

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO
SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

VICTORIA MAIA VIANA MARCIAL

**EFEITOS DA GLUTATIONA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR EM
ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE RATAS
HIPERTENSAS**

Vitória
2022

VICTORIA MAIA VIANA MARCIAL

**EFEITOS DA GLUTATIONA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR EM
ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE RATAS
HIPERTENSAS**

Dissertação de Mestrado elaborada para o Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da Universidade do Espírito Santo (UFES) como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas;

Orientador: Prof^a Dr^a Sonia Alves Gouvea

Coorientador: Prof^o Dr^o Roger Lyrio dos Santos

Vitória
2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

M217e Maia Viana Marcial, Victoria, 1996-
Efeitos da Glutaciona sobre a Reatividade Vascular em
Artérias Mesentéricas de Resistência de Ratas Hipertensas /
Victoria Maia Viana Marcial. - 2022.
54 f. : il.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Sonia Alves Gouvea.

Coorientador: Prof^º Dr^º Roger Lyrio dos Santos.

Tese (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Glutaciona. 2. Reatividade Vascular. 3. Artérias
Mesentéricas. 4. Disfunção Hormonal. 5. Hipertensão. I. Alves
Gouvea, Prof^ª Dr^ª Sonia. II. Lyrio dos Santos, Prof^º Dr^º Roger.
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. IV. Título.

CDU: 612

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos que se desafiam, em especial minha mãe que sempre fez o impossível acontecer.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é estendida a todos que me apoiaram direta e indiretamente.

Agradeço a minha mãe que me ensinou fazer tudo com amor.

Agradeço a minha irmã que é minha fortaleza.

Agradeço a meu pai que sempre me incentivou.

Agradeço a minha parceira que fez meus dias mais alegres.

Agradeço a Izabela que esteve comigo do início ao fim.

Agradeço a Nathalie que foi minha mentora.

Agradeço a Rakel que sempre esteve disposta a me ajudar.

Agradeço aos colegas de laboratório LOCE, LABERV e demais.

Agradeço a professora Sonia por ter me acolhido.

Agradeço ao professor Roger por ter confiado em mim.

Agradeço a CAPES por ter fomentado meu trabalho.

“Nada é permanente a não ser a
mudança.”

Heráclito de Êfesos

RESUMO

A hipertensão arterial representa a principal condição de risco para cardiopatologias, sendo suas complicações mediadas por diversos mecanismos, como a disfunção endotelial, que é caracterizada pela baixa disponibilidade de óxido nítrico e pelo consequente desequilíbrio entre fatores de relaxamento e constrição das arteríolas. O estresse oxidativo está associado à disfunção endotelial e à hipertensão, devido ao excesso de produção de espécies reativas de oxigênio. O sistema antioxidante é responsável por inibir ou reduzir reações de oxidação e combater EROs e estresse oxidativo no nosso organismo. Assim, investigamos que o uso do antioxidante glutatona poderia ter efeito benéfico na hipertensão essencial associada à disfunção hormonal. Este estudo foi aprovado pela CEUA/UFES (nº23/2020). Ratas espontaneamente hipertensas (SHR) foram divididas em 4 grupos: (1) Sham, (2) Sham+ GSH (tratamento com a glutatona 200 mg de GSH/kg via intraperitoneal durante 21 dias) (3) OVX (ovariectomia) e (4) OVX+GSH. A aferição da pressão arterial foi feita por pletismografia de cauda e curvas dose-resposta foram realizadas em artérias mesentéricas de SHR utilizando fenilefrina e acetilcolina. Foram feitas incubações com L-NAME (*N_w*-nitro-L-arginine methyl ester-300 μ M) que é um dos inibidores das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) e com a indometacina (INDO - 10 μ M), inibidor da ciclooxigenase (COX). Os níveis vasculares de NO e peróxido de hidrogênio foram determinados *in situ* utilizando a sonda DAF-2 e DCF, respectivamente. Os dados foram analisados por ANOVA uma ou duas vias, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni/ Tukey. Foi considerado $p < 0,05$. Os resultados encontrados foram de que o tratamento com a glutatona não demonstrou melhorar os parâmetros hemodinâmicos, peso corporal e nem modificar a reatividade em vaso de resistência de animais SHR e reverter a hipertensão, porém foi observado que a GSH pode ser capaz de melhorar e manter a vasodilatação quando o NO está atenuado. Sugerimos que a GSH pode exercer efeito modulatório nos mediadores endoteliais e potencializar a vasodilatação em ratas SHR ovariectomizadas.

Palavras-chaves: Glutaciona; Reatividade Vascular; Artérias Mesentéricas; Disfunção Hormonal; Hipertensão;

ABSTRACT

Arterial hypertension represents the main risk condition for cardiopathologies, and its complications are mediated by several mechanisms, such as endothelial dysfunction, characterized by the low availability of nitric oxide and imbalance between factors of relaxation and constriction of arterioles. Oxidative stress (OS) is associated with endothelial dysfunction and hypertension, due to the excess production of reactive oxygen species (ROS). The antioxidant system is responsible for inhibiting or reducing oxidation reactions and fighting ROS and OS in our body. Thus, we investigated that the use of the antioxidant glutathione (GSH) could have a beneficial effect on essential hypertension associated with hormonal dysfunction. This study was approved by CEUA/UFES (n°23/2020). Spontaneously hypertensive rats (SHR) were divided into 4 groups: (1) Sham, (2) Sham+ GSH (treatment with 200 mg GSH/kg intraperitoneally for 21 days) (3) OVX (ovariectomy) and (4) OVX+GSH. Blood pressure was measured by tail plethysmography and dose-response curves were performed in mesenteric arteries of the SHR using phenylephrine and acetylcholine. Incubations were performed with L-NAME (N ω -nitro-L-arginine methyl ester-300 μ M), which is one of the inhibitors of nitric oxide synthase (NOS) enzymes, and with indomethacin (INDO - 10 μ M), a cyclooxygenase (COX) inhibitor. Vascular levels of NO and hydrogen peroxide were determined in situ using the DAF-2 and DCF probe, respectively. Data were analyzed by one-way or two-way ANOVA, followed by the post-hoc Bonferroni/Tukey test. It was considered $p < 0.05$. The results found were that the treatment with GSH did not improve hemodynamic parameters, body weight or modify the resistance vessel reactivity of SHR animals to reverse hypertension, however it was observed that GSH may be able to improve and maintain vasodilation when NO is attenuated. We suggest that GSH may exert a modulatory effect on endothelial mediators and potentiate vasodilation in ovariectomized SHR rats.

Keywords: Glutathione; Vascular Reactivity; Mesenteric Arteries; Hormonal Dysfunction; Hypertension;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema ilustrativo da reatividade vascular em miógrafo de arame (Hagihara, 2012, Adaptado: Mulvany e Halpern, 1977).....21

Figura 2 Valores da Pressão Arterial Sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em ratas SHR no início e no final do tratamento de 21 dias com Glutathione. Sham (n = 9), Sham+GSH (n=9), OVX (n= 9) e OVX GSH (n = 9). Todos os valores foram expressos com média \pm EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de duas via (two-way ANOVA) seguida pelo Tukey Post Hoc test. *P < 0, 05.....26

Figura 3 Valores de Frequência Cardíaca em ratas SHR no início e no final do tratamento de 21 dias com Glutathione. Sham (n = 9), Sham+GSH (n=9), OVX (n= 9) e OVX GSH (n = 9). Todos os valores foram expressos com média \pm EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de duas via (two-way ANOVA) seguida pelo Tukey Post Hoc test. *P < 0, 05.....26

Figura 4 Reatividade vascular à acetilcolina (ACh, 0,1 nM -10 M) de todos os grupos. (A) curva concentração-resposta à ACh (B) área abaixo da curva (AUC) e (C) resposta de relaxamento máximo à ACh (RM_{ax}.) (n = 9). Sendo (*) diferente do grupo Sham. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo Tukey Post Hoc test. *P < 0, 05.....27

Figura 5: Participação do NO no efeito vasodilatador da ACh (0,1 nM -10 M) em artérias mesentéricas de resistência de ratas SHR. (A) curva concentração-resposta à ACh todos os grupos controle; (B) inibição não seletiva da NOS com L-NAME (300 μ M) nos grupos Sham (n=9), Sham+GSH (n=9), OVX (n=9) e OVX+GSH (n=9). (C) área abaixo da curva (AUC) e (D) resposta de relaxamento máximo à ACh (RM_{ax}.) Os valores foram expressos com média \pm EPM. * p < 0.01. Para a análise utilizou-se ANOVA uma via. Sendo (*) diferente do Sham, (#) diferente do OVX e (\$) diferente de Sham+GSH.29

Figura 6 Participação dos prostanóides no efeito vasodilatador da ACh (0,1 nM -10 M) em artérias mesentéricas de resistência de ratas SHR. (A) curva dose-resposta à ACh todos os grupos controle; (B) efeito da inibição da COX com INDO (10 μ M) nos grupos Sham (n=9), Sham+GSH (n=9), OVX (n=9) e OVX+GSH (n=9). (C) área abaixo da curva (AUC) e (D) resposta de relaxamento máximo à ACh (RM_{ax}.) Os valores foram expressos com média \pm EPM. * p < 0.05. Para a análise utilizou-se ANOVA uma via. Sendo (*) diferente do Sham, (#) diferente do OVX e (\$) diferente de Sham+GSH.30

Figura 7 Participação do NO e dos prostanóides em artérias mesentéricas de resistência de ratas SHR de todos os grupos ACh Controle (n=9), L-NAME (n=9) e INDO (n=9). (A) curva concentração-resposta Sham; (B) AUC Sham; (C) R_{max} Sham. (D) curva concentração-resposta Sham+GSH; (E) AUC Sham+GSH; (F) R_{max} Sham+GSH. (G) curva concentração-resposta OVX; (H) AUC OVX; (I) R_{max} OVX. (J) curva concentração-resposta OVX+GSH; (K) AUC OVX+GSH; (L) R_{max} OVX+GSH. Os valores foram expressos com média \pm EPM. * p < 0.01. Para a análise utilizou-se ANOVA uma via. Sendo (*) diferente do Controle, (#) diferente do L-NAME e (\$) diferente de INDO.31

Figura 8 Reatividade vascular à fenilefrina (PE, 0,1 nM -10 M) em todos os grupos. (A) curva concentração-resposta à PE (B) área abaixo da curva (AUC) e (C) resposta máxima à PE

(RM_{áx.}) (n= 9). Sendo (*) diferente do Sham, (#) diferente do OVX e (\$) diferente de OVX+GSH.32

Figura 9 Participação do NO no efeito vasoconstritor da PE (0,1 nM -10 M) em artérias mesentéricas de resistência de ratas SHR. (A) curva dose-resposta à PE todos os grupos controle; (B) inibição não seletiva da NOS com L-NAME (300 µM) nos grupos Sham (n=9), Sham+GSH (n=9), OVX (n=9) e OVX+GSH (n=9). (C) área abaixo da curva (AUC) e (D) resposta de contração máxima à PE (RM_{áx.}) Os valores foram expressos com média ± EPM. *p < 0.01. Para a análise utilizou-se ANOVA uma via. Sendo (*) diferente do Sham, (#) diferente do OVX e (\$) diferente de OVX+GSH.33

Figura 10 Participação dos prostanoides no efeito vasoconstritor da PE (0,1 nM -10 M) em artérias mesentéricas de resistência de ratas SHR. (A) curva dose-resposta à PE todos os grupos controle; (B) efeito da inibição da COX pela INDO (10 µM) nos grupos Sham (n=9), Sham+GSH (n=9), OVX (n=9) e OVX+GSH (n=9). (C) área abaixo da curva (AUC) e (D) resposta de contração máxima à PE (RM_{áx.}) Os valores foram expressos com média ± EPM. * p < 0.01. Para a análise utilizou-se ANOVA uma via. Sendo (*) diferente do Sham, (#) diferente do OVX e (\$) diferente de OVX+GSH.34

Figura 11 Participação do NO e dos prostanóides em artérias mesentéricas de resistência de ratas SHR de todos os grupos PE Controle (n=9), L-NAME (n=9) e INDO (n=9). (A) curva concentração-resposta Sham; (B) AUC Sham; (C) R_{máx} Sham. (D) curva concentração-resposta Sham+GSH; (E) AUC Sham+GSH; (F) R_{máx} Sham+GSH. (G) curva concentração-resposta OVX; (H) AUC OVX; (I) R_{máx} OVX. (J) curva concentração-resposta OVX+GSH; (K) AUC OVX+GSH; (L) R_{máx} OVX+GSH. Os valores foram expressos com média ± EPM. * p < 0.01. Para a análise utilizou-se ANOVA uma via. Sendo (*) diferente do Controle, (#) diferente do L-NAME e (\$) diferente de INDO.35

Figura 12 (A) Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por *diamonofluoresceina* (DAF) em artérias mesentéricas de ratas SHR nos quatro grupos. Barra de escala = 20 µm. Os valores foram expressos com média ± EPM. * p < 0.05. Para a análise utilizou-se ANOVA uma via seguida do teste post hoc de Tukey. (B) Gráfico representativo da microscopia de fluorescência emitida por DAF-2 em artérias mesentéricas de resistência dos quatro grupos. Os valores foram expressos com média ± EPM. *p < 0,05, A análise estatística foi realizada por meio de two-way ANOVA seguida pelo teste post hoc de Tukey. Sendo (*) diferente do Sham, (#) diferente do OVX.36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dados ponderais dos animais SHR.....	25
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh Acetilcolina	i.p Injeção Intraperitoneal
ATP Adenosina Trisfosfato	INDO Indometacina
AUC Área abaixo da curva	L-NAME N ^ω -nitro-L-arginina metil éster
COX Ciclooxygenase	NO Óxido Nítrico
DAF Diamonofluoresceína	NOO⁻ Peroxinitrito
DCF Diclorofluoresceína	NOS Óxido Nítrico Sintase
DCVs Doenças Cardiovasculares	OCT Optimum cutting temperature
EDRF Fator Relaxante Derivado do Endotélio	PA Pressão Arterial
EDHF Fator Hiperpolarizante Dependente do Endotélio	PAS Pressão Arterial Sistólica
eNOS Óxido Nítrico Sintase Endotelial	PBS Fosfato-salino ou phosphate buffered saline
EO Estresse Oxidativo	PGI₂ Prostaciclina
EPM Erro Padrão da Média	PE Fenilefrina
ERNs Espécies reativas de nitrogênio	R_{máx} Resposta máxima
EROs Espécies reativas de oxigênio	SHR Ratas Espontaneamente Hipertensas
FC Frequência Cardíaca	HO[•] Radical hidroxila
GSH Glutationa Reduzida	WHO World Health Organization
H₂O₂ Peróxido de hidrogênio	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	17
3.1.1 Grupos Experimentais	17
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS REALIZADOS	18
3.2.1 Ovariectomia	18
3.2.2 Cirurgia de simulação da ovariectomia.....	19
3.2.3 Tratamento com Glutathione	19
3.2.4 Avaliação não Invasiva da Pressão Arterial (Pletismografia de cauda).....	19
3.2.5 Estudo da reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência ...	20
3.2.6 Viabilidade muscular e endotelial	21
3.2.7 Protocolos de reatividade vascular.....	22
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4 RESULTADOS	25
4.1 PESO CORPORAL E DOS ÓRGÃOS.....	25
4.2 PRESSÃO ARTERIAL	25
4.3 PROTOCOLO DE REATIVIDADE VASCULAR	26
4.3.1 Relaxamento induzido pela Acetilcolina	26
4.3.2 Mediadores Endoteliais envolvidos na resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina	27
4.3.3 Contração induzida pela Fenilefrina	31
4.3.4 Mediadores endoteliais envolvidos na resposta de contração induzida pela fenilefrina	32
4.5 ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA.....	36
4.5.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	36
4.5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂)...	36

5 DISCUSSÃO.....	38
6 CONCLUSÃO	44
7 REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) correspondem a um grupo de doenças do coração e dos vasos sanguíneos que acometem cerca de 17,9 milhões de vidas a cada ano, sendo a causa de morte que predomina em todo o mundo de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2022). Dentre os fatores de risco para as cardiopatologias, a hipertensão arterial representa a principal condição de risco, sendo responsável por significativa contribuição na carga global das doenças e nos anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (MALTA *et al.*, 2015), pois conforme Simone (2006), níveis elevados de pressão arterial (PA), aumentam as chances de doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, doença vascular encefálica, insuficiência renal crônica e óbito. A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2022), estima que cerca de 1,28 bilhões de pessoas tenham hipertensão, com crescimento global de 60% dos casos até 2025, sendo que sua prevalência é heterogênea em âmbito mundial, pois de acordo com Mills *et al.* (2020), há variações culturais dos níveis de fatores de risco, como alta ingestão de sódio, baixa ingestão de potássio, obesidade, consumo de álcool, sedentarismo e alimentação pouco saudável. Vale ressaltar que um estudo recente feito pelo Imperial College London e a WHO, publicado no *The Lancet*, estimou que mais de 700 milhões de pessoas não tem conhecimento nem tratam a hipertensão (ZHOU *et al.*, 2021).

