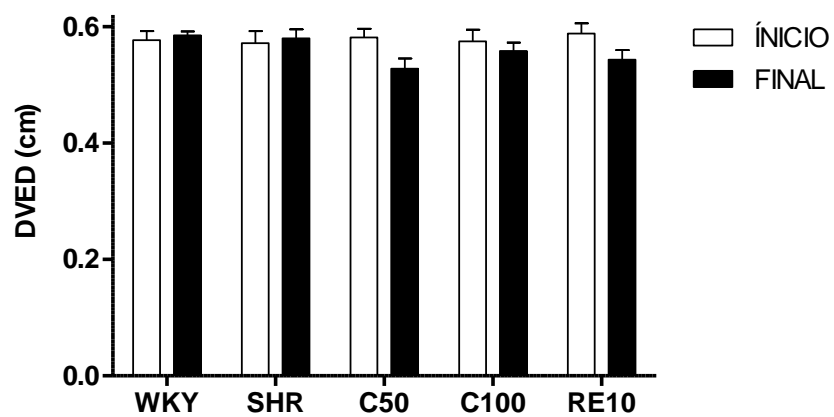
ANEXO B

Figura 23 - Efeito do carvedilol sobre parâmetros ecocardiográficos.

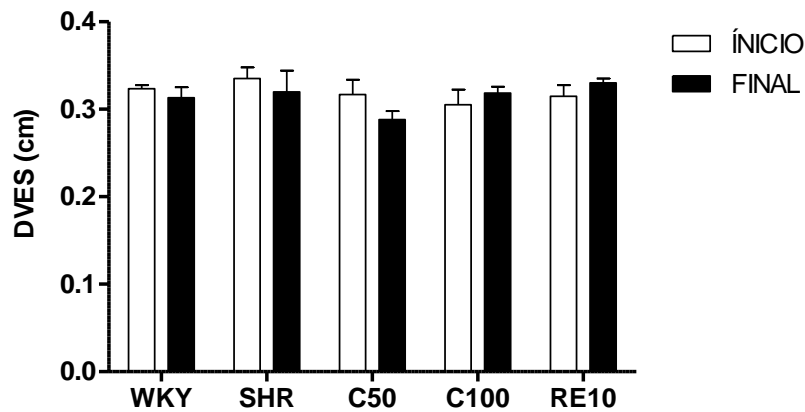
A



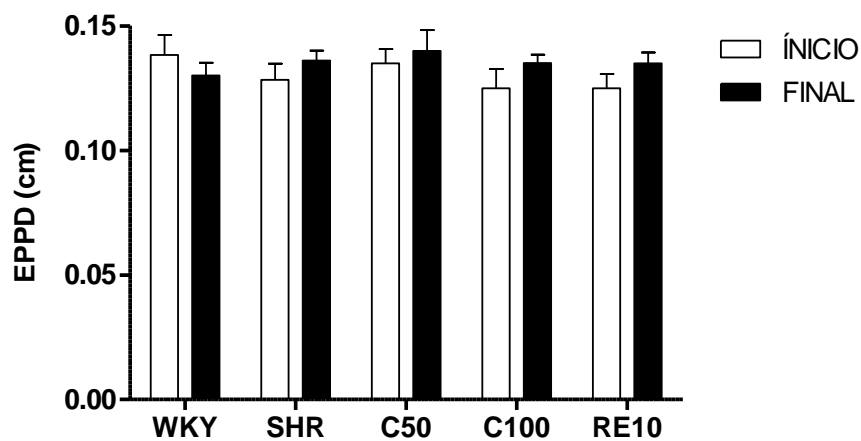
B



C

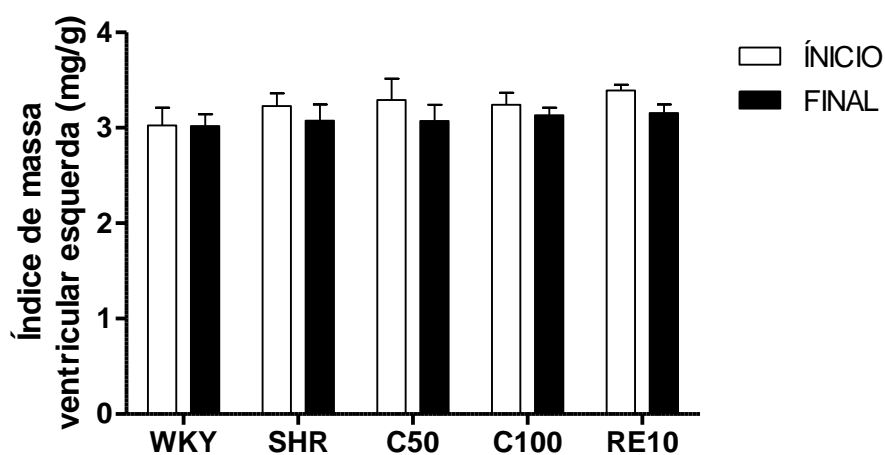


D



Valores médios dos parâmetros ecocardiográficos. A) Efeito do carvacrol sobre a espessura do septo intraventricular. B) Efeito do carvacrol sobre o diâmetro do ventrículo esquerdo ao final da diástole. C) Efeito do carvacrol sobre o diâmetro do ventrículo esquerdo ao final da sístole. D) Efeito do carvacrol sobre a espessura da parede posterior ao final da diástole. Dados obtidos antes e após o tratamento por vinte oito dias (4 semanas). Grupos: WKY, controle normotenso (n=6); SHR, controle hipertenso (n=5); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol (n=5); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol (n=6); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol (n=6). Os resultados estão expressos como média \pm E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. Fonte: LIMA, 2022.

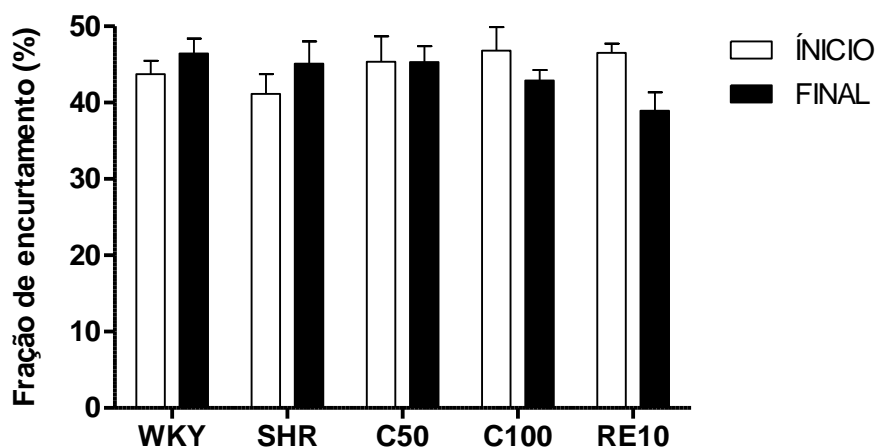
Figura 24 - Índice de massa ventricular esquerda.



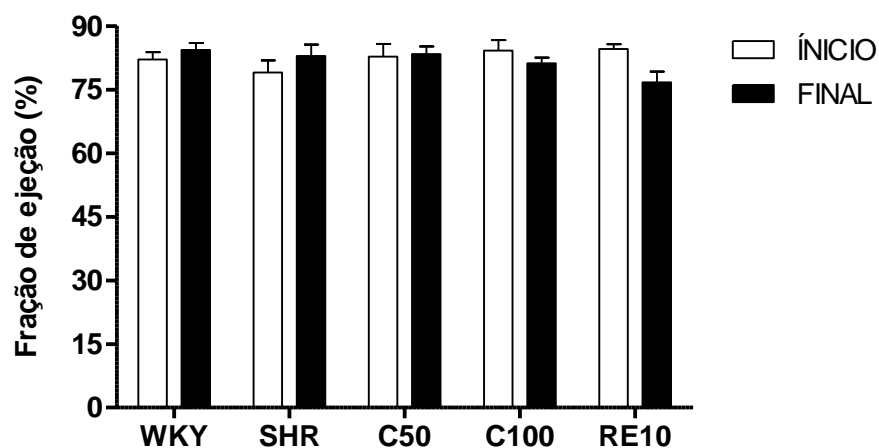
Valores médios efeito do carvacrol sobre o índice de massa ventricular esquerda. Dados obtidos antes e após o tratamento por vinte oito dias (4 semanas). Grupos: WKY, controle normotenso (n=6); SHR, controle hipertenso (n=5); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol (n=5); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol (n=6); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol (n=6). Os resultados estão expressos como média \pm E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. Fonte: LIMA, 2022.

Figura 25 - Efeito do carvacrol sobre a fração de ejeção e fração de encurtamento.

A



B



Valores médios dos parâmetros ecocardiográficos. A) Efeito do carvacrol sobre a fração de encurtamento (%). B) Efeito do carvacrol sobre a fração de ejeção (%). Dados obtidos antes e após o tratamento por vinte oito dias (4 semanas). Grupos: WKY, controle normotenso (n=6); SHR, controle hipertenso (n=5); C50, animais hipertensos tratados com 50 mg/kg de carvacrol (n=5); C100, animais hipertensos tratados com 100 mg/kg de carvacrol (n=6); RE10, animais hipertensos tratados com 10 mg/kg de resveratrol (n=6). Os resultados estão expressos como média \pm E. P. M. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de *Turkey*. Fonte: LIMA, 2022.