



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITOS CARDIOVASCULARES DA HIDROXICLOROQUINA EM
ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

JAQUELINE MOURA DA COSTA

GOIÂNIA-GO
2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Jaqueline Moura da Costa

3. Título do trabalho

EFEITOS CARDIOVASCULARES DA HIDROXICLOROQUINA EM ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique De Castro, Professor do Magistério Superior**, em 12/06/2025, às 10:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jaqueline Moura Da Costa, Discente**, em 12/06/2025, às 12:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5436011** e o código CRC **B09A62B0**.

Referência: Processo nº 23070.018872/2025-62

SEI nº 5436011

JAQUELINE MOURA DA COSTA

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DA HIDROXICLOROQUINA EM
ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia
Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes

GOIÂNIA-GO

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Costa, Jaqueline Moura da
Efeitos Cardiovasculares da Hidroxicloroquina em animais normotensos e hipertensos [manuscrito] / Jaqueline Moura da Costa. 2025.
84, LXXXIV f.: il.

Orientador: Prof. Carlos Henrique de Castro; co-orientador Rodrigo Mello Gomes.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Goiânia, 2025.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Hidroxicloroquina. 2. Alterações cardiovasculares. 3. Alterações metabólicas. 4. Contratilidade cardíaca. 5. Hipertensão. I. Castro, Carlos Henrique de , orient. II. Título.

CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata nº 131 da sessão de Defesa de Tese do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, que confere a **Jaqueline Moura da Costa** o título de Doutora em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Aos onze dias do mês de abril de 2025, a partir das 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “EFEITOS CARDIOVASCULARES DA HIDROXICLOROQUINA EM ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Carlos Henrique de Castro (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Rodrigo Mello Gomes (ICB - UFG), coorientador; Doutora Larissa Matuda Macedo (ICB - UFG), membro titular externo; Professor Doutor Daniel Alves Rosa (ICB - UFG), membro titular externo; Professor Doutor Diego Basile Colugnati (ICB - UFG), membro titular interno; Professora Doutora Fernanda Cristina Alcantara dos Santos (ICB - UFG), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Carlos Henrique de Castro, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos onze dias do mês de abril de 2025.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique De Castro, Professor do Magistério Superior**, em 11/04/2025, às 18:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diego Basile Colugnati, Professor do Magistério Superior**, em 11/04/2025, às 18:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Cristina Alcantara Dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 11/04/2025, às 18:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Alves Rosa, Professor do Magistério Superior**, em 11/04/2025, às 18:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Mello Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 11/04/2025, às 18:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Matuda Macedo, Técnico**, em 11/04/2025, às 18:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5303123** e o código CRC **4135A2CE**.

Referência: Processo nº 23070.018872/2025-62

SEI nº 5303123

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Nazaré (*in memoriam*) e Belchior por sempre me ensinarem a importância da educação e me incentivarem a nunca desistir dos meus objetivos, apesar de todas as dificuldades.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por seu amor incondicional, por estar sempre ao meu lado, me dando forças e sabedoria para sempre seguir em frente.

À minha família, principalmente aos meus pais, Nazaré (*in memoriam*) e Belchior, por todo amor dedicado a mim, por todos os sacrifícios que fizeram para me permitir chegar até aqui. Por ser exemplo de vida, sempre mostrando a importância da humildade e honestidade. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês! Ao meu esposo Paulo Henrique e minha filha Sofia, minha família tão amada, por estarem sempre ao meu lado. Como eu amo compartilhar a minha vida com vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro, pela oportunidade, confiança e por compartilhar todo seu conhecimento comigo. Saiba que você é exemplo de profissionalismo, ética e dedicação. Tenho muito orgulho de ter sido sua orientanda no mestrado e doutorado e sempre terei orgulho de dizer que fui sua aluna.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Rodrigo Melo Gomes, pela orientação e colaboração na execução do presente trabalho.

Aos professores do Laboratório Integrado de Fisiopatologia Cardiovascular e Neurológica (LIFCaN), Profa. Dra. Elizabeth Pereira Mendes, Profa. Dra. Aline Priscila Pansani e Prof. Dr. Diego Basile Colugnati pelo total apoio e ensinamentos ao longo deste período.