A instalação e o desenvolvimento das DCVs de acordo com Matuz-Mares *et al.* (2021), estão intimamente ligadas a alterações metabólicas que geram um estado de estresse oxidativo (EO), devido ao excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), sendo ele o responsável por danos celulares provindos de radicais livres ou não radicais, que para Júnior (2001), seriam respectivamente, toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados ou quando dois radicais livres compartilham seus elétrons desemparelhados. É importante salientar que a causa da hipertensão é poligênica e caracterizada funcionalmente pelo aumento na resistência vascular periférica e a diminuição no débito cardíaco, sendo mencionado na literatura diversos tipos de hipertensão, porém é de consenso classificar duas categorias, uma chamada hipertensão primária ou essencial que seria quando a causa é desconhecida e outra quando a causa pode ser encontrada, chamada de hipertensão secundária. Sabe-se que a hipertensão causa alterações morfológicas e funcionais, sendo a disfunção

endotelial um traço comum que pode levar ao desenvolvimento das DCVs. Além disso, já está bem estabelecido que a prevalência da hipertensão difere entre homens e mulheres, pois níveis mais elevados de PA são encontrados em homens até 50 anos quando comparado às mulheres, quadro este que é revertido a partir da 5ª década de vida (RECKELHOFF, 2018). Perante este fato, vários mecanismos etiopatogênicos têm sido estudados com objetivo de correlacionar a falta do estrogênio que apresenta ações protetoras sobre o sistema cardiovascular e surgimento das DCVs em mulheres no climatério. Ademais, sabe-se que a menopausa é um período caracterizado pela perda gradual da função ovariana e da capacidade reprodutiva, instalando-se um hipoestrogenismo (BECHLIOULIS *et al.*, 2012).

Diante da proteção que o estrogênio exerce sobre o sistema cardiovascular, várias pesquisas apontam que o hipoestrogenismo ou deficiência hormonal estão associados à redução da vasodilatação, devido a uma disfunção endotelial que culmina em um aumento na incidência de DCVs em mulheres na pós-menopausa (HAMMES, LEVIN, 2007; PEDROSA, *et al.* 2009; DA ROCHA MACIEL *et al.* 2021; MARTINS *et al.* 2021). O comprometimento do sistema cardiovascular proveniente do hipoestrogenismo ocorre primeiramente por um aumento na pressão arterial sanguínea e um aumento na prevalência da hipertensão que culmina no aparecimento de várias outras DCVs (SANTOS *et al.*, 2016). Ainda sobre a hipertensão, é importante salientar que de acordo com Mattei *et al.* (1997), suas complicações são mediadas por diversos mecanismos cujo traço comum é a disfunção endotelial, caracterizada pela baixa disponibilidade de óxido nítrico (NO) e pelo consequente desequilíbrio local entre fatores de relaxamento e constrição de arteríolas, característica essa que foi demonstrada em pacientes com hipertensão essencial, bem como em modelos animais.

Considerando Konukoglu e Uzun (2016), a disfunção endotelial decorre do desequilíbrio entre a produção de NO pela sintase endotelial (eNOS) ou a transformação do NO no radical livre peroxinitrito (NOO^\cdot), ou seja, a vasodilatação mediada por vários peptídeos, incluindo a bradicinina e angiotensina 1-7, é prejudicada, o que leva ao aumento da resistência vascular periférica e à alteração da permeabilidade endotelial. Segundo Boos e Lip (2006), a instalação de um estado inflamatório crônico em pacientes com hipertensão, pelo aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (como moléculas de adesão leucocitária, endotelina-1,

angiotensina II), reduz a expressão da eNOS, enquanto o aumento do estresse oxidativo acelera a degradação do NO, levando a um estado disfuncional. Todavia, nos últimos anos, de acordo com Bernatova *et al.*, (2009), tornou-se evidente que dentre as várias condições fisiopatológicas associada à disfunção endotelial, incluindo a hipertensão, sendo entendido por Dikalov e Ungvari (2013), que o aumento de PA é diretamente proporcional ao aumento de EO.

Reckelhoff (2018) e Grunfeld *et al.*, (1995), afirmam que as EROs são conhecidas por interagirem com diferentes fatores vasoativos liberados pelo endotélio e também são capazes de reduzir a atividade de canais de potássio ativados por cálcio envolvidos em respostas mediadas pela hiperpolarização dependente do endotélio, além de participar na ativação da ciclooxigenase (COX) e na produção subsequente de fatores de contração derivados do endotélio. A regulação do tônus vascular é realizada pelas células endoteliais que produzem numerosas substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras. No que se refere aos vasoconstritores libertados pelo endotélio destacam-se os derivados do ácido araquidônico, o ânion superóxido (O_2^-), endotelina 1 e a angiotensina II. Já na vasodilatação, o endotélio relaxa a musculatura lisa vascular através de três mediadores principais, o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF) (FÉLÉTOU, KÖHLER, VANHOUTTE, 2010). Em condições de inflamação, a atividade da COX aumenta, principalmente a COX2 que é induzida pelo processo. Isto faz com que o endotélio produza grandes quantidades de EROS como o O_2^- e o radical hidroxila (HO^\bullet) que, por sua vez, diminuem a biodisponibilidade do NO endotelial e o seu efeito vasodilatador, além do efeito vasoconstritor do O_2^- (FERNANDES, 2013).

Atualmente existem várias terapias para combater e prevenir a hipertensão e no âmbito fisiológico, compreende-se que existem mecanismos de defesa do próprio organismo, dentre eles, o sistema antioxidante, que de acordo com Apak (2019), seria um sistema que inibe ou atrasa indesejadas reações de oxidação, eficaz para combater danos das EROs e do EO. Descalzo e Sancho (2008), dividem os agentes oxidantes em não enzimáticos (ou dietéticos) e enzimáticos, sendo os dietéticos compostos de baixo peso molecular, como minerais, vitaminas (E,C,B2), β -caroteno, ácido úrico e GSH (glutationa reduzida) e flavonóides obtidos via alimentação e os agentes endógenos representados por enzimas oriundas do metabolismo celular, como a superóxido dismutase, a catalase, a glutaciona peroxidase, a glutaciona transferase, a

tioredoxina e a peroxirredoxinas. A GSH é conceituada por Huber *et al.* (2008) e Meister (1988a), como um tripeptídeo (γ -glutamilcisteinilglicina), ou seja, possui três aminoácidos, Glutamato, Cisteína e Glicina utilizados para sua síntese. A união de glutamato com cisteína a partir da enzima gama-glutamil cisteína sintetase forma um dipeptídeo gama glu cis glutamato cisteína, e toda enzima com o nome sintetase, usa ATP (adenosina trifosfato) para fazer a sua reação acontecer, então essa moeda metabólica da célula, usa a energia metabólica para construção de uma molécula que tem principalmente função antioxidante.

A GSH é o mais abundante tiol de baixa massa molecular. O grupo tiol seria todo enxofre ligado a um hidrogênio e a um carbono, e toda vez que essa união está presente ela dá uma certa característica química para a molécula geralmente caracterizado por um odor característico de enxofre (gás de cozinha) e quimicamente são grupos que tem grande habilidade de doar elétrons, ou seja, tem muita habilidade de serem agentes redutores, fazendo com que outra molécula reduza e doe elétrons, por isso a presença desse grupo na glutathione. Esse antioxidante é encontrado intracelularmente em altas concentrações essencialmente em todos os organismos aeróbicos e possui um papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. Naturalmente a GSH atua como um fornecedor de elétrons para outros compostos, sendo essa habilidade de doar elétrons o que a faz ser um bom redutor (MEISTER, 1988a). Jan, Ali e Haq (2011), elucidam que a GSH é sintetizada principalmente no fígado que é o órgão central regulador da maioria das vias metabólicas, (BISWAS; RAHMAN, 2009)., mas está presente ubiquamente em todas as células (LU, 2013)

A glutathione, inicia sua história em 1888 quando Rey-Pailhade descobriu que as células de levedura continham uma substância que reagia espontaneamente com o enxofre elementar resultando em sulfeto de hidrogênio, substância essa nomeada por ele de "philothion" (MEISTER, 1988b). Em seus demais estudos, Rey-Pailhade (1928), estabeleceu a presença generalizada de *philothion* em tecidos animais e vegetais, o que o levou à conclusão de que o composto continha cisteína que pode sofrer oxidação reversível a uma forma dissulfeto na presença de oxigênio. Mas somente em 1921, Hopkins extraiu do tecido muscular, um composto posteriormente aceito como *philotion*, que relatou que era auto-oxidável e continha ácido glutâmico, bem como cisteína. Na ausência de uma composição definitiva, ele sugeriu que

provisoriamente, para facilitar a referência, o nome glutathione talvez fosse admissível (HOPKINS, 1921). Contudo, Hunter e Eagles em 1927, contestaram a visão de Hopkins de que a glutathione era um dipeptídeo de ácido glutâmico e cisteína, afirmando em um relatório que o composto era possivelmente um tripeptídeo (HUNTER; EAGLES, 1927). De acordo com Noctor *et al.* (2011), dois anos depois, o desenvolvimento de um novo procedimento para a preparação do composto na forma cristalina confirmou que a glutathione era de fato um tripeptídeo de ácido glutâmico, cisteína e glicina, e no mesmo ano, conferiu a Hopkins o Prêmio Nobel por este e outros trabalhos sobre vitaminas e fatores nutricionais.

A GSH tem múltiplas funções fisiológicas, como regulação do ciclo celular, catabolismo de xenobióticos e fonte importante de cisteína, que é importante para a geração de ligações sulfidríla entre dois tióis, sendo essa característica fundamental para doação de elétrons estabelecendo sua função antioxidante (MEISTER 1983). Contudo, no que tange suas funções no sistema cardiovascular, alguns poucos estudos mencionam benefícios, como que ela é capaz de prevenir o desacoplamento da eNOS ou seja, evita que ela produza superóxido ao invés de NO (LIMA *et al.*, 2010), ajuda a prolongar a biodisponibilidade do NO (RUIZ-RAMIREZ, *et al.*, 2014), também é capaz de si conjugar com NO para formar S-nitrosoglutathione que parece ser eficaz para o tratamento da hipertensão (EL HAFIDI, 2006), além de fornecer proteção contra EO, EROS e ERNS (MEISTER, 1983). As evidências em animais trazem que a GSH tem propriedades antioxidantes e antiaterogênicas, já evidências de estudos em humanos mostra que pacientes com DCVs tem um baixo nível plasmático de GSH. Também é pontuado que o aumento do nível de GSH leva à diminuição dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (BAJIC, 2019).

Embora existam estudos que demonstram os efeitos da GSH, poucas informações são descritas em relação aos seus efeitos sobre o leito mesentérico em animais hipertensos e com deficiência hormonal. Diante de todas estas informações, testamos a hipótese de que o tratamento com glutathione tenha um efeito benéfico na hipertensão essencial associada à disfunção hormonal. Esses efeitos podem estar relacionados a redução da disfunção endotelial em artérias mesentéricas de resistência, levando em consideração que é o principal local de controle da pressão arterial, à otimização da função vascular diante da redução do estresse oxidativo promovendo melhor resposta vasodilatadora. Portanto, o presente estudo teve como objetivo

estudar os efeitos do tratamento com a glutathione durante 21 dias sobre parâmetros cardiovasculares, principalmente, sobre a reatividade vascular mesentérica de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) e ovariectomizadas, já que de acordo com Ulker *et al.*, dentre os modelos experimentais, o SHR desenvolvido por Okamoto e Aoki em (1963), é o mais bem aceito para se estudar a hipertensão essencial humana e seu uso se justifica pela fisiopatogenia da hipertensão similar à dos humanos, além de possuírem níveis elevados de EROs que diferem conforme o envelhecimento e diferenças sexuais (FAZAN, SILVA, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os efeitos do tratamento com Glutathione sobre a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência em ratas espontaneamente hipertensas ovariectomizadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar os efeitos da glutathione sobre o relaxamento e contração dependente do endotélio em artérias mesentéricas de resistência;
- Investigar os efeitos da GSH sobre os mediadores endoteliais envolvidos na vasodilatação induzida pela Acetilcolina (ACh) e vasoconstrição induzida pela Fenilefrina (PE) após incubação com INDO (indometacina) e L-NAME (N^ω-nitro-L-arginina metil éster);
- Investigar os efeitos do tratamento com GSH sobre a pressão arterial e frequência cardíaca;
- Investigar a formação de H₂O₂ e NO em artérias mesentéricas de resistência;
- Coletar dados antropométricos como peso corporal e dos órgãos;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas ratas adultas da linhagem SHR (Spontaneously Hypertensive Rat) isogênico, com idade entre 12 a 14 semanas e aproximadamente 200 g. Os animais foram fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde – CCS da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os protocolos de pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFES (CEUA 23/2020). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes de pesquisa biomédica para o cuidado e uso de animais de laboratório, conforme diretrizes do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA-MCT, 2006).

Os animais foram mantidos em ambiente com iluminação artificial (ciclo claro-escuro de 12h) em temperatura de 20 – 24°C e umidade relativa do ar (40% a 60%) controladas de acordo com o recomendado para biotérios de pesquisa e foram aleatoriamente distribuídos e abrigados em grupos de quatro com espaço para movimentação em caixas de polipropileno devidamente forradas com maravalha, que permitiu a ingestão *ad libitum* de água e ração padrão para biotérios (LABGOLD RC 20MM, SP - Brasil).

