



ESTUDO DE ALTERAÇÕES EM ARTÉRIAS DE RATOS ESPONTANEAMENTE  
HIPERTENSOS APÓS O TRATAMENTO COM BLOQUEADORES DOS  
RECEPTORES DA ANGIOTENSINA II USANDO MICROSCOPIA DE RAIOS X  
DE BAIXA ENERGIA COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Arissa Pickler Oliveira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Nuclear.

Orientador(es): Delson Braz

Regina Cely Rodrigues Barroso

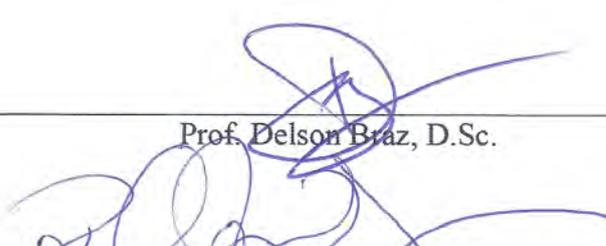
Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2019

ESTUDO DE ALTERAÇÕES EM ARTÉRIAS DE RATOS ESPONTANEAMENTE  
HIPERTENSOS APÓS O TRATAMENTO COM BLOQUEADORES DOS  
RECEPTORES DA ANGIOTENSINA II USANDO MICROSCOPIA DE RAIOS X  
DE BAIXA ENERGIA COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Arissa Pickler Oliveira

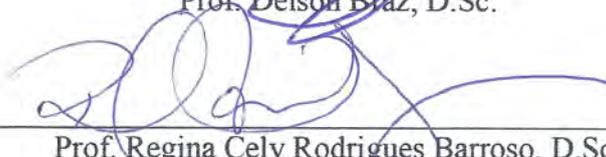
TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ  
COIMBRA PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Examinada por:



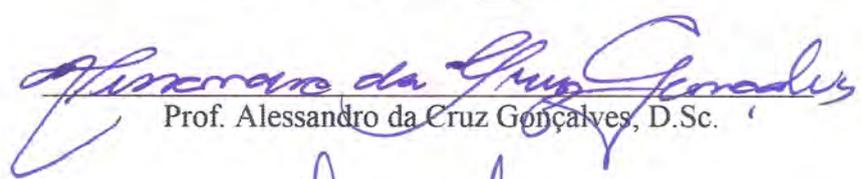
---

Prof. Delson Braz, D.Sc.



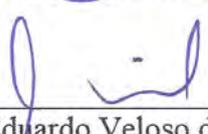
---

Prof. Regina Cely Rodrigues Barroso, D.Sc.



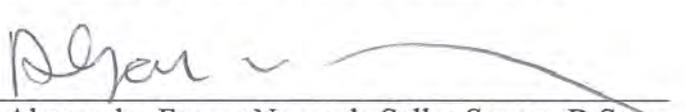
---

Prof. Alessandro da Cruz Gonçalves, D.Sc.



---

Dr. Carlos Eduardo Veloso de Almeida, Ph.D.



---

Dr. Alessandro Facure Neves de Salles Soares, D.Sc.



---

Prof. Carlos Alberto Pérez, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL  
FEVEREIRO DE 2019

Oliveira, Arissa Pickler

Estudo de alterações em artérias de ratos espontaneamente hipertensos após o tratamento com bloqueadores dos receptores da angiotensina II usando microscopia de raios X de baixa energia com radiação síncrotron/ Arissa Pickler Oliveira. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2019.

XIII, 108 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Delson Braz

Regina Cely Rodrigues Barroso

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2019.

Referências Bibliográficas: p. 97-108.

1. LEXRF. 2. Artérias. 3. Hipertensão. I. Braz, Delson *et al.*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título.

*Aos meus pais, Arilza e Henrique.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por ter me dado força e determinação para conseguir conquistar meus objetivos.

À minha mãe, minha rainha e meu exemplo de vida. Sem ela ao meu lado nada seria possível. Obrigada por aturar todo meu estresse e me dar todo o suporte que precisei sempre.

À professora Regina Cely, pela oportunidade que me deu ainda na iniciação científica. Foi com ela que descobri meu amor pela pesquisa e me deu forças para seguir até aqui. Obrigada pela sua orientação e principalmente pela amizade e carinho durante todo esse trabalho.

Ao professor Delson Braz, por me orientar e me proporcionar esse momento único da minha vida.

Aos amigos do Laboratório de Física Médica da UERJ, que se tornaram uma segunda família. Em especial, Deda, Carlinha, Gabi e Gabriel por estarem presentes não só no trabalho mas também nos momentos de relaxamento e diversão.

A toda a minha família, que me apoiou sempre em todas as fases da minha vida e me deu suporte para enfrentar essa jornada.

Ao meu noivo Bruno, meu amor e companheiro de todos os momentos.

Ao Laboratório de Ciências Radiológicas da UERJ, em especial ao professor Carlos Eduardo, Camila e Samara. Sem eles esse trabalho não seria possível.

À Alessandra, física responsável pela linha TwinMic, pela auxílio na realização das medidas.

E ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

ESTUDO DE ALTERAÇÕES EM ARTÉRIAS DE RATOS ESPONTANEAMENTE  
HIPERTENSOS APÓS O TRATAMENTO COM BLOQUEADORES DOS  
RECEPTORES DA ANGIOTENSINA II USANDO MICROSCOPIA DE RAIOS X  
DE BAIXA ENERGIA COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Arissa Pickler Oliveira

Fevereiro/2019

Orientadores: Delson Braz

Regina Cely Rodrigues Barroso

Programa: Engenharia Nuclear

A hipertensão arterial (HA) é um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo pelo seu forte impacto na morbidade e mortalidade cardiovascular (CV). A HA pode causar lesões em órgãos alvo, como artérias, rins e sistema nervoso central. As principais formas de tratamento da HA incluem medidas não medicamentosas e o uso de fármacos anti-hipertensivos, a fim de reduzir a pressão arterial (PA) e prevenir desfechos CV e renais. Entre os fármacos anti-hipertensivos utilizados na regulação da PA estão os bloqueadores dos receptores da angiotensina II (BRA). A eficácia na redução da PA dessa classe medicamentosa está amplamente reconhecida pela literatura, contudo, sua eficiência na proteção de órgãos que podem ser afetados ainda é pouco explorada. O objetivo deste trabalho foi avaliar, a nível elementar, os efeitos dos BRAs, losartana e olmesartana, nas artérias, coronária e aorta, de ratos hipertensos. A técnica Fluorescência de raios X de baixa energia (LEXRF- Low Energy X-Ray Fluorescence) foi usada para obter mapas de distribuição elementar, permitindo análises semiquantitativas dos elementos O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn em amostras de coronárias e aortas. Os resultados demonstram que, apesar dos agentes anti-hipertensivos utilizados pertencerem à mesma classe, as suas capacidades para inibir alterações químicas e estruturais nas artérias aortas e coronárias causadas pela hipertensão são diferentes.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

STUDY OF ALTERATIONS IN SHR RATS ARTERIES AFTER TREATMENT  
WITH ANGIOTENSIN II RECEPTOR BLOCKS USING LOW ENERGY MICRO X-  
RAY MICROSCOPY WITH SYNCHROTRON RADIATION

Arissa Pickler Oliveira

February/2019

Advisors: Delson Braz

Regina Cely Rodrigues Barroso

Department: Nuclear Engineering

Hypertension is one of the major public health problems worldwide due to its strong impact on cardiovascular (CV) morbidity and mortality. The hypertension can cause damage in target organs such as arteries, kidneys, and the central nervous system. The main forms of hypertension treatment include non-drug actions and also the use of antihypertensive drugs in order to reduce blood pressure (BP) and prevent CV and renal outcomes. Among the antihypertensive drugs used to regulate BP are the angiotensin II receptor blockers (ARBs). The efficacy in reducing BP of this drug class is widely recognized in the literature. However, its efficiency to protect organs that may be affected is still poorly explored. The aim of this work was evaluate, at an elemental level, the effects of the BRAs, losartan and olmesartan in the coronary and aortic arteries of hypertensive rats. The Low Energy X-Ray Fluorescence (LEXRF) technique was used to obtain elemental distribution maps, allowing semiquantitative analyzes of O, Na, Mg, Fe, Cu and Zn elements in coronary and aortic samples. The results demonstrate that despite the antihypertensive agents used belong the same class, their capacities to inhibit chemical and structural changes in coronary and aortic arteries caused by hypertension are different.

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>7</b>
<b>2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	<b>7</b>
2.1. Sistema cardiovascular .....	7
2.2. Artérias .....	9
2.2.1. Aorta .....	11
2.2.2. Coronária .....	12
2.3. Hipertensão arterial .....	14
2.4. Sistema renina-angiotensina .....	16
2.5. Anti-hipertensivos .....	18
2.6. Modelo animal para hipertensão arterial .....	21
2.6.1. Controle experimental para SHR - Wistar-Kyoto .....	23
2.7. Os elementos e a saúde cardiovascular .....	24
2.8. Fluorescência de raios X .....	27
2.8.1. Energia de corte de absorção .....	30
2.8.2. Rendimento da fluorescência .....	31
2.9. Microfluorescência de raios X .....	34
2.10. Radiação Síncrotron associada à Fluorescência de raios X .....	35
2.11. Fluorescência de raios X de baixa energia (LEXRF) - TwinMic .....	38
2.12. Coeficiente de atenuação .....	43
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>45</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
3.1. Protocolo experimental.....	45
3.1.1. Animais .....	45
3.1.2. Aferição da pressão arterial.....	46
3.1.3. Administração dos anti-hipertensivos .....	47
3.1.4. Eutanásia dos animais .....	48
3.2. Preparação das amostras para análise por $\mu$ XRF .....	49
3.3. Instrumentação (TwinMic) .....	49
3.4. Ensaios histológicos.....	54
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>55</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>55</b>
4.1. Resultados de pressão arterial e frequência cardíaca .....	55
4.2. Aorta.....	57
4.2.1. Análise histológica .....	58
4.2.2. Resultados TwinMic.....	61
4.2.3. Análise estatística das intensidades elementares para a aorta.....	68
4.2.4. Coeficiente de atenuação .....	75
4.3. Coronária.....	76
4.3.1. Análise histológica .....	77
4.3.2. Resultados TwinMic.....	80
4.3.3. Análise estatística das intensidades elementares para coronária.....	87
4.3.1. Coeficiente de atenuação .....	93

<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>95</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>97</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura das artérias (Fonte - <a href="http://www.anatomiaonline.com/artérias/">http://www.anatomiaonline.com/artérias/</a> ) .....	9
Figura 2 - Desenho esquemático da aorta torácica e seus ramos.....	12
Figura 3 – Artérias coronárias direta e esquerda. ....	13
Figura 4 – Esquema do eixo clássico de ativação do sistema renina-angiotensina.....	17
Figura 5 – Probabilidade de ocorrência de efeitos fotoelétrico, Compton e produção de pares. Adaptado de KNOLL, 2000. ....	27
Figura 6 – Ilustração da emissão de raio X característico entre. (Fonte - <a href="https://efeitofotoeletricoecompton.webnode.com.br">https://efeitofotoeletricoecompton.webnode.com.br</a> ).....	28
Figura 7 – Energia de ligação ou corte de absorção nos níveis K, L e M em função do número atômico (NASCIMENTO, 1999).....	31
Figura 8 – Rendimento da fluorescência das camadas K, L e M em função do número atômico (Z) (NASCIMENTO, 1999).....	33
Figura 9 – Exemplo de matriz utilizada para a análise por $\mu$ XRF em uma aorta de rato SHR.....	34
Figura 10 - Vista esquemática planar de uma instalação de radiação síncrotron. (figura adaptada de BALERNA & MOBILIO, 2015).....	36
Figura 11 – Layout geral de um anel de armazenamento de terceira geração. (SHENOY, 2003) .....	37
Figura 12 – Esquema da linha de luz TwinMic com fonte de raio-X gerada a partir de um ondulador híbrido curto (SU5.6), orifício de pinhole (PH), espelho cilíndrico de colimação (M1), monocromador de grade plana (espelho plano (M2) e grade plana (G)), espelho toroidal (M3) e fonte secundária de raios-X (SS). (Gianoncelli <i>et al</i> , 2016)....	39
Figura 13 – Elementos acessíveis com a utilização da TwinMic (Adaptada de: <a href="https://www.elettra.trieste.it/lightsources/elettra/elettra-beamlines/twinmic/info-for-users.html">https://www.elettra.trieste.it/lightsources/elettra/elettra-beamlines/twinmic/info-for-users.html</a> ).....	40
Figura 14 – Linha TwinMic, Elettra – Itália. ....	41
Figura 15 – Esquema do Setup da TwinMic. ....	42
Figura 16 – Aferição da pressão arterial utilizando o pletismógrafo de cauda Insight. .	47
Figura 17 – Interface do programa para aferição da pressão arterial.....	47
Figura 18 – Administração dos anti-hipertensivos. ....	48

Figura 19 – Foto do porta amostra utilizado na TwinMic. ....	50
Figura 20 – Mosaico feito a partir das imagens de absorção obtidas na TwinMic da A) aorta e B) coronária para localização das coordenadas dos ROIs de interesse para medidas de LEXRF.....	50
Figura 21 - Software dedicado de aquisição de imagem de fluorescência, absorção e contraste de fase utilizado na TwinMic. ....	51
Figura 22 – Exemplo do espectro de uma amostra de coronária analisado com o software PyMca <sup>®</sup> .....	53
Figura 23 – Pressão arterial sistólica (mmHg) dos grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O de acordo com a idade em semanas.....	55
Figura 24 – Frequência cardíaca (batimentos por minuto) dos grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O de acordo com a idade em semanas.....	56
Figura 25 – Peso (em gramas) dos grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O de acordo com a idade em semanas.....	57
Figura 26 – Imagem obtida por microscopia óptica (objetiva de 5x) de aortas típicas dos grupos WKY, SHR, SHR+L, SHR+O coradas utilizando a técnica de hematoxilina-eosina. ....	59
Figura 27 – Aorta do grupo SHR com a presença de ateroma. A) Aumento de 5x e B) aumento de 20x.....	61
Figura 28 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de aorta típica do grupo WKY, adquiridos em uma região de 76,8 $\mu\text{m}$ x 79,2 $\mu\text{m}$ .....	63
Figura 29 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de aorta típica do grupo SHR, adquiridos em uma região de 76,8 $\mu\text{m}$ x 78 $\mu\text{m}$ .....	64
Figura 30 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de aorta típica do grupo SHR+L, adquiridos em uma região de 42 $\mu\text{m}$ x 78 $\mu\text{m}$ .....	66
Figura 31 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de aorta típica do grupo SHR+O, adquiridos em uma região de 78 $\mu\text{m}$ x 66 $\mu\text{m}$ . ....	67
Figura 32 – Média de intensidade de Oxigênio na aorta dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.....	69

Figura 33 – Média de intensidade de Sódio na aorta dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.....	70
Figura 34 – Média de intensidade de Magnésio na aorta dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.....	71
Figura 35 – Média de intensidade de Ferro na aorta dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.....	72
Figura 36 – Média de intensidade de Cobre na aorta dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.....	73
Figura 37 – Média de intensidade de Zinco na aorta dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.....	73
Figura 38 – Razões Zn/Cu, Cu/Fe e Mg/Na para as aortas dos grupos WKY, SHR, SHR+L, SHR+O.....	74
Figura 39 – Imagem obtida por microscopia óptica (objetiva de 20x) de coronárias típicas dos grupos WKY, SHR, SHR+L, SHR+O coradas utilizando a técnica de hematoxilina-eosina.....	78
Figura 40 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de coronária típica do grupo WKY, adquiridos em uma região de 69,6 $\mu\text{m}$ x 79,2 $\mu\text{m}$ .....	81
Figura 41 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de coronária típica do grupo SHR, adquiridos em uma região de 63,6 $\mu\text{m}$ x 42 $\mu\text{m}$ .....	83
Figura 42 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de coronária típica do grupo SHR+L, adquiridos em uma região de 72 $\mu\text{m}$ x 72 $\mu\text{m}$ .....	85
Figura 43 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de coronária típica do grupo SHR+O, adquiridos em uma região de 66 $\mu\text{m}$ x 66 $\mu\text{m}$ .....	86
Figura 44 – Média de intensidade de Oxigênio na coronária dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.....	87
Figura 45 – Média de intensidade de sódio na coronária dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.....	88
Figura 46 – Média de intensidade de Magnésio na coronária dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.....	89

Figura 47 – Média de intensidade de Ferro na coronária dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.....	90
Figura 48 – Média de intensidade de Cobre na coronária dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.....	91
Figura 49 – Média de intensidade de Zinco na coronária dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.....	92
Figura 50 – Razões Zn/Cu, Cu/Fe e Mg/Na para as coronárias dos grupos WKY, SHR, SHR+L, SHR+O.....	93

## **CAPÍTULO I**

### **1. INTRODUÇÃO**

A hipertensão arterial (HA) é um fator de risco para o desenvolvimento da doença coronária, acelera o processo de aterosclerose e pode ser um fator determinante para o surgimento prematuro de morbidade e mortalidade cardiovascular associado à doença coronária, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular encefálico e doença renal terminal. Assim, é extremamente importante o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença para o desenvolvimento de novas terapias e para um tratamento farmacológico mais eficiente (SANJULIANI, 2002).

Evidências científicas mostram que pequenas reduções na pressão arterial (PA) têm grande impacto na redução da morbidade e da mortalidade cardiovascular. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), um em cada três adultos sofre de hipertensão arterial.

Dados norte-americanos de 2016 revelaram que HA estava presente em 69% dos pacientes com primeiro episódio de infarto agudo do miocárdio, 77% de acidente vascular encefálico, 75% com insuficiência cardíaca e 60% com doença arterial periférica (MOZAFFARIAN *et al.*, 2016). A HA é responsável por 45% das mortes cardíacas e 51% das mortes decorrentes de AVE (LIM *et al.*, 2013).

No Brasil, a HA atinge 32,5% (36 milhões) dos indivíduos adultos, mais de 60% dos idosos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por doença cardiovascular (DCV). Junto com diabetes melito, as complicações causadas pela HA (cardíacas, renais e acidente vascular encefálico) tem impacto elevado na perda da produtividade do trabalho e da renda familiar (ABEGUNDE *et al.*, 2007). Em 2013 ocorreram 1.138.670 óbitos, 339.672 dos quais (29,8%) decorrentes de DCV, a principal causa de morte no país.

Segundo estudo feito por Kearney e colaboradores (2005), até 2025 o número de hipertensos nos países em desenvolvimento, como o Brasil, deverá crescer 60%,

A regulação da pressão arterial é uma das funções fisiológicas mais complexas do organismo, dependendo das ações integradas dos sistemas cardiovasculares, renal, neural e endócrino. A HA parece ter causa multifatorial para a sua gênese e manutenção. A investigação da sua fisiopatologia necessita de conhecimentos dos

mecanismos normais de controle da PA para procurar então, evidências de anormalidades que precedem a elevação da PA para níveis considerados patológicos (SANJULIANI, 2002).

O tratamento da HA envolve uma abordagem multifatorial e visa à redução dos riscos cardiovasculares associados aos valores elevados da PA, o que diminui, assim, a morbidade e a mortalidade associada às doenças cardiovasculares (CAVALCANTE *et al.*, 2007).

A abordagem terapêutica da PA elevada inclui medidas não medicamentosas e estratégia farmacológica, a fim de reduzir a PA, proteger os órgãos-alvo e prevenir desfechos cardiovasculares e renais (MANCIA *et al.*, 2013). Na estratégia não farmacológica enfatiza-se a mudança de estilo de vida com a aquisição de hábitos saudáveis, que visem à diminuição dos fatores de risco para as doenças cardiovasculares. Para o tratamento farmacológico utilizam-se os medicamentos anti-hipertensivos.

De acordo com a VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, a escolha do medicamento, deve ser individualizada e recomenda-se que o medicamento seja seguro, bem tolerado, permita a administração em menor número possível de vezes diárias e seja iniciado com as menores doses efetivas preconizadas para cada situação clínica. Indica-se a monoterapia como estratégia anti-hipertensiva para pacientes com hipertensão arterial estágio 1, onde a pressão arterial sistólica (PAS) varia entre 140-159mmHg e a pressão arterial diastólica (PAD) varia entre 90-99mmHg e que apresentem risco cardiovascular baixo a moderado, devendo a posologia ser ajustada até que se consiga valores da PA inferior ao limite estabelecido. A estratégia anti-hipertensiva associada é indicada no estágio 1 para pacientes que apresentam risco cardiovascular alto a muito alto e naqueles nos estágios 2 e 3 (PAS 160-179mmHg; PAD 100-109mmHg e PAS  $\geq$  180; PAD  $\geq$  110, respectivamente). (MALACHIAS *et al.*, 2016).

Existem dezenas de drogas diferentes aprovadas para o controle dos níveis de pressão arterial. Atualmente, três classes de anti-hipertensivos são consideradas de primeira linha por apresentarem boa resposta no controle da pressão arterial e baixa incidência de efeitos adversos graves: os diuréticos; as drogas que intervêm no sistema renina-angiotensina, que são os inibidores da enzima conversora da angiotensina II

(IECA) e os bloqueadores dos receptores da angiotensina II e; os antagonistas dos canais de cálcio.

Os antagonistas do receptor da angiotensina II, também conhecidos como bloqueadores dos receptores da angiotensina II (BRA), pertencem a uma classe de anti-hipertensiva relativamente nova, mas com mecanismo de ação semelhante aos IECA. A entrada no mercado farmacêutico dos BRAs é relativamente recente. A losartana foi a primeira representante dessa classe de medicamentos (TIMMERMANS, 1999) que já possui atualmente vários outros representantes que apareceram no mercado farmacêutico há poucos anos. No Brasil os BRA comercializados são: candesartana, irbesartana, losartana, olmesartana, telmisartana e valsartana (RAMOS & CASALI, 2012).

O membro mais recente desta classe de medicamentos a ser aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), olmesartan medoxomil, contém características únicas que podem explicar sua eficácia clínica (BROUSIL & BURKE, 2003).

A HA acaba por danificar as paredes arteriais com o tempo, o que pode levar a uma série de complicações, como a aterosclerose que é o acúmulo de depósitos ou de chapas de gordura nas paredes que alinham as artérias, calcificando-as e as deixando frágeis, o que restringe o fluxo de sangue, ou possibilita a formação de coágulos, facilitando ataques do coração, ou AVCs.

CARVALHO *et al* (2001) mostraram que em decorrência da hipertensão arterial crônica, artérias de grande calibre geralmente apresentam hipertrofia da parede vascular com elevação da rigidez de componentes do meio extracelular, enquanto em artérias menores ocorre hipertrofia da camada média, através da proliferação de células endoteliais e musculares lisas.

Os efeitos dos anti-hipertensivos na diminuição da pressão arterial já são amplamente reconhecidos pela literatura. Contudo, além da normalização da PA os medicamentos devem também ser capazes de prevenir ou minimizar os danos causados pela PA nas artérias. Por isso seu efeito protetivo para as artérias vem sendo cada vez mais estudados.

Estudos demonstraram uma correção da disfunção endotelial e da estrutura arterial de pequenas artérias após o tratamento anti-hipertensivo utilizando a losartana (RIZZONI *et al.*, 1998; SCHIFFRIN *et al.*, 2000). O grupo de SMITH (2008) verificou

os efeitos da olmesartana na remodelação vascular. Após um ano de tratamento verificou-se uma diminuição na razão parede/luz, os valores foram comparáveis a dados de paciente normotensos.

Os sistemas biológicos são compostos por uma morfologia muito complexa e composição química altamente heterogênea dominada por elementos leves. Discriminar qualitativamente a nível sub micrométrico a distribuição dos elementos constitutivos, e correlacioná-los com a estrutura biológica sub celular, continua a ser um desafio (KAULICH *et al.*, 2009).

Kyrychenko *et al.* (2015) verificaram através de micrografia eletrônica a importância do controle de elementos químicos fundamentais para as mitocôndrias, como o Na, encontrados no núcleo das células do tecido cardíaco, os cardiomiócitos. Kolte *et al.* (2014) estudaram a importância do magnésio (Mg) para contração muscular, na função das células endoteliais, e na excitabilidade do miocárdio sendo, portanto, essencial para a etiopatogenia de várias doenças cardiovasculares. Šimůnek *et al.* (2005) mostraram a importância dos elementos cálcio, magnésio, potássio, selênio e ferro (Ca, Mg, K, Se e Fe) associados com doenças cardiovasculares. Entretanto, os benefícios do uso dos BRAs para a proteção ou regressão das doenças vasculares nunca foram estudadas a nível elementar.

A fluorescência de raios-X (XRF) é uma técnica que se baseia na emissão característica de raios X, resultante da desexcitação dos átomos ionizados devido à absorção de energia. Como o processo de desexcitação envolve níveis discretos de energia dos elétrons nos átomos, a espectroscopia XRF é uma excelente ferramenta para análises elementares e químicas.

A crescente demanda da ciência para melhorar a resolução espacial para a localização e especiação de elementos traço em sistemas heterogêneos foi atendida pela implantação de XRF em laboratórios de luz síncrotron, onde o alto brilho e alto fluxo da fonte de raios-X permitiram a obtenção de raios X com resolução óptica até faixas submicrométricas, preservando a alta sensibilidade química (JANSSENS *et al.*, 2000).

A microfluorescência de raios X por radiação síncrotron (SR- $\mu$ XRF) é uma técnica microanalítica que permite o mapeamento dos elementos presentes na amostra. Entre as modalidades de imagem atualmente disponíveis a SR- $\mu$ XRF é a única técnica compatível com amostras biológicas totalmente hidratadas, como células inteiras ou

seções de tecido, ao mesmo tempo em que oferece sensibilidade a elementos traço e resolução espacial submicrométrica (FAHRNI, 2007).

Em geral, grande parte dessas configurações são adequadas para detectar raios X de fluorescência na faixa de keV, emitidos a partir de níveis eletrônicos K, L e M de elementos de médio e alto-Z.

Um sistema de fluorescência de raios X de baixa energia (LEXRF) baseada em uma configuração de múltiplos detectores de Si (SDD – Silicon Drift Detectors) foi desenvolvido e implementado na estação europeia de microespectroscopia de raios X - TwinMic que opera no síncrotron italiano ELETTRA, em Trieste, Itália. A TwinMic trabalha com oito detectores SDDs com uma eletrônica de leitura especialmente adaptada que demonstrou excelente desempenho para análise elementar na faixa de energia de fótons 400-2200 eV, cobrindo os níveis K e L de elementos leves, a partir do Carbono (GIANONCELLI *et al.*, 2009).

A grande vantagem da LEXRF da TwinMic é a combinação de duas abordagens de microscopia de raios X em um único instrumento, a microscopia de varredura (SXM) e microscopia de transmissão (TXM) (GIANONCELLI *et al.*, 2009). Isso permite a aquisição de mapas de composição elementar de materiais constituídos predominantemente de elementos leves e, simultaneamente, mapas de absorção e contraste de fase, fornecendo informações morfológicas complementares sobre o material, tudo isso em escalas submicrométricas.

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos adversos e/ou protetivos, a nível elementar e estrutural, de dois diferentes bloqueadores dos receptores da angiotensina II.

Para melhor compreender estes efeitos, foram avaliadas as alterações morfológicas e elementares nas artérias (aorta e coronária) de ratos hipertensos e sádios. Foram analisados elementos de baixo número atômico nunca antes quantificados na literatura, como C, N, O, Na, Mg e Fe usando as duas técnicas de microscopia de raios X disponíveis da linha TwinMic. Para esse estudo foram utilizados ratos normotensos (Kyoto) e ratos hipertensos (SHR), que foram divididos em quatro diferentes grupos. O primeiro grupo foi constituído de ratos normotensos que não receberam medicamento. Os grupos de ratos hipertensos foram: ratos que não receberam qualquer tratamento

(SHR), ratos que foram tratados com losartana (SHR+L) e ratos que receberam doses diárias de olmesartana (SHR+O).

No capítulo seguinte serão apresentadas as fundamentações teóricas nas quais os estudos realizados nesse trabalho foram baseados e justificados. No capítulo subsequente serão descritos os materiais e a metodologia utilizada. No capítulo IV serão apresentados e discutidos os resultados obtidos. E por fim, no capítulo V, serão expostas as etapas futuras deste trabalho.

## **CAPÍTULO II**

### **2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

#### **2.1. Sistema cardiovascular**

O sistema cardiovascular é compreendido por dois órgãos fundamentais para a manutenção da homeostase corpórea, coração e vasos sanguíneos.

O coração se localiza na caixa torácica, entre os pulmões. Possui a função de bombear o sangue através dos vasos sanguíneos para todo o corpo. Suas paredes são constituídas por um músculo, o miocárdio, que é o responsável pelas contrações do coração. O miocárdio apresenta internamente quatro cavidades: duas superiores denominadas átrios (direito e esquerdo) e duas inferiores denominadas ventrículos (direito e esquerdo). Os ventrículos possuem paredes mais grossas que os átrios.

Os átrios, direito e esquerdo, são bombas de reforço que funcionam como reservatórios de sangue e aumentam em até 25% a eficiência de contração ventricular (GUYTON, HALL, 2006). Os ventrículos, direito e esquerdo, por sua vez, funcionam em série, ejetando sangue em direção aos pulmões e à aorta, respectivamente, para ser distribuído a todos os órgãos periféricos.

O coração possui dois tipos de movimentos: a sístole e a diástole. O movimento de sístole se refere à contração da musculatura cardíaca. Os átrios se contraem primeiro, pois tem a finalidade de impulsionar o sangue para os ventrículos. Posteriormente, ocorre a contração muscular dos ventrículos impulsionando o sangue que veio dos átrios para fora do coração (BERNE, LEVY, 1990). No momento da sístole, o sangue com é ejetado do coração com a força máxima, exercendo a pressão sobre as paredes das artérias.

O movimento diástole se refere por sua vez ao relaxamento do músculo cardíaco de modo a diminuir a pressão interna do coração possibilitando que ele se encha novamente de sangue. Na diástole, assim que há o relaxamento ventricular, também há a contração atrial, para encher os ventrículos de sangue (BERNE, LEVY, 1990). Nesse momento a pressão exercida sobre as paredes das artérias é baixa.

Os eventos cardíacos que ocorrem no início de cada batimento do coração, até o início do próximo batimento, são chamados de ciclo cardíaco. O ciclo cardíaco consiste de um período de relaxamento (diástole), seguido de um período de contração (sístole).

Os vasos sanguíneos equivalem a um circuito fechado constituído por uma ampla rede de tubos. Existem três tipos de vasos sanguíneos, as artérias, as veias e os vasos capilares, que em conjunto formam a circulação sistêmica (NETO *et al.*, 2004).

As artérias são os vasos do sistema cardiovascular por onde passa o sangue que sai do coração, sendo transportado para as outras partes do corpo. A musculatura das artérias é espessa, formada de tecido muscular bastante elástico que permite que as paredes se contraíam e relaxem a cada batimento cardíaco. As artérias se ramificam pelo corpo e vão se tornando mais finas, constituindo as arteríolas, que por sua vez se ramificam ainda mais formando os capilares.

As veias são vasos do sistema cardiovascular que transportam o sangue das diversas partes do corpo de volta para o coração. Sua parede é mais fina que a das artérias e, com isso, o transporte do sangue se torna mais lento. Assim, a pressão do sangue no interior das veias é baixa, o que dificulta o seu retorno ao coração. A existência de válvulas nesses vasos faz com que o sangue se desloque sempre em direção ao coração.

Os vasos capilares são ramificações microscópicas de artérias e veias, que integram o sistema cardiovascular, formando uma rede de comunicação entre as artérias e as veias. Suas paredes são constituídas por uma camada finíssima de células que permitem a troca de substâncias (nutrientes, oxigênio, gás carbônico) do sangue para as células e vice-versa.