À todos os meus amigos do LIFCaN, Monique Machado Louredo Teles Bombardelli, Helen Cristian M. Tomaz, João Batista R. Dutra, Cláudio Q. de Lima Júnior, Amanda de Sá Martins de Bessa e Carla Carolina R. da Silveira (agregadas do LIFCaN), por toda ajuda e principalmente pela amizade. Vocês são exemplos de dedicação e companheirismo. Os desafios da pós-graduação se tornaram mais leves por ter vocês ao meu lado!

Ao professor Dr. Paulo César Ghedini, e sua aluna Pâmela Yasmin de Oliveira Ferreira pelas contribuições e parcerias nos experimentos de estresse oxidativo.

Aos professores Fernanda Cristina Alcântara dos Santos, Manoel Francisco Biancardi e sua aluna Bárbara Costa Malmann Medeiros pela parceria nos experimentos de imuno-histoquímica.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, à Universidade Federal de Goiás e a todos os seus professores, que contribuíram muito para o meu conhecimento e desenvolvimento profissional.

Às agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro, permitindo que eu me dedicasse à realização desta pesquisa.

IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA A SOCIEDADE

Esta pesquisa investigou como a Hidroxicloroquina (HCQ), um remédio usado há muitos anos para tratar doenças reumáticas, como malária, lúpus e artrite reumatoide, afeta o coração e alguns processos relacionados ao metabolismo. Embora esse medicamento seja amplamente utilizado, seus efeitos no corpo ainda geram dúvidas. Alguns estudos indicam que ele pode causar problemas no coração e no metabolismo, enquanto outros sugerem que pode ter efeitos protetores. No entanto, há poucas pesquisas analisando como a HCQ age especificamente em pessoas com pressão alta (hipertensão), uma condição muito comum e que aumenta o risco de doenças cardiovasculares.

Os resultados deste estudo mostraram que a HCQ age de forma diferente dependendo do nível da pressão arterial. Essas descobertas são importantes porque mostram que a HCQ pode influenciar no tratamento de problemas do coração em pessoas com hipertensão. Saber exatamente como esse medicamento age no organismo é essencial para garantir que ele seja usado de forma segura, especialmente por quem precisa tomá-lo por muito tempo.

Além disso, essa pesquisa abre caminho para novos estudos em humanos, que poderão confirmar se esses efeitos observados em ratos também acontecem em pessoas hipertensas. Isso pode ajudar a melhorar a forma como a HCQ é usada, garantindo que seus benefícios sejam aproveitados enquanto se evitam possíveis riscos. Assim, este estudo tem um impacto tanto na ciência básica quanto na prática médica, auxiliando no uso mais seguro e eficiente desse medicamento.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

“O primeiro gole do copo das ciências naturais o tornará um ateu. Mas, no fundo do copo, Deus estará esperando por você.”

Werner Heisenberg

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS.....	IX
IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA A SOCIEDADE.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XV
RESUMO.....	XX
ABSTRACT.....	XXII
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Mecanismo de ação da HCQ	26
1.2. Impacto cardiovascular e metabólico das doenças reumáticas	27
1.3. Hipertensão arterial sistêmica	28
2.OBJETIVOS.....	32
2.1. Gerais.....	32
2.2. Específicos.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Animais	33
3.2. Tratamento.....	33
3.3. Massa corporal e ingestão alimentar	33
3.4. Pletismografia de cauda.....	34
3.3. Coração Isolado	34
3.3.1. Protocolo experimental de isquemia	36
3.4. Reatividade vascular aórtica	36
3.5. Histologia	38
3.5.1. Análise morfológica do ventrículo esquerdo.....	38
3.5.2. Imuno-histoquímica.....	41
3.6. Western Blotting.....	42
3.7. Zimografia	43
3.8. Análise do estresse oxidativo.....	43
3.8.1. Determinação do Teor de Proteína	43
3.8.2. Níveis de Peroxidação Lipídica	43