3.1.1 Grupos Experimentais

As ratas SHR foram randomicamente separadas em quatro diferentes grupos experimentais:

- **Grupo 1:** Sham (Ovariectomia fictícia) e tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) via intraperitoneal (ip) durante 21 dias;
- **Grupo 2:** Sham + GSH (Ovariectomia fictícia) e tratadas com Glutathione (200 mg de GSH/kg) via intraperitoneal (ip) durante 21 dias;
- **Grupo 3:** OVX (Ovariectomizadas) e tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) via intraperitoneal (ip) durante 21 dias;
- **Grupo 4:** OVX + GSH (Ovariectomizadas) e tratadas com Glutathione (200 mg de GSH/kg) via intraperitoneal (ip) durante 21 dias;

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS REALIZADOS

3.2.1 Ovariectomia

A cirurgia de ovariectomia foi realizada nas ratas do grupo 2 (OVX) e 3 (OVX+GSH) conforme protocolo descrito por Silva (2020), e ocorreu após as ratas completarem oito semanas de vida. As ratas receberam anestesia geral de solução aquosa com mistura de ketamina (70 mg.kg⁻¹) anestésico geral e xilazina (10 mg.kg⁻¹) substância sedativa e relaxante muscular por via intraperitoneal (i.p). Antes de iniciar a cirurgia e durante todo decorrer do procedimento cirúrgico, a efetividade da anestesia geral foi checada pela compressão da cauda, patas e olhos para avaliar os reflexos periféricos juntamente com o controle da frequência respiratória através da observação visual. Após anestesia, fixou-se as ratas em camas cirúrgicas em decúbito lateral com gaze estéril embebida em soro fisiológico a 0,9% nos olhos, a fim de prevenir o ressecamento do globo ocular.

Após a anestesia geral, foi realizada bilateralmente a tricotomia do pêlo na região lateral, seguida pela antissepsia do campo operatório com álcool iodado. Foi realizado um pequeno corte longitudinal com extensão média de 1 cm com tesoura na camada epitelial. Após a sua identificação dentro da massa de tecido adiposo, o ovário foi exposto para fora da cavidade abdominal com o auxílio de uma pinça. Com fio absorvível, foi realizado uma sutura simples para ligadura das tubas uterinas e artérias ováricas em cada região adjacente ao ovário para a contenção de hemorragia da vasculatura local. O ovário foi retirado junto a tecidos moles adjacentes e as trompas foram reposicionadas dentro da cavidade abdominal.

Por fim, foi realizada a sutura local, sendo que na camada muscular e no peritônio foi feita uma sutura contínua com fio de sutura absorvível e na camada epitelial da pele uma sutura com pontos simples com fio de nylon de modo a fechar as margens. Tais procedimentos descritos foram realizados bilateralmente. Após a cirurgia, os animais permaneceram sob observação e foram isolados em gaiolas individuais e posicionados em local aquecido para prevenção de hipotermia até a completa recuperação da anestesia geral. No pós-operatório todos os animais foram medicados com analgésico (Flunixin meglumine, uma dose de 2,5 mg.kg⁻¹) via intramuscular e dipirona (uma gota) via de administração oral.

3.2.2 Cirurgia de simulação da ovariectomia

No Grupo 1 (Sham) e o Grupo 2 (Sham+GSH) foi realizada cirurgia de simulação de ovariectomia, em que todos procedimentos acima foram realizados nas mesmas condições descritas, incluindo a exposição dos ovários, exceto pela sutura de ligadura das trompas e a remoção dos mesmos, a fim de estabelecer parâmetros semelhantes em todos os animais deste estudo.

3.2.3 Tratamento com Glutathione

A GSH foi administrada através da via intraperitoneal, pois de acordo com Greenfield (2019), a injeção intraperitoneal é uma via comum de administração para pequenos roedores, pois fornece rápida drenagem no sistema linfático, que dá acesso ao sistema vascular, além de ser descrita por Nurulain *et al.* (2015), como a opção que permite a circulação sistêmica rápida comparada administração intramuscular ou oral, sendo assim a mais adequada em quantificar o verdadeiro efeito dos compostos. Lomaestro e Malone (1995) e Matuz-Mares *et al.*, (2021) pontuam que com administração oral da GSH, há uma baixa biodisponibilidade e com a administração intravenosa foi encontrado uma meia-vida curta (2 min). Portanto, os animais do Grupo Sham+GSH e OVX+GSH foram tratados de forma crônica por 21 dias com Glutathione Cristalizada em forma reduzida $\geq 99\%$ (L-Glutathione reduced 50g) da Sigma-Aldrich, sendo 200mg de GSH/kg de peso corporal dissolvido em NaCl a 0,9% (100mg/1 ml) duas vezes por semana (BRAVENBOER *et al.*, 1992) com o total de seis doses de 0,7ml pela via i.p.

3.2.4 Avaliação não Invasiva da Pressão Arterial (Pletismografia de cauda)

A medida da pressão arterial e frequência cardíaca por pletismografia de cauda foi realizada antes e após os procedimentos experimentais, como a castração, o tratamento e a reatividade vascular a fins de comparação. Previamente aos registros oficiais, os animais foram condicionados durante 10 minutos no equipamento (Insight Equipamentos EFF 306, V12.11, Bivolt) durante três dias, para que fossem familiarizados e adaptados, com o objetivo de minimizar a influência do estresse sobre a pressão arterial. Nos dias do registro os animais foram aquecidos em uma câmara de retenção com um cuff de pulso pneumático acoplado na região proximal da cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e o valor da PAS foi

coletado automaticamente por meio de sinais do transdutor acoplado a um computador, como descrito por Baldo *et al.*, (2018). A temperatura foi controlada entre 29 °C e 40 °C durante a coleta dos dados, por um período máximo de 15 minutos de permanência no equipamento. Foi obtida a média de cinco registros no mínimo com diferença máxima de 10 mmHg, sendo descartados os registros associados às influências causadas por movimentos dos animais.

3.2.5 Estudo da reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência

Para a avaliação da reatividade vascular das artérias mesentéricas de resistência foi utilizado o método de Mulvany e Halpern (1977), onde os animais foram eutanasiados por decapitação, sem a utilização de anestésicos, a fim de evitar a interferência nos padrões de resposta (HATANO *et al.*, 1989) e tiveram o leito mesentérico isolado, removido e colocado em uma placa de Petri contendo solução de Krebs a 4 °C (composição em mM: NaCl 119; KCl 4,7; KH₂PO₄ 0,4; NaHCO₃ 14,9; MgSO₄.7H₂O 1,17; CaCl₂.2H₂O 1,6 e glicose 5,5). O protocolo utilizado foi adaptado de Peixoto *et al.*, (2017), onde as artérias mesentéricas da terceira ramificação foram identificadas, isoladas e dissecadas dos tecidos circundantes não vasculares (tecido adiposo), posteriormente foram cortadas em segmentos de 2,0 mm de comprimento com o auxílio de um microscópio para dissecação. Dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias e fixados em um miógrafo de arame para vasos de resistência previamente descrito por Mulvany e Halpern (1977) e ilustrado na figura 1 para o estudo da tensão isométrica. Os segmentos arteriais foram mantidos em solução de Krebs e aerados com carbogênio, a 37 °C. As respostas foram registradas por meio de um sistema de aquisição e análise informatizado e acoplado a transdutores isométricos denominados (620 M; Danish Myo Technology - DMT, Dinamarca) e o percentual de relaxamento e contração foram determinados utilizando um sistema de aquisição de dados LabChart 8 (AD Instruments Pty Ltd., Nova SouthWales, Austrália).

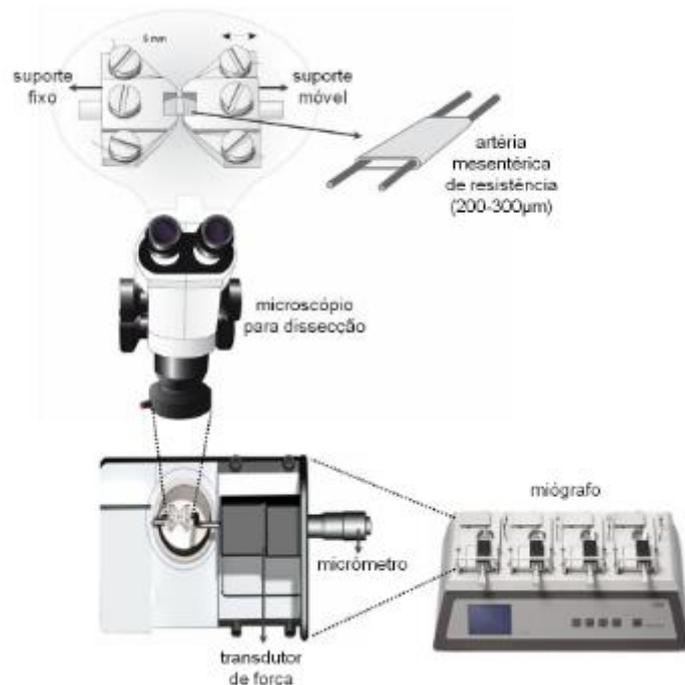


Figura 1 Esquema ilustrativo da reatividade vascular em miógrafo de arame (Hagihara, 2012, Adaptado: Mulvany e Halpern, 1977).

3.2.6 Viabilidade muscular e endotelial

Para testar a viabilidade muscular e a resposta contrátil máxima do segmento, foi realizada uma pré contração adicionando à cuba 223 mg de cloreto de potássio (KCl) à 25 ml de solução de Krebs específica para Mulvany, (composição em mM): NaCl (119), KCl (4.7), KH₂PO₄ (0.4), NaHCO₃ (14.9), MgSO₄.7H₂O (1.17), CaCl₂.2H₂O (2.5) e glicose (5.5) a 37 °C e gaseificada com mistura carbogênica (5 % CO₂ e 95 % O₂), durante 5 minutos. Já a viabilidade e integridade do endotélio foram testadas após o período de 3 lavagens intervaladas por 15 minutos e estabilização em resposta a administração de acetilcolina (10µM, ACh), que é um vasodilatador dependente de endotélio em vasos pré-contraídos com fenilefrina (3µM PE). Para as curvas de concentração resposta com endotélio, os anéis foram considerados com endotélio intacto quando o relaxamento obtido foi maior que 80% em resposta a ACh e sem endotélio, quando menor que 10%. As curvas concentração-resposta foram obtidas antes e após incubações com INDO e L-NAME.

3.2.7 Protocolos de reatividade vascular

- i. com objetivo de avaliar a participação do NO na resposta vasodilatadora da Glutathiona nas artérias mesentéricas de resistência, a curva dose resposta foi realizada antes e após o uso de um inibidor inespecífico da NOS, L-NAME (300 μ M) adicionado à cuba por 30 minutos;
- ii. o mesmo protocolo foi realizado para avaliar a participação da PGI₂ na resposta vasodilatadora, no qual, o inibidor da enzima COX, indometacina (10 μ M) foi adicionado à cuba durante 30 minutos;

3.2.8 Diamonofluoresceína (DAF-2)

O terceiro ramo das artérias mesentéricas de resistência foi isolado, limpo e dissecado dos tecidos aderentes e imediatamente congelado em líquido de crioproteção (TissueTek - optimum cutting temperature, OCT). Os blocos contendo as artérias foram armazenados em freezer a -80°C até o momento do preparo das lâminas no criostato (-25°C , sem iluminação; lâminas de $10\ \mu\text{m}$ de espessura). As lâminas foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento dos experimentos. Baseando-se no proposto por Costa *et al.* (2018) com algumas modificações, as lâminas foram gelatinizadas com solução de gelatina a 1% mais água destilada (1 g de gelatina para 100 ml de água destilada), etiquetadas e levadas ao criostato onde as amostras com OCT foram cortadas a $10\ \mu\text{m}$ e a -20°C . Posteriormente foram armazenadas na geladeira. Após essa preparação das lâminas, é feita uma câmara escura forrada com papel Watmann umedecido com água do Milli Q que servem de base para as lâminas com os cortes que são levadas para a estufa a 37° por 30 minutos com a intenção de derreter o OCT para que posteriormente ele seja lavado com solução tampão de PBS (fosfato-salino ou phosphate buffered saline, 200uL) para remover o excesso.

Após essa lavagem a caixa com as lâminas retornou para a estufa a 37° por 30 minutos e finalmente depois desse processo, as seis lâminas para cada grupo, ao abrigo da luz, foram incubadas com o corante fluorescente diacetato de 4, 5 - diaminofluoresceína (DAF-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), que é uma sonda de permeabilidade à membrana não fluorescente, que reage com NO e produz DAF-2, um derivado fluorescente e DAF + L-NAME na quantidade de 200uL para a avaliação da produção de NO. Brevemente, as lâminas do grupo DAF foram incubadas com DAF-2 ($10\ \mu\text{M}$) por 30 minutos, em 37°C , para investigar a produção basal de NO. E as lâminas DAF-2 + L-NAME ($300\ \mu\text{M}$) foram incubadas por 30 minutos sendo um controle negativo para a produção de NO. Posteriormente as lâminas são secadas com o uso do secador e conduzidas ao microscópio de fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão de 515 e 500 nm, respectivamente, indicativo da formação de NO (HETRICK; SCHOENFISCH, 2009). Dessa forma, foram obtidas imagens digitais na objetiva de 40x, no microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager. As imagens foram analisadas no programa Image J 1.48, usando a função de análise de densidade óptica de fluorescência da área de interesse (ROI manager).

3.7.2 Diclorofluoresceína (DCF)

Foi utilizado o protocolo de Giesen *et al.*, (2020) e Somberg *et al.* (2017), com algumas modificações. Foi feita a análise da produção de H_2O_2 em cortes de artéria mesentérica através da microscopia de fluorescência realizada de maneira indireta, através da utilização das sonda 2',7 Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA; Invitrogen). O DCF é uma sonda permeável à membrana celular e não fluorescente. Entretanto, na presença de espécies reativas, especialmente o H_2O_2 , este composto é oxidado no interior da célula e produz um composto fluorescente, 2, 7-diclorofluoresceína (DCF) que permanece intracelular. Brevemente, após a gelatinização, cortes no criostato e preparação das lâminas na estufas semelhantemente ao protocolo de DAF-2, foram incubadas 6 lâminas para cada grupo ao abrigo da luz. As seis lâminas foram incubada com DCF ($10 \mu M$) por 30 minutos, em $37^\circ C$, para investigar a produção basal de H_2O_2 . Já as outras seis foram incubadas com DCF + Catalase pelo mesmo tempo, ($1000 UI/ml$), sendo um controle de que a fluorescência observada será proveniente do H_2O_2 . Imagens digitais foram obtidas na objetiva de 40x, usando o microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager analisadas no programa Image J 1.48, usando a função de análise de densidade óptica de fluorescência da área de interesse (ROI manager).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa estatístico GraphPad Prism (versão 8.00, EUA). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A comparação entre os grupos foi realizada por meio da análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA), e para verificar entre quais grupos houveram diferenças foi utilizado o teste *post hoc* de Bonferroni, já na análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA) foi utilizado o teste *post hoc* de Tukey. O nível de significância foi estabelecido para valores de $p < 0,05$ e o teste de normalidade utilizado foi o Shapiro-Wilk.

4 RESULTADOS

4.1 PESO CORPORAL E DOS ÓRGÃOS

O tratamento com a GSH não alterou o peso corporal das ratas como pode ser observado na Tabela 1. O fígado apresentou diferença entre grupos, quando comparado o grupo Sham com o OVX+GSH. O peso do útero foi realizado para confirmar a eficácia da castração e como já era esperado devido à retirada dos hormônios sexuais e observado na tabela 1, houve uma redução nesta variável nas ratas ovariectomizadas (OVX) quando comparado com as ratas Sham.