As funções do sistema circulatório baseiam-se no transporte de oxigênio, hormônios e nutrientes aos tecidos e órgãos, remoção de produtos finais metabólicos, e manutenção do funcionamento adequado à sobrevivência celular (homeostasia) através da circulação do sangue por todo o organismo (GOMES, 2005, SOUZA & ELIAS, 2006).

Esse sistema divide-se em pequena e grande circulação. A pulmonar ou pequena circulação contém o sangue venoso, que após ser bombeado pelo ventrículo direito em direção às artérias pulmonares, sofre troca gasosa (hematose pulmonar) e passa a ser oxigenado (sangue arterial) (KLABUNDE, 2011). Este por sua vez, através da circulação sistêmica ou grande circulação, é distribuído a todas as células e tecidos do organismo, e inclusive ao próprio coração pelas artérias coronárias (BERNE & LEVY, 1990, GUYTON & HALL, 2006).

Além de transportar os nutrientes e o oxigênio por todo o organismo, o sistema cardiovascular é responsável ainda por diversas outras funções, como o controle da pressão arterial, do fluxo sanguíneo e do débito cardíaco (GUYTON, HALL, 2006).

O coração é um órgão dependente de todo sistema cardiovascular. Uma disfunção primária no coração pode induzir modificações reflexas nos vasos assim como alterações tanto funcionais quanto estruturais nos vasos, podem comprometer a funcionalidade cardíaca. Dessa forma, para compreender os mecanismos relacionados com a fisiopatogenia cardíaca, é importante levar em consideração a relação de todo o conjunto: coração e vasos (COLOMBO, *et al.*, 2001).

## 2.2. Artérias

As artérias são os vasos sanguíneos que conduzem o sangue com grande pressão, uma vez que este deverá chegar a todas as partes do corpo levando oxigênio e nutrientes a todas às células. Ao contrário das veias, que conduzem o sangue desoxigenado de volta ao coração, as artérias levam o sangue rico em oxigênio para todo o corpo. Isto se dá através do sistema circulatório. (BERNE & LEVY, 1990, POWERS & HOWLEY, 2000).

As artérias são dutos membranosos, elásticos e com ramificações divergentes, encarregados de distribuir por todo o organismo o sangue bombeado a cada sístole pelas cavidades ventriculares do coração. Elas podem ser de grande, médio e pequeno calibre.

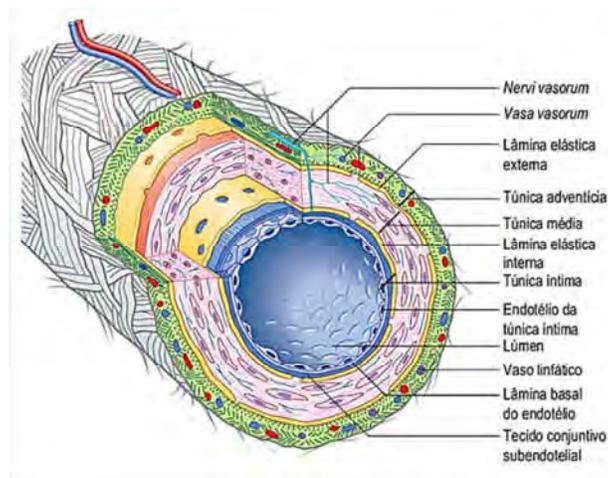


Figura 1 – Estrutura das artérias (Fonte - <http://www.anatomiaonline.com/artérias/>)

As artérias são formadas basicamente por três camadas. A camada que está em contato direto com o fluxo sanguíneo é a túnica íntima, geralmente chamada de íntima. A íntima forra internamente e sem interrupções as artérias, inclusive capilares. Esta camada é composta principalmente de células endoteliais e tem como objetivo principal o auxílio da condutividade do sangue. Pode-se dizer que ela é quase desprezível nos adultos saudáveis, pois apresenta uma espessura muito pequena e baixa resistência mecânica. Logo abaixo desta camada encontra-se a túnica média. A túnica média, a camada intermediária, é composta por fibras musculares lisas e pequena quantidade de tecido conjuntivo elástico. Ela é a maior responsável pela resistência mecânica das artérias. A camada mais externa (mais distante do fluxo sanguíneo) é conhecida como túnica adventícia. Esta camada é composta de tecido conjuntivo, que tem como principal função a manutenção da forma e a proteção da camada média. Nesta túnica encontramos pequenos filetes nervosos e vasculares que são destinados à inervação e a irrigação das artérias. (BERNE & LEVY, 1990)

Existem diversos tipos de artérias que se distinguem por suas características anatômicas e suas funções. Dentre elas estão: artérias de grande calibre, artérias de médio calibre, as arteríolas e os capilares.

As artérias de grande calibre, de maior diâmetro, são artérias elásticas. A aorta e as artérias pulmonares são exemplos de artérias elásticas. Elas têm uma grande capacidade para se expandirem em cada batimento, quando o coração tem uma grande quantidade de sangue no seu interior, para de imediato regressar ao seu diâmetro original à medida que impulsionam a corrente sanguínea até à rede arterial. Graças a este mecanismo, o sangue que sai do coração com grande turbulência transforma-se num fluxo contínuo que chega a todo o organismo.

As artérias de médio calibre são as artérias musculares. São vasos de diâmetro mediano, distribuídos por todo o organismo, e contam com uma grande proporção de fibras musculares dispostas de forma concêntrica. Quando estas fibras estão relaxadas, as artérias dilatam-se e, quando se contraem, o diâmetro arterial diminui. Graças a este mecanismo, controlado pelo sistema nervoso autônomo, o fluxo de sangue pode distribuir-se de várias maneiras às diversas regiões anatômicas, segundo as necessidades de cada momento. Essas artérias apresentam túnica média bem desenvolvida. Também

estão presentes, na túnica média, fibras elásticas, cuja presença aumenta de acordo com o calibre da artéria até que seja considerada uma artéria elástica e não mais muscular.

As arteríolas são as artérias de menor diâmetro, são as ramificações finais da rede arterial, que imediatamente se transformam em capilares. Estas arteríolas têm ao nível do seu diâmetro uma parede proporcionalmente mais espessa, com uma túnica média muito desenvolvida e dotada de inúmeras fibras musculares. Elas possuem estrutura semelhante às artérias de médio calibre, mas geralmente as membranas limitantes elásticas, interna e externa, estão ausentes. A túnica adventícia nas arteríolas é pouco desenvolvida (BERNE & LEVY, 1990).

Os capilares são a continuação das pequenas arteríolas. Têm um diâmetro muito reduzido, paredes muito delicadas, formadas por uma única camada de células, tão finas que permitem a troca de oxigênio, substâncias nutritivas e resíduos metabólicos entre o sangue e os tecidos que este irriga.

### 2.2.1. Aorta

A aorta é a maior e a principal artéria do corpo humano. Ela inicia-se na parte superior do ventrículo esquerdo do coração e segue em direção à raiz do pulmão esquerdo. Depois ela passa através do diafragma até chegar ao abdômen e se divide, no nível da quarta vértebra lombar, nas artérias ilíacas. Anatomicamente, a artéria aorta está dividida em cinco seções: aorta ascendente, arco da aorta, aorta descendente, aorta torácica e aorta abdominal.

Esta artéria é a principal responsável pelo transporte do sangue oxigenado a partir do ventrículo esquerdo do coração para o resto do corpo. Esta artéria divide-se em artérias menores, que distribuem o sangue oxigenado e os nutrientes a todas as células. Todas as artérias do organismo, com exceção da artéria pulmonar derivam da artéria aorta.

A Figura 2 mostra um esquema da aorta torácica. Nele está representada a aorta ascendente (início da aorta, que sai do coração), o arco aórtico, e a aorta descendente. Na figura é possível ainda localizar as artérias que se ramificam da parte inicial da aorta, como as artérias coronárias e as artérias carótidas.

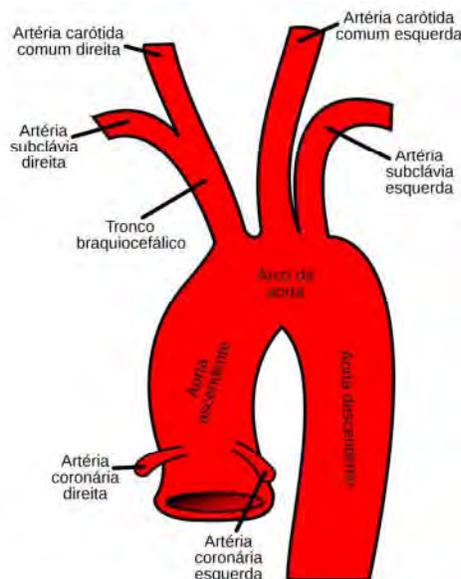


Figura 2 - Desenho esquemático da aorta torácica e seus ramos.

(fonte -<http://anatomiaonline.com/aorta/>)

A aorta é classificada como artéria elástica, por conter grande quantidade de fibras elásticas, em contraposição à maioria das artérias, chamadas musculares por terem fibras musculares lisas como seu mais abundante componente. As fibras elásticas, juntamente com a matriz extracelular que as circundam, são responsáveis pela integridade maior destas estruturas vasculares, permitindo que durante a sua distensão, devido à alta pressão com que o sangue sai do coração (sístole), ela possa retornar à sua posição inicial de relaxamento (diástole), sem sofrer danos em sua estrutura (ROBERT *et al.*, 1995; RAINES, 2000).

### 2.2.2. Coronária

A funcionalidade normal do coração depende de um aporte de sangue adequado e das boas condições morfológicas das artérias que o irrigam. As artérias coronárias e seus ramos são os principais vasos responsáveis pela nutrição e suprimento sanguíneo do miocárdio.

Apesar de existirem variações anatômicas das artérias coronárias entre indivíduos, a descrição padronizada da origem anatômica coronária normal se dá a partir dos dois óstios que ficam na base da aorta. Inicialmente, as artérias coronárias, têm um percurso epicárdico, ou seja, sobre a superfície do coração, e posteriormente, assumem um percurso intramiocárdico, pois penetram no miocárdio (CESAR & FERREIRA, 2004). De cada óstio originam suas respectivas artérias coronárias, a direita e esquerda que são responsáveis pela vascularização do coração (Figura 3)

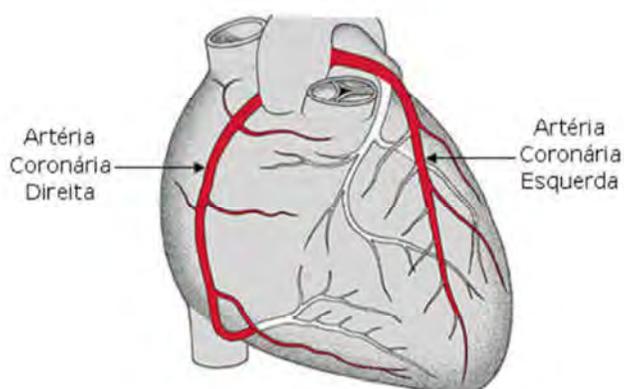


Figura 3 – Artérias coronárias direita e esquerda.

(fonte -<https://www.auladeanatomia.com/novosite/sistemas/sistema-cardiovascular/vasos-sanguineos/sistema-arterial/>)

Após originarem do seio aórtico, as artérias coronárias seguem seus trajetos, ramificam-se e distribuem-se pela superfície do miocárdio, irrigando-o.

Essas artérias são as únicas que se enchem na fase diastólica do ciclo cardíaco e quaisquer malformações valvulares e anatômicas das artérias coronárias, alterações na integridade anatômica da valva aórtica, no diâmetro, posição e anatomia dos óstios coronarianos resultarão na redução do aporte sanguíneo coronário e conseqüentemente comprometimento funcional do miocárdio (CAVALCANTI *et al.*, 2003).

### **2.3. Hipertensão arterial**

A cada sístole do coração, um fluxo sanguíneo é lançado para dentro das artérias. A pressão que o sangue exerce sobre as paredes internas das artérias é chamada de pressão arterial.

Alguns mecanismos estão envolvidos com o aumento da pressão arterial, como por exemplo, níveis elevados de colesterol, obesidade, diabetes, aumento da resistência vascular periférica e também fatores genéticos. Este estado é definido como hipertensão arterial sistêmica (MARTE & SANTOS, 2007).

A hipertensão arterial sistêmica é conceituada como uma condição clínica multifatorial distinta por níveis elevados e sustentados de pressão arterial, podendo levar a complicações associadas às alterações funcionais e/ou estruturais em órgãos-alvo como rins, cérebro, olhos, coração e especialmente artérias, durante a sístole e diástole. Podendo assim, acarretar em um aumento do risco cardiovascular (WEBER *et al.*, 2014).

Dados norte-americanos de 2015 revelaram que hipertensão arterial sistêmica estava presente em 69% dos pacientes com primeiro episódio de Infarto Agudo do Miocárdio, 77% de acidente vascular encefálico, 75% com insuficiência cardíaca e 60% com doença arterial periférica. A hipertensão arterial sistêmica é responsável ainda por 45% das mortes cardíacas e 51% das mortes decorrentes de acidente vascular encefálico (MALACHIAS *et al.*, 2016).

No Brasil, hipertensão arterial sistêmica atinge 32,5% (36 milhões) de indivíduos adultos, mais de 60% dos idosos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por doenças cardiovasculares (DCV). Junto com Diabetes melito, suas complicações (cardíacas, renais e AVE) têm impacto elevado na perda da produtividade do trabalho e da renda familiar, estimada em US\$ 4,18 bilhões entre 2006 e 2015 (MALACHIAS *et al.*, 2016).

Em 2013 ocorreram 1.138.670 óbitos, 339.672 dos quais (29,8%) decorrentes de doença cardiovascular, a principal causa de morte no país. As taxas de mortalidade têm apresentado redução ao longo dos anos, com exceção das doenças hipertensivas, que aumentou entre 2002 e 2009 e mostrou tendência a redução desde 2010. As taxas de doenças hipertensivas no período oscilaram de 39/100.000 habitantes (2000) para 42/100.000 habitantes. As doenças isquêmicas do coração saíram de 120,4/100.000

habitantes (2000) para 92/100.000 habitantes (2013), e as doenças cerebrovasculares (DCbV) saíram de 137,7/100.000 habitantes (2000) para 89/100.000 habitantes (2013); também houve redução da IC congestiva, que variou de 47,7/100.000 habitantes (2000) para 24,3/100.000 habitantes (2013). As doenças cardiovasculares são ainda responsáveis por alta frequência de internações, com custos socioeconômicos elevados. Dados do Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SUS) apontam significativa redução da tendência de internação por hipertensão arterial, de 98,1/100.000 habitantes em 2000 para 44,2/100.000 habitantes em 2013 (MALACHIAS *et al.*, 2016).

A avaliação inicial de um paciente com hipertensão arterial sistêmica inclui a confirmação do diagnóstico, a suspeição e a identificação de causa secundária, além da avaliação do risco CV. As lesões de órgão-alvo e doenças associadas também devem ser investigadas. Fazem parte dessa avaliação a medição da PA no consultório e/ou fora dele, utilizando-se técnica adequada e equipamentos validados, história médica (pessoal e familiar), exame físico e investigação clínica e laboratorial.

Os pontos de corte para determinar indivíduos com hipertensão arterial sistêmica, em geral, são ditados pelo report “*The joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure*” e pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Em 2003, foi publicado o *JNC 7 report* com uma nova proposta de classificação, tendo em vista estudos demonstrando que as pessoas com pressão sistólica entre 130 e 139 mmHg ou pressão diastólica entre 80 e 89 apresentam maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares, sendo classificadas como pré-hipertensas. (CHOBANIAN, *et al.*, 2003)

Tabela 1 - Classificação da hipertensão arterial sistêmica segundo *JNC 7 report*.

Categorias	Pressão sistólica (mm Hg)	Pressão diastólica (mm Hg)
- Normal	< 120	e < 80
- Pré-hipertensão	120 a 139	ou 80 a 89
- Hipertensão: estágio 1	140 a 159	ou 90 a 99
- Hipertensão: estágio 2	≥ 160	ou ≥ 100

Dentre as complicações associadas à hipertensão, merecem destaque o acidente vascular cerebral (AVC) e o infarto agudo do miocárdio (IAM), as duas maiores causas isoladas de mortes no país (MALACHIAS *et al.*, 2016). Segundo estudo realizado por He e MacGregor (2003), no Reino Unido, 125.600 casos de AVC não fatais ou doença cardíaca isquêmica poderiam ter sido evitados se os hipertensos reduzissem sua pressão sistólica para 140 mm Hg.

Quanto maior for pressão arterial, mais o coração esforça-se para bombear o sangue para a artéria principal, a aorta. O músculo cardíaco adapta-se a esse estresse crescente e engrossa com o passar do tempo, criando uma hipertrofia do músculo cardíaco, dificultando seu funcionamento em comparação a pessoas com pressão arterial normal, o risco de ter um ataque cardíaco aumenta três ou quatro vezes para os pacientes com pressão alta.

A pressão alta, com o tempo, danifica as paredes arteriais, o que pode levar a uma série de complicações, como a aterosclerose, que é o acúmulo de depósitos ou de chapas de gordura nas paredes que alinham as artérias, calcificando-as e as deixando frágeis. Este dano nas paredes arteriais pode restringir o fluxo de sangue ou possibilitar a formação de coágulos, facilitando ataques do coração, ou AVCs.

Outro órgão que pode ser afetado é o rim quando há problemas nas veias menores (como as dos rins) que representam parte do seu sistema de filtração.

#### **2.4. Sistema renina-angiotensina**

As pesquisas sobre as ações do sistema renina-angiotensina (SRA) trazem sólidas informações sobre como esse sistema é capaz de contribuir na homeostase hidroeletrolítica, no controle da pressão arterial, na regulação de processos metabólicos, na modulação do crescimento e da proliferação celular de vários tecidos. Com isso, a hiperatividade do SRA tem sido relacionada cada vez mais à gênese de várias doenças como a hipertensão arterial, o infarto agudo do miocárdio, a insuficiência cardíaca congestiva, as arritmias cardíacas, o diabetes mellitus, a insuficiência renal crônica e o acidente vascular encefálico (FYHRQUIST & SAIJONMAA, 2008).

O SRA é um sistema fisiológico de enzimas e peptídeos que se inter-relacionam a fim de regular a vasoconstrição, um importante mecanismo fisiológico do organismo.

Esse sistema é iniciado através do angiotensinogênio, uma glicoproteína formada por 14 aminoácidos, sintetizada principalmente pelo fígado e também produzida pelo tecido adiposo, sistema nervoso central e rins. O angiotensinogênio sofre diversas clivagens e conduz a formação de diferentes peptídeos como a ANG I, ANG II, ANG III, ANG IV e ANG 1-7. Cada um desses peptídeos, exceto a ANG I, que é um peptídeo inativo, atua em receptores específicos como AT1 e AT2 (ANG II), Mas (ANG 1-7), AT4 (ANG IV). Estes receptores são expressos em tecidos como rins, fígado, coração, tecido muscular e pâncreas, e quando se ligam aos seus peptídeos específicos desenvolvem ações importantes para a homeostase do organismo (SKOV *et al.*, 2014)

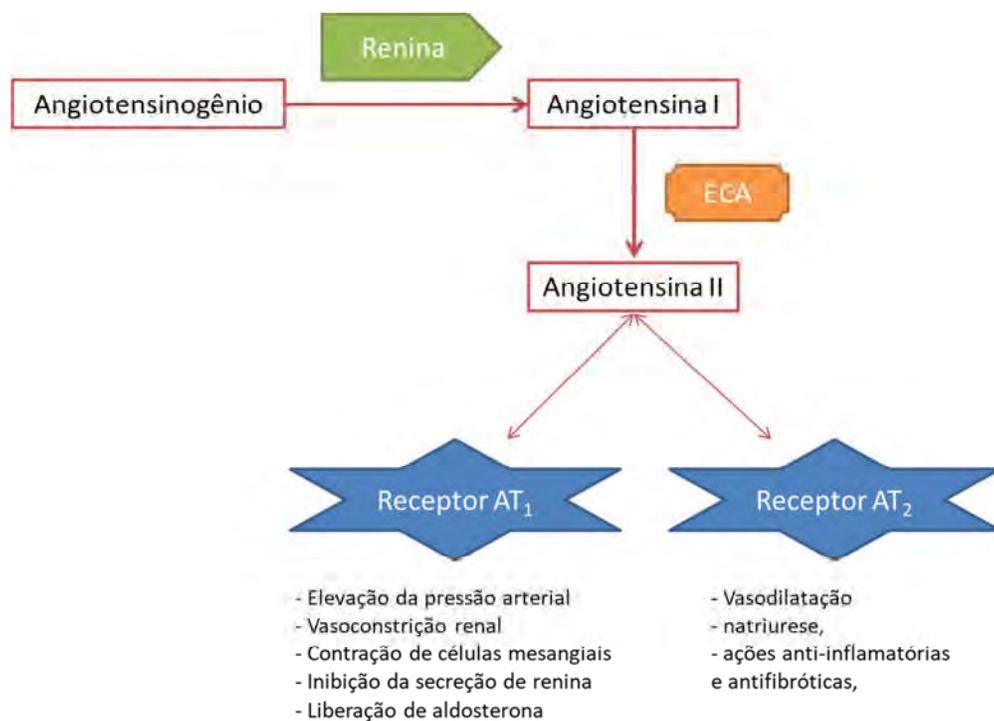


Figura 4 – Esquema do eixo clássico de ativação do sistema renina-angiotensina

A figura 4 mostra o esquema do eixo clássico de ativação do SRA. A cascata do SRA é desencadeada a partir da enzima renina que age sobre o substrato angiotensinogênio circulante, formando a Angiotensina I (Ang I). A enzima conversora de angiotensina (ECA) realiza a conversão de Angiotensina I em Angiotensina II (Ang II) graças à clivagem de dois aminoácidos. A Ang II, considerada o peptídeo efetor

fundamental do sistema em questão, atua através de seus receptores específicos, receptor AT1 (AT1R) e receptor AT2 (AT2R). Ao se ligar aos seus receptores, a Ang II exerce diversos efeitos fisiológicos em diferentes tecidos, como no rim, no córtex adrenal, no músculo liso, vascular e cerebral (KLOET *et al.*, 2010).

Ao se ligar ao receptor AT1, a ANG II apresenta efeitos como vasoconstrição, aumento da sede, síntese de aldosterona, reabsorção de sódio, aumento da liberação de noradrenalina reforçando os efeitos simpáticos, hipertrofia e fibrose. Enquanto que os receptores AT2 são predominantemente encontrados durante a vida fetal e nos adultos são menos expressos. Suas funções são opostas aos dos receptores AT1, estimulam a vasodilatação, natriurese (aumento da excreção urinária de sódio), além de ações anti-inflamatórias e antifibróticas, através da ativação da proteína tirosina fosfatase e produção de óxido nítrico (HIGUCHI *et al.*, 2007).

Entre os importantes efeitos de ANG II, a partir do receptor AT1, pode-se citar o aumento na liberação do hormônio mineralocorticóide, aldosterona. Este é produzido, principalmente em resposta a ANG II na zona glomerulosa do córtex da adrenal. Por sua atividade mineralocorticóide, aumenta a reabsorção de sódio no néfron distal, e fisiologicamente, mantém o equilíbrio dos níveis de sódio, via ativação do canal de sódio endotelial e Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- ATPase. Quando a aldosterona é sintetizada em excesso pode interferir negativamente na reabsorção de sódio. Os efeitos dessa reabsorção de sódio no rim, coração e vasos sanguíneos podem desencadear patologias como a hipertensão arterial e arteriosclerose (ZHOU *et al.*, 2012).

## **2.5. Anti-hipertensivos**

O objetivo primordial do tratamento da hipertensão arterial é a redução da morbidade e da mortalidade cardiovasculares (KANNEL, 1996; WEBER *et al.*, 2014; THOMOPOULOS *et al.*, 2015). Assim, os anti-hipertensivos devem não só reduzir a pressão arterial, mas também os eventos cardiovasculares fatais e não fatais.

Durante as últimas cinco décadas, a pesquisa farmacológica produziu novas classes de drogas para tratar a hipertensão e a partir dos anos 70 e 80 os anti-hipertensivos tornaram-se uma ferramenta importante no tratamento da pressão arterial elevada (SULLIVAN *et al.*, 1995).

Os medicamentos anti-hipertensivos utilizados no tratamento farmacológico da hipertensão arterial são prescritos isoladamente (monoterapia) ou em uso associado. Os anti-hipertensivos são classificados em Diuréticos, Inibidores adrenérgicos (Ação central – agonistas alfa-2 centrais, Betabloqueadores – bloqueadores beta-adrenérgicos, Alfabloqueadores – bloqueadores alfa-1 adrenérgicos); Vasodilatadores diretos; Bloqueadores dos canais de cálcio; Inibidores da enzima conversora da angiotensina; Bloqueadores do receptor AT<sub>1</sub> da angiotensina II e Inibidor direto da renina (MALACHIAS *et al.*, 2016).

Os diuréticos, que foram desenvolvidos nos anos 60, estão relacionados com o aumento da diurese (excreção de água) e natriurese (excreção de sódio). Os beta-bloqueadores foram desenvolvidos nos anos 70 e sua ação anti-hipertensiva não está totalmente estabelecida, mas pode decorrer basicamente do fato de que reduzem a liberação de renina e diminuem o débito cardíaco, diminuindo assim o volume sanguíneo. Os bloqueadores de canal de cálcio foram desenvolvidos nos anos 70 e 80 e inibem o influxo de cálcio na célula muscular lisa, acarretando a vasodilatação.

Os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) foram desenvolvidos nos anos 80. Os inibidores da ECA têm como uma de suas principais ações a de inibir a conversão da Ang I em Ang II. Desta forma, a ação essencialmente vasoconstritora da Ang II é minimizada.

Os bloqueadores do receptor de angiotensina II (BRA) são agentes anti-hipertensivos orais, cujo mecanismo de ação básico é o de antagonizar especificamente o receptor AT<sub>1</sub>, deixando livre o receptor AT<sub>2</sub>. Essa classe de anti-hipertensivos, desenvolvida nos anos 90, apresenta como mecanismo de ação a inibição da ligação da Ang II aos receptores AT<sub>1</sub>, impedindo assim a vasoconstrição das arteríolas (PAULA *et al.*, 2005).

Os BRAs são uma classe de drogas amplamente utilizada para o tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca, nefropatia diabética, e, mais recentemente, para a redução do risco cardiovascular. Alguns estudos experimentais implicam o sistema renina-angiotensina, particularmente a angiotensina II e seus receptores tipo 1, na regulação da proliferação celular, angiogênese, e a progressão do tumor. Desse modo, o uso dos BRAs tem sido considerado também como potencial agente anticâncer (SIPAHÍ *et al.*, 2010).

Assim como a classe dos IECA, os BRA também vão agir farmacodinamicamente impedindo a ação da Angiotensina II. Porém, como farão isso por outra via, manterão intacta a enzima responsável pela conversão da Angiotensina I em Angiotensina II. Esta enzima é a responsável pelo processo fisiológico natural de degradação da bradicinina. Inibindo-a como ocorre com os IECA haverá acúmulo de bradicinina gerando efeitos colaterais como, por exemplo, a característica tosse seca, presente em 30% dos tratamentos com IECA. Contudo, o acúmulo de bradicinina não acontece normalmente em um tratamento com fármacos da classe dos BRA.

Para a realização deste trabalho foram utilizados dois representantes da classe de fármacos anti-hipertensivos bloqueadores dos receptores de angiotensina II, a losartana e a olmesartana.

O fármaco losartana, fórmula molecular  $C_{22}H_{22}C_1KN_6O$ , foi o primeiro fármaco da classe dos BRA a ser desenvolvido. Foi originalmente sintetizado como um composto anti-hipertensivo, mas atualmente também é usado em tratamentos de problemas cardiovasculares e diabetes (WU *et al.*, 1993; RAGHAVAN *et al.*, 1993). Atualmente é o BRA mais utilizado devido ao seu baixo custo.

A olmesartana medoxomila, fórmula molecular  $C_{29}H_{30}N_6O_6$ , é o fármaco mais novo da classe BRAs. Os BRAs compartilham elementos estruturais semelhantes que são necessários para o antagonismo efetivo do receptor AT1. No entanto, o olmesartan medoxomil possui características estereoeletrônicas únicas que o distinguem de outros membros da classe.

Estudos comparando diversos anti-hipertensivos, incluindo a losartana e a olmesartana, mostraram que embora a eficácia anti-hipertensiva dos BRAs seja semelhante, há hoje evidências de que a olmesartana apresente maior potência na diminuição da pressão arterial (RIBEIRO & FLORÊNCIO, 2007). O trabalho de Mire e colaboradores (2005) apontam características típicas da olmesartana que possivelmente explicam essa vantagem farmacológica. Uma delas é que esta aumenta a expressão da ECA2 que converte a Ang II em Ang I, que possui ação vasodilatadora. Uma característica dos BRA é que a queda pressórica obtida praticamente permanece a mesma com o aumento da dose. Trata-se de uma curva dose-resposta “rasa”. Já com a olmesartana, a curva tem uma inclinação maior. Estudos realizados com a molécula da olmesartana mostram que esta tem o maior número de sítios funcionais. A sua ligação

ao receptor é não competitiva e, portanto, não pode ser sobrepujada pela Ang II mesmo que esta esteja em grandes concentrações, ocorrendo, desse modo, uma saída mais lenta do receptor.

A olmesartana também representou melhor escolha de tratamento em pesquisa realizada por Swindle *et al.* (2011). Em seu estudo de coorte o pesquisador acompanhou por um tempo médio de 2,5 anos aproximadamente 184.000 indivíduos, que divididos em grupos utilizaram losartana, valsartana, irbesartana e olmesartana. O tratamento com olmesartana foi associado com menores riscos de eventos cardíacos e menor utilização de recursos de saúde e custos em relação aos outros medicamentos.

## **2.6. Modelo animal para hipertensão arterial**

Em 1963, Okamoto e Aoki introduziram um novo modelo experimental de hipertensão, sem que nenhum recurso fisiológico, farmacológico ou cirúrgico fosse necessário (OKAMOTO & AOKI, 1963). Os autores examinaram centenas de ratos de uma colônia Wistar do centro de animais na universidade de Kyoto. A média das pressões sanguíneas nestes animais ficou entre 120-140 mm Hg e foram medidas por um pletismógrafo de calda. As pressões foram medidas com os animais não anestesiados. Foram feitos quatro acasalamentos entre um macho que apresentou uma pressão de 145-175 mm Hg e uma fêmea com pressão entre 130-140 mm Hg. Entre os descendentes (16 machos e 20 fêmeas) 12 machos e 6 fêmeas, mantidos com uma alimentação normal, com idade de 20 semanas demonstraram uma pressão elevada (por volta de 150 mm Hg). Com 30 semanas de idade, 14 machos e 11 fêmeas apresentaram essa elevação de pressão. Os descendentes que exibiram hipertensão por mais de um mês foram usados para um acasalamento entre irmãos. As sucessivas gerações de animais hipertensos foram obtidas por acasalamento entre irmãos de animais selecionados que apresentavam alta pressão arterial. Esse processo foi continuado até que a toda colônia de ratos produzida apresentasse pressões maiores que 180 mm Hg com 20 semanas de idade (UDENFRIEND *et al.*, 1976)

Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foram desenvolvidos por esta reprodução genética meticulosa, entre irmãos e irmãs, que resultou em animais naturalmente portadores de doença hipertensiva, em 100% dos descendentes

(OKAMOTO *et al.*, 1966). Desde então, o SHR é reconhecido como um excelente modelo de hipertensão experimental e pode servir como modelo de estudos clínicos da hipertensão essencial humana.