3.8.3. Determinação da Atividade da Glutathione Peroxidase	44
3.8.4. Atividade da Superóxido Dismutase	44
3.8.5. Atividade da Catalase	44
3.9. Análise estatística	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Efeito da HCQ no peso corporal	46
4.2. Efeito da HCQ na pressão arterial sistólica e frequência cardíaca in vivo em ratos normotensos e hipertensos.....	47
4.3. Efeito da HCQ na função ventricular esquerda ex vivo em ratos normotensos e hipertensos	48
4.3. Efeito da HCQ em anéis de aorta torácica isolada de ratos normotensos e hipertensos	53
4.4. Efeito da HCQ no índice de massa ventricular e morfologia do ventrículo esquerdo.....	55
4.5. Efeito da HCQ na atividade de MMPs no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos.....	57
4.6. Efeito da HCQ nos níveis de LPO, GPx, SOD e CAT no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos.....	58
4.7. Efeito da HCQ na expressão de proteínas no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos.....	60
4.8. Efeito da HCQ na expressão de IL-1 β beta no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos.....	62
4.9. Efeito da HCQ no peso do fígado e pâncreas de ratos normotensos e hipertensos	63
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES.....	72
8. REFERÊNCIAS.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh, *Acetylcholine* – Acetilcolina.

AE, Átrio esquerdo.

Ang II, Angiotensina II.

AKT, *Protein kinase B* – Proteína quinase B.

aPL, Anticorpos antifosfolípidos.

AR, Artrite reumatoide.

AVC, Acidente vascular cerebral.

CaCl₂.2H₂O, Cloreto de cálcio.

C₆H₁₂O₆, Glicose

CQ, Cloroquina.

DC, Débito cardíaco.

ECA, Enzima conversora de angiotensina.

ERK, *Extracellular signal-regulated protein kinases* – Proteína quinase regulada por sinal extracelular.

ERO, Espécies reativas de oxigênio.

FC, Frequência cardíaca.

GMP-AMP cíclica sintase, Guanosina monofosfato/adenosina monofosfato cíclica sintase.

HCQ, Hidroxicloroquina.

HAS, Hipertensão arterial sistêmica.

IAM, Infarto agudo do miocárdio.

IL, Interleucina.

IMH, Índice de massa hepática.

IMV, Índice de massa ventricular.

IMP, Índice de massa pancreática.

KCL, Cloreto de potássio.

KH₂PO₄, Fosfato monopotássico.

LES, Lúpus eritematoso sistêmico.

LROs, *Lysosome-related organelles* - Organelas Relacionadas a Lisossomos.

MEC, Matriz extracelular.

MgSO₄.7H₂O, Sulfato de magnésio.

MMP, Metaloproteinases.

mTOR, *Mechanistic target of rapamycin* - Alvo mecanístico da rapamicina.

M6P, Manose-6-fosfato.

NaCl, Cloreto de sódio.

NADPH, *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.

NaHCO₃, Bicarbonato de sódio.

NF-κB, Fator nuclear kappa B.

NOX, NADPH oxidase. NPS, Nitroprussiato de sódio.

OMS, Organização mundial da saúde.

PA, Pressão arterial

PAS, Pressão arterial sistólica

PCR, Proteína C-reativa.

PIVD, Pressão intraventricular diastólica.

PIVS, Pressão intraventricular sistólica.

PI3K, *Phosphatidylinositol 3-kinase* - Fosfatidilinositol 3-quinase

Phe, Phenylephrine - Fenilefrina.

PPARγ, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma - Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma tipo gama.

RPT, Resistência periférica total.

RE, Retículo endoplasmático.

SHR, *Spontaneously hypertensive rat* - Rato espontaneamente hipertenso.

SM, Síndrome metabólica.

SKH, Solução de Krebs-Henseleit.

SKR, Solução de Krebs-Ringer.

TIMP's, *Tissue inhibitor of metalloproteinases* - Inibidores teciduais de metaloproteinases.

TLR, *Toll-like Receptor* – Receptor *Toll-Like*.

TNF-α, *Tumor necrosis factor* - Fator de necrose tumoral.

v-ATPase, Adenosina trifosfatase de prótons do tipo vacuolar.