Tabela 1 Dados ponderais dos animais SHR

Órgãos	Sham	Sham + GSH	OVX	OVX + GSH
Peso corporal final (g)	172 ± 0,00	181 ± 0,00	191 ± 0,00	191 ± 0,00
Fígado (g/mm)	0,214 ± 0,01	0,233 ± 0,01	0,250 ± 0,01	0,268 ± 0,01*
Útero Úmido (mg/mm)	0,009 ± 0,01	0,009 ± 0,01	0,004 ± 0,01*	0,003 ± 0,01*#
Útero Seco (mg/mm)	0,001 ± 0,01	0,002 ± 0,01	0,001 ± 0,01*	0,001 ± 0,01*#

Os valores foram expressos como média \pm EPM. Na tabela são apresentados dados relativos, de modo que o peso em miligramas (mg) dos órgãos, foi corrigido pela tibia, em milímetros (mm). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo Tukey Post Hoc test. *P < 0,05 vs Sham, # vs OVX.

4.2 PRESSÃO ARTERIAL

A figura 2 indica os valores pressóricos nos quatro grupos analisados. Podemos observar que o tratamento de 21 dias com a Glutathione, não foi capaz de reduzir os valores da pressão arterial sistólica, sendo os valores iniciais (Sham: 189,3 ± 3; Sham+GSH: 198,5 ± 8; OVX: 194,8 ± 5; OVX+GSH: 206,8 ± 6), e os finais (Sham: 195,3 ± 3; Sham+GSH: 183,3 ± 8; OVX: 204,1 ± 5; OVX+GSH: 194,4 ± 6) O tratamento também se mostrou ineficaz em alterar a frequência cardíaca, como demonstrado na figura 3, sendo os valores iniciais (Sham: 359 ± 2; Sham+GSH: 350 ± 8; OVX: 362,5 ± 8; OVX+GSH: 369 ± 6) e os finais (Sham: 355,7 ± 2; Sham+GSH: 366,7 ± 8; OVX: 398,6 ± 8; OVX+GSH: 380,7 ± 6).

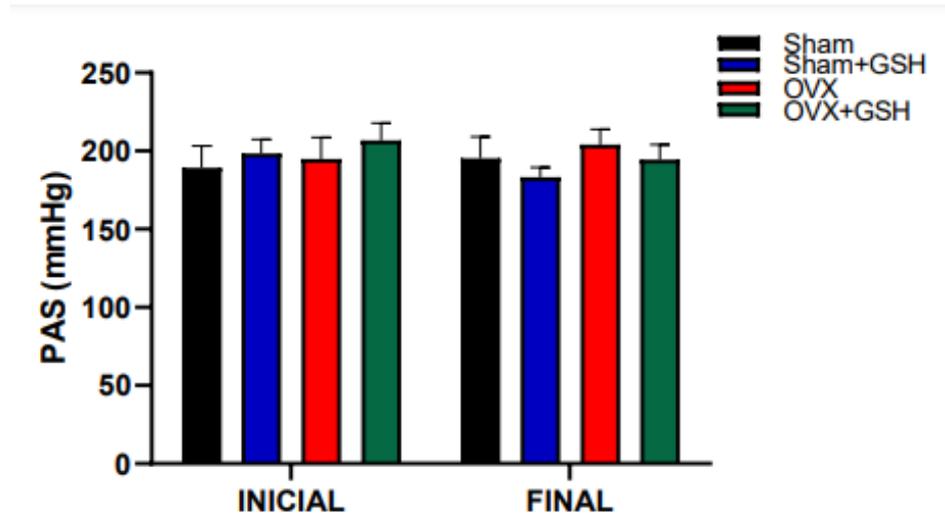


Figura 2 Valores da Pressão Arterial Sistólica (PAS) por pletismografia de cauda em ratas SHR no início e no final do tratamento de 21 dias com Glutathione. Sham ($n = 9$), Sham+GSH ($n=9$), OVX ($n= 9$) e OVX GSH ($n = 9$). Todos os valores foram expressos com média \pm EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de duas via (two-way ANOVA) seguida pelo Tukey Post Hoc test. * $P < 0, 05$

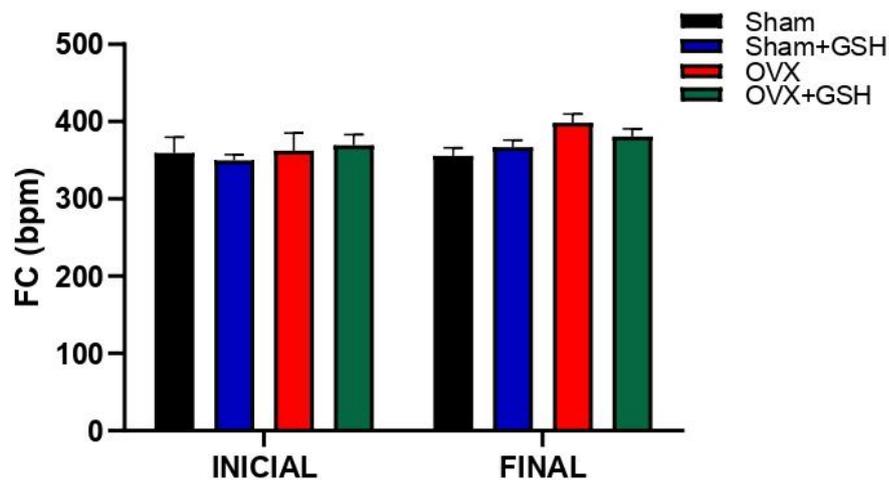


Figura 3 Valores de Frequência Cardíaca em ratas SHR no início e no final do tratamento de 21 dias com Glutathione. Sham ($n = 9$), Sham+GSH ($n=9$), OVX ($n= 9$) e OVX GSH ($n = 9$). Todos os valores foram expressos com média \pm EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de duas via (two-way ANOVA) seguida pelo Tukey Post Hoc test. * $P < 0, 05$

4.3 PROTOCOLO DE REATIVIDADE VASCULAR

4.3.1 Relaxamento induzido pela Acetilcolina

Os resultados a seguir estão configurados dentro do protocolo de reatividade mesentérica de resistência de ratas espontaneamente hipertensas, de modo que na figura 4A o eixo y corresponde ao percentual de relaxamento induzido pela ACh, em relação a contração máxima alcançada pela pré-contração à PE ($3 \mu M$). Observamos que ambos grupos de ratas ovariectomizadas responderam de forma

semelhante ao relaxamento induzido pela ACh (OVX: 54 ± 9 e OVX+GSH: 54 ± 10). Adicionalmente, tanto a análise de área abaixo da curva (AUC) (figura 4B) (Sham: 257 ± 34 ; Sham+GSH: 210 ± 29 , OVX: 276 ± 30 , OVX+GSH: 274 ± 21), como a resposta máxima (R_{máx}) (figura 4C) (Sham: 84 ± 6 ; Sham+GSH: 82 ± 6 , OVX: 85 ± 5 , OVX+GSH: 90 ± 3) não apresentaram diferenças.

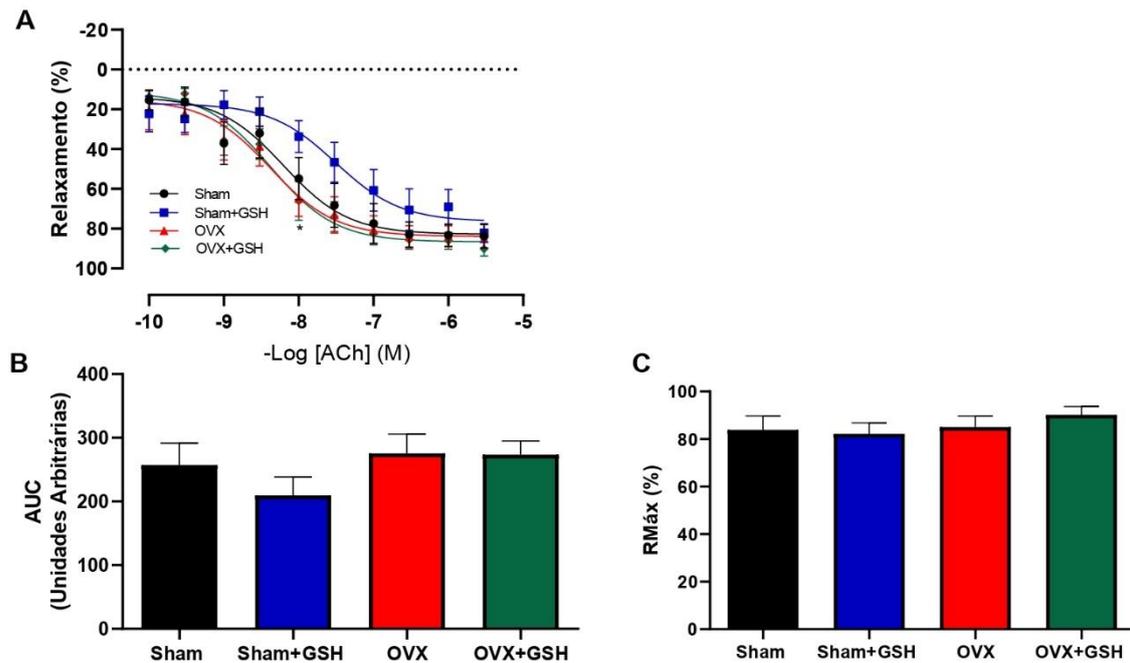


Figura 4 Reatividade vascular à acetilcolina (ACh, 0,1 nM -10 M) de todos os grupos. (A) curva concentração-resposta à ACh (B) área abaixo da curva (AUC) e (C) resposta de relaxamento máximo à ACh (RMáx.) (n = 9). Sendo (*) diferente do grupo Sham. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo Tukey Post Hoc test. *P < 0,05

4.3.2 Mediadores Endoteliais envolvidos na resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina

Os mediadores endoteliais, PGI₂ e EDRF (fator relaxante derivado do endotélio) envolvidos no relaxamento induzido pela ACh foram investigados após inibições inespecíficas. O gráfico 5A demonstra a curva de dose-resposta à ACh de todos os grupos, e para verificar a participação da via do NO, os vasos foram incubados com inibidor inespecífico da NOS (L-NAME – 300 μM) (figura 5B) (Sham: 31 ± 7 ; Sham+GSH: $9,5 \pm 2$; OVX: 17 ± 4 ; OVX+GSH: 34 ± 9). Após 30 minutos de incubação, observamos que o grupo Sham+GSH apresentou uma redução na resposta de relaxamento induzida pela ACh. Ao analisarmos o grupo OVX, observamos que esse grupo apresenta um relaxamento comprometido ao comparar com o grupo Sham. De forma interessante, o tratamento com GSH em ratas castradas

promoveu uma recuperação da resposta de relaxamento induzida pela ACh. Nas análises da AUC (figura 5C) podemos observar o padrão de resposta descrito acima. Após inibição com L-NAME, os grupos Sham+GSH e OVX, apresentaram uma redução nos valores de AUC (Sham:157,4±20; Sham+GSH: 48,53±18, OVX: 87,43±18, OVX+GSH: 171,7±27) e o tratamento nas ratas castradas promoveu aumento nesse parâmetro. Na resposta máxima (R_{máx}) (figura 5D) (Sham: 61,65±11; Sham+GSH: 24,32±10, OVX: 87,43±40; OVX+GSH: 88,12±76), observamos que houve aumento no que diz respeito ao efeito vasodilatador induzido pela ACh nos grupos OVX e OVX+GSH em relação ao Sham+GSH.

O papel dos prostanóides comparado com o grupo controle (figura 6A), foi avaliado na presença do inibidor da ciclooxigenase (INDO, 10 µM) e observamos que o relaxamento do grupo apresentado na curva (figura 6B) com a inibição da COX, se mostrou diferente em relação ao gráfico controle (figura 6A) desde a quarta até a décima dose. Já na figura 6C que mostra o gráfico de AUC, não foram observadas diferenças (Sham: 347,7±42; Sham+GSH: 205±50, OVX: 222,7±34, OVX+GSH: 290±18) e na R_{máx} (figura 6D) (Sham: 98±0; Sham+GSH: 69,25±10; OVX: 88,53±5, OVX+GSH: 98±0), o grupo Sham+GSH se mostrou diferente do grupo OVX+GSH. Afim de entender como se deu a resposta dos grupos sem incubação (grupo controle) e com incubações com L-NAME e INDO foram expostos os gráficos de concentração resposta, AUC e R_{máx} de todos os grupos (Sham, Sham+GSH, OVX e OVX+GSH) na figura 7. Observamos que o grupo Sham demonstrou diferença entre a resposta com L-NAME e a resposta com INDO no que se trata da AUC e R_{máx}, esse mesmo dado foi demonstrado no grupo Sham+GSH, ainda que com a diferença entre o controle e o L-NAME. Já os grupos ovariectomizados (OVX e OVX+GSH) demonstraram ter diferenças entre o controle e o L-NAME e entre o L-NAME e INDO.

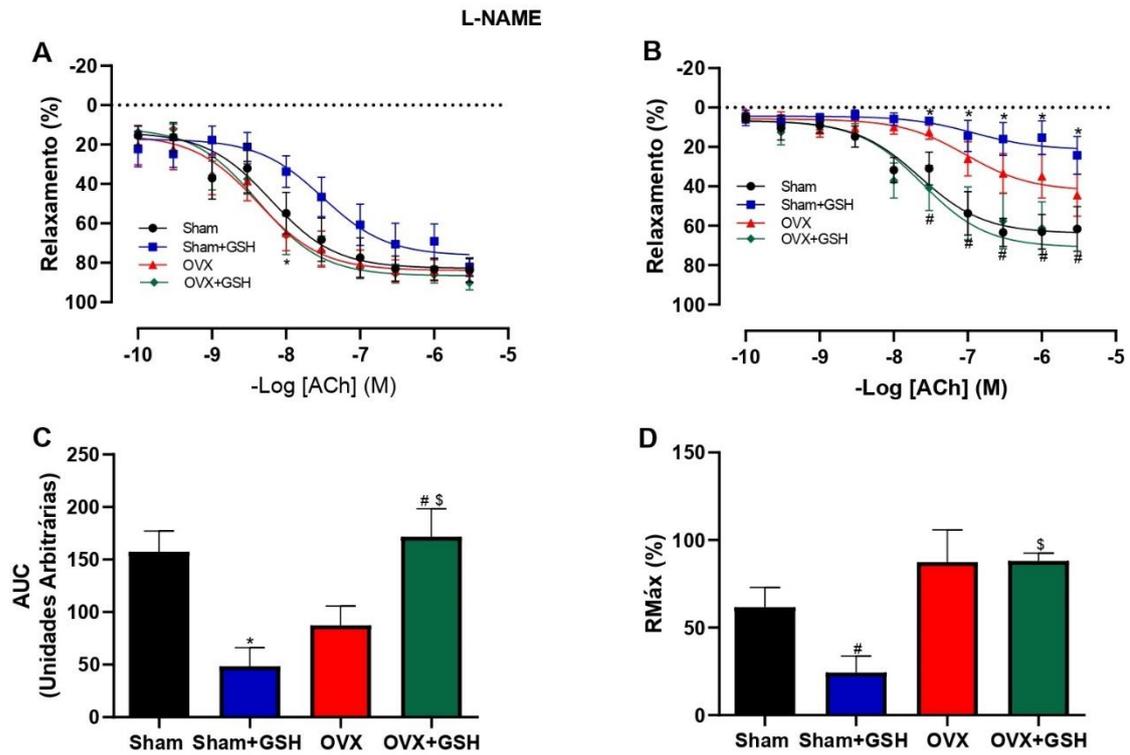


Figura 5: Participação do NO no efeito vasodilatador da ACh (0,1 nM -10 M) em artérias mesentéricas de resistência de ratas SHR. (A) curva concentração-resposta à ACh todos os grupos controle; (B) inibição não seletiva da NOS com L-NAME (300 μ M) nos grupos Sham (n=9), Sham+GSH (n=9), OVX (n=9) e OVX+GSH (n=9). (C) área abaixo da curva (AUC) e (D) resposta de relaxamento máximo à ACh (RMáx.) Os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0.01$. Para a análise utilizou-se ANOVA uma via. Sendo (*) diferente do Sham, (#) diferente do OVX e (\$) diferente de Sham+GSH.