O primeiro modelo de hipertensão espontânea no rato a ser desenvolvido não foi o rato espontaneamente hipertenso (SHR), mas sim o modelo GH originado de uma linhagem de ratos da Nova Zelândia<sup>10</sup>. Entretanto, desde o desenvolvimento do SHR (OKAMOTO & AOKI, 1963), esta linhagem, se não é o modelo mais estudado na literatura pertinente, certamente está entre os mais estudados. A sua importância tem sido creditada à similaridade da sua fisiopatogenia com a hipertensão essencial (primária) do homem.

A semelhança entre a hipertensão humana e a observada no SHR, inclui: a) a predisposição genética para hipertensão sem etiologia específica, b) o aumento da resistência periférica total sem expansão de volume e, c) igual resposta a tratamentos com drogas (TRIPPODO & FROHLICH, 1981). Por apresentar um relativo curto período de vida, ser pequeno, ter relativamente baixo custo, e ser de fácil manutenção em biotérios, os SHR são utilizados para estudo da história natural, determinantes genéticos e alterações fisiopatológicas da doença hipertensiva essencial.

Os SHRs começam a desenvolver hipertensão arterial com 5 semanas de vida, já apresentando um nível de pressão considerado como hipertensão espontânea entre a 7ª e a 15ª semanas, atingindo um platô entre a 20ª e 28ª semanas, não havendo influência sexual nesse desenvolvimento (YAMORI, 1984). Entretanto, fatores ambientais, tais como ingestão exagerada de sódio, estresse, alterações sociais e alterações do ciclo claro/escuro, afetam o desenvolvimento da hipertensão.

Com o desenvolvimento da hipertensão arterial, o SHR desenvolve uma progressiva hipertrofia cardíaca (THOMAS *et al.*, 1997). O débito cardíaco permanece em níveis normais com o progresso da hipertensão, até que nos estágios finais a função cardíaca começa a ser comprometido, quando então, o débito cardíaco começa a reduzir-se em função de uma insuficiência cardíaca congestiva (FROHLICH, 1977).

Com relação à frequência cardíaca, esta se encontra mais elevada que nos ratos WKY já na 3ª semana de vida e se correlaciona, positivamente, com os níveis de pressão atingidos até a 6ª semana de vida (DICKHOUT *et al.*, 1998). A taquicardia é

considerada como resultado de um aumento na frequência intrínseca do marcapasso cardíaco.

Trippodo e Frohlich (1981) ressaltaram que, embora o SHR seja um excelente modelo da hipertensão essencial humana, há as seguintes ressalvas: 1) reconhecimento da improbabilidade de que ambas as formas de hipertens<sup>o</sup> espontânea (rato e o homem) sejam expressões idênticas de uma doença hipertensora determinada geneticamente; 2) ambas têm origem poligênica e são influenciadas por fatores ambientais; 3) sendo o controle cardiocirculatório multifatorial, certos mecanismos pressores não se expressam, necessariamente, em ambas as situações; 4) o conceito fisiológico de que o desequilíbrio de um mecanismo regulatório implica na expressão de outro mecanismo, isto implica que alterações secundárias, por exemplo, adaptativas, devam ocorrer nos dois modelos.

Independentemente da controvérsia quanto à similaridade, ou não, entre o SHR e a hipertensão essencial do homem, este modelo tem se revelado bastante útil para melhor compreensão de mecanismos fisiopatológicos, quer do próprio modelo em si, quer da hipertensão essencial do homem. Embora a hipertensão dos SHR seja de desenvolvimento espontâneo, fatores ambientais tais como, ingestão exagerada de sódio, estresse, alterações sociais, e alterações do ciclo claro/escuro afetam esse desenvolvimento.

#### 2.6.1. Controle experimental para SHR - Wistar-Kyoto

Um das decisões mais importantes ao planejar um experimento é a escolha do controle já que a base da técnica experimental nas ciências biomédicas é comparativa. Ou seja, para o entendimento de um fenômeno biológico decorrente de um experimento é necessário comparar os efeitos do procedimento experimental em um grupo de animais que são presumidamente idênticos aos animais testados que não sejam submetidos a esses procedimentos.

O principal motivo de se usar o rato SHR é a determinação de patogêneses decorrentes da elevada pressão sanguínea, isto é, determinar causas e efeitos relacionados à hipertensão. Desde que a linhagem SHR representa uma única entidade genética, um sistema experimental ideal consistiria em duas populações, geneticamente

idênticas, exceto pelo único gene responsável pela elevação da pressão sanguínea. Como isso não seria possível, uma melhor aproximação se dá com o uso da linhagem Wistar-Kyoto (WKY), a base normotensa da qual a linhagem SHR foi derivada. (UDENFRIEND *et al.*, 1976)

## **2.7. Os elementos e a saúde cardiovascular**

Os estudos sobre a distribuição de elementos em tecidos biológicos são de grande importância no estudo de doenças, já que o desbalanceamento químico pode alterar algumas funções biológicas. Está bem estabelecido pela literatura que alguns elementos são protagonistas em vários processos biológicos, principalmente através de suas ações como ativadores ou inibidores de reações enzimáticas, competindo com outros elementos e proteínas para locais de ligação, influenciando a permeabilidade das membranas celulares, ou através de outros mecanismos. (FRAGA, 2005) Sendo assim, pode-se supor que minerais como Na, Mg, Fe, Cu e Zn exercem uma ação, direta ou indiretamente, também nas células cardíacas, nas paredes dos vasos sanguíneos, nos centros reguladores da pressão sanguínea ou em outros sistemas relacionados à função cardiovascular.

Em vários estudos, foi identificada relação direta entre as mudanças no conteúdo de tecidos e a gravidade, duração ou incidência de uma determinada doença. Embora tais mudanças possam ser secundárias à degeneração e não uma prova de uma relação de causa e efeito real, elas podem fornecer pistas sobre o papel desempenhado pelos elementos na patogênese de uma dada doença, ou ainda, ter um valor preditivo.

Em humanos e outros mamíferos, 23 elementos são conhecidos por suas atividades fisiológicas. Os metais de transição Fe, Cu, Zn, entre outros, pertencem à categoria de micronutrientes, que são essenciais, porém estão presentes em quantidades muito limitadas no corpo humano (geralmente inferiores a 100 mg / dia). Em oposição estão os elementos considerados macronutrientes, como o Na, Ca, Mg, K, etc., que são exigidos em quantidades maiores pelo organismo (FRAGA, 2005).

Os níveis de oxigênio intracelular devem satisfazer as condições cinéticas e termodinâmicas para a fosforilação oxidativa. O oxigênio é fornecido pela difusão intracelular às mitocôndrias, etapa final no sistema de cascata respiratória (GNAIGER

*et al.*, 1995). A falta de oxigênio leva a consequências fisiológicas e patológicas de hipoxia variando de comprometimento de funções aeróbicas até lesão isquêmica e morte celular.

O perfeito funcionamento do coração depende da contração dos cardiomiócitos, que por sua vez depende diretamente de sódio. Graves danos para o coração tais como enfarte do miocárdio e isquemia, têm sido associados a apoptose de cardiomiócitos. A isquemia do miocárdio altera o metabolismo celular para a respiração anaeróbica, o que resulta em sobrecarga de cálcio intracelular (HONG *et al.*, 2015). O íon de sódio também pode atuar em artérias grandes hipertensas através de uma modificação de sua função de condução (e subsequente alteração do fluxo sanguíneo) ou de uma modificação de sua função de amortecimento. O Na atua sobre a rigidez das artérias grandes e, portanto, sobre a estrutura e função arterial. (SAFAR *et al.*, 2010)

A deficiência de Mg é considerada outro fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A suplementação de Mg atrasa o início da aterosclerose e também dificulta seu desenvolvimento. O magnésio intensifica a saída de Ca das células, ativando enzimas importantes que participam de processos metabólicos e de fosforilação, competindo com Ca em muitas de suas funções. A relação entre deficiência de Mg e hipertensão arterial ainda não foi totalmente estabelecida. Contudo, pelo menos dois tipos de hipertensão - flutuante e por excesso de Ca e renina - podem estar relacionados à deficiência de Mg. (TUBEK, 2006)

O Fe é um elemento essencial para quase todos os organismos vivos, pois participa de uma grande variedade de processos metabólicos, incluindo transporte de oxigênio, síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e transporte de elétrons. No entanto, como o Fe participa do processo biológico de oxidação e pode formar radicais livres, a sua concentração nos tecidos do corpo deve ser rigorosamente regulada, pois em quantidades excessivas pode causar danos nos tecidos. Os distúrbios do metabolismo do ferro estão entre as doenças mais comuns dos seres humanos e abrangem um amplo espectro de doenças com diversas manifestações clínicas, desde anemia até sobrecarga de Fe e, possivelmente, doenças neurodegenerativas. A deficiência de Fe está associada a alterações dos mecanismos de imunidade e também ao aumento das taxas de morbidade. (ABBASPOUR *et al.*, 2014)

Os elementos Mg, Cu e Fe, analisados neste trabalho, são considerados essenciais e exercem papéis importantes na redução do risco de doença cardiovascular. Estudos mostram, entretanto, que o Zn tem um duplo papel quando se trata de doenças cardiovasculares, ao serem associados a efeitos benéficos ou maléficos, dependendo de vários fatores. (TUBEK, 2006)

Zn desempenha uma função na regulação da pressão arterial e faz parte da etiopatogênese da hipertensão arterial. Ele pode dar origem à acumulação intracelular de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , resultando em hipertensão, mas sua deficiência pode reduzir a vasodilatação. Além disso, a deficiência de Zn resulta na diminuição da atividade da enzima conversora de angiotensina I, que precisa de Zn em seu centro ativo. Zn também é considerado um bloqueador de canal Ca. Vários estudos experimentais mostraram a atividade hipotensiva e protetora de Zn contra o desenvolvimento da hipertensão. Entretanto, outros trabalhos revelam uma correlação negativa entre a concentração de Zn no soro sanguíneo e a hipertensão arterial. (TUBEK, 2006)

O Cu é necessário para a formação de glóbulos vermelhos e mantém os vasos sanguíneos, os nervos, o sistema imunológico e os ossos saudáveis. O Cu é associado a várias enzimas intra e extracelulares que estão envolvidas em importantes processos metabólicos, incluindo: a biossíntese de catecolaminas, o transporte de Fe, síntese de tecido conjuntivo e ainda possui importante papel antioxidante. (FERNS *et al.*, 1997)

O Zn e o Cu no corpo possuem algumas funções fisiológicas importantes, mas possuem regulamentações e restrições entre si, de modo que as variações do conteúdo de Zn e relação Zn/Cu refletem os efeitos desses dois microelementos no corpo humano. Um aumento de Zn e da relação Zn/Cu pode reduzir significativamente o nível de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e aumentar os níveis de triglicerídeos, colesterol e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o que poderia causar aterosclerose e doença cardiovascular (TANG *et al.*, 2003).

## 2.8. Fluorescência de raios X

A Fluorescência de raios X (XRF – do inglês: *X-ray fluorescence*) é uma técnica não destrutiva utilizada para análise qualitativa e quantitativa multielementar de uma ampla variedade de amostras. Esta técnica é baseada na medida das intensidades (números de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra quando devidamente excitada por fontes de radiação como tubos de raios X, radiação síncrotron, entre outras.

Quando a radiação eletromagnética incide e interage com uma amostra, alguns tipos de interação com a matéria podem ocorrer: absorção, emissão e espalhamento de radiação eletromagnética (SKOOG *et al.*, 2009). O tipo de interação depende da energia do fóton de raios X e número atômico do elemento (KNOLL, 2000)

Ao interagir com a matéria, existe a possibilidade dos fótons serem absorvidos, emitidos ou espalhados, diferenciando a interação de acordo com o número atômico do elemento e da energia do fóton que com ele interage. Para energias próximas de 1keV interagindo com elementos de baixo número atômico, o efeito fotoelétrico é o efeito predominante, seguido pelo efeito Compton (Figura 5).

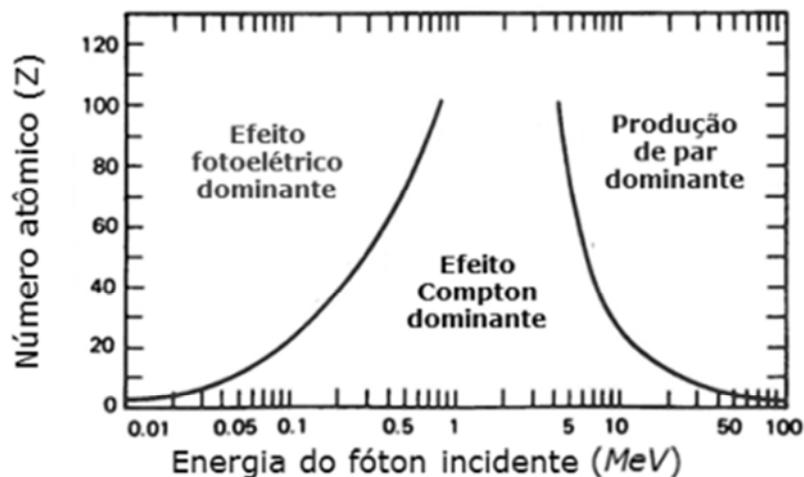


Figura 5 – Probabilidade de ocorrência de efeitos fotoelétrico, Compton e produção de pares. Adaptado de KNOLL, 2000.

A Figura 6 ilustra o mecanismo para as emissões de raios X característicos.

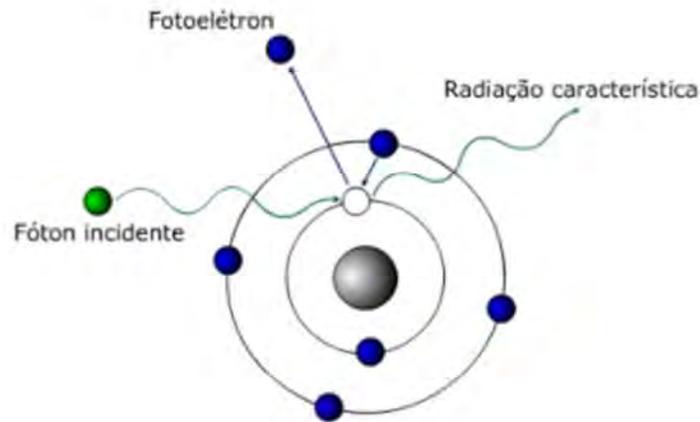


Figura 6 – Ilustração da emissão de raio X característico entre. (Fonte - <https://efeitofotoeletricoecompton.webnode.com.br>)

Suponhamos um átomo irradiado por um fóton incidente de energia igual ou superior à energia de ligação do elétron de uma determinada camada (nível energético) do material alvo. Este fóton pode interagir com o elétron dessa camada e, ao quebrar a barreira de potencial do elétron naquele nível de energia, o retira do orbital produzindo uma vacância. O átomo fica então num estado excitado e tende a se estabilizar naturalmente. Para isso, ocorre um rearranjo eletrônico, onde um elétron de um orbital mais externo realiza um salto quântico para preencher a vacância oriunda da ejeção do elétron. Ao realizar a transição eletrônica existe a liberação de energia, na forma de um fóton de raios X, de energia igual à diferença entre as energias dos orbitais. Este fóton possui uma energia bem definida que é característica para cada elemento. Por esse motivo são chamados de raios X característicos.

A energia dos raios X característicos emitidos pelos elementos pode ser calculada de modo aproximado pela equação (1) (OKUNO & YOSHIMURA, 2010):

$$E = 13,65 \cdot (Z - b)^2 \cdot \left( \frac{1}{n_f^2} - \frac{1}{n_i^2} \right) \quad (1)$$

Onde:

E = energia dos raios X (medida em eV);

$n_i, n_f$  = número quântico principal do nível inicial e final do salto quântico, respectivamente;

Z = número atômico do elemento emissor dos raios X;

b = constante de Moseley, com valores iguais a 1 e 7,4, para as camadas K e L, respectivamente.

Pela equação (1), tem-se que a energia dos raios X emitida é diretamente proporcional ao quadrado do número atômico Z do elemento excitado. Esta equação é importante para se compreender o conceito da proporcionalidade entre a energia (ou amplitude do pulso produzido no detector) e o elemento a ser analisado em equipamentos de fluorescência de raios X que fazem uso da dispersão de energia com detectores semicondutores.

De modo resumido, na XRF, a fluorescência emitida pelos elementos presentes na amostra incide em um detector, que possui uma eletrônica associada, capaz de resolver a energia dos fótons incidentes com precisão suficiente para fornecer uma distribuição espectral de intensidades versus energia. Analisadores multicanais computadorizados são utilizados para adquirir, mostrar o espectro (diferenciando as energias) e realizar a análise dos dados.

A intensidade de qualquer pico no espectro de raios X é proporcional ao número de átomos que emitem fótons de energias atribuídas a esta linha. Porém vários fatores devem ser levados em conta numa quantificação devido aos efeitos matriz. Os efeitos de matriz são causados basicamente por processos de absorção e de intensificação (reforço) do sinal de emissão, por parte dos outros elementos que compõem a matriz amostral.

A fração da radiação incidente que leva à emissão de uma determinada linha de raios X característicos é determinada pela probabilidade de excitação ( $P_{E_i}$ ), que é o produto de três outras probabilidades (LACHANCE *et al.*, 1995).

$$P_{E_i} = P_{nível} \cdot P_{linha} \cdot P_{fluorescência} \quad (2)$$

Onde:

$P_{nível}$  é a probabilidade da radiação incidente retirar elétrons de um dado nível quântico. Pode ser o nível K, L, M, N, etc.;

$P_{linha}$  é a probabilidade que uma determinada energia seja emitida dentro de sua série. Para um elétron retirado do nível K podemos ter as seguintes transições do nível L: K-L2 e K-L3;

$P_{fluorescência}$  é a probabilidade de ocorrer emissão de fluorescência de raios X ao invés do processo Auger, a partir de uma transição realizada entre dois estados quânticos.

A probabilidade de a radiação incidente retirar elétrons de um determinado nível está fortemente ligada com a fração da radiação que é absorvida no mesmo nível (LACHANCE *et al.*, 1995).

### 2.8.1. Energia de corte de absorção

Como mencionado anteriormente, para que ocorra uma transição entre dois estados quânticos é necessário que um elétron seja liberado do átomo. Para que isso ocorra, a energia de excitação mínima deve ser igual ou superior à energia de ligação do elétron ao orbital de origem. Essa energia de ligação eletrônica é denominada energia de corte de absorção. A Figura 7 representa o corte de absorção (ou energia de ligação) dos elétrons nos níveis K, L e M em função do número atômico.

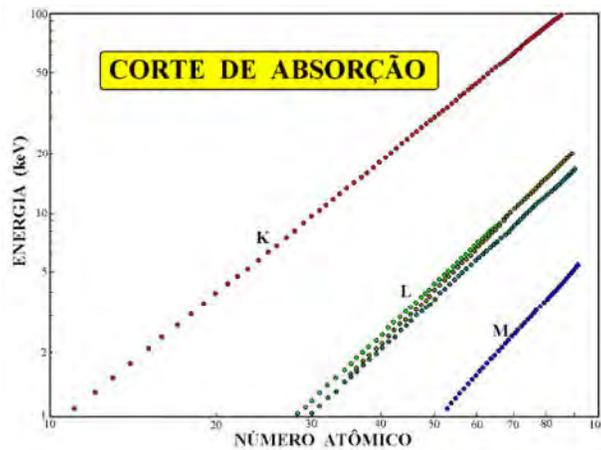


Figura 7 – Energia de ligação ou corte de absorção nos níveis K, L e M em função do número atômico (NASCIMENTO, 1999).

Em geral, a energia crítica de excitação refere-se à energia de ligação, visto que essa representa a menor energia necessária para que elétrons possam ser ejetados de um átomo. Sendo assim, para que ocorra emissão de raios X característicos é necessário que a energia da radiação incidente seja igual ou superior a estas energias de ligação.

#### 2.8.2. Rendimento da fluorescência

Sabe-se que a desexcitação de átomos pode ocorrer não apenas pela emissão de radiação eletromagnética, mas também por outros processos concorrentes. Esses processos são conhecidos como transições radiativas e as transições não radiativas. A principal diferença entre essas transições é a emissão de fótons, que ocorrem nas transições radiativas. (BAMBYNEK *et al.*, 1972)

As transições radiativas podem ocorrer, se a energia do feixe incidente for superior à energia de ligação de um elétron das camadas mais internas do átomo. Nesta situação o elétron absorve parte da energia e então é ejetado, formando uma vacância, posteriormente ocupada por um elétron de uma camada superior, que ao ocupar a vacância emite um fóton de raios X.

Algumas vezes o fóton emitido é absorvido dentro do próprio átomo por outro elétron do mesmo, ou de outra camada em que ocorreu a emissão de energia característica e, ao invés de serem emitidos raios X característicos, são emitidos

elétrons, denominados elétrons Auger. Essa transição é dita não radiativa, pois não ocorre a emissão de fótons.

Além do efeito de Auger, outra forma de transição não radiativa pode ocorrer quando um elétron transita entre as subcamadas de uma camada atômica com o mesmo número quântico principal. Por exemplo, um elétron transita da subcamada p para a subcamada s da camada L, em vez de transitar da camada L para a K, como se verifica no efeito de Auger. A esta transição intra camadas dá-se o nome de transição de Coster-Kronig. (COSTER & KRONIG, 1935)

O rendimento de fluorescência de uma camada ou subcamada atômica é definido como a probabilidade de que a vacância naquela camada ou subcamada seja preenchida por meio da transição radiativa. Contudo, o cálculo do rendimento de fluorescência de uma camada ou subcamada  $i$ ,  $\omega_i$ , exige o conhecimento das probabilidades de decaimento por todas as vias possíveis, sejam elas não radiativas ( $P_{RN}$ ) ou radiativas ( $P_R$ ), da vacância inicialmente criada em  $i$ . Este rendimento é dado por:

$$\omega_i = \frac{P_R}{P_R + P_{RN}} \quad (3)$$

A aplicação dessa definição para a camada K de um átomo, normalmente contendo dois elétrons, é direta. O rendimento de fluorescência para essa camada é:

$$\omega_k = \frac{I_K}{n_K} \quad (4)$$

Onde:

$I_K$  é o número de fótons de raios X característicos emitido pela amostra;

$n_k$  é o número de vacâncias produzidas na camada K

A definição de rendimentos de fluorescência de camadas atômicas mais altas é mais complicada por duas razões:

- i) Camadas acima da camada K são constituídas por mais de uma subcamada porque os elétrons podem ter diferentes números quânticos de momento angular.

O rendimento médio de fluorescência depende, portanto, em geral, de como as camadas são ionizadas, uma vez que diferentes métodos de ionização dão origem a diferentes conjuntos de vacâncias primárias.

ii) Transições de Coster-Kronig (COSTER E KRONIG, 1935) possibilitam que uma vacância primária gerada em uma subcamada mude para outra subcamada mais alta antes da vacância ser preenchida por outra transição.

Todos os conceitos, definições e probabilidades para o cálculo do rendimento da fluorescência pode ser encontrado em BAMBYNEK *et al.* (1972).

O rendimento de fluorescência pode ser definido como sendo então o número de raios X efetivamente emitidos em relação ao número de vacâncias produzidas em uma dada camada (NASCIMENTO, 1999), representado na Figura 8.

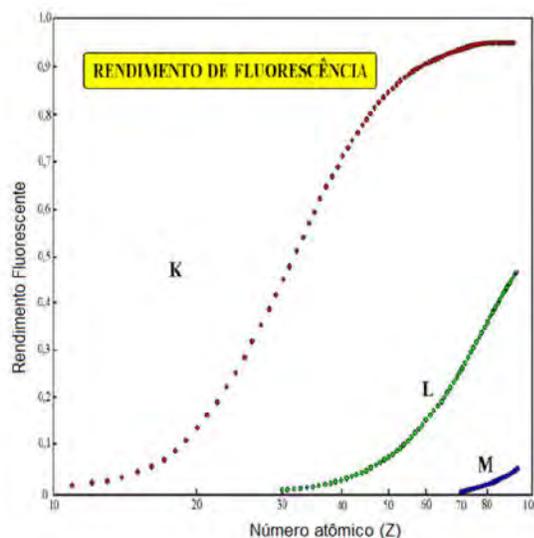


Figura 8 – Rendimento da fluorescência das camadas K, L e M em função do número atômico (Z) (NASCIMENTO, 1999).

Nota-se que há um baixo rendimento de fluorescência no nível K para elementos leves (de número atômico abaixo de 20), no nível L o rendimento ainda é baixo para os elementos de número atômico abaixo de 60 e no nível M para praticamente todos os elementos (NASCIMENTO, 1999).

## 2.9. Microfluorescência de raios X

A microfluorescência de raios X ( $\mu$ XRF) é uma variante da XRF que se diferencia principalmente nas dimensões e geometria do feixe. É baseada na excitação localizada de uma área microscopicamente pequena (na ordem de  $\mu\text{m}$ ) na superfície de uma amostra, fornecendo informações da distribuição espacial de elementos majoritários e minoritários no material de estudo. Por esse motivo, a  $\mu$ XRF é uma técnica bastante atrativa para a análise local e para o mapeamento elementar em vários tipos de materiais (BERNASCONI *et al.*, 1994).

Assim como na XRF um feixe primário de raios X irradia uma área (no caso da  $\mu$ XRF o feixe na ordem de poucos micrometros) de uma amostra e induz a emissão de raios X fluorescentes desta área. Um detector semicondutor coleta a radiação fluorescente que transporta informações sobre a composição local da amostra. Contudo, na  $\mu$ XRF, a amostra então é movida por motores controlados por um computador, permitindo assim obtenção de informações elementares do próximo ponto. Este procedimento é realizado de forma a varrer toda a amostra em análise. O mapeamento elementar é realizado dividindo-se a área a ser analisada em pixels (Figura 9), e para cada pixel, é obtido um espectro de fluorescência de raios X (PRINS *et al.*, 1984).

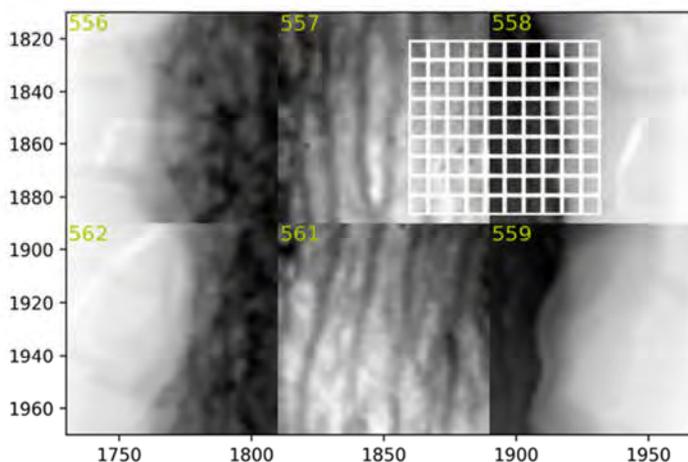


Figura 9 – Exemplo de matriz utilizada para a análise por  $\mu$ XRF em uma aorta de rato SHR.

As dificuldades na exploração deste método estão relacionadas com a produção de feixes de raios X suficientemente intensos e de dimensões micrométricas para que se obtenham microanálises sensíveis. Há poucos anos atrás se considerava muito difícil focalizar um feixe de raios X de pequenas dimensões e a solução deste problema somente apareceu recentemente com o uso da radiação síncrotron.

A  $\mu$ XRF é um poderoso método para a análise de amostras biológicas, tendo as vantagens de um baixo limite de detecção (0,01  $\mu$ g/g), pequeno dano térmico e na maioria dos casos as medidas podem ser realizadas no ar (EKTESSABI *et al.*, 1999). O uso dessa técnica em associação com a radiação síncrotron (SR- $\mu$ XRF) permite maior sensibilidade para a análise de concentrações muito baixas e possibilita estudar amostras da ordem de micrômetros.

#### **2.10. Radiação Síncrotron associada à Fluorescência de raios X**

A luz, ou radiação, síncrotron é um tipo de radiação eletromagnética de alto fluxo e alto brilho que se estende por uma faixa ampla do espectro eletromagnético desde a luz infravermelha, passando pela radiação ultravioleta e chegando aos raios X. Ela é produzida quando elétrons relativísticos são acelerados e têm sua trajetória desviada por campos magnéticos. Então, é emitida radiação em uma ampla faixa do espectro eletromagnético, a radiação síncrotron (CASTILHO, 2006). A Figura 10 mostra uma vista esquemática de uma instalação síncrotron.

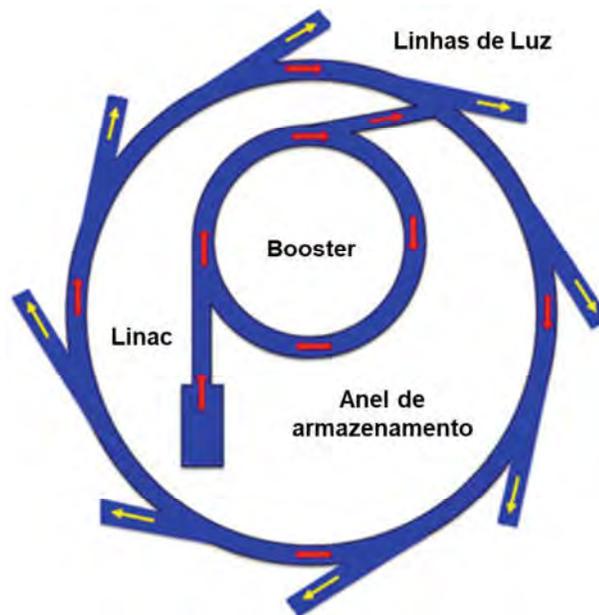


Figura 10 - Vista esquemática planar de uma instalação de radiação síncrotron. (figura adaptada de BALERNA & MOBILIO, 2015)

O processo de produção de luz síncrotron é iniciado pela aceleração de elétrons em um acelerador linear (Linac) até que sua energia atinja a ordem de MeV. Então, os elétrons são direcionados para um acelerador circular, chamado Booster, onde atingem uma energia na ordem de GeV. Em seguida, o feixe de elétrons é injetado em um anel de armazenamento, onde se encontram três dispositivos básicos: Os ímãs de deflexão, que são formados por ímãs dipolares que produzem um campo magnético homogêneo no sentido vertical. Eles são responsáveis pela deflexão do feixe de elétrons e consequentemente pela produção de luz síncrotron; Os quadripolos ou sextupolos, que estão situados nos trechos retos do anel e servem para focalizar os elétrons e reduzir as aberrações cromáticas e; as cavidades de rádio frequência, que estão situadas em um ou mais trechos retos, são responsáveis por fornecer aos elétrons, em cada passagem pelo seu interior, a energia perdida em cada volta devido à radiação produzida nas partes curvas de suas trajetórias aumentando, assim, o tempo de vida do feixe (MARGARITONDO, 1995).