VE, Ventrículo esquerdo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração representativa da estrutura química da Cloroquina e Hidroxicloroquina.	24
Figura 2 - Ilustração representativa da pletismografia de cauda.	34
Figura 3 - Ilustração representativa da preparação de coração isolado de rato em sistema de pressão constante (técnica de Langendorff).	35
Figura 4 - Esquema do protocolo experimental de isquemia-reperfusão em coração isolado.	36
Figura 5 - Ilustração representativa da preparação de aorta isolada de rato em sistema de banho de órgãos (Yildiz, Seyrek and Gul, 2013).	37
Figura 6 - Efeito da HCQ no peso corporal de ratos normotensos e hipertensos.	46
Figura 7 - Efeito da HCQ na ingestão de ração e água de ratos normotensos e hipertensos.	47
Figura 8 - Efeito da HCQ na PA e FC de ratos normotensos e hipertensos.	48
Figura 9 - Efeito da HCQ na PIVS e PIVD do coração isolado de ratos normotensos e hipertensos.	50
Figura 10 - Efeito da HCQ na dP/dt máxima e dP/dt mínima do coração isolado de ratos normotensos e hipertensos.	51
Figura 11 - Efeito da HCQ no fluxo coronariano e FC do coração isolado de ratos normotensos e hipertensos.	52
Figura 12 - Efeito da HCQ no tempo de fibrilação do coração isolado de ratos normotensos e hipertensos.	53
Figura 13 - Efeito da HCQ em anéis de aorta isolados de ratos normotensos e hipertensos.	54
Figura 14 - Efeito da HCQ no IMV e morfologia do VE de ratos normotensos e hipertensos.	55
Figura 15 - Efeito da HCQ na morfologia do VE de ratos normotensos.	56
Figura 16 - Efeito da HCQ na morfologia do VE de ratos hipertensos.	57
Figura 17 - Efeito da HCQ na atividade de MMPs no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos.	58
Figura 18 - Efeito da HCQ nos níveis de peroxidação lipídica no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos.	59

Figura 19 - Efeito da HCQ na expressão de proteínas da superóxido dismutase (SOD) no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos.	60
Figura 20 - Efeito da HCQ na expressão de proteínas da Catalase no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos.	61
Figura 21 - Efeito da HCQ na expressão de proteínas da ERK 1-2 fosforilada e ERK total no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos.	61
Figura 22 - Efeito da HCQ na marcação imuno-histoquímica para IL-1 β no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos.	62
Figura 23 - Efeito da HCQ no IMH e IMP de ratos normotensos e hipertensos. ...	63
Figura 24 - Efeito da HCQ na relação entre o peso do tecido e o tamanho da tíbia para a gordura marrom, gordura inguinal, gordura mesentérica, gordura retroperitoneal e gordura epididimal de ratos normotensos e hipertensos.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da Solução de Krebs-Ringer.....	36
Tabela 2 - Composição da Solução Krebs-Henseleit	38
Tabela 3 - Composição da solução de Bouin.	39
Tabela 4 - Etapas realizadas para o processo de desidratação e diafanização do tecido até o emblocamento.....	39
Tabela 5 - Procedimentos utilizados para desparafinização, coloração e montagem das lâminas.....	40
Tabela 6 - Lista de anticorpos utilizados para o western blot.	42
Tabela 7 - Parâmetros basais da função ventricular esquerda dos corações isolados dos ratos.....	49