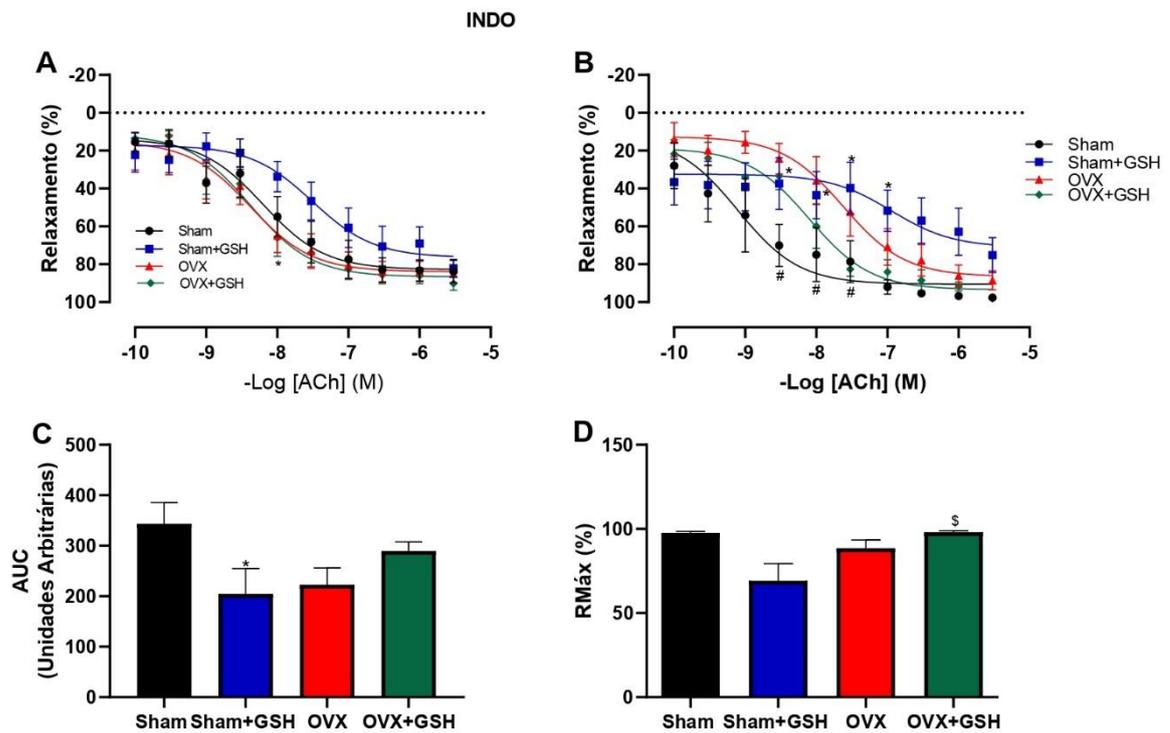


Figura 6 Participação dos prostanoídeos no efeito vasodilatador da ACh (0,1 nM -10 M) em artérias mesentéricas de resistência de ratas SHR. (A) curva dose-resposta à ACh todos os grupos controle; (B) efeito da inibição da COX com INDO (10 μ M) nos grupos Sham (n=9), Sham+GSH (n=9), OVX (n=9) e OVX+GSH (n=9). (C) área abaixo da curva (AUC) e (D) resposta de relaxamento máximo à ACh (RMáx.) Os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0.05$. Para a análise utilizou-se ANOVA uma via. Sendo (*) diferente do Sham, (#) diferente do OVX e (\$) diferente de Sham+GSH.

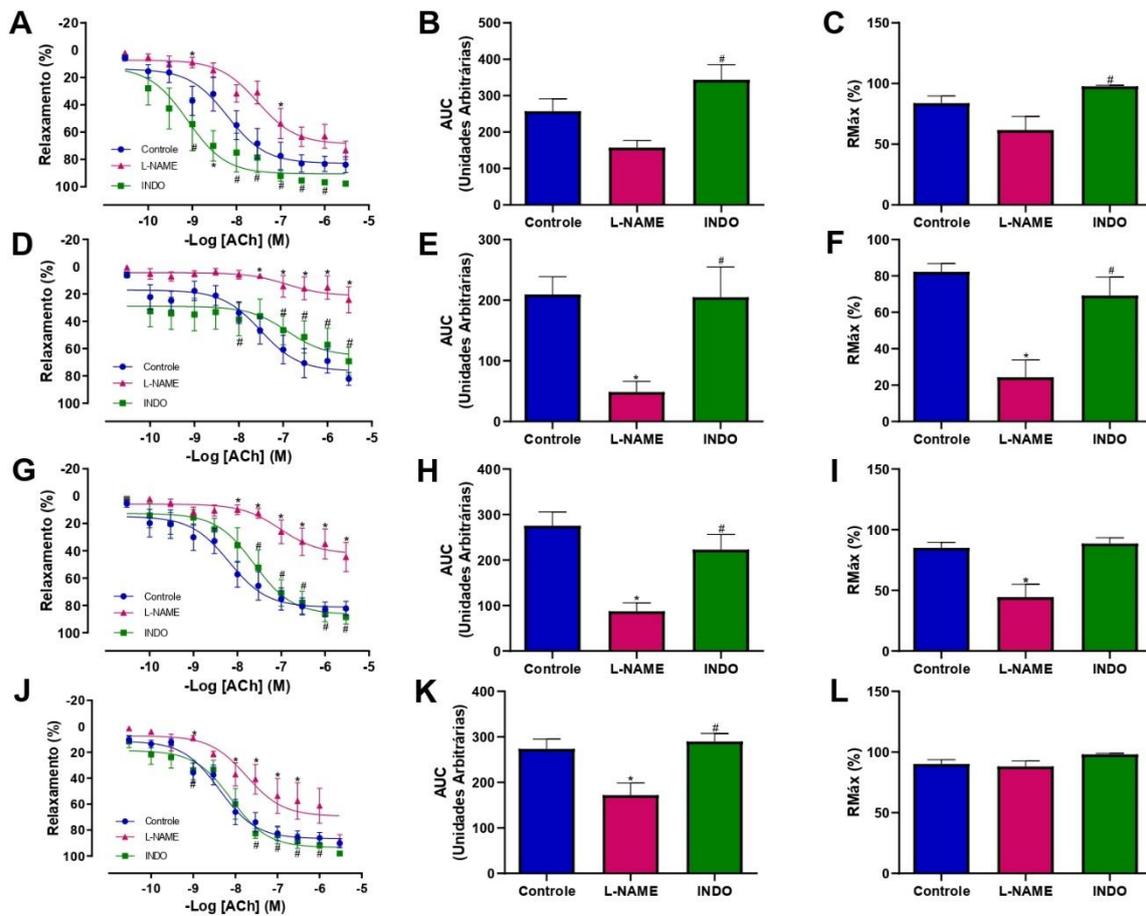


Figura 7 Participação do NO e dos prostanoïdes em artérias mesentéricas de resistência de ratas SHR de todos os grupos ACh Controle ($n=9$), L-NAME ($n=9$) e INDO ($n=9$). (A) curva concentração-resposta Sham; (B) AUC Sham; (C) Rmáx Sham. (D) curva concentração-resposta Sham+GSH; (E) AUC Sham+GSH; (F) Rmáx Sham+GSH. (G) curva concentração-resposta OVX; (H) AUC OVX; (I) Rmáx OVX. (J) curva concentração-resposta OVX+GSH; (K) AUC OVX+GSH; (L) Rmáx OVX+GSH. Os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0.01$. Para a análise utilizou-se ANOVA uma via. Sendo (*) diferente do Controle, (#) diferente do L-NAME e (\$) diferente de INDO.

4.3.3 Contração induzida pela Fenilefrina

Os resultados a seguir demonstram o protocolo de reatividade mesentérica de resistência de ratas SHR, de modo que na figura 7A o eixo y corresponde ao percentual de contração induzido pela PE. Observamos que houve diferença na curva em todos os grupos em relação ao Sham+GSH no que tange ao potencial de vasoconstrição (Sham: 8 ± 2 ; Sham+GSH: 3 ± 1 ; OVX: $11 \pm 1,6$; OVX+GSH: $8,5 \pm 2$). Na análise da AUC (Figura 7B) (Sham: 40 ± 7 ; Sham+GSH: $17 \pm 1,7$, OVX: 60 ± 11 , OVX+GSH: 42 ± 5), diferenças foram encontradas entre o grupo Sham+GSH, OVX e OVX+GSH, já na Rmáx (Figura 7C) (Sham: $15,7 \pm 1,4$; Sham+GSH: $8,4 \pm 0$; OVX: $19 \pm 1,6$ OVX+GSH: $18,3 \pm 1$), as diferenças apareceram entre o grupo Sham+GSH e os demais (Sham, OVX e OVX+GSH).

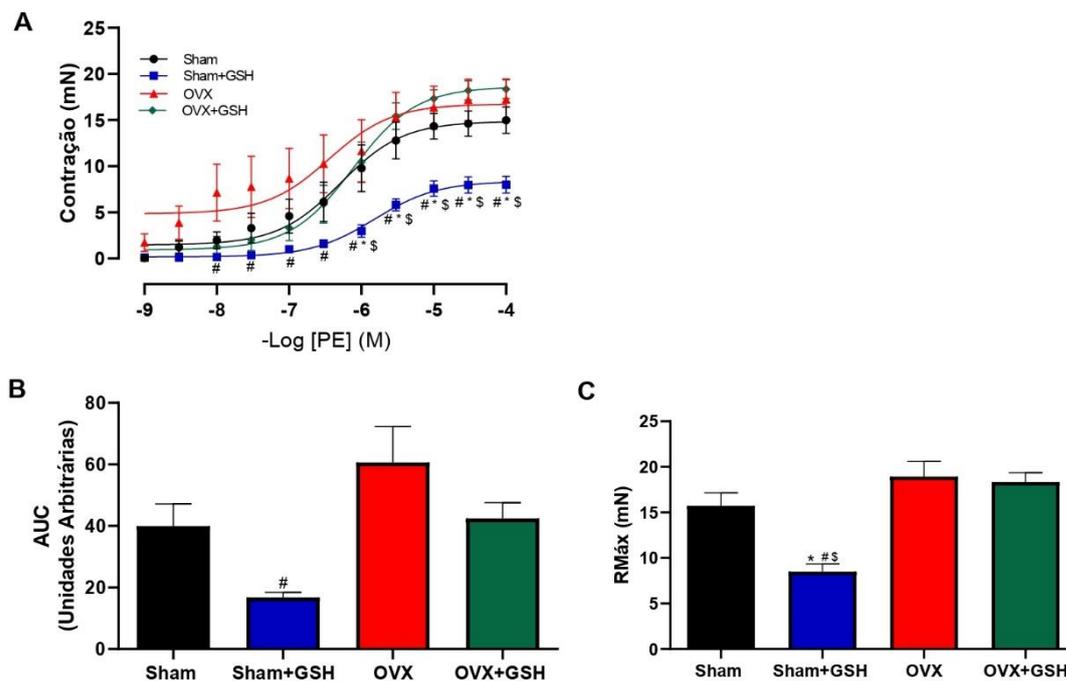


Figura 8 Reatividade vascular à fenilefrina (PE, 0,1 nM -10 M) em todos os grupos. (A) curva concentração-resposta à PE (B) área abaixo da curva (AUC) e (C) resposta máxima à PE (RMáx.) (n= 9). Sendo (*) diferente do Sham, (#) diferente do OVX e (\$) diferente de OVX+GSH.

4.3.4 Mediadores endoteliais envolvidos na resposta de contração induzida pela fenilefrina

Os mediadores endoteliais avaliados, envolvidos na vasoconstrição induzido pela PE foram investigados após a inibição inespecífica da NOS (com L-NAME – 300 μ M) ilustrado na figura 8B e afim de comparação, a figura 8A demonstra os resultados encontrados na curva de dose-resposta de todos os grupos controle. As curvas apresentaram diferenças em diversas doses nos diferentes grupos (Sham: 12 ± 1 ; Sham+GSH: $3,7 \pm 0$; OVX: 11 ± 2 ; OVX+GSH: $10 \pm 9,5$), sendo que o grupo Sham+GSH demonstrou uma redução da resposta vasoconstritora em comparação com os demais grupos. Já no que se trata da AUC (figura 8C) (Sham: $60 \pm 9,5$; Sham+GSH: $19,4 \pm 3,7$; OVX: 60 ± 9 ; OVX+GSH: 48 ± 6) e da Rmáx (figura 8D) (Sham: $18,35 \pm 1$; Sham+GSH: $5,4 \pm 0$; OVX: $17,90 \pm 2$; OVX+GSH: 21 ± 1) com inibição da enzima NOS, observamos que a resposta do grupo Sham+GSH foi diminuída em relação aos grupos Sham, o OVX e OVX+GSH.

O papel dos prostanóides foi avaliado diante do uso do inibidor da COX (INDO, 10 μ M) e no gráfico de dose-resposta à PE exposto na figura 9A, observamos a curva referente ao controle e ao compararmos com a curva de dose resposta após a inibição

(figura 9B), vemos que houve diferença em várias doses e grupos (Sham: 8 ± 1 ; Sham+GSH: 3 ± 1 ; OVX: 9 ± 2 ; OVX+GSH: 4 ± 1), sendo que ambos grupos tratados demonstraram ter respostas semelhantes à inibição dos prostanoídes. A AUC (figura 9C) (Sham: $41,7 \pm 9,5$; Sham+GSH: $14 \pm 2,5$; OVX: 45 ± 11 ; OVX+GSH: 20 ± 2) foi diferente ao comparar o grupo Sham+GSH com o Sham e OVX. Já a análise da R_{máx} (figura 9D) (Sham: 15 ± 1 ; Sham+GSH: 9 ± 1 ; OVX: 18 ± 2 ; OVX+GSH: 13 ± 0) mostrou que o grupo Sham+GSH foi diferente do Sham, OVX e OVX+GSH. No que se trata da resposta dos grupos sem incubação (grupo controle) e com incubações com L-NAME e INDO, foram expostos os gráficos de concentração resposta, AUC e R_{máx} de todos os grupos (Sham, Sham+GSH, OVX e OVX+GSH) conforme ilustrado na figura 11. Dentre todos os grupos, apenas o OVX+GSH que demonstrou diferença na AUC, sendo diferente controle e INDO e L-NAME e INDO.