Os anéis de armazenamento mais avançados são chamados de síncrotrons de terceira geração. Eles são baseados em duas características principais: baixa emitância e muitas seções retas para dispositivos de inserção como, por exemplo, wigglers e

onduladores (Figura 11). Esses dispositivos consistem em um arranjo de ímãs projetados para desviar periodicamente a trajetória dos elétrons gerando feixe de radiação de maior energia e maior fluxo. As fontes de terceira geração são capazes de fornecer radiação cerca de 10.000 vezes mais brilho do que as fontes de segunda geração. (SHENOY, 2003)

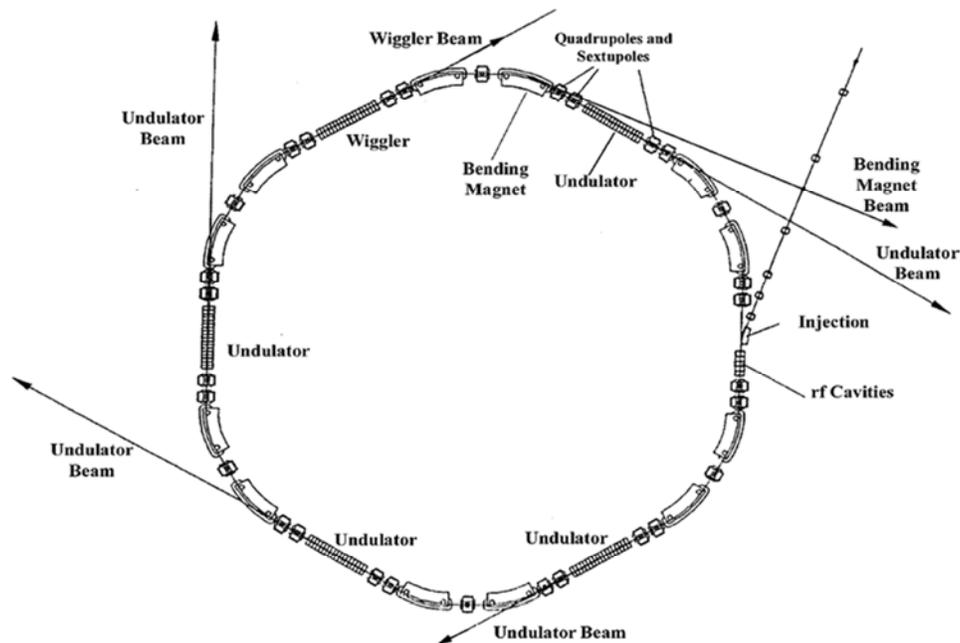


Figura 11 – Layout geral de um anel de armazenamento de terceira geração. (SHENOY, 2003)

Os feixes de raios X obtidos em uma máquina de luz síncrotron são extremamente intensos, colimados e dotados de um elevado grau de coerência longitudinal (espacial). Além disso, com a utilização de cristais monocromadores é possível obter feixes monocromáticos com energia selecionável dentro de um amplo espectro de energia (ARFELLI *et al*, 2000).

A técnica de Fluorescência de raios X por radiação Síncrotron (SRXRF) difere da XRF convencional pelo fato de empregar a luz síncrotron como fonte de excitação. Este tipo de fonte tem proporcionado melhoras significativas na detecção dos elementos, decorrentes das próprias propriedades físicas deste tipo de radiação. Assim, atualmente, pesquisadores aplicam a SRXRF, por exemplo, na área médica, num estudo de avaliação da composição elementar de tecidos humanos saudáveis e doentes (BAZHANOVA *et al.*, 2007)

De um modo geral, a microanálise pode ser utilizada em vários tipos de amostras, tais como, aerossóis, sedimentos em suspensão, resíduos de descarga de armas de fogo, tecidos, amostras biológicas ou não biológicas em geral. (GRIEKEN; XHOFFER, 1992; HOLYNSKA, 1997; JANSSENS, 1994).

### **2.11. Fluorescência de raios X de baixa energia (LEXRF) - TwinMic**

As duas configurações típicas de microscopia de raios X mais usadas são a microscopia de transmissão (TXM, do inglês: *transmission X-ray microscopy*) e a microscopia de varredura (STXM, do inglês: *scanning transmission X-ray microscopy*). No modo de imagem STXM, a amostra é varrida por um microfeixe de raios X, enquanto os sinais emitidos e transmitidos podem ser adquiridos simultaneamente por sistemas de detecção adequados, tornando este modo de imagem preferível para mapeamento elementar e análise química (KIRZ *et al.*, 1992). Por outro lado, os estudos morfológicos com imagens de exposição única por microtomografia, por exemplo, são tipicamente realizados por TXM, onde amostra é atingida por uma fonte de raios-X e uma lente objetiva cria uma imagem ampliada da amostra em um detector de matriz de pixels bidimensional (SCHMAHL *et al.*, 1993).

Em 2001, o Síncrotron Elettra, localizado em Trieste (Itália), começou integrar as vantagens destes dois tipos de microscopias, STXM e TXM, de forma complementar e simultânea, em um único instrumento. A partir desse projeto foi criada a TwinMic (KAULICH *et al.*, 2006). Ela é a única linha, a nível mundial, que combina esses dois tipos de microscopia em um único instrumento.

A linha de luz de espectroscopia de raios-X, TwinMic, foi otimizada para operar tanto em STXM quanto em TXM pela utilização de um ondulator híbrido curto com fonte intermediária e propriedades de divergência que podem ser comparadas com fontes de ímã de deflexão e também com onduladores convencionais. A Figura 12 mostra um Esquema da linha de luz TwinMic desde a saída do feixe do anel de armazenamento até a estação experimental. O feixe de raios X gerado pelo ondulator é colimado por um espelho cilíndrico ( $M_1$ ) disposto verticalmente em um monocromador de grade plana ( $M_2 + G$ ), a fim de adaptar o fluxo de fótons e a resolução de energia aos requisitos experimentais. O espelho toroidal ( $M_3$ ) é responsável por focalizar o feixe

para a fonte secundária (SS), que consiste em aberturas circulares (com diâmetros de 15, 25, 35, 50, 75 100 ou 150  $\mu\text{m}$ ) servindo como fenda de saída possibilitando o ajuste do tamanho e fluxo final da fonte.

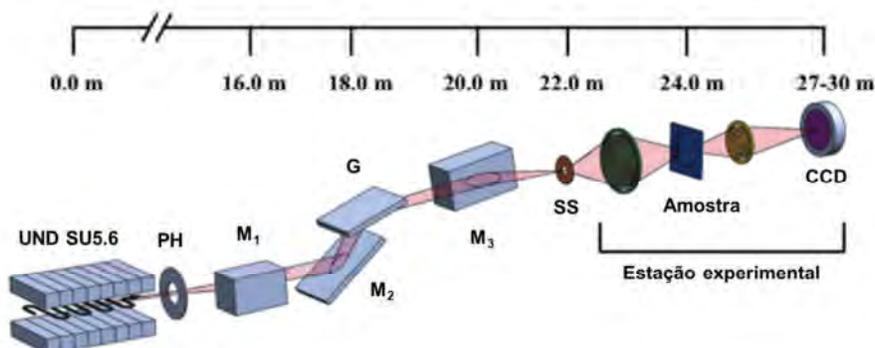


Figura 12 – Esquema da linha de luz TwinMic com fonte de raio-X gerada a partir de um ondulador híbrido curto (SU5.6), orifício de pinhole (PH), espelho cilíndrico de colimação (M1), monocromador de grade plana (espelho plano (M2) e grade plana (G)), espelho toroidal (M3) e fonte secundária de raios-X (SS). (Gianoncelli *et al.*, 2016)

A linha de luz TwinMic traz um sistema de raios X de baixa energia (LEXRF) operado no regime de raios X moles (numa faixa de 400 a 2200 eV). Foi projetada para atender várias áreas de pesquisa tais como: ciências ambientais, agricultura, nanotecnologia, materiais entre outros. Essa linha vem sendo amplamente utilizada especialmente para pesquisas na área biológica por fornecer a distribuição de elementos de baixo número atômico como carbono, nitrogênio, oxigênio, sódio, magnésio e outros elementos de fundamental importância para o metabolismo de sistemas biológicos, a nível celular e intracelular (KAULICH *et al.*, 2009).

A Figura 13 mostra os elementos que são de possível análise pela TwinMic. Como é possível observar, para elementos de baixo número atômico o rendimento da fluorescência é muito baixo. Esse problema é contornado devido ao setup experimental desta linha, que será descrito mais adiante, e também, o tipo de preparação da amostra, tornando possível a análise desses elementos.

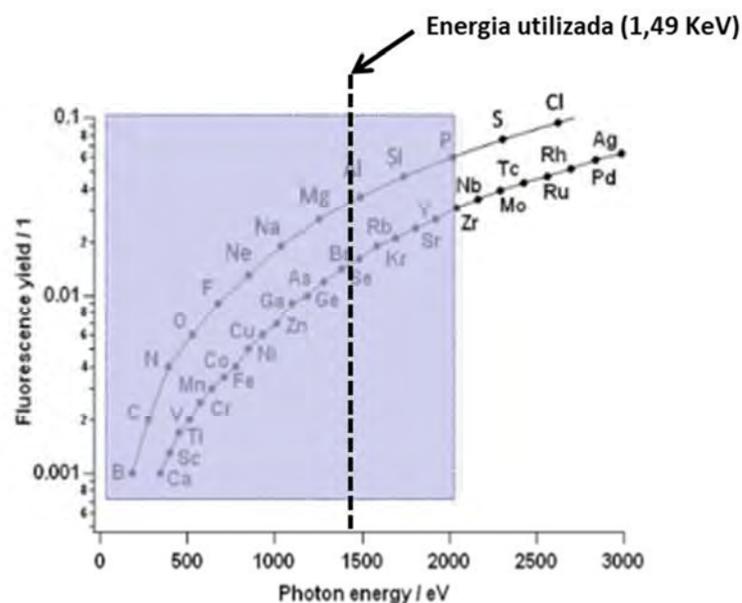


Figura 13 – Elementos acessíveis com a utilização da TwinMic (Adaptada de: <https://www.elettra.trieste.it/lightsources/elettra/elettra-beamlines/twinmic/info-for-users.html>)

A Figura 14 mostra a linha TwinMic e, de maneira geral, os componentes constituintes do sistema: a saída do feixe de raios X bem como toda a eletrônica necessária para a utilização da linha. Dentro do sistema a vácuo ( $10^{-6}$  mbar) se encontram as lentes de Fresnel, a amostra, e os oito detectores SDDs, minimizando assim, os efeitos de absorção e espalhamento do feixe de raios X no ar (GIANONCELLI *et al.*, 2013; KAULICH *et al.*, 2009).



Figura 14 – Linha TwinMic, Elettra – Itália.

Para as medições utilizando o modo STXM, o feixe atinge uma zona óptica (lentes de Fresnel), passa por um sistema seletor de abertura OSA – order sorting aperture, e atinge a amostra. Oito detectores do tipo SDD (Silicon Drift Detectors) dispostos circularmente em torno do feixe e a  $20^\circ$  em relação às amostras, captam as energias fluorescentes para formar as imagens por varredura, os mapas de fluorescência. Cada um dos 8 detectores possui área ativa de  $30\text{mm}^2$ , largura à meia altura (FWHM) de 135 eV a 5,9 keV e 69 eV para a linha  $K\alpha$  do Carbono e eficiência maior que 90%. A distância entre detectores e amostra é de 28 mm.

Os detectores do tipo SDDs são ideais para a detecção de fótons de baixa energia que proporcionam uma capacitância de saída muito baixa de algumas femto-Farads ( $\sim 10^{-15}$  Faradays). Isto permite reduzir significativamente o ruído eletrônico, quando comparados aos detectores de diodo de Si convencionais com área ativa e espessura equivalente. (GIANONCELLI, *et al.*, 2016).

Simultaneamente às medidas de STXM, após passar pela amostra, o feixe transmitido atinge uma tela de fósforo, converte os raios X em luz visível, passa por uma primeira lente de distância focal  $f_1=15\text{mm}$ , atinge um espelho que reflete a luz visível para uma segunda lente de foco  $f_2=50\text{mm}$  e converge finalmente para a câmara

CCD. Os sinais são captados através da câmara CCD e formam-se as imagens de absorção, referentes à TXM.

A Figura 15 representa um esquema do *setup* da estação experimental da TwinMic. De forma resumida o *setup* para realização de medidas nessa linha funciona da seguinte forma: o feixe passa pela lente de Fresnel e atinge a amostra produzindo os raios X característicos. Esses raios X são coletados pelos oito detectores SDD e então são gerados os espectros fluorescentes. Simultaneamente, os raios X que passam pela amostra, após o processo descrito anteriormente, são coletados pela câmara CCD formando as imagens de absorção da amostra. Ao final das medidas têm-se informações morfológicas e químicas da amostra analisada.

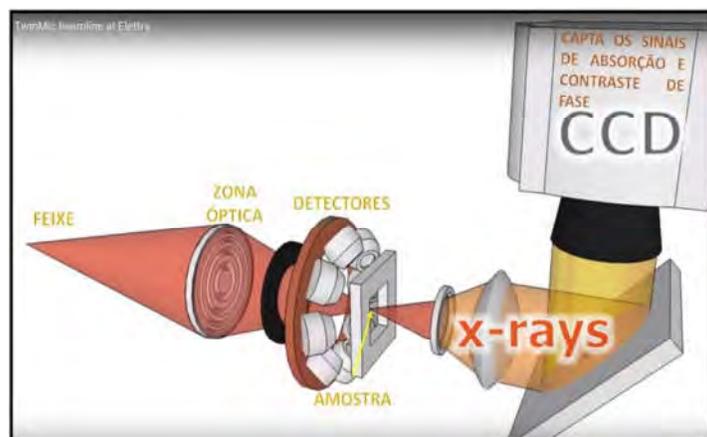


Figura 15 – Esquema do Setup da TwinMic.

Usando fluorescência de raios X de baixa energia (LEXRF) obtemos a análise estrutural (qualitativa) e a análise elementar (semiquantitativa) possibilitando uma completa análise da amostra. A informação semiquantitativa é obtida através dos mapas de distribuição elementar normalizando as intensidades obtidas nos mapas (ponto a ponto) pelas intensidades de espalhamento Compton e Rayleigh (inelástico e elástico).

Muitos trabalhos com grande impacto científico no âmbito biológico e médico vêm sendo realizados na linha TwinMic com amostras biológicas.

TREVISAN (2016) investigou se a acumulação de Fe induzida pela inalação de fibras de amianto tinha relação com a acumulação de íons de cálcio no pulmão de ratos

expostos ao amianto. MEROLLE *et al.* (2016) fizeram análises de repetibilidade e reprodutibilidade para a estatística usada em trabalhos de análise a nível celular comparando o conteúdo elementar de células de adenocarcinoma de cólon humano obtidos por três acessos diferentes. KOUROUSIAS (2015) estudaram a alta resolução da linha de luz TwinMic usando raios X moles, para uma rápida sondagem de características de distribuição de nanopartículas e o sofrimento nas células expostas a radiação. PASCOLO *et al.* (2014) estudaram distribuição a multielementar na jugular para melhor compreender a ligação entre doenças neurodegenerativas e drenagem venosa cerebral. MANTUANO *et al.* (2016) analisaram alterações de Na, Mg e Fe em tecido cardíaco de ratas que foram submetidas à protocolos de quimioterapia e radioterapia para compreensão de possível cardiotoxicidade devido à esses tratamentos.

### **2.12. Coeficiente de atenuação**

Quando um feixe de fótons atravessa um determinado material, sofre atenuação devido à interação dos fótons com os átomos do material. No caso de um feixe de raios X, esta interação ocorre, normalmente, por meio dos seguintes processos: efeito fotoelétrico, espalhamentos Rayleigh e Compton.

A soma das probabilidades de ocorrência de tais efeitos é a probabilidade por unidade de comprimento que o fóton de raios X percorre na amostra, chamada de coeficiente de atenuação linear como mostra a equação:

$$\mu = \tau_{\text{fotoelétrico}} + \sigma_{\text{compton}} + \kappa_{\text{rayleigh}} \quad (6)$$

Cada um desses processos tem uma probabilidade de ocorrência, que é dada pelo valor da seção de choque. Tal valor depende da energia do fóton incidente e do tipo de átomo (número atômico) constituinte do material. Assim, a seção de choque é, basicamente, uma maneira de expressar numericamente a probabilidade de que um tipo de átomo faça com que um fóton, com uma dada energia, sofra um determinado processo.

Uma forma de quantificar o processo de interação da radiação com a matéria é verificar a fração de intensidade de radiação atenuada pelo meio material. Esse parâmetro é exatamente o coeficiente de atenuação linear, que depende da energia da

radiação eletromagnética incidente e da natureza do meio material. O cálculo do coeficiente de atenuação linear de um determinado material depende da intensidade do feixe incidente ( $I_i$ ), da intensidade do feixe transmitido ( $I_o$ ), da espessura ( $x$ ) do material e do ângulo de incidência do feixe  $I_i$  ( $\theta_0$ ). Este parâmetro pode ser calculado através da equação 7:

$$I_i = I_o \cdot e^{-\mu_{(E_0)} \cdot x / \sin \theta_0} \quad (7)$$

Sendo  $\theta_0$  igual a  $90^\circ$ , tem-se:

$$\mu_{(E_0)} = -\frac{1}{x} \ln \frac{I_i}{I_o} \quad (8)$$

O coeficiente de atenuação linear também depende do estado físico do meio material. Para eliminarmos esta dependência, outro parâmetro pode ser definido através da razão do coeficiente de atenuação linear e da densidade do meio material. Essa grandeza é chamada de coeficiente de atenuação em massa.

O coeficiente de atenuação em massa é um parâmetro fundamental no estudo da interação da radiação com a matéria. Ele fornece a medida da fração da intensidade de radiação dispersada ou absorvida pela matéria através dos diversos tipos de interação.

A partir do estudo de como a radiação interage com um dado material, se torna possível a determinação do coeficiente de atenuação daquele material. A determinação desse coeficiente para amostras de tecidos biológicos gera um novo parâmetro de comparação entre amostras.

Esse parâmetro foi calculado anteriormente na literatura, para amostras biológicas, utilizando LEXRF (MANTUANO *et al.*, 2016). Neste trabalho o autor calcula os coeficientes de atenuação para análise de alterações em tecidos cardíacos após o tratamento de quimioterapia e radioterapia.

### ***CAPÍTULO III***

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Protocolo experimental**

#### **3.1.1. Animais**

Para a realização deste trabalho dezoito ratos *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar-SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*), e seis ratos *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar-Kyoto, inicialmente com idade aproximada de dois meses e pesando entre 220 e 240 gramas, foram mantidos no biotério do Laboratório de Ciências Radiológicas (LCR) localizado na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes internacionais de proteção animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Processo CEA/018/2018).

Os animais permaneceram em gaiolas de plástico apropriadas (três ratos por gaiola), contendo serragem, e receberam uma alimentação normal com água potável e ração (Nuvilab ® CR1) *ad libitum*. Durante todo o procedimento, os animais foram submetidos a ciclos de luminosidade (ciclo 12 horas dia/12 horas noite) e temperatura (22°C) controlada. Os ratos foram divididos em quatro grupos, de forma randômica (com exceção do grupo WKY, composto por todos os ratos do tipo Kyoto utilizados durante a pesquisa), de acordo com o tratamento no qual foram submetidas, conforme pode ser observado na tabela 2. Os animais do grupo denominado WKY e SHR não foram submetidos a nenhum tratamento, sendo o grupo controle não hipertenso e controle hipertenso, respectivamente.

Tabela 2 – Distribuição dos animais, de acordo com o tratamento realizado.

<b>Grupos</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Tratamento</b>
WKY	Kyoto	6	-
SHR	SHR	6	-
SHR-L	SHR	6	Losartana potássica (25mg/kg)
SHR-O	SHR	6	Olmesartana (30mg/kg)

### 3.1.2. Aferição da pressão arterial

O controle da pressão arterial de todos os ratos utilizados no estudo foi feito por técnica indireta utilizando um pletismógrafo de cauda, obtido pelo LCR-UERJ, fabricado pela empresa Insight. Antes da primeira aferição os ratos passaram por um processo de adaptação do recipiente de contenção, o qual foi fornecido junto com o pletismógrafo, durante uma semana para minimizar o estresse e a possível variação de pressão devido ao novo estímulo.

O protocolo utilizado para a aferição da pressão dos ratos consistiu no prévio aquecimento dos ratos a uma temperatura de 32° durante 20 minutos. Para isso, os ratos foram mantidos em uma estufa com temperatura controlada durante esse tempo. Esse procedimento é necessário para que haja uma vasodilatação na cauda do rato e assim, torna-se possível a medição da pressão arterial. Posteriormente os ratos foram colocados no recipiente de contenção para sua imobilização e então foi realizada a aferição da pressão arterial como mostra a Figura 16.

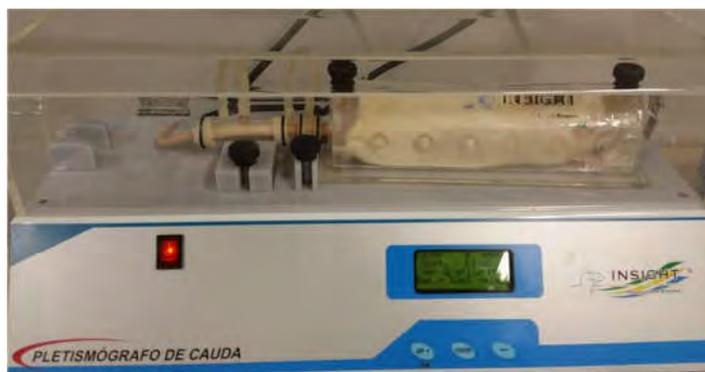


Figura 16 – Aferição da pressão arterial utilizando o pletismógrafo de cauda Insight.

Esse procedimento foi realizado pela primeira vez quando os ratos tinham 10 semanas de idade e então uma vez por semana durante todo o estudo.

A Figura 17 mostra a interface do programa de utilização do pletismógrafo que permite a aquisição das pressões arteriais.

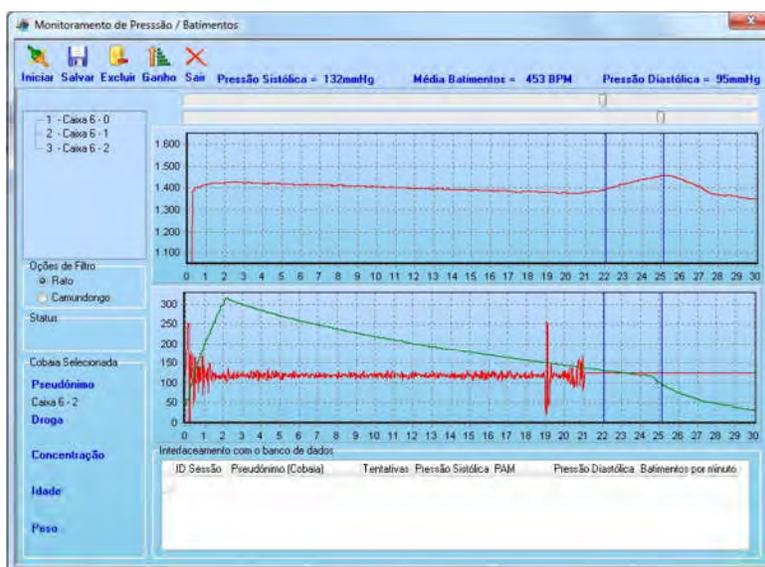


Figura 17 – Interface do programa para aferição da pressão arterial.

### 3.1.3. Administração dos anti-hipertensivos

Para a administração dos medicamentos foi utilizada uma técnica alternativa à tradicional gavagem (ATCHA, *et al.*, 2010). Esta técnica consiste em treinar os animais a tomarem o medicamento espontaneamente utilizando uma seringa e como veículo,

água com 10% de sacarose. Visto que este trabalho tem o objetivo de estudar ratos hipertensos, esse método foi adotado a fim de reduzir os efeitos adversos como o sofrimento devido à restrição física e ao estresse associado ao procedimento de gavagem em ratos.

Todos os medicamentos foram preparados frescos a cada dia experimental em uma solução de sacarose a 10% para disfarçar qualquer sabor aversivo das drogas. Cada rato ingeriu 1 ml de solução (água + 10% sacarose + dose de medicamento) por dia de tratamento. A Figura 18 mostra um animal recebendo sua dose diária de anti-hipertensivo pelo método descrito.



Figura 18 – Administração dos anti-hipertensivos.

#### 3.1.4. Eutanásia dos animais

Um dia após do término do tratamento, os animais (com aproximadamente cinco meses de idade) foram anestesiados com xilasina e ketamina (2mg/kg e 40mg/kg, IM), e submetidos à eutanásia para a retirada dos tecidos.

Depois de anestesiados, a caixa torácica foi aberta para obtenção de sangue intracardíaco e posteriormente uma injeção de cloreto de potássio foi aplicada

diretamente no ventrículo esquerdo. Esse procedimento garante que todos os animais teriam parada cardíaca em diástole, como forma de padronização. Posteriormente o coração, aorta e coronária foram retirados, limpos e pesados.

### **3.2. Preparação das amostras para análise por $\mu$ XRF**

Após a eutanásia dos animais, as aortas e coronárias foram colocados em uma solução preparada de formaldeído (4% w/v) em 0,1M de tampão de fosfato, pH 7,2, durante 48 horas a temperatura ambiente, processado para microscopia ótica e então incorporado em Paraplast plus (GONZALEZ, 2005). O Paraplast é composto por uma mistura de parafina ultrapura e diversos polímeros. Esse material possui um maior grau de elasticidade quando comparado à parafina normal, permitindo cortes limpos e minimizando as rugas em amostras de tecidos. O paraplast representa um avanço técnico e é recomendado para rotina e trabalhos de pesquisa utilizando tanto tecidos humanos quanto de animais. O paraplast plus, por conter sulfóxido de dimetilo, possui uma rápida penetração no material, reduzindo o tempo de processamento do tecido. (CULLING, 2013)

A aorta e a coronária de cada animal foram incluídas em um único bloco de Paraplast plus. Foram feitos cortes de 5  $\mu$ m de espessura de cada bloco utilizando um micrótomo e então, colocados sobre um filme Ultralene no Laboratório de Imunofarmacologia-IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

### **3.3. Instrumentação (TwinMic)**

A linha TwinMic faz parte de um anel de luz sincrotron de terceira geração de (KAULICH *et al.*, 2006). Esta linha de trabalho destina-se à análise da composição química multielementar em uma faixa de baixa energia (400–2200 eV) (GIANONCELLI *et al.*, 2013), como foi descrito no 2.11 deste trabalho. Os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos durante a execução do projeto 20165187.

Após as amostras serem cortadas e postas sobre o ultralene, como relatado na sessão 3.2, os filmes contendo as amostras foram montados em um suporte próprio para realização das medidas na TwinMic. Um exemplo desse suporte é apresentado na Figura 19.



Figura 19 – Foto do porta amostra utilizado na TwinMic.

Após a análise das possíveis regiões de interesse previamente identificadas por um microscópio óptico, imagens rápidas de absorção foram feitas nas amostras para identificar e localizar as regiões de interesse para realização das medidas de LEXRF. Para aquisição dessas imagens foi utilizada matrizes de 80 x 80 pixels com uma resolução espacial de 1 $\mu$ m x 1 $\mu$ m com tempo de aquisição de 20 ms por pixel.

A Figura 20 mostra uma montagem com as de imagens prévias de absorção feitas para a identificação e marcação de coordenadas dos ROIs para as medidas de LEXRF. As matrizes representadas nas figuras exemplificam as regiões de interesse escolhidas para a realização das medidas e construção dos mapas de LEXRF e absorção.

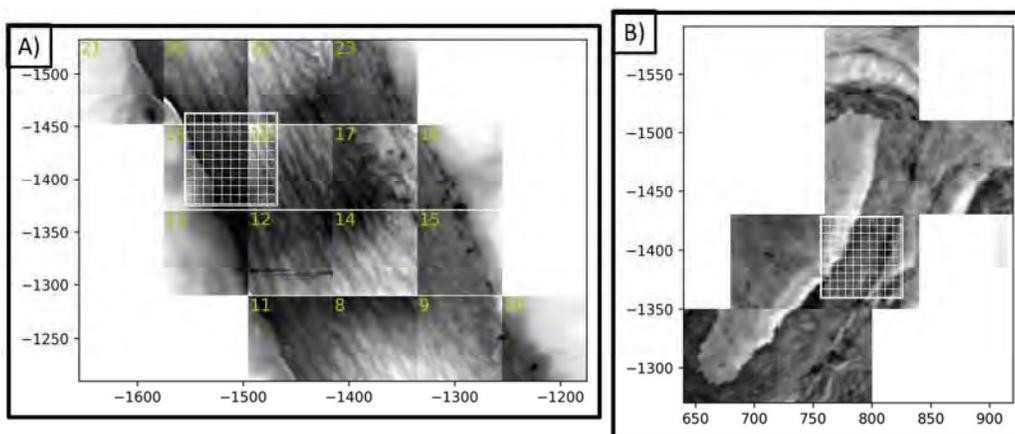


Figura 20 – Mosaico feito a partir das imagens de absorção obtidas na TwinMic da A) aorta e B) coronária para localização das coordenadas dos ROIs de interesse para medidas de LEXRF.

Foi utilizado um feixe monocromático com uma energia incidente efetiva de 1,49 keV para a obtenção dos mapas de LEXRF e de absorção. Esta energia foi calculada previamente pelo software dedicado da linha TwinMic.

O tempo de exposição por pixel utilizado foi de 12 segundos com um campo total variando de acordo com a amostra. O campo máximo utilizado foi de 80 x 80  $\mu\text{m}^2$  para os mapas de LEXRF, com resolução espacial de 1,2  $\mu\text{m}$ . Simultaneamente, a intensidade transmitida foi medida pela câmara CCD de rápida aquisição para obtenção dos mapas de absorção, com um tempo de exposição de 20 ms.

A Figura 21 mostra o software dedicado da linha TwinMic durante a medida de uma aorta de um rato SHR. A partir desse software é possível posicionar e controlar a amostra e também iniciar ou pausar a medida. Durante a realização das medidas o software apresenta os espectros gerados a partir de cada detector. Cada cor representa o espectro referente a um detector. Foram analisados elementos leves como: C, N, O, Na, Mg (linha K) e Fe, Cu e Zn (linha L).

Os mapas de fluorescência, absorção e contraste de fase pixel a pixel em tempo real são também fornecidos.

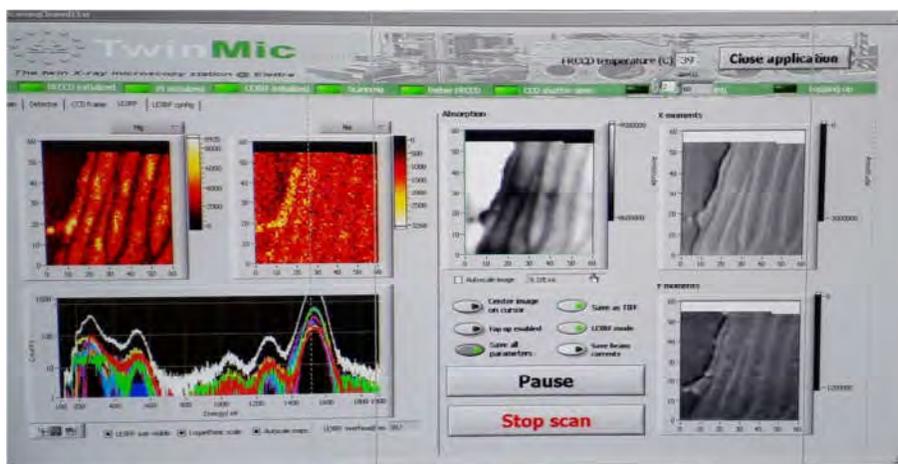


Figura 21 - Software dedicado de aquisição de imagem de fluorescência, absorção e contraste de fase utilizado na TwinMic.

Os espectros gerados pelos oito detectores são somados pelo próprio software da linha. O espectro soma é gerado para cada pixel possibilitando a formação um mapa de

distribuição elementar. Para o ajuste dos espectros dos raios X característicos, determinação dos elementos e suas respectivas intensidades fluorescentes foi utilizado o software PyMca<sup>®</sup>.