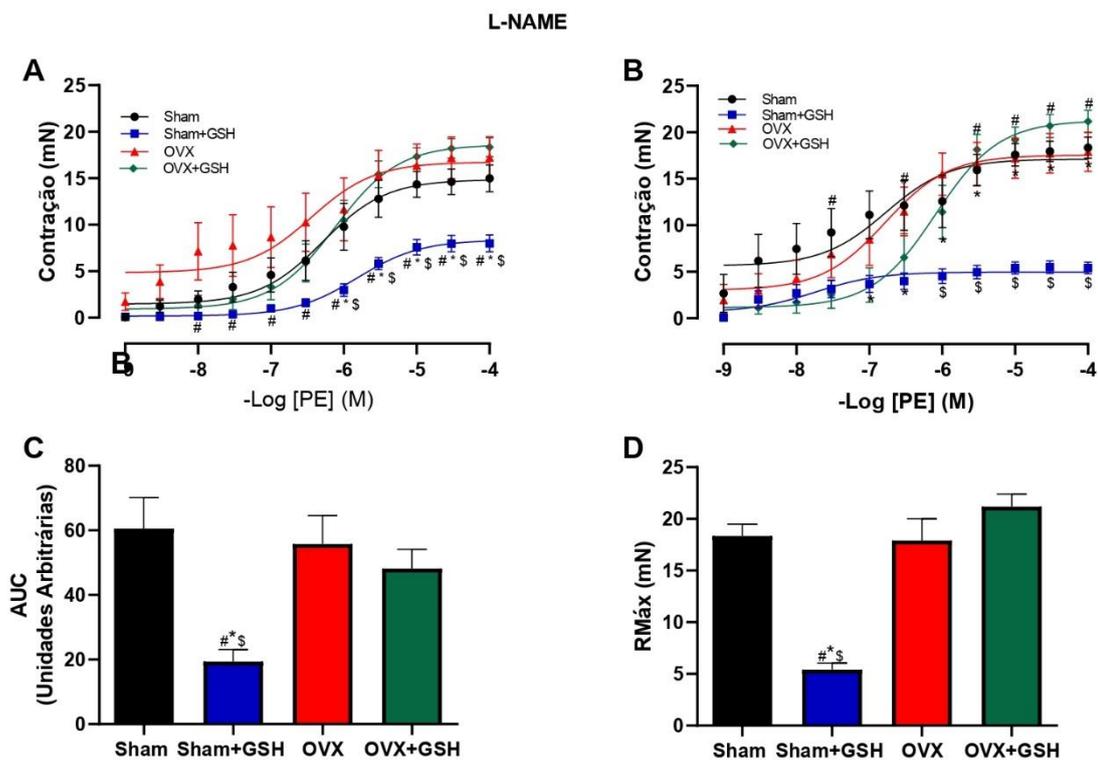


Figura 9 Participação do NO no efeito vasoconstritor da PE (0,1 nM - 10 M) em artérias mesentéricas de resistência de ratas SHR. (A) curva dose-resposta à PE todos os grupos controle; (B) inibição não seletiva da NOS com L-NAME (300 μ M) nos grupos Sham (n=9), Sham+GSH (n=9), OVX (n=9) e OVX+GSH (n=9). (C) área abaixo da curva (AUC) e (D) resposta de contração máxima à PE (RMáx.) Os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0.01$. Para a análise utilizou-se ANOVA uma via. Sendo (*) diferente do Sham, (#) diferente do OVX e (\$) diferente de OVX+GSH.

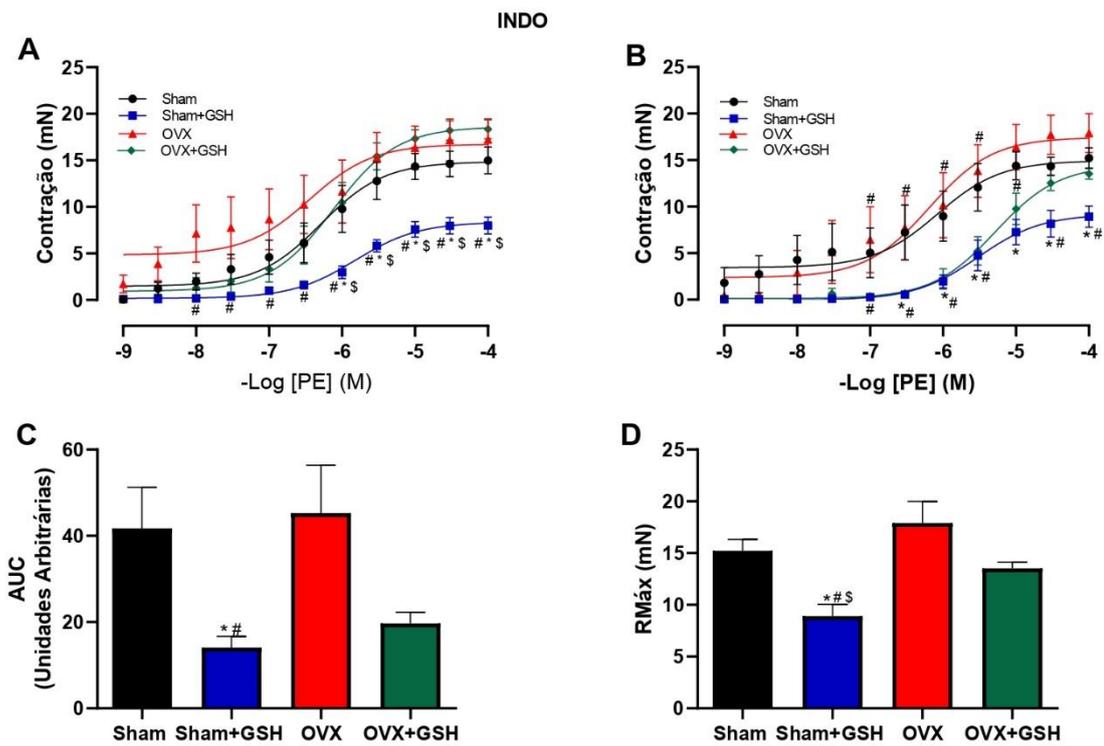


Figura 10 Participação dos prostanoídeos no efeito vasoconstritor da PE (0,1 nM -10 M) em artérias mesentéricas de resistência de ratas SHR. (A) curva dose-resposta à PE todos os grupos controle;(B) efeito da inibição da COX pela INDO (10 μ M) nos grupos Sham (n=9), Sham+GSH (n=9), OVX (n=9) e OVX+GSH (n=9). (C) área abaixo da curva (AUC) e (D) resposta de contração máxima à PE (RMáx.) Os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0.01$. Para a análise utilizou-se ANOVA uma via. Sendo (*) diferente do Sham, (#) diferente do OVX e (\$) diferente de OVX+GSH.

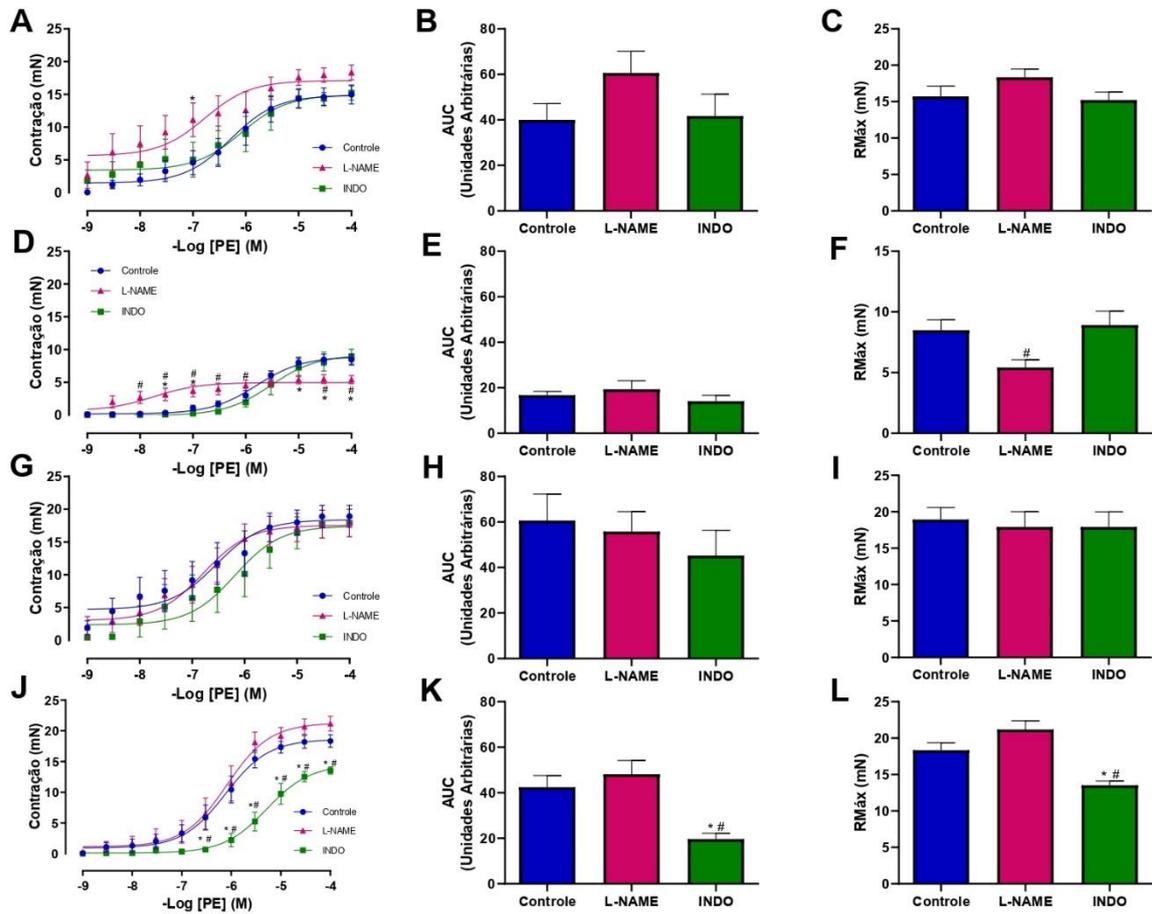


Figura 11 Participação do NO e dos prostanoïdes em artérias mesentéricas de resistência de ratos SHR de todos os grupos PE Controle ($n=9$), L-NAME ($n=9$) e INDO ($n=9$). (A) curva concentração-resposta Sham; (B) AUC Sham; (C) Rmáx Sham. (D) curva concentração-resposta Sham+GSH; (E) AUC Sham+GSH; (F) Rmáx Sham+GSH. (G) curva concentração-resposta OVX; (H) AUC OVX; (I) Rmáx OVX. (J) curva concentração-resposta OVX+GSH; (K) AUC OVX+GSH; (L) Rmáx OVX+GSH. Os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0.01$. Para a análise utilizou-se ANOVA uma via. Sendo (*) diferente do Controle, (#) diferente do L-NAME e (\$) diferente de INDO.

4.5 ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA

4.5.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Os níveis de NO foram mensurados pela produção de fluorescência emitida por DAF-2 (figura 10A). Em condições basais (ausência de estímulos), a análise de fluorescência revelou maior produção de NO no grupo Sham+GSH (64 ± 5) e OVX+GSH (70 ± 4) quando comparado a seus respectivos grupos controle, Sham (40 ± 3) e OVX (45 ± 5), conforme ilustrado na figura 10B.

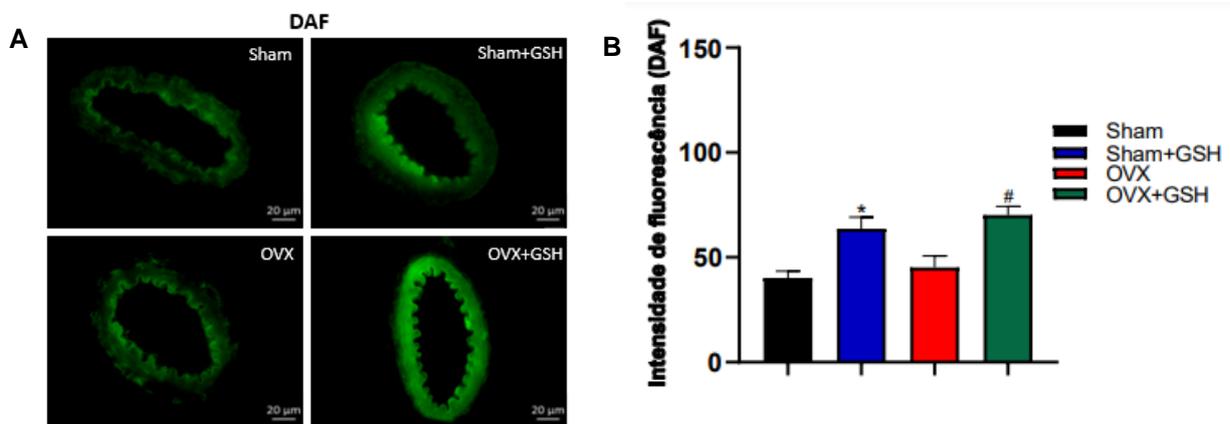


Figura 12 (A) Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por *diamonofluoresceína* (DAF) em artérias mesentéricas de ratas SHR nos quatro grupos. Barra de escala = 20 μ m. Os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0.05$. Para a análise utilizou-se ANOVA uma via seguida do teste post hoc de Tukey. (B) Gráfico representativo da microscopia de fluorescência emitida por DAF-2 em artérias mesentéricas de resistência dos quatro grupos. Os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0,05$, A análise estatística foi realizada por meio de two-way ANOVA seguida pelo teste post hoc de Tukey. Sendo (*) diferente do Sham, (#) diferente do OVX.

4.5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)

Na ausência de estímulos (condições basais), a análise da fluorescência produzida pela oxidação com diclorofluoresceína em artérias mesentéricas (figura 11A) revelou baixa produção de H₂O₂ no grupo Sham+GSH (45 ± 4) e OVX+GSH (53 ± 4) quando comparado a seus respectivos grupos controle Sham (93 ± 4) e OVX (98 ± 7), conforme ilustrado na figura 11B.

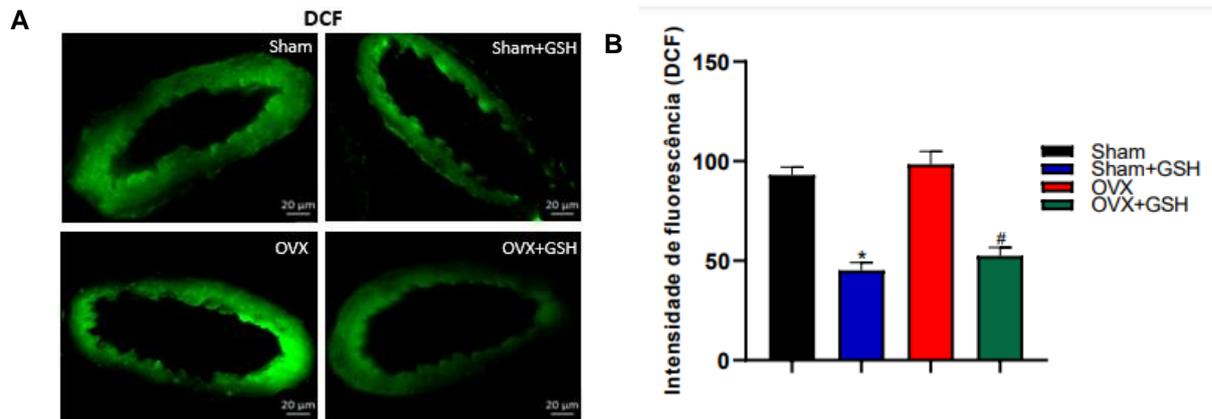


Figura 11 Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por diclorofluoresceína (DCF) em artérias mesentéricas de ratas SHR nos quatro grupos. Escala = 20 μ m. Os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0.05$. Utilizou-se ANOVA uma via seguida do teste post hoc de Tukey. Gráfico representativo da microscopia de fluorescência emitida por DCF em artérias mesentéricas de resistência dos quatro grupos. Os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada por meio de two-way ANOVA seguida pelo teste post hoc de Tukey. Sendo (*) diferente do Sham e (#) diferente do OVX.

5 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo foram que o tratamento de 21 dias com Glutathione não alterou a resposta de relaxamento induzida pela ACh, porém foi capaz de reduzir a resposta contrátil induzida pela PE em artérias mesentéricas de resistência em ratas SHR ovariectomizadas. Além disso, pudemos identificar que os mediadores endoteliais, prostaciclina e o EDHF participaram desta resposta. Sendo assim, observamos uma maior participação da via do NO no grupo Sham+GSH e OVX. Já as ratas Sham e OVX+GSH, apresentaram uma menor dependência da via do NO e no que se trata da inibição com INDO, notamos que ambos grupos tratados demonstraram responder de forma semelhante à inibição dos prostanóides.

Em relação aos pesos apresentados, entendemos que no que se trata do fígado, o papel da GSH como antioxidante é especialmente relevante porque é seu principal local de síntese, armazenamento e exportação (LU,2013). A importância da GSH no fígado reside no papel central que este órgão tem como responsável pela oxidação e eliminação de substâncias tóxicas que induzem o EO, assim, a presença de agentes antioxidantes no fígado previnem e reduzem esse estresse, seja capturando, metabolizando ou transformando moléculas em agentes menos tóxicos que EROs (LIEBER 2003). Sendo assim, observamos que o fígado apresentou diferença entre o grupo Sham e OVX, pois conforme pontuado na literatura por Ramos *et al.* (2018), as ratas têm maior concentração endógena de estrógenos em comparação aos ratos machos e sabe-se que quando é feita uma hepatectomia parcial em ratas ovariectomizadas cuja as concentrações de hormônios sexuais são deficientes, é provocado uma proliferação diminuída dos hepatócitos, ou seja, o resultado encontrado de que o fígado aumentasse seu tamanho quando retirado os hormônios sexuais com a ovariectomia era esperado, porém, o fato do tratamento com a GSH não ter restaurado os parâmetros do Sham, é um dado que adverte da literatura, pois era esperado que o antioxidante fosse capaz de reestabelecer as alterações provocadas pela ovariectomia no fígado de ratas (SCHULLER, 2016).

Batmunkh (2017), ainda corrobora que o tecido hepático é alvo dos hormônios sexuais, visto que os estrogênios por exemplo, estão envolvidos na prevenção do acúmulo de triglicerídeos pois, reduzem a síntese lipídica no fígado, além de agirem como anti-inflamatórios fisiológicos no organismo, sendo sua falta uma fator que

acelera o processo de senescência por desencadear inflamação generalizada. Acredita-se que um dos fatores responsáveis pelo aumento do peso do fígado e alguns processos inflamatórios encontrados, pode ser devido à via de administração escolhida, pois Alsina-Shanchis *et al.*, (2021), diz que a injeção intraperitoneal de diferentes óleos causa inflamação peritoneal e depleção de macrófagos peritoneais residentes. Mesmo a GSH usada não sendo um óleo, mas sim uma substância cristalizada, acredita-se que ela sendo aplicada pela via intraperitoneal pode ter contribuído para os processos inflamatórios acontecerem. A aferição do peso do útero, foi realizada para confirmar a eficácia da castração e como já era esperado houve uma redução nesta variável nas ratas ovariectomizadas, já que o útero sofre relevante influência das alterações hormonais que acarretam em sua hipotatividade e conseqüentemente redução da massa uterina caso sejam retirados (ROCHA, 2017). Contudo o tratamento com GSH reduziu ainda mais o peso do útero, tal dado não foi encontrado na literatura, mas sabe-se que a diminuição dos níveis de hormônios sexuais femininos pode causar um desequilíbrio oxidante/antioxidante, pois a glutathione redutase uterina é regulada pelo estradiol e pela progesterona (DIAZ-FLORES, 1999).

Não obstante, outro dado que não foi confirmado pela literatura foram os dados hemodinâmicos, pois era esperado que a GSH protegesse o tecido vascular contra o EO e aumentasse a disponibilidade de NO para exercer um efeito relaxante, contribuindo para a redução da PA elevada em ratos SHR (VASDEV *et al.*, 2001 e RUIZ-RAMIREZ *et al.*, 2014), contudo a aferição indireta da pressão não mostrou diferenças neste aspecto e nem na frequência cardíaca. Especula-se que a medida direta da pressão poderia ter fornecido melhores análises já que seria um método que permitiria a obtenção, batimento-a-batimento, dos valores de pressão intraarterial. Da mesma forma não encontramos diferenças no peso corporal dos animais, ainda que se esperasse que a privação dos hormônios ovarianos fosse um fator relacionado com o maior ganho ponderal em ratas (VASCONCELLOS *et al.*, 2005). No que se trata do relaxamento induzido pela ACh diante dos parâmetros utilizados nesse estudo, observamos que nossos resultados corroboram o encontrado por Nawate *et al.* (2005), de que relaxamento dependente do endotélio induzido por ACh na artéria mesentérica não foi modificado pela ovariectomia. Contudo, diante da

literatura esperava-se que a glutathione potencializasse a vasodilatação mediada por ACh conforme pontuado por Prasad *et al.*, (1999), no entanto vimos que o tratamento de 21 dias com Glutathione não alterou a resposta de relaxamento induzida pela ACh.

Conforme elucidado anteriormente por Matuz-Mares *et al.*(2021), muitas patologias cardiovasculares, durante o seu desenvolvimento, geram um estado de estresse e a GSH é uma molécula presente em todos os tecidos, que participa ativamente na neutralização do efeito oxidante das espécies reativas, sendo sua síntese e/ou regeneração importantes para poder responder ao aumento de agentes oxidantes e a eliminação direta de radicais. Dessa forma, quando falamos das EROs elevadas, é importante frisar sobre a disfunção endotelial que é caracterizada pela vasodilatação e vasoconstrição desequilibradas, fatores pró-inflamatórios e deficiência de biodisponibilidade de NO (TRIGGLE *et al.*, 2012) rompendo a permeabilidade da barreira endotelial que faz parte da resposta inflamatória no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SUN *et al.*, 2020). Adicionalmente, quando falamos de mediadores endoteliais nos resultados de ACh, sabemos que o L-NAME potencializa uma contração dependente do endotélio e uma inibição do relaxamento dependente do endotélio induzido pela ACh, além de ser capaz de inibir a produção do NO que é um fator relaxante derivado do endotélio (LIU, 2019).

Neste estudo observamos que ao aumentar a ação de agentes vasoconstritores, inibindo a NOS, o grupo Sham e o grupo OVX se mostraram diferentes dos seus respectivos grupos com GSH, ou seja, o grupo Sham relaxou mais que o Sham+GSH e o grupo OVX relaxou menos que o grupo OVX+GSH. Esses dados corroboram Pechánová *et al.* (1999), que mostrou que a diminuição do nível de GSH aumentou a vasoconstrição em ratos com deficiência de NO e que o L-NAME foi mais potente no aumento da vasoconstrição em animais com insuficiência de GSH. Entende-se que a GSH, desempenha um papel importante no sistema cardiovascular porque é um importante antioxidante que restaura o equilíbrio redox intracelular e previne a inativação de NO produzido pelo endotélio (LEOPOLD, 2005), portanto, quando inibido o NO nas ratas hipertensas sem os hormônios sexuais, observamos uma melhora da vasodilatação no grupo tratado com GSH, pois sabemos que o estrogênio tem uma forte participação na ativação da NOS e na diminuição do EO (GRYGRESKI, 1986), e seus níveis reduzidos nos grupos castrados pode ter levado a uma menor dependência da via do NO e a GSH foi capaz de recuperar essa via, ou

seja, percebemos que a ovariectomia foi capaz de reduzir a resposta vasodilatadora da ACh após inibição do NO, mas o tratamento com GSH conseguiu recuperar o relaxamento. Dessa forma, observamos que a diminuição do nível de GSH aumentou a vasoconstrição em ratos com deficiência de NO e o L-NAME foi mais potente no aumento da vasoconstrição em animais com insuficiência de GSH (ZIMMER, 2016). Todavia, no que se trata da incubação com INDO na curva com ACh, observamos que o grupo OVX+GSH e o Sham+GSH se mostraram diferentes no que se trata da capacidade de vasodilatação, sendo a resposta reduzida demonstrada no Sham+GSH. Sabemos que a INDO é capaz de inibir a resposta secundária e aumentar a duração dos relaxamentos induzidos pela ACh nas artérias de ratas espontaneamente hipertensas (PARAPLAMMOOTTIL, 2022), e o encontrado neste estudo, demonstrou que quando os prostanóides são retirados, o relaxamento é facilitado e quando há a castração, o relaxamento acontece de forma mais dificultada, mas quando as ratas são tratadas com GSH, o relaxamento parece acontecer de forma mais facilitada novamente mesmo sem a proteção dos hormônios sexuais.

Em análise dos resultados da vasoconstrição induzida pela PE, notamos que todos os grupos se mostraram diferentes em relação ao grupo Sham+GSH, o que difere do esperado na literatura, de que na ovariectomia, a contração da artéria pela PE seria aumentada (NAWATE, 2005) e de que a sensibilidade seria diminuída à contração induzida por PE em ratos com GSH (WELDY et al., 2012). No entanto, ao avaliar a contribuição do NO derivado do endotélio para as respostas induzidas por PE, os segmentos foram incubados com o inibidor da NOS (L-NAME) e notamos que esta droga aumentou a resposta à PE em artérias obtidas de todos os grupos experimentais, mas que o grupo Sham+GSH teve uma redução da resposta contrátil, revelando que contração na região mesentérica de células vasculares musculares lisas também está associada à ativação das células endoteliais para liberar NO (DORA, *et al.* 2000), o que corrobora o achado anteriormente por Caracul *et al.* (2019) e Prasad *et al.*, (1999), de que a administração de GSH melhora a disfunção endotelial aumentando a atividade do NO, mas sem aumentar a ação vasodilatadora dos doadores de NO. Contudo na incubação com INDO, sabemos que em ratos SHR, a enzima COX exerce um papel pivotal, transformando o ácido araquidônico em endoperóxidos e esses precursores de prostaglandinas são liberados durante as contrações dependentes do endotélio (VANHOUTTE, 2009). Notamos que assim

como achado anteriormente por Ferguson *et al.* (2015), o inibidor da COX atenuou a vasoconstrição induzida por PE e o grupo Sham+GSH se mostrou significativamente diferente do OVX mas similar ao OVX+GSH, demonstrando que ambos grupos tratados foram capazes de manter os níveis normais de contração. No entanto a literatura traz que os hormônios sexuais femininos diminuem a produção de prostanóides vasoconstritores (DANTAS *et al.*, 1999), porém não observamos tal dado, bem como era esperado no SHR uma dependência maior dos prostanóides, pois quando se tira os hormônios sexuais a COX produz muitos prostanóides (SULLIVAN *et al.*, 2005) e não foi observamos tal dado nos grupos ovariectomizados com a presença da INDO.

Adicionalmente, levando em consideração que a fluorescência ilustra a intensidade da disponibilidade do NO e do H₂O₂, constatamos que sobre os níveis de NO mensurados pela fluorescência emitida por DAF-2, em condições basais, revelou maior produção de NO no grupo Sham+GSH e OVX+GSH quando comparado a seus respectivos grupos controle, o que corresponde com o encontrado por Orshal e Khalil (2004), que afirmam que os estrogênios colaboram com o relaxamento dos vasos e a ovariectomia prejudica esse efeito, aumentando a vasoconstrição. Sabe-se que o NO reage com GSH produzindo S-nitrosoglutathione biologicamente ativa (KERWIN JR; HELLER, 1994) e em concentrações tóxicas de NO, a formação de S-nitrosoglutathione menos reativa protege as células contra os ataques oxidantes. No nosso estudo, os dados de fluorescência utilizando o DAF-2, revelaram que ambos grupos com GSH demonstraram ter mais produção de NO ou também menor degradação. Resultados previamente pontuados na literatura demonstraram que devido à maior estabilidade em comparação com o próprio NO, a S-nitrosoglutathione demonstrou funcionar como EDRF e como um inibidor da agregação plaquetária (STAMLER *et al.*, 1992; IGNARRO, 1989), corroborando o encontrado neste estudo, onde o tratamento com GSH pareceu ser capaz de aumentar a biodisponibilidade de NO nas ratas hipertensas e ovariectomizadas.

Contudo os dados de fluorescência produzida pela oxidação envolvendo o DCF na ausência de estímulos, nos mostrou que houve uma menor produção de H₂O₂ no grupo OVX+GSH e isso está de acordo com estudos anteriores demonstrando que o ciclo redox da GSH representa o sistema de desintoxicação de H₂O₂ mais importante

em células endoteliais (SUTTORP, *et al.* 1991). Hermann *et al.*, (1997), pontuam que na ausência de NO, o H_2O_2 pode ser reduzido por um sistema redox da GSH, e de fato, o grupo tratado com GSH e ovariectomizado revelou menores níveis de H_2O_2 , sugerindo que o tratamento foi capaz de manter o equilíbrio redox mesmo sem a biodisponibilidade dos hormônios sexuais. Portanto, entendemos que diante dos resultados a GSH pode ser capaz de melhorar e manter a vasodilatação mesmo quando o NO está ausente.

6 CONCLUSÃO

Concluimos que o tratamento com a glutathione não demonstrou melhorar os parâmetros hemodinâmicos, peso corporal e nem modificar a reatividade em vaso de resistência de animais SHR, porém foi observado que diferentes mediadores endoteliais participam desta resposta e a GSH pode ser capaz de melhorar e manter a vasodilatação mesmo quando o NO está atenuado. Além do mais, o tratamento com a Glutathione não foi capaz de reverter a hipertensão. Essas observações podem fornecer uma nova perspectiva para a compreensão dos mecanismos vasculares envolvidos nas respostas induzidas pela GSH, que poderiam ter potencial terapêutico por ser capaz de melhorar a função endotelial e contrabalancear as alterações cardiovasculares que são observadas com a modificação na produção de hormônios sexuais. Portanto, o estudo da glutathione continua a ser um importante e extenso campo de pesquisa que requer uma análise mais aprofundada.