O PyMca<sup>®</sup> foi desenvolvido pelo grupo de softwares do “European Synchrotron Radiation Facility” (ESRF), o laboratório de luz síncrotron localizado em Grenoble, na França. O software é capaz de resolver a maioria das necessidades relacionadas à espectroscopia de fluorescência de raios X. O programa permite o processamento interativo e em lote de grandes conjuntos de dados e é distribuído gratuitamente para aplicações não comerciais. Sua política de código aberto também o torna uma valiosa ferramenta de pesquisa. (SOLÉ *et al.*, 2007).

Para a análise dos espectros utilizando o PyMca são necessários arquivos de calibração, que relacionam os canais do detector com a energia, e arquivos de configuração, que traz informações sobre energia do feixe incidente, filtros utilizados e elementos presentes no espectro. Um manual com o passo a passo para obtenção desses arquivos e completa análise do conjunto de espectros pode ser encontrado em Pickler (2015).

A Figura 22 mostra a interface do software com o *fit* de um espectro de uma amostra de coronária. É possível observar, com destaque, os elementos O, Na, Mg e o pico Compton.

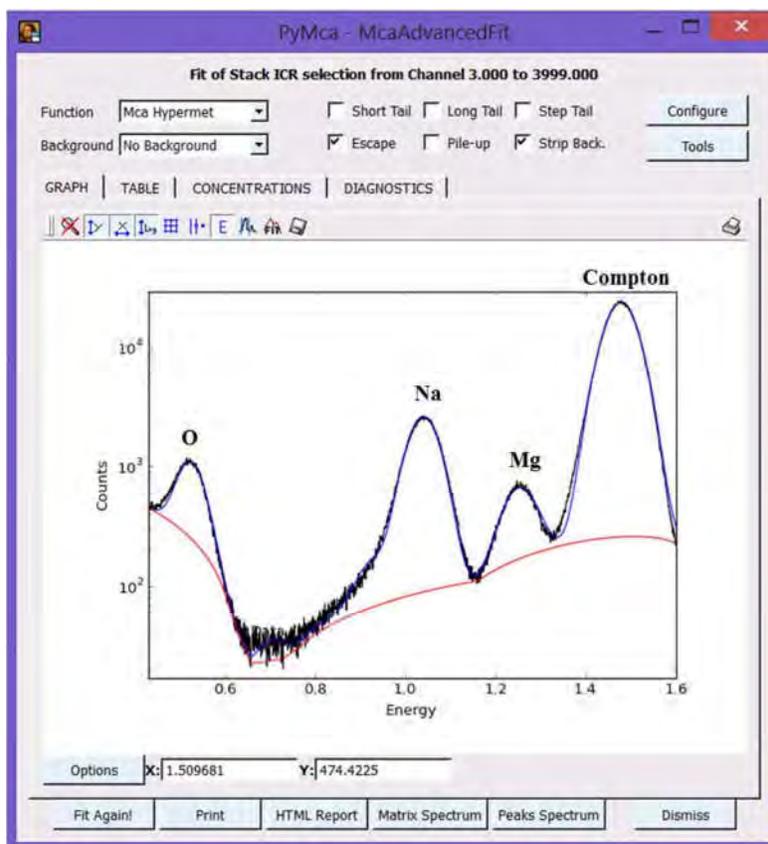


Figura 22 – Exemplo do espectro de uma amostra de coronária analisado com o software PyMca<sup>®</sup>.

Após o processamento dos espectros referentes a cada amostra é gerado um arquivo de saída *.dat* com as intensidades elementares em cada pixel do mapa.

Todas as intensidades elementares foram normalizadas pela intensidade do pico Compton. O espalhamento Compton foi utilizado como um padrão interno para compensar as diferenças na espessura e densidade nas seções finas de tecido e também possíveis flutuações do feixe. Desta forma, foi possível a análise semiquantitativa entre os diferentes grupos.

### **3.4. Ensaios histológicos**

Cortes sequenciais das amostras emblocadas conforme descrito no item 3.2 foram feitos para análise histológica das artérias. Foram montadas laminas com cortes de 5µm de espessura para cada bloco. Na espessura em que são feitos os cortes histológicos, a maioria dos tecidos apresentam-se incolores. A coloração é uma etapa importante para o estudo de células e tecidos, pois permite a visualização e identificação mais precisa das diferentes estruturas. As laminas contendo cortes de aortas e coronárias foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para possibilitar a quantificação dos parâmetros estruturais das artérias.

A coloração HE é amplamente utilizada em ensaios histológicos por serem adequados para evidenciar características estruturais. A hematoxilina é um corante básico que cora o núcleo das células e regiões do citoplasma que sejam ricas em retículo endoplasmático rugoso em uma tonalidade azul-arroxeadada. A eosina é um corante ácido que cora outras regiões citoplasmáticas, além de vários componentes extracelulares, em tonalidade vermelho-rosada. Quando corantes ácidos são utilizados juntamente com corantes básicos como a hematoxilina, coram o citoplasma, filamentos citoplasmáticos e fibras extracelulares. (CAPUTO *et al.*, 2009)

As imagens digitais das laminas histológicas coradas com HE foram adquiridas usando a câmera microscópica de alta resolução Zeiss AXIOCAM HRc (Jena, Alemanha), acoplada ao microscópio Zeiss AXIO SCOPE A.1 (Jena, Alemanha), de forma a permitir a análise morfológica das artérias.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos pelas medidas de LEXRF para as amostras de coronária e aorta de ratos para os grupos: WKY, SHR, SHR+L, SHR+O. A metodologia de tratamento de cada grupo e preparação de amostras utilizadas encontra-se descrita no capítulo 3 deste trabalho.

O teste utilizado para todas as análises estatísticas deste trabalho foi o *one-way* ANOVA (análise de variância com um fator) com o teste *post-hoc* Tukey (MCDONALD, 2009).

#### 4.1. Resultados de pressão arterial e frequência cardíaca

A aferição da pressão arterial de todos os ratos utilizados neste estudo foi realizada uma vez por semana, desde a 10ª semana de vida dos animais até o final do experimento, como descrito no item 3.1.2. A Figura 23 mostra a variação média da pressão arterial dos animais de todos os grupos estudados durante todo o experimento.

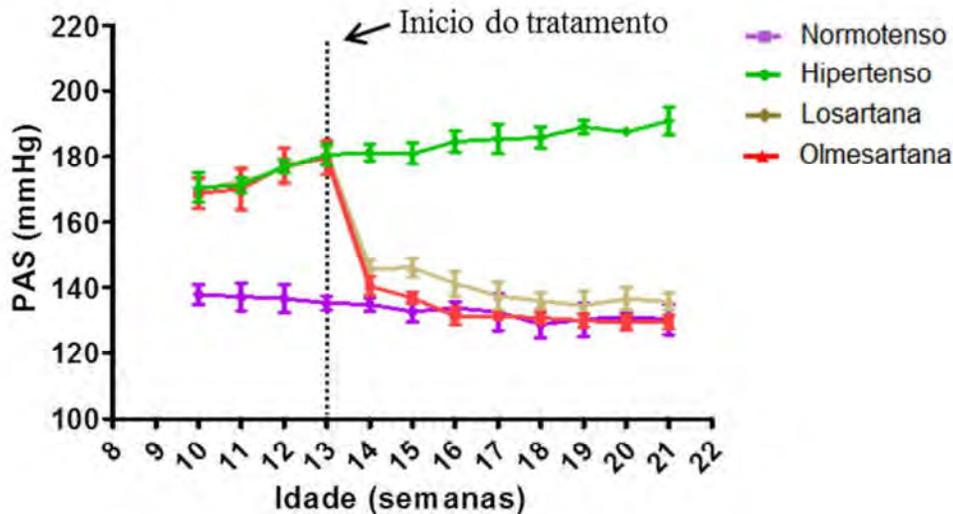


Figura 23 – Pressão arterial sistólica (mmHg) dos grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O de acordo com a idade em semanas.

O acompanhamento da pressão arterial demonstrou o efeito dos medicamentos, losartana potássica e olmesartana, já na primeira semana de uso contínuo. Foi possível

verificar uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) da pressão dos grupos WKY, SHR+L e SHR+O em relação ao grupo de animais hipertensos não tratados SHR. Contudo, o grupo tratado com a losartana potássica não apresentou resultados que se assemelhavam ao grupo WKY, o qual representaria uma pressão normal esperada para ratos. Foi encontrada uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo SHR+L e o grupo WKY. A maior eficácia da olmesartana em relação à losartana na diminuição da pressão arterial foi previamente verificada na literatura (RIBEIRO & FLORÊNCIO, 2007).

O software de aquisição para aferição da pressão arterial fornece simultaneamente informações sobre a frequência cardíaca. A Figura 24 mostra a variação média da frequência cardíaca dos animais de todos os grupos estudados durante todo o experimento.

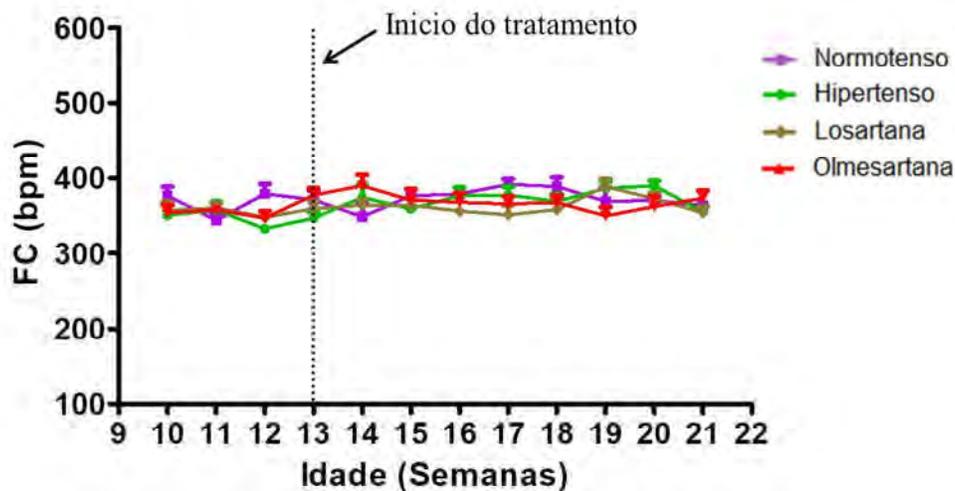


Figura 24 – Frequência cardíaca (batimentos por minuto) dos grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O de acordo com a idade em semanas.

Não houve variação significativa ( $p > 0,05$ ) da frequência cardíaca dos animais em nenhum dos grupos estudados. Isto é, nenhuma variação da frequência cardíaca foi constatada devido à hipertensão ou pelo efeito de algum dos medicamentos. Levando em consideração a média das frequências cardíacas por grupo de estudo, durante todas as semanas do experimento, a frequência máxima foi de 391 bpm enquanto a frequência mínima foi de 333 bpm.

O peso dos animais foi mensurado na primeira semana de experimento e posteriormente a cada duas semanas. Esse processo foi executado a fim de verificar algum aumento ou diminuição anormal de peso dos ratos devido ao uso do medicamento e também para o ajuste da dose dos mesmos de acordo com o crescimento dos ratos. Não foi verificada nenhuma variação de peso nos animais devido ao uso de medicamentos. Foi constatado somente um aumento normal de peso devido ao aumento da idade. Além disso, foi observado que os ratos da linhagem Kyoto são naturalmente mais pesados que os ratos da linhagem SHR.

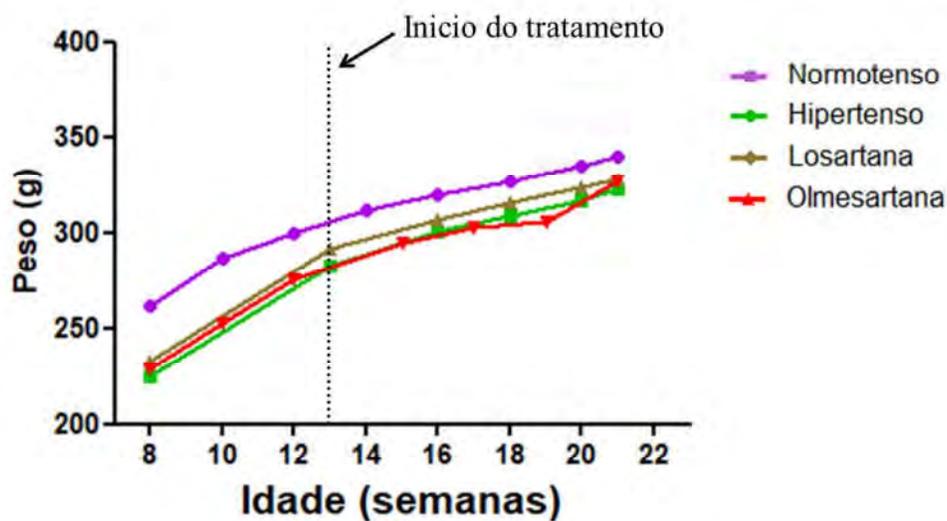


Figura 25 – Peso (em gramas) dos grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O de acordo com a idade em semanas.

#### 4.2. Aorta

Como descrito no item 2.2.1 a aorta é a maior e mais importante artéria do sistema circulatório do corpo humano. Dela se derivam quase todas as outras artérias do organismo, com exceção da artéria pulmonar. Ela possui paredes muito elásticas, que se distendem com a sístole e impulsionam secundariamente o sangue para as outras artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veias. É a elasticidade desses vasos que mantém a pressão sistólica em níveis normais. Sendo assim, a rigidez desses vasos condiciona o aumento da pressão sistólica, levando à hipertensão. São artérias de condução, de

grande calibre, formadas por fibras elásticas e musculares, com predomínio das fibras elásticas.

#### 4.2.1. Análise histológica

A Figura 26 mostra imagens obtidas por microscopia óptica das laminas coradas com HE de aortas representativas de cada grupo de estudo, WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. Através de imagens obtidas por microscopia ótica das laminas histológicas coradas com HE, se torna possível o estudo de parâmetros como, por exemplo: largura da túnica média e diâmetro do lúmen (luz da artéria).

Foram feitas imagens das lâminas das aortas de todos os ratos estudados. A partir dessas imagens, foi medida a largura da camada média (média de 10 medidas para cada aorta), o diâmetro do lúmen (média de 8 medidas para cada aorta), e posteriormente foi possível calcular a razão largura da túnica média pelo diâmetro do lúmen (M/L). O parâmetro M/L é um dos parâmetros mais utilizados para comparação de artérias de médio e pequeno calibre. (SCHIFFRIN *et al.*, 2000).

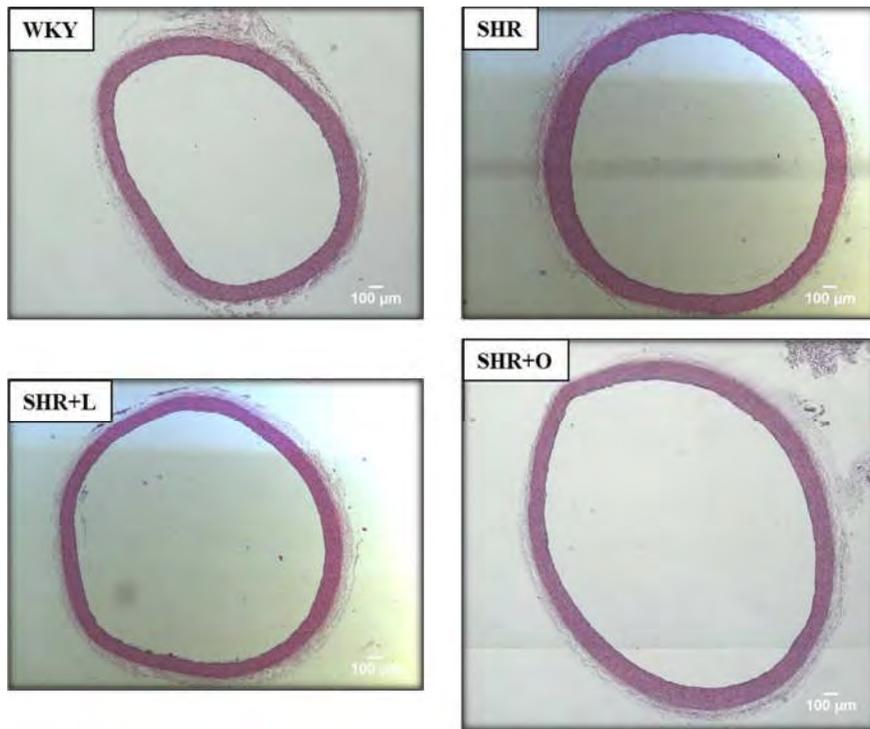


Figura 26 – Imagem obtida por microscopia óptica (objetiva de 5x) de aortas típicas dos grupos WKY, SHR, SHR+L, SHR+O coradas utilizando a técnica de hematoxilina-eosina.

A tabela 3 mostra os valores obtidos da largura da camada média, do diâmetro do lúmen e a razão M/L para as aortas dos grupos WKY, SHR, SHR+L, SHR+O. Nenhuma diferença na largura da túnica média foi observada em nenhum dos grupos estudados. Entretanto, foi observado um aumento no diâmetro do lúmen e uma diminuição da razão M/L nos dois grupos tratados com anti-hipertensivos quando comparados aos grupos WKY e SHR.

Tabela 3 – Valores médios  $\pm$  erro padrão da espessura da túnica média ( $\mu\text{m}$ ), diâmetro do lúmen ( $\mu\text{m}$ ) e razão média/lúmen (M/L) para artérias aortas dos ratos dos grupos WKY, SHR, SHR + L e SHR + O.

	WKY	SHR	SHR+L	SHR+O
<b>Espessura da camada média (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	122,3 $\pm$ 2,8	125,6 $\pm$ 4,9	115,4 $\pm$ 11,99	132,1 $\pm$ 3,9
<b>Diâmetro da luz (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	1566 $\pm$ 28,8	1715 $\pm$ 61,9	1820 $\pm$ 58,2*	2023 $\pm$ 25,5*†
<b>M/L</b>	0,075 $\pm$ 0,001	0,074 $\pm$ 0,003	0,060 $\pm$ 0,003*†	0,065 $\pm$ 0,001*

\* p < 0.05 vs WKY; † p < 0.05 vs SHR ; ‡ p < 0.05 vs SHR+L

Com a análise da razão M/L, é possível entender como ocorre o remodelamento das artérias devido à hipertensão e como os mesmos são afetados por algum tipo de tratamento. Schiffrin e coautores mostraram que os vasos de resistência exibiram significativamente maior espessura média e M/L em pacientes hipertensos do que em indivíduos normotensos. (SCHIFFRIN *et al.*, 2000).

Para artérias de grande calibre, como a artéria aorta, pouco se tem na literatura sobre a razão M/L. Neste trabalho não foi encontrada diferença significativa entre a razão M/L entre os grupos normotensos e hipertensos. Entretanto, apesar da diminuição desse parâmetro devido ao uso dos BRAs não indicar um remodelamento da aorta devido à hipertensão, é verificada a necessidade de outros estudos acerca desse assunto para elucidar o tipo de remodelamento causado pelos anti-hipertensivos na aorta.

Em uma das lâminas contendo cortes da aorta de um rato do grupo SHR foi verificada a formação de um ateroma (Figura 27). As placas de ateroma são manifestações da aterosclerose, doença inflamatória crônica e progressiva que acomete artérias de calibre grande e intermediário. O ateroma é depósito lipídico na superfície interna das paredes das artérias. Isto é, a placa de ateroma é formada por depósitos de gordura, principalmente de colesterol, na camada íntima da artéria e que tem sua formação iniciada por injúrias no endotélio decorrentes dos fatores de risco, como por exemplo, a hipertensão. A placa ateromatosa cresce lentamente, diminuindo o fluxo sanguíneo até bloquear completamente a artéria causando efeitos como infarto ou AVC.

Não foi verificada a presença de ateroma em nenhuma outra artéria de nenhum outro grupo estudado.

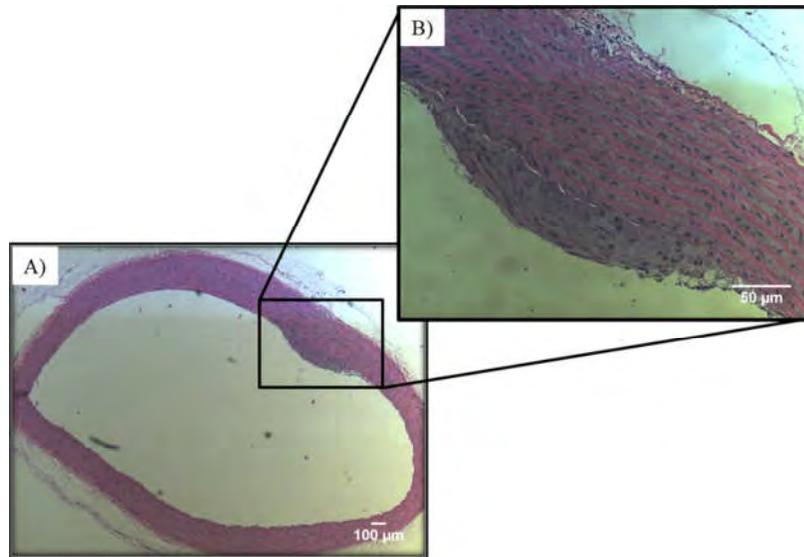


Figura 27 – Aorta do grupo SHR com a presença de ateroma. A) Aumento de 5x e B) aumento de 20x.

#### 4.2.2. Resultados TwinMic

Além das imagens de fluorescência de raios X a TwinMic possibilita, simultaneamente, a obtenção dos mapas de absorção através da medida dos raios X transmitidos por uma câmara CCD de rápida aquisição. Além disso, o software de aquisição da linha também proporciona imagens de contraste de fase da amostra, através de algoritmos matemáticos.

As imagens de absorção e de contraste de fase são utilizadas para identificar a morfologia da estrutura dos tecidos. Imagens de absorção são sensíveis à densidade do tecido, ou seja, quanto mais denso o tecido mais escuro aparecerá na imagem. Já a imagem de contraste de fase está correlacionada com a topografia do tecido, sendo mais sensível às descontinuidades na amostra, como por exemplo, bordas, buracos e protuberâncias.

As aortas dos ratos apresentam largura consideravelmente grande (mais de 100μm). Por limitações do sistema, tempo e área disponível para realização das medidas, não foi possível a varredura de toda a extensão da aorta. Por esse motivo as

medidas de LEXRF foram realizadas na região da íntima e média da aorta, preferenciando assim, regiões de maior contato com a corrente sanguínea. Essa região foi escolhida por ser uma região de maior probabilidade de alterações causadas tanto pela hipertensão quanto pelo uso dos medicamentos. Por esta razão, as imagens apresentadas contém uma parte da camada média, a camada íntima e uma parte da luz da aorta. Todas as intensidades elementares apresentadas neste trabalho foram corrigidas pela intensidade do pico Compton, como descrito no item 3.3. Após testes realizados, as intensidades corrigidas foram multiplicadas por um fator de  $10^5$ , possibilitando uma melhor visualização das imagens pelo software ImageJ.

A Figura 28 mostra os mapas de absorção, contraste de fase e de intensidade corrigida dos elementos O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn, para uma aorta representativa de um rato do grupo WKY.

Pode-se notar na Figura 28-Abs que, na aorta, existem regiões de maiores e menores densidades. Essas regiões podem ser bem distinguidas pelos tons mais escuros e mais claros, respectivamente. As áreas que apresentam uma maior absorção correspondem também às áreas que apresentam uma maior protuberância na amostra (Figura 28-PhC). Nessas áreas estão localizadas as fibras elásticas da aorta. Nessas fibras aparecem em maior intensidade os elementos O e Fe.

Os elementos Na, Mg, Cu e Zn (Figura 28) exibem a mesma localização preferencial. A localização desses elementos é oposta a maior intensidade de O e Fe, estando preferencialmente localizadas nas áreas menos densas da aorta, ou seja, nas fibras musculares. Tanto o Na quanto o Cu apresentam uma distribuição mais homogênea nas áreas nas quais estão localizados.

Além de estar presente nas fibras musculares, o Mg se apresenta também em áreas de maior intensidade bem definidas. Essas áreas são os núcleos das células das fibras musculares presentes na camada média e as células endoteliais presentes na íntima.

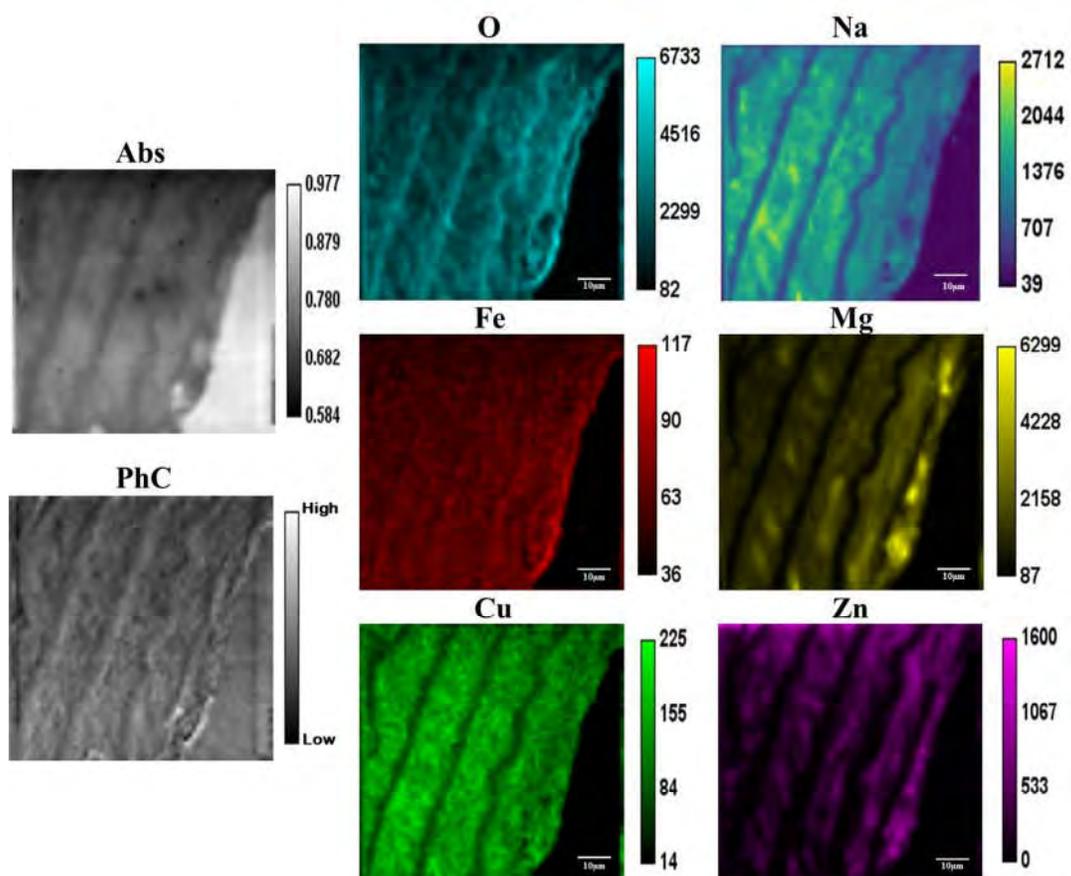


Figura 28 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de aorta típica do grupo WKY, adquiridos em uma região de 76,8  $\mu\text{m}$  x 79,2  $\mu\text{m}$ .

A Figura 29 mostra os mapas de absorção, contraste de fase e de intensidade corrigida dos elementos O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn, para uma aorta representativa de um rato do grupo SHR.

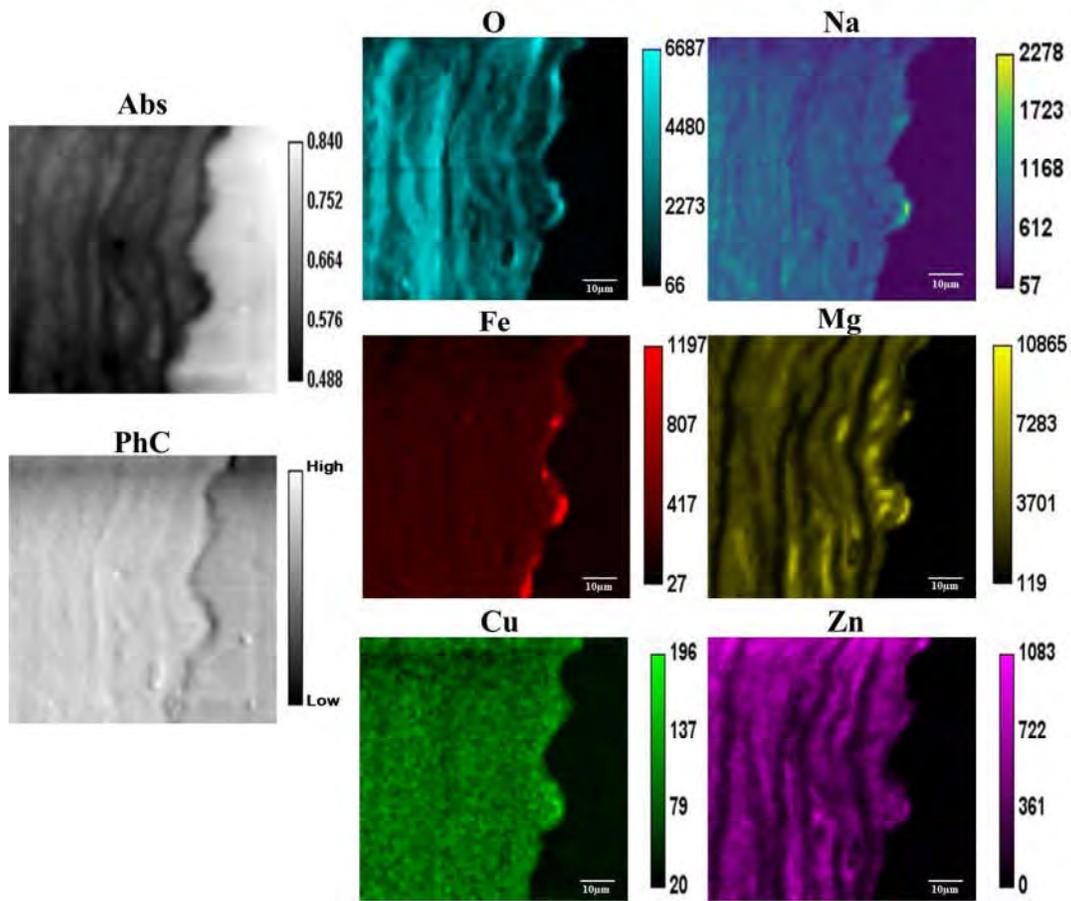


Figura 29 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de aorta típica do grupo SHR, adquiridos em uma região de  $76,8 \mu\text{m} \times 78 \mu\text{m}$ .

O mapa de absorção na aorta do grupo SHR mostrou áreas de maior densidade na íntima da aorta. Esse aumento de densidade pôde ser comprovado pelo aumento de Fe nessa região. Na Figura 29-PhC pode-se observar um maior destaque também na região da íntima. Comparando as imagens de contraste de fase do grupo WKY (Figura 28-PhC) e do grupo SHR (Figura 29-PhC), nota-se uma maior homogeneidade entre as regiões de maior e menor densidade no grupo SHR. Isto é, pouca definição entre as fibras elásticas e musculares. Esta maior homogeneidade nas amostras do grupo SHR pôde ser verificada também pelos mapas de Na, Cu e Zn, nos quais a localização bem definida desses elementos apresentada pelo grupo WKY se perde.

Estudos anteriores mostraram que os depósitos de Fe foram observados nas lesões ateroscleróticas de pacientes (LEE *et al.*, 1998) e animais experimentais (MAKJANIC *et al.*, 1999). Pallon e co-autores (1995) relataram que microcalcificações podem coincidir com pontos de alta concentração de Fe, em particular em áreas próximas à lâmina elástica interna da camada vascular. Outro estudo mostrou que concentrações locais elevadas de Fe presentes em lesões precoces podem acarretar em um processo acelerado de aterogênese em regiões específicas da parede da artéria (MERTZ, 1981). Desta forma, a alta concentração de Fe localizada em pontos específicos da parede aórtica dos ratos SHR pode indicar lesões ateroscleróticas causadas pela hipertensão.

Não foi verificada nenhuma alteração na localização preferencial dos elementos O e Mg quando comparados ao grupo WKY.

A Figura 30 mostra os mapas de absorção, contraste de fase e de intensidade corrigida dos elementos O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn, para uma aorta representativa de um rato do grupo SHR+L.

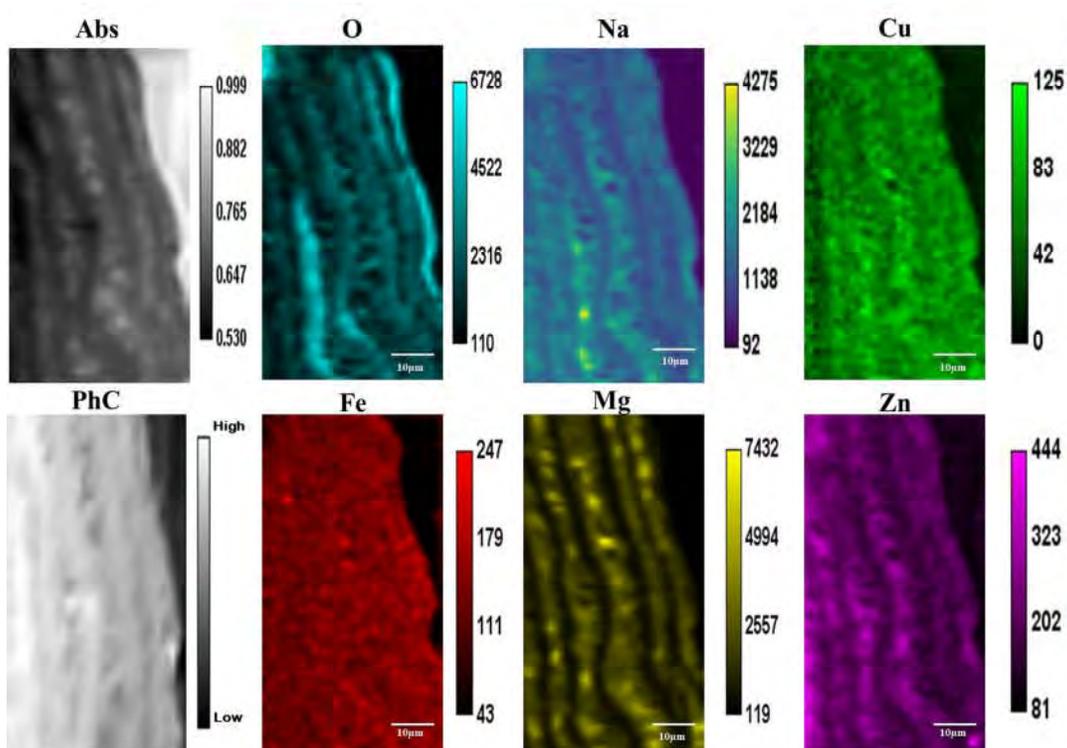


Figura 30 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de aorta típica do grupo SHR+L, adquiridos em uma região de  $42 \mu\text{m} \times 78 \mu\text{m}$ .

As aortas do grupo tratado SHR+L apresenta maior quantidade de áreas mais escuras na imagem de absorção (Figura 30-Abs). Isto demonstra que as fibras musculares das aortas tratadas com losartana possuem largura menor do que as fibras musculares do das aortas do grupo WKY. Contudo, a imagem de contraste de fase (Figura 30-PhC) demonstra uma diferenciação maior entre as fibras elásticas e musculares quando comparado ao grupo SHR.

Esta característica de maior quantidade de áreas mais densas é enfatizada pelo fato de que o Fe aparece de uma forma mais homogênea na amostra, não sendo possível definir uma localização preferencial deste elemento neste grupo. Assim como o Fe, os elementos Na e Cu também se apresentaram em uma forma mais homogênea em todo o tecido, sendo a distribuição desses elementos mais semelhante ao grupo SHR do que ao grupo WKY.

Diferentemente dos grupos WKY e SHR, o Zn possui uma maior intensidade nas camadas mais internas das aortas (camada média) do grupo SHR+L. A distribuição de O e de Mg nas amostras deste grupo se mantiveram bem definidas e opostas, assim como nos grupos WKY e SHR.

A Figura 31 mostra os mapas de absorção, contraste de fase e de intensidade corrigida dos elementos O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn, para uma aorta representativa de um rato do grupo SHR+O.

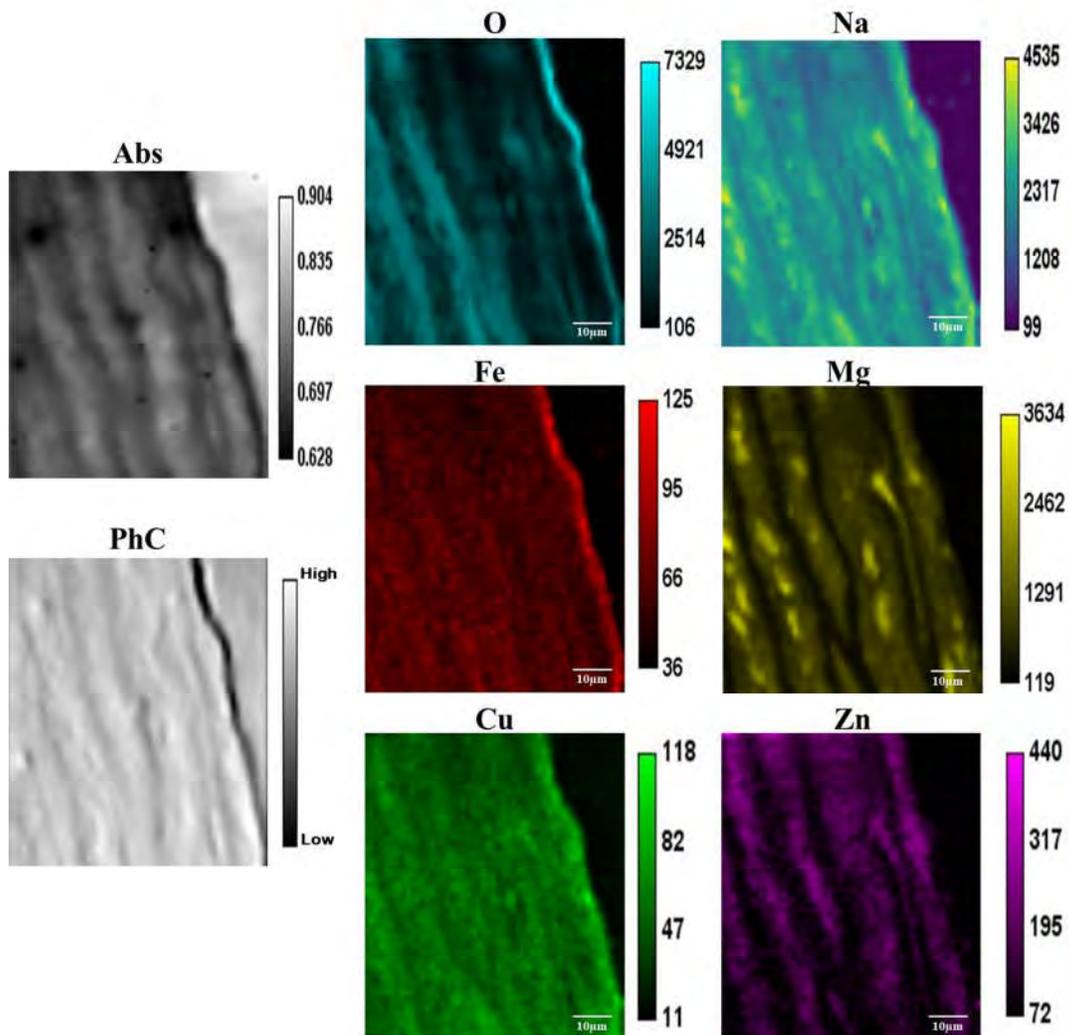


Figura 31 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de aorta típica do grupo SHR+O, adquiridos em uma região de 78 µm x 66 µm.

No mapa de absorção representativo do grupo SHR+O (Figura 31-Abs), pode-se observar regiões capazes de absorver mais radiação na íntima da aorta, assim como foi verificado no grupo SHR. O mesmo pôde ser verificado no mapa de contraste de fase, que apresenta um relevo nesta região.

Apesar de apresentar uma distribuição de Na, Fe e Cu mais homogênea do que o grupo WKY, esses elementos apareceram mais intensos na parede da aorta. Essa localização preferencial na parede também foi observada para o oxigênio. Pode-se notar também, uma maior intensidade de Na nos núcleos das células das fibras musculares da aorta. Este elemento sempre está presente no interior das células, contudo, o Na compete naturalmente com o Mg (REINHART, 1988). Desta forma, a maior evidencia de Na no interior das células pode indicar uma diminuição de Mg nessa região.

Os elementos Mg e Zn apresentam uma colocação entre si, assim como nos outros grupos estudados. Porém, apresentaram uma menor intensidade na íntima da artéria.

#### 4.2.3. Análise estatística das intensidades elementares para a aorta

Neste tópico serão apresentados os resultados das médias das intensidades elementares corrigidas obtidas das aortas para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. As médias das intensidades foram tomadas levando em consideração todo o tecido, incluindo íntima e camada média e excluindo o lúmen. Todos os valores foram dados em média com barras de erro padrão.

As médias das intensidades obtidas para o oxigênio nos grupos WKY e SHR não apresentaram diferença significativa entre si. O grupo de ratos hipertensos tratados com losartana potássica (SHR+L) demonstrou um aumento de aproximadamente 10% nos níveis de oxigênio em relação aos grupos WKY e SHR, contudo, essa diferença não foi considerada estatisticamente significativa de acordo com o teste estatístico utilizado.

No grupo SHR+O, houve uma diminuição significativa nos níveis de oxigênio de aproximadamente 30% em relação aos grupos WKY e SHR e SHR+L. O suprimento de oxigênio é fundamental para uma correta função celular, uma vez que a maioria dos processos metabólicos depende do fornecimento de ATP (molécula responsável por

armazenar energia para as atividades vitais básicas das células) que é produzido principalmente pela fosforilação oxidativa (GREENE *et al.*, 1992). Por este motivo, a falta de oxigênio no tecido pode ocasionar consequências fisiológicas e patológicas levando à lesão isquêmica e até morte celular.

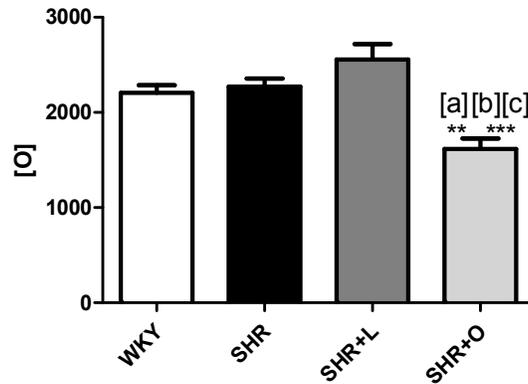


Figura 32 – Média de intensidade de Oxigênio na aorta dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. O símbolo (a) diferença em relação ao grupo WKY. O símbolo (b) diferença em relação ao grupo SHR; o símbolo (c) diferença em relação ao grupo SHR+L; o símbolo \*\* significa diferença significativa ( $p < 0,01$ ) e; o símbolo \*\*\* significa diferença significativa ( $p < 0,001$ ).

Comparando o grupo SHR com o grupo controle não hipertenso WKY foi observada uma diminuição significativa de quase 50% na intensidade de Na ( $p < 0,001$ ). Os ratos tratados tanto no grupo SHR+L quanto no grupo SHR+O não apresentaram nenhuma diferença significativa para o elemento Na quando comparado com o grupo WKY. Conseqüentemente, os dois medicamentos utilizados causaram um aumento significativo na intensidade de Na quando comparado aos ratos hipertensos que não tomaram nenhum medicamento.

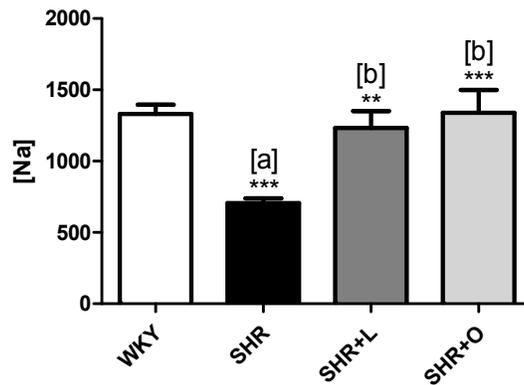


Figura 33 – Média de intensidade de Sódio na aorta dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. O símbolo (a) diferença em relação ao grupo WKY. O símbolo (b) diferença em relação ao grupo SHR; o símbolo \*\* significa diferença significativa ( $p < 0,01$ ) e; o símbolo \*\*\* significa diferença significativa ( $p < 0,001$ ).

Os resultados para o Mg mostraram um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de aproximadamente 44% do grupo SHR quando comparado ao grupo WKY. A quantidade de Mg no grupo SHR+L foi comparável ao grupo WKY e teve uma variação de menos 33% em relação ao grupo SHR.

Os animais do grupo tratado com olmesartana (SHR+O) apresentaram a menor quantidade de Mg de todos os grupos estudados. Uma diferença de menos 47% em relação aos grupos WKY e SHR+L ( $p < 0,001$ ) e uma diferença de menos 63% em relação ao grupo SHR ( $p < 0,001$ ). Estudos anteriores mostram que a deficiência de Mg pode agravar ou até mesmo causar lesões arteriais. (SONTIA, & TOUYZ, 2007; UESHIMA, 2005)

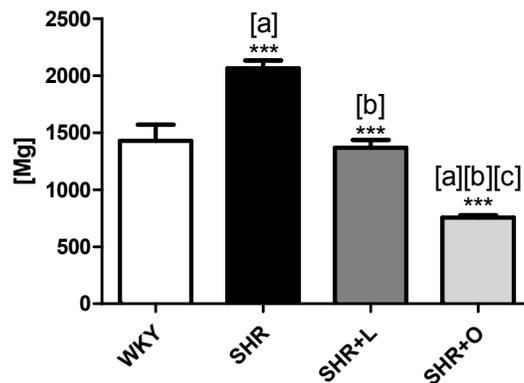


Figura 34 – Média de intensidade de Magnésio na aorta dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. O símbolo (a) diferença em relação ao grupo WKY. O símbolo (b) diferença em relação ao grupo SHR; o símbolo (c) diferença em relação ao grupo SHR+L e; o símbolo \*\*\* significa diferença significativa ( $p < 0,001$ ).

Os grupos controle normotenso e hipertenso (WKY e SHR, respectivamente) não apresentaram variação significativa ( $p > 0,05$ ) da quantidade de Fe entre eles. O grupo SHR+L mostrou uma menor quantidade, aproximadamente 15% ( $p < 0,05$ ), deste elemento na aorta dos ratos pertencentes a esse grupo em comparação ao grupo WKY. Animais do grupo SHR+O apresentaram uma diminuição significativa ainda maior (18%) do que os animais tratados com losartana em comparação aos grupos WKY e SHR.

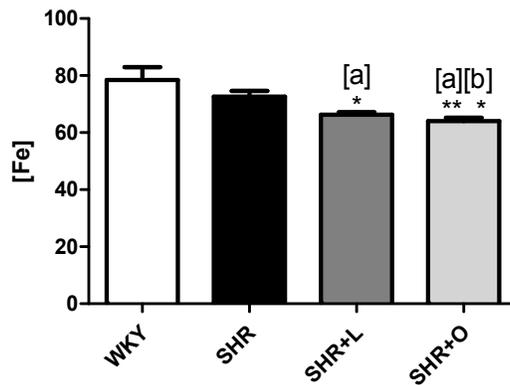


Figura 35 – Média de intensidade de Ferro na aorta dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. O símbolo (a) diferença em relação ao grupo WKY. O símbolo (b) diferença em relação ao grupo SHR; o símbolo \* significa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e; o símbolo \*\* significa diferença significativa ( $p < 0,01$ ).

Sendo o grupo WKY um grupo de animais normotensos e não tratados com nenhum medicamento, as intensidades obtidas para esse grupo são as quantidades elementares esperadas para aorta de animais saudáveis. Como mostra o gráfico da Figura 36, todos os grupos apresentaram uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ), entre 39 e 49%, de Cu em relação ao grupo WKY.

Comparando o efeito dos medicamentos sobre os níveis de Cu na aorta com os animais do grupo SHR pode-se observar também uma diminuição desse elemento para os dois grupos, em torno de 14% para o grupo SHR+L e aproximadamente 16% para o grupo SHR+O.

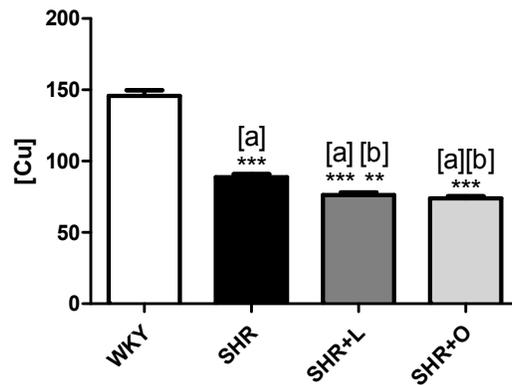


Figura 36 – Média de intensidade de Cobre na aorta dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. O símbolo (a) diferença em relação ao grupo WKY; o símbolo (b) diferença em relação ao grupo SHR; o símbolo \*\* significa diferença significativa ( $p < 0,01$ ) e; o símbolo \*\*\* significa diferença significativa ( $p < 0,001$ ).

A Figura 37 mostra as médias das intensidades de Zn obtidas para todos os grupos analisados. Apesar de haver variações nas médias de Zn comparando os grupos estudados, nenhuma variação foi considerada significativa de acordo com o teste estatístico utilizado.

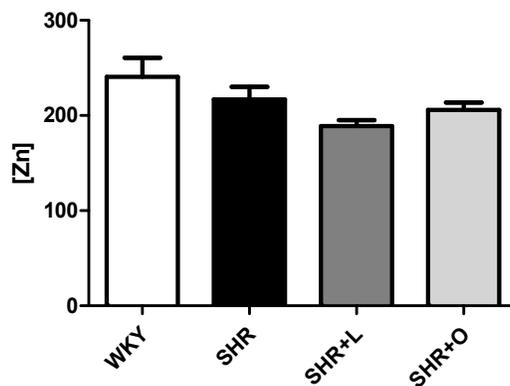


Figura 37 – Média de intensidade de Zinco na aorta dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.

O desequilíbrio de alguns desses elementos são reconhecidos na literatura por estarem diretamente envolvidos na etiologia da hipertensão. Canatan e colaboradores

mostraram que a relação Zn/Cu é significativamente menor no plasma de pacientes hipertensos em comparação com os controles (CANATAN *et al.*, 2004). Fenz e coautores verificaram alterações na relação Cu/Fe devido a pré-eclâmpsia (FENZL *et al.*, 2013), enquanto a elevação na relação Mg/Na pode indicar calcificação. (PASCOLO *et al.*, 2014)

A Figura 38 apresenta os resultados das razões Zn/Cu, Cu/Fe e Mg/Na para as aortas dos diferentes grupos estudados. A razão Zn/Cu teve um aumento em relação ao grupo normotenso em todos os grupos de ratos hipertensos, tratados ou não. Entretanto, somente para o grupo SHR+O esse aumento foi considerado significativo. Por outro lado, a Cu/Fe foi significativamente menor ( $p < 0,001$ ) em todos os grupos quando comparados ao grupo WKY. O desbalanceamento destes elementos se dá, principalmente, devido à diminuição de Cu nas aortas dos grupos SHR, SHR+L e SHR+O.

O desequilíbrio entre Mg e Na nas aortas causado pela hipertensão foi evidenciado pela comparação entre a razão Mg/Na nos grupos SHR e WKY. O aumento dessa razão pode indicar o acúmulo de cálcio nessas artérias. (PASCOLO *et al.*, 2014) Ambos os medicamentos foram capazes de normalizar a relação Mg/Na na aorta dos ratos hipertensos.

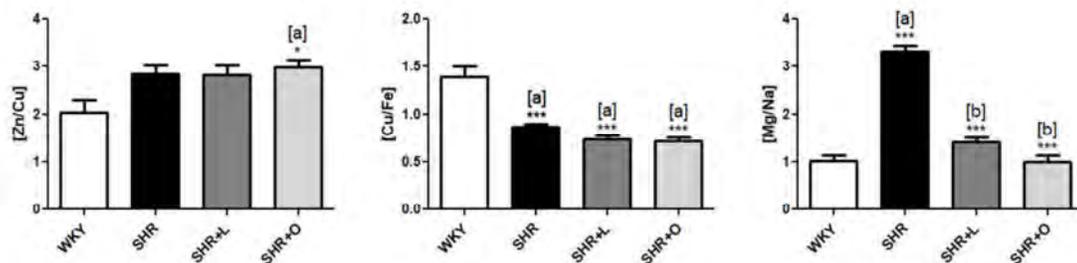


Figura 38 – Razões Zn/Cu, Cu/Fe e Mg/Na para as aortas dos grupos WKY, SHR, SHR+L, SHR+O. O símbolo (a) significa diferença em relação ao grupo WKY; o símbolo (b) significa diferença em relação ao grupo SHR; em relação ao grupo SHR; o símbolo \* significa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e; o símbolo \*\*\* significa diferença significativa ( $p < 0,001$ ).

#### 4.2.4. Coeficiente de atenuação

Através de imagens de absorção obtidas na TwinMic, os coeficientes de atenuação linear ( $\text{cm}^{-1}$ ) foram calculados pixel por pixel para todas as amostras usando a equação (8) descrita no item 2.12.

Após a eutanásia dos animais e retirada do coração, o peso do coração de cada rato foi mensurado em balança de precisão (Digipeso DP-3000, Denver Instrument AA-160). Em seguida, o volume do tecido foi calculado através do método de Scherle (1970).

As densidades medidas para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O foram respectivamente:  $1,059 \pm 0,006 \text{ g/cm}^3$ ;  $1,059 \pm 0,005 \text{ g/cm}^3$ ;  $1,072 \pm 0,008 \text{ g/cm}^3$ ; e  $1,065 \pm 0,004 \text{ g/cm}^3$ . Não houve diferença significativa entre as densidades dos tecidos nos grupos estudados.

Conhecendo os resultados de  $\mu$  obtidos a partir da medição da intensidade do feixe transmitido e a densidade dos tecidos ( $\rho$ ), foram calculados os coeficientes de atenuação da massa  $\mu_p$  ( $\text{cm}^2/\text{g}$ ). O coeficiente de atenuação de massa foi calculado dividindo os valores dos coeficientes de atenuação linear pela densidade calculada para o tecido cardíaco de cada grupo ( $\mu/\rho$ ).

A Tabela 4 apresenta os valores médios  $\pm$  erro padrão para  $\mu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) e  $\mu$  ( $\text{cm}^2/\text{g}$ ) para as aortas dos grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. Além dos valores calculados para os tecidos de cada grupo estudado, a tabela apresenta os coeficientes de atenuação linear e de massa tabelados para tecido mole de referência (soft tissue - ICRU44) e também uma combinação de tecido com parafina wax. Os dados de referência foram obtidos com o programa Xmudat.

Tendo em vista que as aortas foram emblocadas em paraplast plus, o coeficiente de atenuação calculado para os tecidos estudados diferenciaram em ordem de grandeza quando comparados ao coeficiente de atenuação do tecido de referência. Por outro lado, os resultados obtidos possuíram mesma ordem de grandeza dos valores de coeficiente de atenuação da combinação de tecido e parafina.

Tabela 4 – Média  $\pm$  erro padrão do coeficiente de atenuação linear ( $\mu$ ) e coeficiente de atenuação de massa ( $\mu_p$ ) das aortas para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.

	$\mu$ (cm <sup>-1</sup> )	$\mu_p$ (cm <sup>2</sup> /g)
<b>Tecido mole</b>	1348	1272
<b>Tecido mole + Parafina</b>	928	937
<b>WKY</b>	701 $\pm$ 36,41	662 $\pm$ 34,59
<b>SHR</b>	937 $\pm$ 52,43*‡	885 $\pm$ 49,68*‡
<b>SHR+L</b>	671 $\pm$ 34,22†	625 $\pm$ 32,26†
<b>SHR+O</b>	513 $\pm$ 11,61*†‡	482 $\pm$ 11,05*†‡

\* p < 0.05 vs WKY; † p < 0.05 vs SHR ; ‡ p < 0.05 vs SHR+L

Os resultados mostram um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) dos coeficientes de atenuação linear e de massa na artéria aorta causada pela hipertensão. Foi possível verificar a equivalência dos coeficientes de atenuação entre o tecido sadio e o tecido de ratos hipertensos tratados com losartana. Por outro lado, os coeficientes de atenuação linear e de massa das artérias aortas de ratos tratados com olmesartana teve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) em relação a todos os outros grupos estudados.

#### 4.3. Coronária

A função principal das artérias coronárias é fornecer oxigênio e nutrientes ao músculo cardíaco para manter um bom funcionamento do coração. A fisiologia dessas artérias foi descrita neste trabalho no item 2.2.2.

Hipertensão arterial é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doença arterial coronariana. Ao lado do tabagismo e do diabetes melito, a hipertensão arterial constitui um dos mais importantes fatores de risco controláveis ou removíveis para doença arterial coronariana. A pressão sanguínea elevada produz um efeito lesivo

direto nas artérias coronárias, modificando o endotélio e propiciando o início e/ou progressão da aterosclerose.

Todos os resultados apresentados nesta seção foram publicados em Pickler *et al.* (2019).

#### 4.3.1. Análise histológica

A Figura 39 mostra imagens obtidas por microscopia óptica das laminas coradas com HE de coronárias representativas para cada grupo de estudo, WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. Foram feitas imagens das coronárias de todos os ratos estudados. A partir dessas imagens, foi medida a largura da camada média (média de 10 medidas para cada coronária), o diâmetro do lúmen (média de 8 medidas para cada coronária), e posteriormente, foi calculado o parâmetro M/L descrito por Schiffrin e coautores (2000).

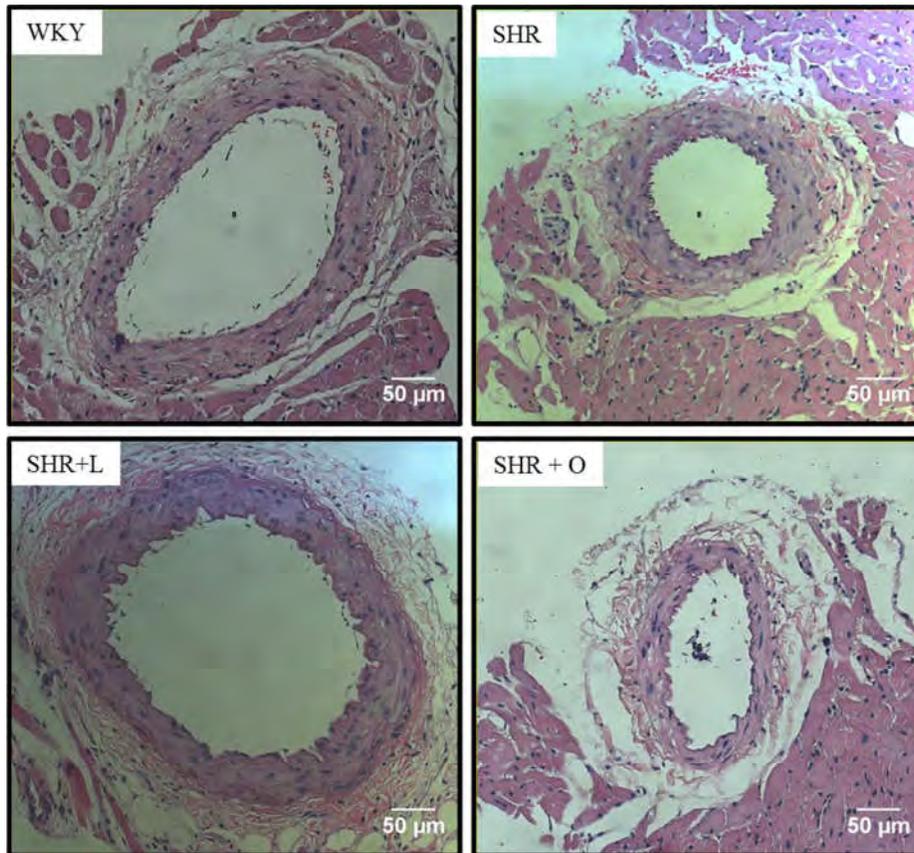


Figura 39 – Imagem obtida por microscopia óptica (objetiva de 20x) de coronárias típicas dos grupos WKY, SHR, SHR+L, SHR+O coradas utilizando a técnica de hematoxilina-eosina.

A tabela 5 mostra os valores obtidos da largura da camada média, do diâmetro do lúmen e a razão M/L para as aortas dos grupos WKY, SHR, SHR+L, SHR+O. Comparando o grupo normotenso com o grupo hipertenso pôde-se observar uma diminuição da largura da camada média e do diâmetro do lúmen e também um aumento na razão M/L. Os dados obtidos estão de acordo com o esperado na literatura (SCHIFFRIN, 2000). As coronárias provenientes do grupo tratado com a losartana apresentaram valores de largura da camada média, diâmetro do lúmen e razão M/L equivalentes aos encontrados para o grupo normotenso. Por outro lado, o valor encontrado para diâmetro do lúmen no grupo SHR+O foi muito inferior aos demais.

Tabela 5 – Valores médios  $\pm$  erro padrão da espessura da túnica média ( $\mu\text{m}$ ), diâmetro do lúmen ( $\mu\text{m}$ ) e razão média/lúmen (M/L) para artérias coronárias dos ratos dos grupos WKY, SHR, SHR + L e SHR + O.

	WKY	SHR	SHR+L	SHR+O
<b>Espessura da camada média (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	31,04 $\pm$ 1,04	26,19 $\pm$ 1,17*	34,47 $\pm$ 1,61†	32,33 $\pm$ 1,18†
<b>Diâmetro da luz (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	196,51 $\pm$ 11,28	124,73 $\pm$ 6,45*	225,10 $\pm$ 8,18†	100,4 $\pm$ 8,47*‡
<b>M/L</b>	0,15 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,02*	0,17 $\pm$ 0,02†	0,19 $\pm$ 0,01

\* p < 0.05 vs WKY; † p < 0.05 vs SHR ; ‡ p < 0.05 vs SHR+L

As alterações estruturais nas artérias decorrente da hipertensão são basicamente de dois tipos: (1) remodelamento eutrófico, no qual os diâmetros externos e do lúmen diminuem, a razão M/L é aumentada e a área da seção transversal é inalterada; e (2) remodelamento hipertrófico, no qual a camada média engrossa e invade o lúmen, resultando em aumento da área seccional da média e da razão M/L. O remodelamento resultante da hipertensão pode inicialmente ser adaptativo, mas eventualmente se torna mal adaptativo podendo comprometer a função dos órgãos, contribuindo para as complicações cardiovasculares da hipertensão. (INTENGAN & SCHIFFRIN, 2001)

As coronárias dos ratos hipertensos avaliados neste estudo apresentaram um remodelamento eutrófico nas coronárias dos ratos hipertensos. Esses dados estão de acordo com a literatura, onde artérias de médio e pequeno calibre de ratos SHR apresentam remodelação predominantemente eutrófica. (INTENGAN & SCHIFFRIN, 2001) Com os resultados obtidos para os parâmetros histológicos avaliados foi possível verificar que o anti-hipertensivo losartana foi capaz de impedir o remodelamento das coronárias devido à hipertensão. O mesmo não foi observado no grupo tratado com a olmesartana.