7 REFERÊNCIAS

- ALSINA-SANCHIS, Elisenda et al. Intraperitoneal Oil Application Causes Local Inflammation with Depletion of Resident Peritoneal Macrophages. *Molecular Cancer Research*, v. 19, n. 2, p. 288-300, 2021.
- APAK, R. Current issues in antioxidant measurement. *Journal of agricultural and food chemistry*, ACS Publications, v. 67, n. 33, p. 9187–9202, 2019.
- BALDO, M. P. A ingestão elevada de frutose altera a reatividade vascular mesentérica em ratos normotensos. Universidade Federal do Espírito Santo, v. 1, p. 1–188, 2018.
- BATMUNKH, Baatarsuren et al. Estrogen accelerates cell proliferation through estrogen receptor α during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Acta histochemica et cytochemica*, p. 17003, 2017.
- BAJIC, Vladan P. et al. Glutathione “redox homeostasis” and its relation to cardiovascular disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
- BECHLIOULIS, A. et al. Short-term hormone therapy improves scd40l and endothelial function in early menopausal women: potential role of estrogen receptor polymorphisms. *Maturitas*, Elsevier, v. 71, n. 4, p. 389–395, 2012.
- BERNATOVA, I.; CONDE, M. V.; KOPINCOVA, J.; GONZÁLEZ, M. C.; PUZSEROVA, A.; ARRIBAS, S. M. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: focus on methodological aspects. *Journal of Hypertension*, LWW, v. 27, p. S27–S31, 2009.
- BISWAS, S. K.; RAHMAN, I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Molecular aspects of medicine*, Elsevier, v. 30, n. 1-2, p. 60–76, 2009.
- BOOS, C. J.; LIP, G. Y. Is hypertension an inflammatory process? *Current pharmaceutical design*, Bentham Science Publishers, v. 12, n. 13, p. 1623–1635, 2006.
- BRAVENBOER, B.; KAPPELLE, A.; HAMERS, F.; BUREN, T. V.; ERKELENS, D.; GISPEN, W. Potential use of glutathione for the prevention and treatment of diabetic neuropathy in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetologia*, Springer, v. 35, n. 9, p. 813–817, 1992.
- CALZERRA, Natália TM et al. Cardiovascular protection effect of a Northeastern Brazilian lyophilized red wine in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, v. 88, p. 104868, 2022.
- CARACUEL, Laura et al. Acute-on-chronic liver disease enhances phenylephrine-induced endothelial nitric oxide release in rat mesenteric resistance arteries through enhanced PKA, PI3K/AKT and cGMP signalling pathways. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.
- CONCEA-MCT. Ministério da ciência, tecnologia e inovação, conselho nacional de controle de experimentação animal. *Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA*, Brasília, v. 1, p.

1–50, 2006.

COSTA, E. D.; SILVA, J. F.; AIRES, R. D.; GARCIA, D. C.; KANSAON, M. J.; WAINSTEIN, A. J.; REZENDE, B. A.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA, R. F.; *et al.* Neuronal nitric oxide synthase contributes to the normalization of blood pressure in medicated hypertensive patients. *Nitric Oxide*, Elsevier, v. 80, p. 98–107, 2018.

DA ROCHA MACIEL, Ellen Larissa Santos et al. Efeito do estrogênio no risco cardiovascular: uma revisão integrativa. *Revista Eletrônica Acervo Médico*, v. 1, n. 1, p. e8527-e8527, 2021.

DANTAS, Ana Paula V. et al. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, v. 34, n. 4, p. 914-919, 1999.

DESCALZO, A. M.; SANCHO, A. A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in argentina. *Meat Science*, Elsevier, v. 79, n. 3, p. 423–436, 2008.

DIAZ-FLORES, M. et al. Uterine glutathione reductase activity: modulation by estrogens and progesterone. *Life sciences*, v. 65, n. 23, p. 2481-2488, 1999.

DIKALOV, Sergey I.; UNGVARI, Zoltan. Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 305, n. 10, p. H1417-H1427, 2013.

DORA, K. A. et al. An indirect influence of phenylephrine on the release of endothelium-derived vasodilators in rat small mesenteric artery. *British journal of pharmacology*, v. 129, n. 2, p. 381-387, 2000.

EL HAFIDI, Mohammed; PÉREZ, Israel; BAÑOS, Guadalupe. Is glycine effective against elevated blood pressure?. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, v. 9, n. 1, p. 26-31, 2006.

FAZAN, R.; SILVA. Modelos de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*, v. 8, n. 1, p. 19–29, 2001.

FÉLÉTOU, Michel; KÖHLER, Ralf; VANHOUTTE, Paul M. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Current hypertension reports*, v. 12, n. 4, p. 267-275, 2010.

FERNANDES, José Miguel da Mota. Doenças cardiovasculares: metabolitos do citocromo P450 da via do ácido araquidônico no controlo do tónus vascular. 2013.

FERGUSON, B. et al. COX Inhibitor Indomethacin Attenuates Phenylephrine Induced Vasoconstriction: Differences in OLETF and LETO Vascular Response. *The FASEB Journal*, v. 29, p. 802.6, 2015.

GIESEN, J. A. S.; ROUVER, W. do N.; COSTA, E. D.; LEMOS, V. S.; SANTOS, R. L. D. Sex differences in progesterone-induced relaxation in the coronary bed from normotensive rats. *Journal of molecular endocrinology*, Bioscientifica Ltd, v. 64, n. 2, p. 91–102, 2020.

GREENFIELD, E. A. Routes of antigen injection in mice and rats. *Cold Spring Harbor*

Protocols, Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 2019, n. 6, 2019.

GRUNFELD, S.; HAMILTON, C. A.; MESAROS, S.; MCCLAIN, S. W.; DOMINICZAK, A. F.; BOHR, D. F.; MALINSKI, T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension*, Am Heart Assoc, v. 26, n. 6, p. 854–857, 1995.

GRYGLEWSKI, R. J. Palmer RM, and Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, v. 320, p. 454-456, 1986.

HAGIHARA, GN. Resposta à angiotensina II em artérias mesentéricas de resistência na obesidade: participação das MAPKs. 2012. 31 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) –Universidade de São Paulo. 2012.

HAMMES, S. R.; LEVIN, E. R. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocrine reviews*, Oxford University Press, v. 28, n. 7, p. 726–741, 2007.

HATANO, Y. et al. The contractile responses of isolated dog cerebral and extracerebral arteries to oxybarbiturates and thiobarbiturates. *Anesthesiology*, v.71, n.1, p.80, 1989.

HERMANN, Corinna; ZEIHNER, Andreas M.; DIMMELER, Stefanie. Shear stress inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 17, n. 12, p. 3588-3592, 1997.

HETRICK, E. M.; SCHOENFISCH, M. H. Analytical chemistry of nitric oxide. *Annual Review of Analytical Chemistry*, Annual Reviews, v. 2, p. 409–433, 2009.

HOPKINS, F. On an autooxidisable component of the cell. *BiochemJ*, Elsevier, v. 15, p. 286–303, 1921.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. d. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, SciELO Brasil, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

HUNTER, G.; EAGLES, B. A. Non-protein sulfur compounds of blood ii. glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 72, n. 1, p. 133–146, 1927.

IGNARRO, Louis J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circulation research*, v. 65, n. 1, p. 1-21, 1989.

JAN, A.; ALI, A.; HAQ, Q. *et al.* Glutathione as an antioxidant in inorganic mercury induced nephrotoxicity. *Journal of postgraduate medicine*, Medknow Publications, v. 57, n. 1, p. 72, 2011.

JÚNIOR, L. R.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, SciELO Brasil, v. 24, p. 112–119, 2001.

KERWIN JR, James F.; HELLER, Michael. The arginine-nitric oxide pathway: A target for new drugs. *Medicinal research reviews*, v. 14, n. 1, p. 23-74, 1994.

KONUKOGLU, D.; UZUN, H. Endothelial dysfunction and hypertension. *Hypertension: from basic research to clinical practice*, Springer, p. 511–540, 2016.

LEOPOLD, Jane A.; LOSCALZO, Joseph. Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 25, n. 7, p. 1332-1340, 2005.

LIEBER, Charles S. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Research & Health*, v. 27, n. 3, p. 220, 2003.

LIMA, Carmen Silvia Passos et al. Glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) and theta 1 (GSTT1) genetic polymorphisms and atopic asthma in children from Southeastern Brazil. *Genetics and molecular biology*, v. 33, p. 438-441, 2010.

LIU, Taiming et al. L-NAME releases nitric oxide and potentiates subsequent nitroglycerin-mediated vasodilation. *Redox biology*, v. 26, p. 101238, 2019.

LOMAESTRO, Ben M.; MALONE, Margaret. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Annals of Pharmacotherapy*, v. 29, n. 12, p. 1263-1273, 1995.

LU, Shelly C. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1830, n. 5, p. 3143-3153, 2013.

LUSCHER, T. F.; VANHOUTTE, PAUL M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, v. 8, n. 4, p. 344-348, 1986.

MALTA, D. C. *et al.* Fatores de risco relacionados à carga global de doença do brasil e unidades federadas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, SciELO Public Health, v. 20, p. 217–232, 2015.

MARTINS, Maria Vitória Figueiredo et al. Uso de Terapia de Reposição Hormonal para Prevenção de Doenças Cardiovasculares na Pós-menopausa: Uma Revisão Sistemática Use of Hormone Replacement Therapy to Prevent Postmenopausal Cardiovascular Diseases: A Systematic Review. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 6, p. 64276-64289, 2021.

MATTEI, P. *et al.* Endothelial function in hypertension. *Journal of nephrology*, Elsevier, v. 10, p. 192–197, 1997.

MATUZ-MARES, Deyamira et al. Glutathione participation in the prevention of cardiovascular diseases. *Antioxidants*, v. 10, n. 8, p. 1220, 2021.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of biological chemistry*, ASBMB, v. 263, n. 33, p. 17205–17208, 1988a.

MEISTER, A. On the discovery of glutathione. *Trends in biochemical sciences*, Elsevier, v. 13, n. 5, p. 185–188, 1988b.

MEISTER A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*; 220:472–7, 1983.

- MILLS, K. T.; STEFANESCU, A.; HE, J. The global epidemiology of hypertension. *Nature Reviews Nephrology*, Nature Publishing Group, v. 16, n. 4, p. 223–237, 2020.
- MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation research*, Am Heart Assoc, v. 41, n. 1, p. 19–26, 1977.
- NAWATE, Satoshi et al. Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor-and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy. *British journal of pharmacology*, v. 144, n. 2, p. 178-189, 2005.
- NOCTOR, G.; QUEVAL, G.; MHAMDI, A.; CHAOUCH, S.; FOYER, C. H. Glutathione. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, American Society of Plant Biologists, v. 9, 2011.
- NURULAIN, S. M.; OJHA, S.; TEKES, K.; SHAFIULLAH, M.; KALASZ, H.; ADEM, A. Efficacy of n-acetylcysteine, glutathione, and ascorbic acid in acute toxicity of paraoxon to wistar rats: survival study. *Oxidative medicine and cellular longevity*, Hindawi, v. 2015.
- OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese circulation journal*, The Japanese Circulation Society, v. 27, n. 3, p. 282–293, 1963.
- ORSHAL, Julia M.; KHALIL, Raouf A. Gender, sex hormones, and vascular tone. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 286, n. 2, p. R233-R249, 2004.
- PARAPLAMMOOTTIL CHERIYAN, Sherin. Effect of hemp seed protein isolate on mesenteric resistance artery isolated from the spontaneously hypertensive rat. 2022.
- PECHÁNOVÁ, Ol'ga; KASHIBA, Misato; INOUE, Masayasu. Role of glutathione in stabilization of nitric oxide during hypertension developed by inhibition of nitric oxide synthase in the rat. *The Japanese Journal of Pharmacology*, v. 81, n. 2, p. 223-229, 1999.
- PEDROSA, Diego França et al. Efeitos benéficos do estrogênio no sistema cardiovascular. *Perspectivas Online 2007-2011*, v. 3, n. 12, 2009.
- PEIXOTO, Pollyana et al. GPER agonist dilates mesenteric arteries via PI3K-Akt-eNOS and potassium channels in both sexes. *Life sciences*, v. 183, p. 21-27, 2017.
- PRASAD, A.; ANDREWS, N. P.; PADDER, F. A.; HUSAIN, M.; QUYYUMI, A. A. Glutathione reverses endothelial dysfunction and improves nitric oxide bioavailability. *Journal of the American College of Cardiology*, American College of Cardiology Foundation Washington, DC, v. 34, n. 2, p. 507–514, 1999.
- RAMOS, Amanda Caroline et al. Alterações Hepatocitológicas ocasionadas pela Ovariectomia em ratas wistar. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso.
- RECKELHOFF, J. F. Sex differences in regulation of blood pressure. *Sex-Specific Analysis of Cardiovascular Function*, Springer, p. 139–151, 2018.
- REY-PAILHADE, J. de. Le philothéion, diastase d'hydrogénation. *CR Soc. Biol. XCIX*, v. 1700, 1928.

ROCHA, Lara Caetano. Alterações morfológicas no útero de ratas Wistar ovariectomizadas submetidas ao protocolo de natalidade. 2017.

RUIZ-RAMÍREZ, Angélica et al. Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fed rats. **Clinical Science**, v. 126, n. 1, p. 19-29, 2014.

SANTOS, R. L. D.; DELLACQUA, L. O.; DELGADO, N. T.; ROUVER, W. N.; PODRATZ, P. L.; LIMA, L. C.; PICCIN, M. P.; MEYRELLES, S. S.; MAUAD, H.; GRACELI, J. B. et al. Pomegranate peel extract attenuates oxidative stress by decreasing coronary angiotensin-converting enzyme (ace) activity in hypertensive female rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, Taylor & Francis, v. 79, n. 21, p. 998–1007, 2016.

SCHULLER, Ártur Krumberg. Antioxidantes restauram alterações provocadas pela ovariectomia no fígado de ratas. 2016.

SILVA, T. A. D. L. Densidade mineral óssea de ratas ovariectomizadas associada à administração sistêmica de bisfosfonatos. 2020.

SIMONE, G. de. Risk factors for arterial hypertension in adults with initial optimal blood pressure: the strong heart study. *Hypertension*, Am Heart Assoc, v. 47, n. 2, p. 162–167, 2006.

SOMBERG, L. B.; GUTTERMAN, D. D.; MIURA, H.; NIRULA, R.; HATOUM, O. A. Shock associated with endothelial dysfunction in omental microvessels. *European journal of clinical investigation*, Wiley Online Library, v. 47, n. 1, p. 30–37, 2017.

SULLIVAN, Jennifer C. et al. Sexual dimorphism in renal production of prostanoids in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, v. 45, n. 3, p. 406-411, 2005.

SUN, H. J et al. Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the link between inflammation and hydrogen sulfide. *Frontiers in pharmacology*, v. 10, p. 1568, 2020.

SUTTORP, Norbert; KÄSTLE, Simon; NEUHOF, Heinz. Glutathione redox cycle is an important defense system of endothelial cells against chronic hyperoxia. *Lung*, v. 169, n. 1, p. 203-214, 1991.

STAMLER, Jonathan S. et al. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, n. 1, p. 444-448, 1992.

TRIGGLE, Chris R. et al. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, v. 90, n. 6, p. 713-738, 2012.

VANHOUTTE PM. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circulation Journal* 73(7):595-601. 2009.

VASCONCELLOS, Leonardo de Souza; SABINO, Kelly Renata; PETROIANU, Andy. Relationship between ovariectomy and body weight in an experimental model. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 32, p. 132-135, 2005.

VASDEV, S. et al. Dietary vitamin C supplementation lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 218, n. 1, p. 97-103, 2001.

ULKER S, et al., Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension*, 41:534–539, 2003.

WELDY, Chad S. et al. Glutathione (GSH) and the GSH synthesis gene *Gclm* modulate vascular reactivity in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 53, n. 6, p. 1264-1278, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Noncommunicable diseases progress monitor 2022.

ZIMMER, Alexandra. Efeitos do treinamento físico aeróbico sobre o metabolismo do óxido nítrico e da endotelina-1 e sobre o estresse oxidativo no parênquima pulmonar de ratos com hipertensão arterial pulmonar. 2016.

ZHOU, Bin et al. Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *The Lancet*, v. 398, n. 10304, p. 957-980, 2021.