#### 4.3.2. Resultados TwinMic

Diferentemente das aortas, as artérias coronárias são artérias musculares de calibre médio. São artérias de distribuição, possuem calibre menor do que as artérias elásticas, e são formadas por fibras elásticas e musculares, com predomínio das fibras musculares. Essa espessura menor (aproximadamente  $50\mu\text{m}$ ) possibilitou que as medidas de LEXRF fossem realizadas varrendo todas as túnicas das coronárias, a túnica íntima, a média e a adventícia. Com isso, as imagens apresentadas contêm todas as camadas da coronária e ainda uma parte do lúmen.

Todas as intensidades elementares obtidas para as coronárias foram corrigidas pela intensidade do pico Compton, como descrito no item 3.3, e multiplicadas por um fator de  $10^5$  para uma melhor visualização pelo software ImageJ.

A Figura 40 mostra os mapas de absorção, contraste de fase e de intensidade corrigida dos elementos O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn, para uma coronária típica de um rato do grupo WKY.

A coronária possui uma predominância de fibras musculares, com isso não é possível identificar as diferentes densidades entre fibras musculares e fibras elásticas como no caso da aorta. Nesse tipo de artéria a túnica média é geralmente a túnica mais desenvolvida e a túnica adventícia muito delgada ou até mesmo inexistente. Essas características podem ser observadas nas imagens de absorção e contraste de fase (Figura 40 – Abs e PhC) das coronárias dos ratos do grupo WKY.

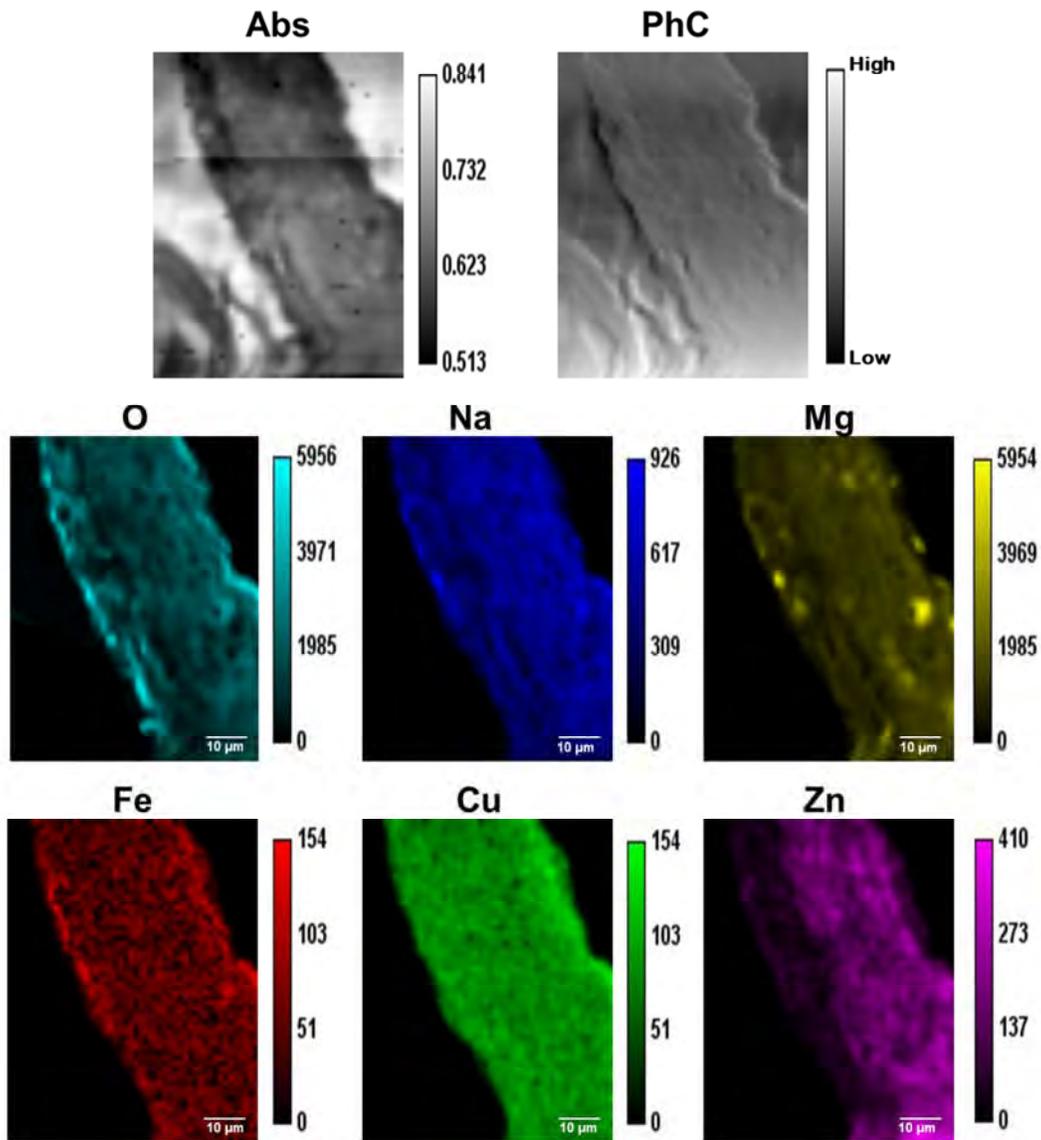


Figura 40 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de coronária típica do grupo WKY, adquiridos em uma região de 69,6 µm x 79,2 µm.

O oxigênio apresentou uma localização preferencial bem definida nas amostras de coronária dos ratos do grupo WKY. Esse elemento apareceu em maior intensidade nas extremidades da artéria, nas túnica íntima e adventícia. Sendo uma quantidade menor na camada média.

Os elementos Na, Mg, Fe, Cu e Zn possuem uma distribuição por praticamente toda a artéria coronária. Apesar disso, é possível destacar alguns pontos importantes. Tanto o Fe quanto o Cu estão presentes em toda a artéria, mas a intensidade desses elementos é ainda maior nas suas extremidades. O Na e o Mg também são encontrados por toda a extensão da amostras, entretanto, possuem pontos de maior intensidade. Nesses pontos estão localizados os núcleos das células endoteliais e as células das fibras musculares. Já o Zn pode ser encontrado em maior quantidade na túnica média da coronária dos ratos normotensos (WKY).

A Figura 41 apresenta os mapas de absorção, contraste de fase e de intensidade corrigida dos elementos O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn, para uma coronária típica de um rato do grupo SHR.

Nas imagens de absorção e contraste de fase (Figura 41 – Abs e PhC) é possível verificar uma menor espessura da camada média nas aortas dos ratos do grupo SHR em comparação ao grupo WKY. Foi verificado também um engrossamento da túnica íntima desse grupo. Essa maior espessura pode estar correlacionada com a hipertensão, que exige um esforço maior das artérias e com isso pode provocar um endurecimento das mesmas.

Quanto aos mapas elementares, podemos destacar uma maior homogeneidade dos elementos Na, Mg, Fe e Cu nas amostras dos ratos que tinham hipertensão comparado com os animais normotensos. Essa característica é ainda mais evidente nos elementos Na e Mg, já que não é possível identificar com a mesma precisão (ou estão presentes em menor quantidade) os núcleos das células das fibras musculares.

Não foi observada nenhuma alteração na localização de Zn nas artérias do grupo SHR quando comparadas ao grupo WKY. Foi observada uma maior intensidade de oxigênio na parede da coronária deste grupo.

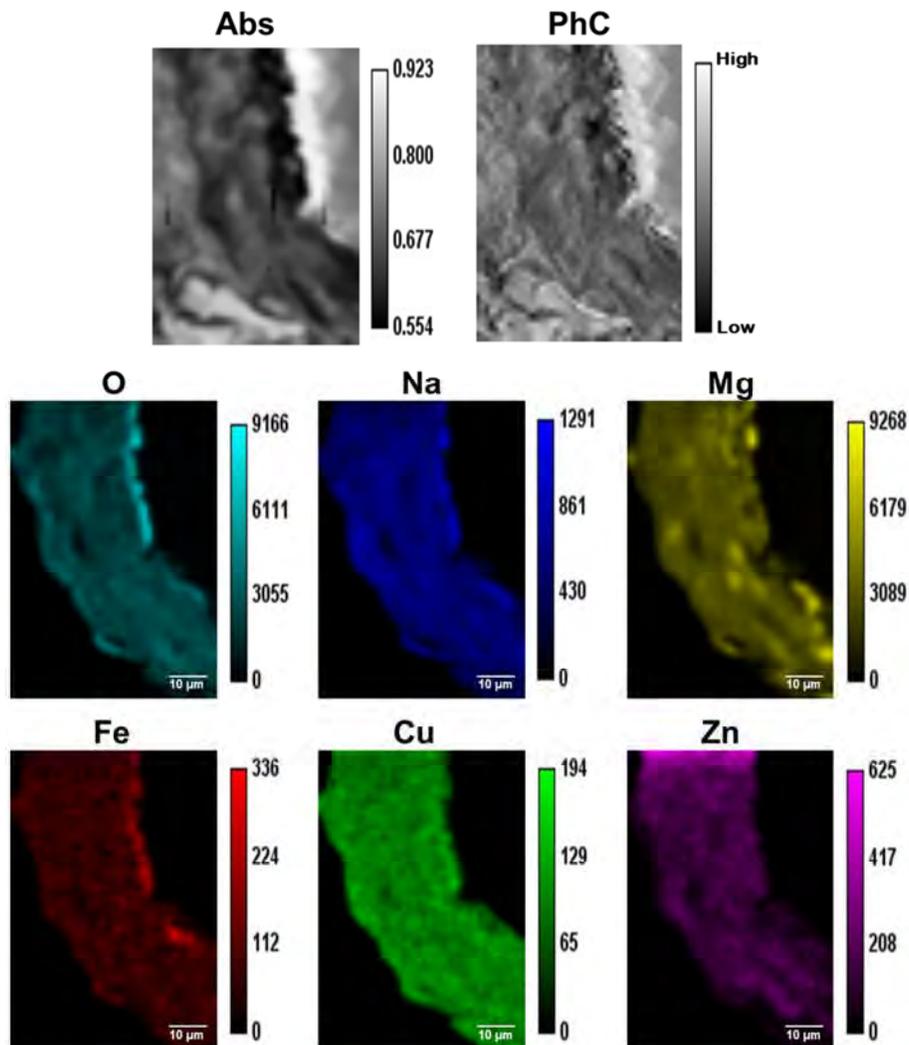


Figura 41 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de coronária típica do grupo SHR, adquiridos em uma região de 63,6  $\mu\text{m}$  x 42  $\mu\text{m}$ .

Os mapas de absorção, contraste de fase e de intensidade corrigida dos elementos O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn, para uma coronária típica de um rato do grupo SHR+L estão apresentados na Figura 42.

Nas imagens de absorção e de contraste de fase nota-se uma alteração na estrutura da coronária dos ratos hipertensos tratados com a losartana potássica (SHR+L). As coronárias dos ratos desse grupo possuem uma túnica média mais compacta comparada aos ratos do grupo WKY. Além disso, a túnica adventícia, que era

quase imperceptível nos grupos anteriores, está bem presente nesse grupo, tendo uma espessura semelhante à túnica média.

A distribuição de Cu e Zn nas coronárias dos ratos do grupo SHR+L foi semelhante às dos ratos do grupo WKY, com uma distribuição regular por toda a artéria.

O elementos Na e o Mg também apresentaram distribuições semelhantes às do grupo WKY, esses elementos estão presentes por toda a amostra, contudo, os núcleos das células endoteliais e células das fibras musculares apresentam as maiores intensidades desses elementos. O oxigênio está presente, em uma quantidade um pouco maior, nas extremidades das coronárias e nas fibras elásticas que separam a camada média da camada adventícia.

Os mapas de Fe das coronárias tratadas com losartana apresentaram pontos de alta intensidade desse elemento, assim como nas aortas do grupo SHR. Essa alta intensidade de Fe podem indicar lesões ateroscleróticas. (LEE *et al.*, 1998; MAKJANIC *et al.*, 1999). O Fe esta presente por toda a artéria, contudo, esses pontos na camada íntima são tão intensos que se torna imperceptível na imagem.

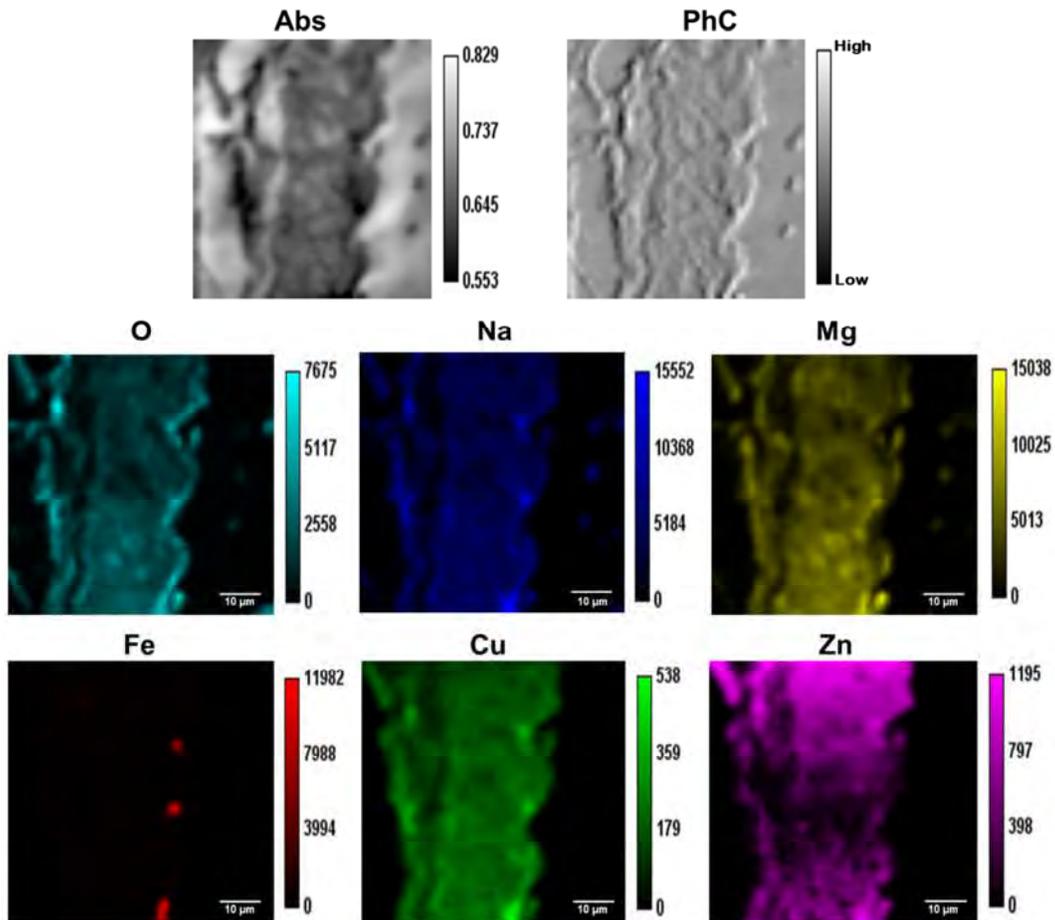


Figura 42 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de coronária típica do grupo SHR+L, adquiridos em uma região de 72  $\mu\text{m}$  x 72  $\mu\text{m}$ .

Os mapas de absorção, contraste de fase e de intensidade corrigida dos elementos O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn, para uma coronária típica de um rato do grupo SHR+O estão apresentados na Figura 43.

Assim como no grupo SHR+L, coronária dos ratos hipertensos tratados com olmesartana revelaram uma alteração estrutural em suas camadas, possuindo a túnica adventícia mais desenvolvida (Figura 43 – Abs e PhC).

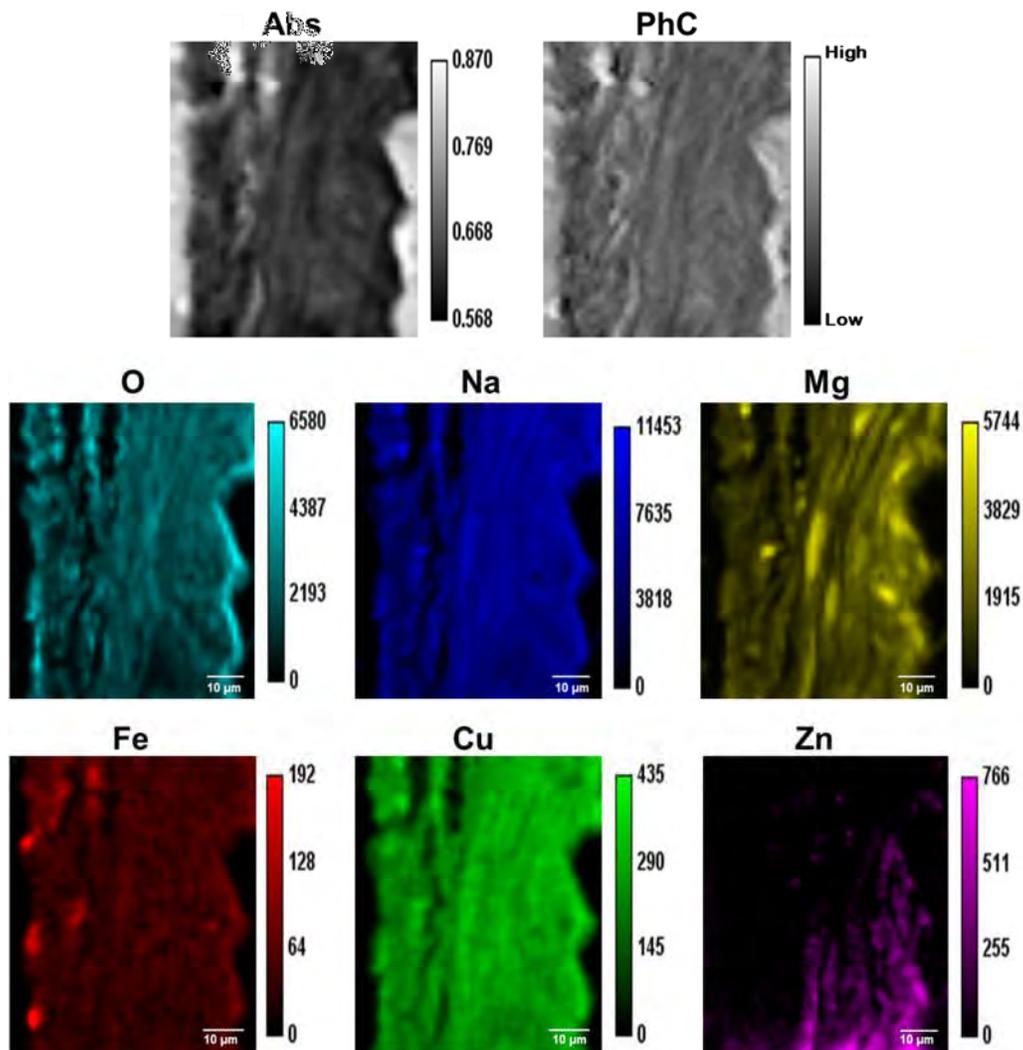


Figura 43 – Imagens absorção (Abs) e de contraste de fase (PhC) com os mapas elementares de O, Na, Mg, Fe, Cu e Zn para uma amostra de coronária típica do grupo SHR+O, adquiridos em uma região de 66 µm x 66 µm.

A distribuição dos elementos estudados nesse grupo apresentam basicamente as mesmas características do grupo SHR+L. No entanto, pode-se destacar uma intensidade maior de O e Cu na túnica íntima do grupo SHR+O. Por outro lado, pontos de alta intensidade de Fe foram encontrados na túnica adventícia das coronárias desse grupo.

Observando o mapa de Mg é possível notar uma aumento no tamanho das células musculares lisas. É reconhecido na literatura que a angiotensina II tem uma função importante para o crescimento das células musculares lisas vasculares.

(GIBBONS, *et al.*, 1992) Sendo assim, mais estudos precisam ser realizados para esclarecer por que o uso da olmesartana afeta o tamanho das células das fibras musculares lisas da artéria coronária, enquanto o losartan não o faz.

#### 4.3.3. Análise estatística das intensidades elementares para coronária

Nesta sessão serão apresentados os resultados das médias das intensidades elementares corrigidas obtidas das coronárias para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. Todos os valores foram dados em média com barras de erro padrão.

Em relação ao oxigênio total presente na coronária dos animais estudados, pôde-se verificar um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de aproximadamente 50% no grupo SHR e de 64% no grupo SHR+L em comparação aos animais normotensos. Em contrapartida, o grupo SHR+O apresentou os mesmos níveis de oxigênio apresentados pelo grupo WKY (Figura 44).

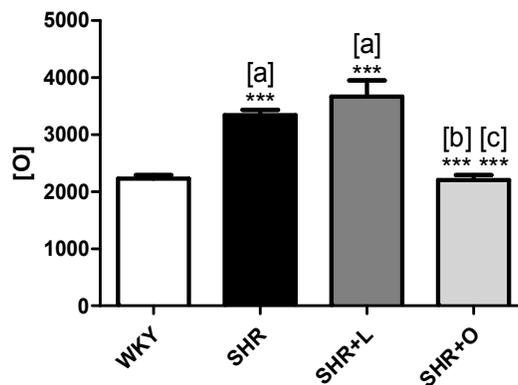


Figura 44 – Média de intensidade de Oxigênio na coronária dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. O símbolo (a) diferença em relação ao grupo WKY. O símbolo (b) diferença em relação ao grupo SHR; o símbolo (c) diferença em relação ao grupo SHR+L e; o símbolo \*\*\* significa diferença significativa ( $P < 0,001$ )

O gráfico da Figura 45 mostra os valores de Na para todos os grupos analisados nesse trabalho. Houve uma diminuição de 80% na quantidade total de Na na coronária dos ratos hipertensos em comparação aos ratos do grupo WKY. Sendo o Na um elemento que está diretamente relacionado à contração dos cardiomiócitos e na função

de condução das artérias, a deficiência de Na nas artérias é um grave problema para o correto funcionamento do sistema cardíaco. Entretanto, os dois medicamentos utilizados foram capazes de evitar a perda excessiva desse elemento nas coronárias dos ratos hipertensos tratados.

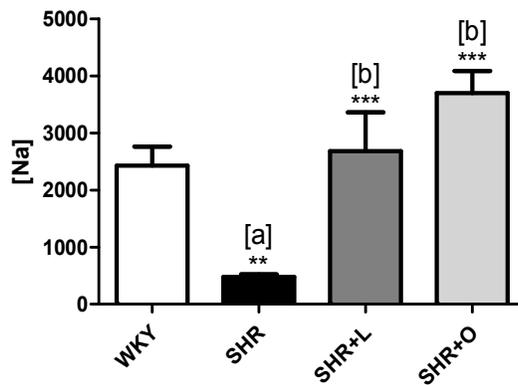


Figura 45 – Média de intensidade de sódio na coronária dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. O símbolo (a) diferença em relação ao grupo WKY. O símbolo (b) diferença em relação ao grupo SHR; o símbolo \*\* significa diferença significativa ( $p < 0,01$ ) e; o símbolo \*\*\* significa diferença significativa ( $p < 0,001$ )

Ocorreu um aumento significativo de Mg nas coronárias dos ratos hipertensos em comparação aos ratos normotensos (Figura 46). Foi constatada uma variação de mais 47% ( $p < 0,01$ ) em relação à quantidade de Mg no grupo SHR em relação ao grupo WKY. Nenhuma diferença significativa foi encontrada nos grupos SHR+L e SHR+O em relação ao grupo normotenso.

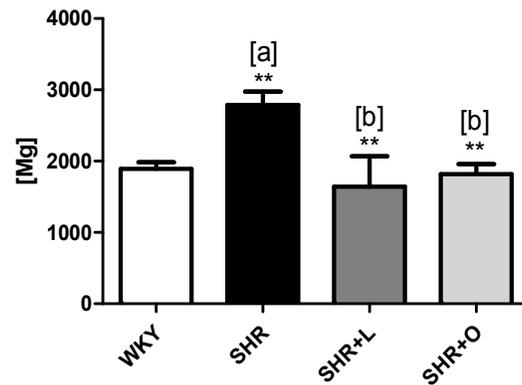


Figura 46 – Média de intensidade de Magnésio na coronária dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. O símbolo (a) diferença em relação ao grupo WKY. O símbolo (b) diferença em relação ao grupo SHR e; o símbolo \*\* significa diferença significativa ( $p < 0,01$ )

Comparando o Fe presente na coronária dos ratos do grupo SHR com os ratos do grupo WKY verificou-se uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) de aproximadamente 27% no grupo de animais hipertensos. A quantidade de Fe nas amostras do grupo tratado com losartana potássica (SHR+L) diferiu do grupo hipertenso, demonstrando uma presença de Fe compatível com os valores esperados para coronárias de ratos ditos normais.

Para o grupo SHR+O os valores obtidos de Fe se assemelham aos valores para coronárias de ratos hipertensos, não havendo diferença significativa entre esse grupo e o grupo SHR. Corroborando esse fato, foi constatada uma diferença significativa desse elemento no grupo SHR+O em relação aos grupos WKY e SHR+L.

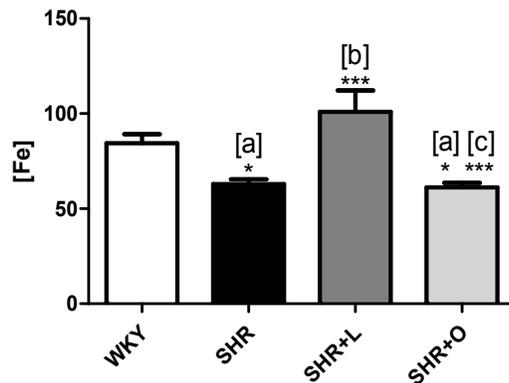


Figura 47 – Média de intensidade de Ferro na coronária dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. O símbolo (a) diferença em relação ao grupo WKY. O símbolo (b) diferença em relação ao grupo SHR; o símbolo (c) diferença em relação ao grupo SHR+L; o símbolo \* significa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e; o símbolo \*\*\* significa diferença significativa ( $p < 0,001$ )

Na Figura 48 estão apresentados os valores referentes ao elemento Cu encontrados para todos os grupos estudados.

Foi identificada uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) de Cu no grupo SHR em comparação ao grupo WKY. Essa diminuição foi de aproximadamente 30%. A quantidade de Cu encontrada nas coronárias dos ratos tratados com losartana divergiu estatisticamente tanto do grupo WKY quanto do grupo SHR. Isto é, a intensidade de Cu nesse grupo foi maior do que as encontradas nos grupos nesses dois grupos.

Apesar do aumento de Cu no grupo SHR+O, esse aumento não foi considerado estatisticamente significativo de acordo com o teste estatístico utilizado. Desta forma, a quantidade desse elemento nesse grupo foi significativamente maior que no grupo SHR.

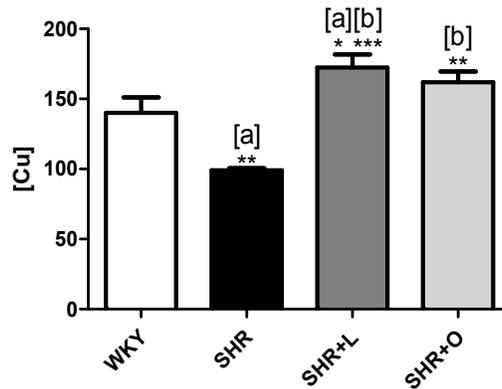


Figura 48 – Média de intensidade de Cobre na coronária dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. O símbolo (a) diferença em relação ao grupo WKY; o símbolo (b) diferença em relação ao grupo SHR; o símbolo \* significa diferença significativa ( $p < 0,05$ ); o símbolo \*\* significa diferença significativa ( $p < 0,01$ ) e; o símbolo \*\*\* significa diferença significativa ( $p < 0,001$ )

Por fim, na Figura 49 encontram-se os valores referentes ao elemento Zn nos grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.

A quantidade de Zn presente nas coronárias do grupo SHR foi 42% menor do que a quantidade desse elemento no grupo WKY. Já no grupo SHR+L, os níveis de Zn foram equivalentes ao grupo WKY. Em consequência disto, houve uma diferença significativa entre o grupo SHR+L e o grupo SHR devido ao uso da losartana. O mesmo ocorreu com os animais do grupo SHR+O, que também apresentou níveis de Zn similares ao do grupo WKY.

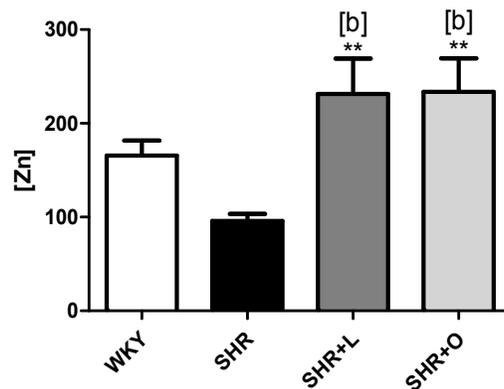


Figura 49 – Média de intensidade de Zinco na coronária dos ratos para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. O símbolo (b)\*\* significa diferença significativa ( $P < 0,01$ ) em relação ao grupo SHR.

A Figura 50 apresenta os resultados das razões Zn/Cu, Cu/Fe e Mg/Na para as coronárias de todos os grupos estudados. Como foi dito anteriormente, essas relações são reconhecidas por indicar danos causados pela hipertensão (Zn/Cu, Cu/Fe) ou indicar calcificação em tecidos (Mg/Na).

As relações Zn/Cu e Cu/Fe foram menores para o grupo SHR quando comparado com o grupo WKY. Estas diminuições causadas pela hipertensão foram previamente descritas na literatura (CANATAN *et al.*, 2004; FENZL *et al.*, 2013). A losartana foi capaz de normalizar a proporção Zn/Cu, enquanto as artérias coronárias dos ratos tratados com olmesartana apresentaram razões de Zn/Cu e Cu/Fe semelhantes às encontradas para o grupo WKY.

O desequilíbrio entre Mg e Na nas coronárias causado pela hipertensão foi evidenciado pela comparação entre a razão Mg/Na nos grupos SHR e WKY. O aumento dessa razão pode indicar o acúmulo de cálcio nessas artérias. (PASCOLO *et al.*, 2014) A relação Mg/Na para coronária dos ratos tratados com losartana foi semelhante à taxa encontrada para os ratos saudáveis. Em contrapartida, a razão Mg/Na para o grupo SHR+O foi significativamente menor do que em todos os outros grupos estudados.

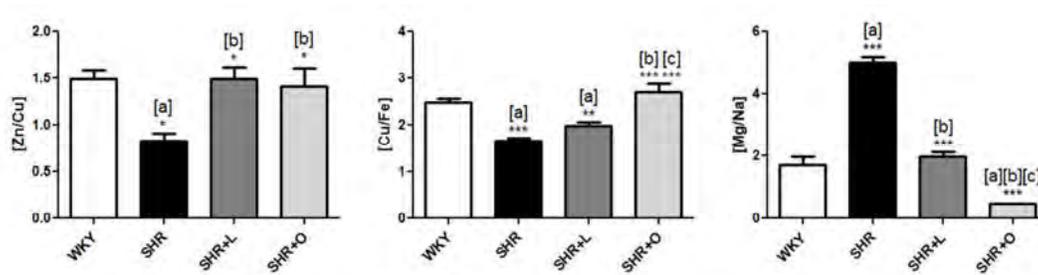


Figura 50 – Razões Zn/Cu, Cu/Fe e Mg/Na para as coronárias dos grupos WKY, SHR, SHR+L, SHR+O. O símbolo (a) significa diferença em relação ao grupo WKY; o símbolo (b) significa diferença em relação ao grupo SHR; em relação ao grupo SHR; o símbolo (c) significa diferença em relação ao grupo SHR+L; o símbolo \* significa diferença significativa ( $p < 0,05$ ); o símbolo \*\* significa diferença significativa ( $p < 0,01$ ); o símbolo \*\*\* significa diferença significativa ( $p < 0,001$ ).

#### 4.3.1. Coeficiente de atenuação

Assim como para as aortas, os coeficientes de atenuação linear  $\mu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) foram calculados pixel por pixel para todas as amostras de coronárias usando a equação (8) descrita no item 2.12.

As densidades utilizadas para o cálculo do coeficiente de atenuação de massa das artérias coronárias foram as mesmas utilizadas para as aortas. Foram eles:  $1,059 \pm 0,006 \text{ g/cm}^3$ ;  $1,059 \pm 0,005 \text{ g/cm}^3$ ;  $1,072 \pm 0,008 \text{ g/cm}^3$ ; e  $1,065 \pm 0,004 \text{ g/cm}^3$  para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O, respectivamente. Não houve diferença significativa entre as densidades dos tecidos.

O coeficiente de atenuação de massa foi calculado dividindo os valores dos coeficientes de atenuação linear encontrado para as coronárias pela densidade calculada para o tecido cardíaco de cada grupo ( $\mu/\rho$ ).

A Tabela 6 apresenta os valores médios  $\pm$  erro padrão para  $\mu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) e  $\mu$  ( $\text{cm}^2/\text{g}$ ) para as artérias coronárias dos grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O. Além dos valores calculados para os tecidos, a tabela 6 apresenta os coeficientes de atenuação de massa tabelados para tecido mole (soft tissue - ICRU44) e também uma combinação de tecido com parafina. Os dados de referência foram obtidos com o programa X mudat. Tendo

em vista que as aortas foram emblocadas em parplast plus, o coeficiente de atenuação calculado para os tecidos foi alterado.

Tabela 6 – Média  $\pm$  erro padrão do coeficiente de atenuação linear ( $\mu$ ) e coeficiente de atenuação de massa ( $\mu_p$ ) das artérias coronárias para os grupos WKY, SHR, SHR+L e SHR+O.

	$\mu$ (cm <sup>-1</sup> )	$\mu_p$ (cm <sup>2</sup> /g)
<b>Tecido mole</b>	1348	1272
<b>Tecido mole + Parafina</b>	928	937
<b>WKY</b>	875 $\pm$ 12,54*	826 $\pm$ 17,24*
<b>SHR</b>	961 $\pm$ 24,21	908 $\pm$ 27,00
<b>SHR+L</b>	848 $\pm$ 23,30*	788 $\pm$ 25,30*
<b>SHR+O</b>	897 $\pm$ 14,31	842 $\pm$ 15,71

\* Diferença significativa para o grupo SHR (p<0.05)

Os resultados mostraram uma diferença significativa entre os valores de coeficiente de atenuação linear e de massa quando comparados os grupos normotensos e hipertensos. Isso demonstra uma mudança na forma que o tecido atenua a radiação, mudança essa causada exclusivamente pela hipertensão. Desta forma, se tornou possível a caracterização de tecidos saudáveis com tecidos expostos a enfermidades utilizando coeficientes de atenuação.

Foi possível verificar também a equivalência nos valores de coeficiente de atenuação entre o tecido sadio e o tecido de ratos hipertensos tratados com losartana. Por outro lado, os coeficientes de atenuação linear e de massa das artérias coronárias de ratos tratados com olmesartana não apresentaram diferença significativa para nenhum dos outros grupos. Sendo assim, somente com a avaliação deste parâmetro, não se pode afirmar a eficiência da olmesartana em prevenir os danos na coronária causados pela hipertensão.

## ***CAPÍTULO V***

### **5. CONCLUSÕES**

A hipertensão arterial é umas das doenças mais comuns que acomete toda a população mundial, tanto crianças quanto adultos. Cerca de um a cada quatro homens e uma a cada cinco mulheres adultas tinham problemas com pressão alta em 2015. Contudo, conforme foi descrito neste trabalho, somente a diminuição da pressão arterial não é suficiente para reverter ou até mesmo eliminar riscos cardiovasculares causados pela hipertensão. Tendo em vista o grande impacto dessa patologia sobre a sociedade e a necessidade de tratamento medicamentoso durante toda, ou grande parte, da vida, grandes esforços vêm sendo feitos com o objetivo de encontrar melhores alternativas terapêuticas que não apenas diminuam a pressão arterial, mas também previna desfechos cardiovasculares.

É reconhecido na literatura o efeito protetivo dos bloqueadores dos receptores da Angiotensina II para prevenção da remodelação de artérias, contudo, a comparação entre dois diferentes representantes dessa classe não havia sido desenvolvida.

O experimento realizado na TwinMic permitiu a análise de importantes elementos relacionados à hipertensão arterial nas artérias aorta e coronária de ratos. A resolução espacial submicrométrica da LEXRF permitiu a identificação de alterações estruturais e químicas na artéria devido à hipertensão e ao uso de medicamentos anti-hipertensivos. Ficaram demonstradas então, a aplicabilidade e as vantagens de se usar essa técnica para a análise das artérias de ratos hipertensos e normotensos.

Os resultados revelaram que os BRAs losartana e olmesartana atuam de diferentes formas para a correção da artéria, apesar de pertencerem à mesma classe de anti-hipertensivos. Ambos os agentes anti-hipertensivos demonstram ter um efeito protetor para a artéria. Entretanto, de acordo com os parâmetros químicos e estruturais analisados neste estudo, a losartana demonstrou ser mais eficiente para prevenir as alterações causadas pela hipertensão tanto na artéria aorta quanto na artéria na coronária.

Ficou demonstrada também neste estudo uma notória deficiência de Cu e Fe mesmo após o tratamento com os BRAs. O Cu auxilia na absorção de Fe no organismo, por essa razão, uma suplementação com Cu poderia auxiliar na prevenção de danos arteriais após o tratamento anti-hipertensivo.

A avaliação do efeito protetivo do anti-hipertensivo utilizado no combate à hipertensão pode abrir um novo parâmetro para a escolha do medicamento utilizado. Como foi verificado neste estudo, apesar da losartana ter menos eficiência na diminuição da pressão arterial, seu efeito protetivo sob as artérias foi maior quando comparado à olmesartana. Sendo assim, o presente trabalho é inédito, e de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias que considerem a tanto a diminuição da pressão arterial em si quanto à minimização de desfechos cardiovasculares como parte da terapia contra a hipertensão.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABBASPOUR, N., HURRELL, R., KELISHADI, R. “Review on iron and its importance for human health”, *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, v. 19, n. 2, pp. 164, 2014.
- ABBASPOUR, N., HURRELL, R., KELISHADI, R. “Review on iron and its importance for human health”, *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, v. 19, n. 2, pp. 164, 2014.
- ABEGUNDE, D O., MATHERS, C.D., ADAM, T., et al. “The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries”, *The Lancet*, v. 370, n. 9603, pp. 1929-1938, 2007.
- ARFELLI, F. “Synchrotron light and imaging systems for medical radiology”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, v. 454, n. 1, pp. 11-25, 2000.
- ATCHA, Z., ROURKE, C., NEO, A.H., et al. “Alternative method of oral dosing for rats”, *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 49, n. 3, pp. 335-343, 2010.
- BALERNA, A. & MOBILIO, S. Introduction to synchrotron radiation. *In: Synchrotron radiation*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 3-28, 2015.
- BAMBYNEK, W., CRASEMANN, B., FINK, R.W., et al. “X-ray fluorescence yields, Auger, and Coster-Kronig transition probabilities”, *Reviews of modern physics*, v. 44, n. 4, pp. 716, 1972.
- BAZHANOVA, V.V., GULJAEVA, L.F., KRASILNIKOV, S.E, et al. “Using XRF SR for the study of changes in elemental composition of healthy and pathological tissues of human organism”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, v. 575, n. 1, pp. 206-209, 2007.
- BAZHANOVA, V.V., GULJAEVA, L.F., KRASILNIKOV, S.E, et al. “Using XRF SR for the study of changes in elemental composition of healthy and pathological tissues of human organism”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics*

*Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, v. 575, n. 1, pp. 206-209, 2007.

BERNASCONI, G., HASELBERGER, N., MARKOWICZ, A., VALKOVIC, V. “Applications of a capillary based X-ray microfluorescence system”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, v. 86, n. 3, pp. 333-338, 1994.

BERNE, R.M., LEVY M.N. “Principles of Physiology”, 6ed. England, International Student Edition, 1990.

BROUSIL, J.A. & BURKE, J.M. “Olmesartan medoxomil: an angiotensin II-receptor blocker”, *Clinical therapeutics*, v. 25, n. 4, pp. 1041-1055, 2003.

CAMPBELL, D.J. “Circulating and tissue angiotensin systems”, *The Journal of clinical investigation*, v. 79, n. 1, pp. 1-6, 1987.

CANATAN, H., BAKAN, I., AKBULUT, M., et al. “Relationship among levels of leptin and zinc, copper, and zinc/copper ratio in plasma of patients with essential hypertension and healthy normotensive subjects”, *Biological trace element research*, v. 100, n. 2, pp. 117-123, 2004.

CAPUTO, L.F.G., DE BRITO GITIRANA, L., DE ABREU MANSO, P.P. “Técnicas histológicas”, *In: Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*. v.4, pp. 89-188, 2009.

CARVALHO, M.H.C., NIGRO, D., LEMOS, V.S., et al. “Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções”, *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 8, n. 1, pp. 76-88, 2001.

CASTILHO, R.B., 2006, Fotoionização de produtos naturais voláteis utilizando luz síncrotron e técnicas de tempo de voo. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

CAVALCANTE, M.A., BOMBIG, M.T.N., LUNA FILHO, B., et al. “Qualidade de vida de pacientes hipertensos em tratamento ambulatorial”, *Arquivos brasileiros de cardiologia*, v. 89, n. 4, p. 245-50, 2007.

CAVALCANTI, J.S., DE MELO, N.C.V., DE VASCONCELOS, R. S. “Estudo morfométrico e topográfico dos óstios coronarianos”, *Arquivos brasileiros de cardiologia*, v. 81, n. 4, p. 355-8, 2003.

- CÉSAR, L.A.M., FERREIRA, J.F.M., “Circulação Coronariana. Aspectos Fisiológicos”, *Revista da sociedade brasileira de hipertensão*, v.1, n.7, pp. 6-10, 2004.
- CHOBANIAN, A.V., BAKRIS, G.L., BLACK, H.R., et al. “The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: the JNC 7 report”, *Jama*, v. 289, n. 19, pp. 2560-2571, 2003.
- COLOMOBO, F.M.C, GOWDAK, L.H.W., BORTOLOTO, L.A., et al. “Avaliação Clínica da Reserva Cardiovascular em Pacientes Hipertensos”, *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 8, n. 4, pp. 393-403, 2001.
- COSTER, D. & KRONIG, R.L. “New type of auger effect and its influence on the x-ray spectrum”. *Physica*, v. 2, n. 1-12, pp. 13-24, 1935.
- CULLING, C.F.A. Handbook of histopathological and histochemical techniques: including museum techniques. Butterworth-Heinemann, 2013.
- DE KLOET, A.D., KRAUSE, E.G., WOODS, S.C. “The renin angiotensin system and the metabolic syndrome”, *Physiology & behavior*, v. 100, n. 5, pp. 525-534, 2010.
- DICKHOUT, J.G., LEE, R.M.K.W. “Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats”, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 274, n. 3, pp. H794-H800, 1998.
- EKTESSABI, A., YOSHIDA, S., TAKADA, K. “Distribution of Iron in a Single Neuron of Patients with Parkinson’s Disease”, *X-ray Spectrometry*, v. 28, n. 6, pp. 456-460, 1999.
- FAHRNI, C.J. “Biological applications of X-ray fluorescence microscopy: exploring the subcellular topography and speciation of transition metals”, *Current opinion in chemical biology*, v. 11, n. 2, p. 121-127, 2007.
- FENZL, V., FLEGAR-MEŠTRIĆ, Z., PERKOV, S., et al. “Trace elements and oxidative stress in hypertensive disorders of pregnancy”. *Archives of gynecology and obstetrics*, v. 287, n. 1, p. 19-24, 2013.
- FERNS, G.A., LAMB, D.J., TAYLOR, A. “The possible role of copper ions in atherogenesis: the Blue Janus”, *Atherosclerosis*, v. 133, n. 2, pp. 139-152, 1997.
- FRAGA, C.G. “Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health”, *Molecular aspects of medicine*, v. 26, n. 4-5, pp. 235-244, 2005.

- FROHLICH, E.D. “The adrenergic nervous system and hypertension state of the art”, *In: Mayo Clinic proceeding*, v. 52, n. 6, pp. 361-368, 1977.
- FYHRQUIST, F. & SAIJONMAA, O. “Renin-angiotensin system revisited”, *Journal of internal medicine*, v. 264, n. 3, pp. 224-236, 2008.
- GIANONCELLI, A., KAULICH, B., ALBERTI, R., et al. “Simultaneous soft X-ray transmission and emission microscopy”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, v. 608, n. 1, p. 195-198, 2009.
- GIANONCELLI, A., KOUROUSIAS, G., MEROLLE, L., et al. “Current status of the TwinMic beamline at Elettra: a soft X-ray transmission and emission microscopy station”, *Journal of synchrotron radiation*, v. 23, n. 6, pp. 1526-1537, 2016.
- GIANONCELLI, A., KOUROUSIAS, G., STOLFA, A., et al. “Recent developments at the TwinMic beamline at ELETTRA: an 8 SDD detector setup for low energy X-ray fluorescence”, *In Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing v. 425, n. 18, pp. 182001, 2013.
- GIBBONS, G. H., PRATT, R., DZAU, V. J. “Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II”, *The Journal of clinical investigation*, v. 90, n. 2, pp. 456-461, 1992.
- GNAIGER, E., STEINLECHNER-MARAN, R., MÉNDEZ, G., et al. “Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen”, *Journal of bioenergetics and biomembranes*, v. 27, n. 6, pp. 583-596, 1995.
- GOMES, O.M. “Fisiologia Cardiovascular Aplicada”, 1ed. Belo Horizonte, Coração Ltda, 2005.
- GONZALEZ, J. “Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) has signed an agreement with Procognia (Maidenhead, England, UK) to market Procognia's functional human protein arrays”, *Pharmaceutical Discovery*, v. 5, n. 1, pp. 20-21, 2005.
- GREENE, A. S., TONELLATO, P. J., ZHANG, Z. H. I. W. E. I., et al. “Effect of microvascular rarefaction on tissue oxygen delivery in hypertension”, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 262, n 5, pp. H1486-H1493, 1992.
- GUYTON, A.C., HALL, J.E. “Textbook of Medical Physiology”, 11 ed. Pennsylvania, Elsevier Saunders, 2006.

- HE, F.J., & MACGREGOR, G.A. “Cost of poor blood pressure control in the UK: 62 000 unnecessary deaths per year”, *Journal of human hypertension*, v. 17, n. 7, pp. 455-457, 2003.
- HIGUCHI, S., OHTSU, H., SUZUKI, H., SHIRAI, H., FRANK, G.D., EGUCHI, S. “Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology”, *Clinical Science*, v. 112, n. 8, pp. 417-428, 2007.
- HONG, S., LEE, J., SEO, H.H., et al. “Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger targeting miR-132 prevents apoptosis of cardiomyocytes under hypoxic condition by suppressing Ca<sup>2+</sup> overload”, *Biochemical and biophysical research communications*, v. 460, n. 4, pp. 931-937, 2015.
- INTENGAN, H. D., & SCHIFFRIN, E. L. “Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis”, *Hypertension*, v. 38, n. 3, pp. 581-587, 2001.
- JANSSENS, K.H.A, ADAMS, F., RINDBY, A. Microscopic X-ray fluorescence analysis. John Wiley & Sons Inc, 2000.
- KANNEL, W.B. “Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment”, *Jama*, v. 275, n. 20, pp. 1571-1576, 1996.
- KAULICH, B., GIANONCELLI, A., BERAN, A., et al. “Low-energy X-ray fluorescence microscopy opening new opportunities for bio-related research”, *Journal of the Royal Society interface*, v. 6, n. Suppl 5, pp. S641-S647, 2009.
- KAULICH, B.; BACESCU, D.; SUSINI, J. et al. “TwinMic - a European twin x-ray microscopy station commissioned at ELETTRA”, *Proc. 8th Int. Conf. X-ray Microscopy. Institute of Pure and Applied Physics*, pp. 22 – 25, 2006.
- KEARNEY, P. M., WHELTON, M., REYNOLDS, K., et al. “Global burden of hypertension: analysis of worldwide data”, *The lancet*, v. 365, n. 9455, pp. 217-223, 2005.
- KIRZ, J., ADE, H., JACOBSEN, C., et al. “Soft x-ray microscopy with coherent x rays”, *Review of Scientific Instruments*, v. 63, n. 1, pp. 557-563, 1992.
- KLABUNDE, R.E. “Cardiovascular Physiology Concepts”, 2ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- KNOLL, G. F. Radiation detection and measurement. New York: Wiley, 2010.

- KOBORI, H., NANGAKU, M., NAVAR, L. G., et al. “The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease”, *Pharmacological reviews*, v. 59, n. 3, pp. 251-287, 2007.
- KOLTE, D., VIJAYARAGHAVAN, K., KHERA, S., et al. “Role of magnesium in cardiovascular diseases”, *Cardiology in review*, v. 22, n. 4, p. 182-192, 2014.
- KOUROUSIAS, G., PASCOLO, L., MARMORATO, P., et al. “High-resolution scanning transmission soft X-ray microscopy for rapid probing of nanoparticle distribution and sufferance features in exposed cells”, *X-Ray Spectrometry*, v. 44, n. 3, pp.163-168, 2015.
- KYRYCHENKO, V., POLÁKOVÁ, E., JANÍČEK, R., et al. “Mitochondrial dysfunctions during progression of dystrophic cardiomyopathy”, *Cell calcium*, v. 58, n. 2, pp. 186-195, 2015.
- LACHANCE, G.R., CLAISSE F. Quantitative X-ray Fluorescence Analysis: Theory and Application. New York. *John Willey & Sons*. 1.ed. 1995.
- LEE, F.Y., LEE, T.S., PAN, C.C., HUANG, A.L., CHAU, L.Y. “Colocalization of iron and ceroid in human atherosclerotic lesions”, *Atherosclerosis*, v. 138, n. 2, pp. 281-288, 1998.
- LIM, S.S., VOS, T., FLAXMAN, A.D., et al. “A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010”, *The lancet*, v. 380, n. 9859, pp. 2224-2260, 2013.
- MAKJANIC, J., PONRAJ, D., TAN, B.K.H., WATT, F. “Nuclear microscopy investigations into the role of iron in atherosclerosis”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, v. 158, n. 1-4, pp. 356-360, 1999.
- MALACHIAS, M., PLAVNIK, F., MACHADO, C., MALTA, D., et al. “7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension”, *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 107, n. 3, pp. 1-24, 2016.
- MANCIA, G., FAGARD, R., NARKIEWICZ, K., et al. “SH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)”, *Blood pressure*, v. 22, n. 4, pp. 193-278, 2013.

- MANTUANO, A., BARROSO, R. C., NOGUEIRA, L. P. et al. “Alterations in Low-Z Elements Distribution in Heart Tissue after Treatments to Breast Cancer Using LEXRF Technique”, *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 7, n. 11, p. 754, 2016.
- MARGARITONDO, G. “A Primer in Synchrotron Radiation: Everything You Wanted to Know About SEX (Synchrotron Emission of X-Rays) But Were Afraid to Ask”. *Journal of Synchrotron Radiation*, v. 2, n. 3, p. 148-154, 1995.
- MARTE, A.P. & SANTOS, R.D. “Bases fisiopatológicas da dislipidemia e hipertensão arterial”, *Rev Bras Hipertens*, v. 14, n. 4, pp. 252-7, 2007.
- MCDONALD, J.H. Handbook of biological statistics. Baltimore, MD: Sparky House Publishing, 2009.
- MELO JÚNIOR, A.S., 2007, Análise quantitativa do material particulado na região de campinas através das técnicas de microfluorescência de raios x e reflexão total usando radiação síncrotron. Tese de D.Sc., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- MEROLLE, L., MALUCELLI, E., FRATINI, M., et al. “Repeatability and reproducibility of intracellular molar concentration assessed by synchrotron-based x-ray fluorescence microscopy”, *In AIP Conference Proceedings*, v. 1696, n. 1, pp. 020032, 2016.
- MERTZ, W. “The essential trace elements”. *Science*, v. 213, n. 4514, pp. 1332-1338, 1981.
- MIRE, D. E., SILFANI, T. N., & PUGSLEY, M. K. “A review of the structural and functional features of olmesartan medoxomil, an angiotensin receptor blocker”, *Journal of cardiovascular pharmacology*, v. 46, n. 5, pp. 585-593, 2005.
- MOZAFFARIAN, D., BENJAMIN, E. J., GO, A. S., et al. “Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A report from the American Heart Association”, *Circulation*, v. 133, n. 4, pp. e38, 2016.
- MULLINS, L.J., BAILEY, M.A., MULLINS, J.J. “Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective”, *Physiological reviews*, v. 86, pp. 709-746, 2006.
- NASCIMENTO, V. *Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XRF) e por reflexão total (TXRF)*. Julho, 1999. Disponível em: <[http://www.raiosx.ufc.br/site/wpcontent/uploads/downloads/2012/10/EDXRF\\_TXRF.pdf](http://www.raiosx.ufc.br/site/wpcontent/uploads/downloads/2012/10/EDXRF_TXRF.pdf)>. Acesso em: 10 de janeiro 2014.

- NETO, A.R., MENDES, C.L., REZENDE, E.A.C., et al. Monitorização em UTI. 1 ed. Rio de Janeiro, Editora Revinter, 2004.
- OKAMOTO, K., AOKI, K. “Development of a strain of spontaneously hypertensive rats”, *Japanese circulation journal*, v. 27, n. 3, pp. 282-293, 1963.
- OKAMOTO, K., TABEL, R., FUKUSHIMA, M., et al. “Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats”, *Japanese circulation journal*, v. 30, n. , pp. 703-716, 1966.
- OKUNO, E. & YOSHIMURA, E.M. Física das radiações. Oficina de Textos, 2010.
- PALLON, J., HOMMAN, P., PINHEIRO, T., HALPERN, M.J., MALMQVIST, K. “A view on elemental distribution alterations of coronary artery walls in atherogenesis”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, v. 104, n. 1-4, pp. 344-350, 1995.
- PASCOLO, L., GIANONCELLI, A., RIZZARDI, C., et al. “Calcium micro-depositions in jugular truncular venous malformations revealed by Synchrotron-based XRF imaging”, *Scientific reports*, v. 4, pp. 6540, 2014.
- PEART, W.S. “Renin-angiotensin system”, *New England Journal of Medicine*, v. 292, n. 6, pp. 302-306, 1975.
- PICKLER, A. “Avaliação dos efeitos de quimioterápicos em fêmures de ratas wistar usando SR- $\mu$ XRF”. 2015. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- PICKLER, A., MANTUANO, A., MOTA, C.L. *et al.* “Effects of angiotensin II receptor blockers in coronary arteries of hypertensive rats: analysis of elemental distribution using LEXRF”, *X-Ray Spectrometry*, pp. 1-10, 2019.
- POWERS, S.K., HOWLEY, E.T. “Fisiologia do Exercício”, 3 ed. São Paulo, Manole Ltda, 2000.
- PRINS, M., DAVIES, S.T., BOWEN, D.K. “Trace element analysis and element mapping by scanning X-ray fluorescence at daresbury SRS”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, v. 222, n. 1, pp. 324-328, 1984.
- RAGHAVAN, K., DWIVEDI, A., CAMPBELL JR, G.C., et al. “A spectroscopic investigation of losartan polymorphs”, *Pharmaceutical research*, v. 10, n. 6, pp. 900-904, 1993.

- RAINES, E.W. “The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease”, *Int J Exp Pathol.*, v. 81, n. 3, pp. 173-182, 2000.
- RAMOS, D.C. & CASALI, A.C.G. “Antagonistas dos receptores da angiotensina II: uma revisão de classe”, *Revista Saúde e Desenvolvimento*, v. 1, n. 1, pp. 80-94, 2012.
- REINHART, R. A. “Magnesium metabolism: a review with special reference to the relationship between intracellular content and serum levels”, *Archives of internal medicine*, 148(11), 2415-2420, 1988.
- RIBEIRO, J. M., & FLORÊNCIO, L. P. “Bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT1”, *Rev Bras Hipertens*, v. 7, n. 3, pp. 293-302, 2000.
- RIZZONI, D., PORTERI, E., PICCOLI, A., et al. “Effects of losartan and enalapril on small artery structure in hypertensive rats. Hypertension”, v. 32, n. 2, pp. 305-310, 1998.
- ROBERTS, L., JACOB, M.P., FULOP, T. “Elastin in blood vessels”, *Ciba Found Symp*, v. 192, pp. 286-299, 1995.
- SAFAR, M.E., THUILLIEZ, C.H., RICHARD, V., BENETOS, A. “Pressure-independent contribution of sodium to large artery structure and function in hypertension”, *Cardiovascular research*, v. 46, n. 2, pp. 269-276, 2000.
- SANJULIANI, A.F. “Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a prática clínica”, *Revista da SOCERJ*, v. 15, n. 4, 2002.
- SCHERLE, W. “A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology”, *Mikroskopie*, v. 26, pp. 57-60. 1970.
- SCHIFFRIN, E. L., PARK, J. B., INTENGAN, H. D., et al. “Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan”. *Circulation*, v. 101, n. 14, pp. 1653-1659, 2000.
- SCHMAHL, G., RUDOLPH, D., NIEMANN, B. “X-ray microscopy studies”, *Optik*, v. 93, n. 3, pp. 95-102, 1993..
- ŠIMŮNEK, T., ŠTĚRBA, M., HOLEČKOVÁ, M., et al. “Myocardial content of selected elements in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits”, *Biometals*, v. 18, n. 2, p. 163-169, 2005.

- SIPAHI, I., DEBANNE, S.M., ROWLAND, D.Y., SIMON, D.I., FANG, J.C. “Angiotensin-receptor blockade and risk of cancer: meta-analysis of randomized controlled trials”, *The lancet oncology*, v. 11, n. 7, pp. 627-636, 2010.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. pp. 31-36, 317-342.
- SKOV, J., PERSSON, F., FRØKLÆR, J., CHRISTIANSEN, J.S. “Tissue renin-angiotensin systems: a unifying hypothesis of metabolic disease”, *Frontiers in endocrinology*, v. 5, 2014.
- SMITH, R. D., YOKOYAMA, H., AVERILL, D. B., et al. “Reversal of vascular hypertrophy in hypertensive patients through blockade of angiotensin II receptors”, *Journal of the American Society of Hypertension*, v. 2, n. 3, pp. 165-172, 2008.
- SOLÉ, V.A., PAPILLON E., COTTE M., et al. “A multiplatform code for the analysis of energy dispersive X-ray fluorescence spectra”, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 62, n. 1, pp. 63-68, 2007.
- SONTIA, B., & TOUYZ, R. M. “Role of magnesium in hypertension”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 458, n. 1, pp. 33-39, 2007.
- SOUZA, M.H.L., ELIAS, D.O. “Fundamentos da Circulação Extracorpórea”, 2ed. Rio de Janeiro, Centro Editorial Alfa Rio, 2006.
- SULLIVAN, J.M., FROHLICH, E.D., LEWIS, R.P., PASTERNAK, R.C. “Guidelines for training in adult cardiovascular medicine. Core Cardiology Training Symposium (COCATS). Task Force 10: training in preventive cardiovascular medicine”, *Journal of the American College of Cardiology*, v. 25, n. 1, pp. 33-34, 1995.
- SWINDLE, J. P., BUZINEC, P., IORGA, Ş.R., et al. “Long-term clinical and economic outcomes associated with angiotensin II receptor blocker use in hypertensive patients”. *Current medical research and opinion*, v. 27, n. 9, pp. 1719-1731, 2011.
- TANG, Y. R., ZHANG, S. Q., XIONG, Y., et al. “Studies of five microelement contents in human serum, hair, and fingernails correlated with aged hypertension and coronary heart disease”, *Biological trace element research*, v. 92, n. 2, pp. 97-103, 2003.

- THOMAS, C.J., RANKIN, A.J., HEAD, G.A., & WOODS, R.L. “ANP enhances bradycardic reflexes in normotensive but not spontaneously hypertensive rats”, *Hypertension*, v. 29, n. 5, pp. 1126-1132, 1997.
- THOMOPOULOS, C., PARATI, G., ZANCHETTI, A. “Effects of blood pressure-lowering on outcome incidence in hypertension: 5. Head-to-head comparisons of various classes of antihypertensive drugs—overview and meta-analyses”, *Journal of hypertension*, v. 33, n. 7, pp. 1321-1341, 2015.
- TIMMERMANS, P. “Angiotensin II receptor antagonists: an emerging new class of cardiovascular therapeutics”, *Hypertension Research*, v. 22, n. 2, pp. 147-153, 1999.
- TREVISAN, E., ZABUCCHI, G., PASCOLO, L., et al. “Histopathological data of iron and calcium in the mouse lung after asbestos exposure”. *Data in brief*, v. 6, pp. 769-775, 2016.
- TRIPPODO, N.C., FROHLICH, E.D. “Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat”, *Circulation Research*, v. 48, n. 3, pp. 309-319, 1981.
- TUBEK, S. “Role of trace elements in primary arterial hypertension”. *Biological trace element research*, v. 114, n. 1-3, pp. 1-5, 2006.
- UDENFRIEND, S., BUMPUS, F. M., FOSTER, H. L., et al. “Spontaneously hypertensive (SHR) rats: Guidelines for breeding, care, and use”, *Ilar News*, v. 19, n. 3, pp. G6-12, 1976.
- UESHIMA, K. “Magnesium and ischemic heart disease: a review of epidemiological, experimental, and clinical evidences”, *Magnesium Research*, v. 18, n. 4, pp. 275-284, 2005.
- VAN GRIEKEN, R., MARKOWICZ A., 2002, *Handbook of X-ray Spectrometry*. 2 ed. New York, Basel.
- WEBER, M.A., SCHIFFRIN, E.L., WHITE, W. B., et al. “Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community”, *The journal of clinical hypertension*, v. 16, n. 1, pp. 14-26, 2014.
- WU, L.S., GERARD, C., HUSSAIN, M.A. “Thermal analysis and solution calorimetry studies on losartan polymorphs”, *Pharmaceutical research*, v. 10, n. 12, pp. 1793-1795, 1993.

YAMORI, Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: De Jong W (ed.). Experimental and Genetic Models of Hypertension. Handbook of Hypertension. Elsevier, pp. 224-39, 1984.

ZHOU, M.S., SCHULMAN, I.H., ZENG, Q. “Link between the renin–angiotensin system and insulin resistance: Implications for cardiovascular disease”, *Vascular medicine*, v. 17, n. 5, pp. 330-341, 2012.