RESUMO

A Hidroxicloroquina (HCQ) é amplamente utilizada para o tratamento de doenças reumáticas. Estudos mostram que pacientes que utilizam essa medicação podem apresentar alterações cardiovasculares e metabólicas. Por outro lado, pesquisas indicam que a HCQ pode ter efeitos protetores sobre o coração e o metabolismo. No entanto, há poucos estudos avaliando seus efeitos em condições de hipertensão. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos cardiovasculares da HCQ e se esses efeitos diferem em animais hipertensos. Foram utilizados ratos machos normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR, *spontaneously hypertensive rats*), com 16 semanas de vida. Os grupos experimentais foram divididos em Wistar veículo, Wistar HCQ, SHR veículo e SHR HCQ. Os animais receberam solução salina ou HCQ (40mg/kg/dia) por gavagem, durante 30 dias. O peso corporal, o consumo de água e ração, a pressão arterial sistólica (PAS) e a frequência cardíaca (FC) foram avaliados semanalmente. A PAS e FC foram analisadas por pletismografia de cauda. A contratilidade cardíaca foi avaliada pela técnica de coração isolado com pressão constante. A reatividade aórtica foi avaliada em anéis isolados de aorta em sistema de banho de órgãos. Os seguintes órgãos foram coletados para pesagem e/ou análise histológica e molecular: ventrículo esquerdo (VE), fígado, pâncreas e tecidos adiposos branco e marrom. Os animais normotensos tratados com HCQ apresentaram redução no peso corporal em comparação ao basal e ao grupo veículo no mesmo período. Tanto os animais hipertensos tratados quanto os animais não tratados apresentaram aumento semelhante do peso corporal. Os ratos Wistar tratados com HCQ consumiram menos ração e água do que seu grupo controle, e houve redução na ingestão hídrica em SHR tratado. O tratamento com HCQ não alterou significativamente a PAS em nenhuma das linhagens; no entanto, aumentou a FC nos ratos Wistar. A função ventricular esquerda, a reatividade coronariana e aórtica não foram alteradas pela HCQ. O índice de massa ventricular (IMV) foi menor nos ratos Wistar HCQ e o diâmetro dos cardiomiócitos foi reduzido tanto nos animais normotensos quanto nos hipertensos tratados. A HCQ não alterou a expressão ou a fosforilação da ERK1/2, nem a atividade da metaloproteinase de matriz 2 em nenhuma das linhagens. A expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foi maior nos animais Wistar HCQ, mas não nos hipertensos. A HCQ aumentou os níveis de peroxidação lipídica e a atividade da SOD, CAT e glutathiona peroxidase

tanto nos ratos Wistar quanto nos SHR. O tratamento também reduziu o colágeno perivascular nos Wistar e o colágeno intersticial nos SHR. A HCQ reduziu a marcação imuno-histoquímica para interleucina-1 beta (IL-1 β) no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos. A HCQ reduziu a massa de gordura mesentérica, retroperitoneal e epididimal nos animais normotensos, mas não nos hipertensos. O peso do fígado e do pâncreas não foi afetado pela HCQ em nenhuma das linhagens. Assim, pode-se concluir que o tratamento com HCQ afeta de maneira distinta o perfil metabólico e a morfologia cardíaca em animais normotensos e hipertensos. Notavelmente, a HCQ demonstrou benefícios mais significativos nos SHR, promovendo maior proteção contra hipertrofia, fibrose cardíaca e estresse oxidativo.

Palavras-Chave: Hidroxicloroquina; alterações cardiovasculares; alterações metabólicas; contratilidade cardíaca; hipertensão; tecido adiposo.

ABSTRACT

Hydroxychloroquine (HCQ) is widely used for the treatment of rheumatic diseases. Studies show that patients using this medication may experience cardiovascular and metabolic alterations. On the other hand, studies indicate that HCQ may have protective effects on the heart and metabolism. However, there are not many studies evaluating its effects under hypertensive conditions. Thus, the present study aimed to evaluate the cardiovascular effects of HCQ and whether these effects differ in hypertensive animals. Male normotensive (Wistar) and hypertensive (SHR, spontaneously hypertensive rats) rats, aged 16 weeks, were used. The experimental groups were divided into Wistar vehicle, Wistar HCQ, SHR vehicle, and SHR HCQ groups. The animals received either saline or HCQ (40 mg/kg/day) via gavage for 30 days. Body weight, water and food intake, systolic blood pressure (SBP), and heart rate (HR) were assessed weekly. SBP and HR were analyzed using tail-cuff plethysmography. Cardiac contractility was evaluated using the isolated heart technique under constant pressure. Aortic reactivity was assessed in isolated aortic rings using an organ bath system. The following organs were collected for weighing and/or histological and molecular analysis: left ventricle (LV), liver, pancreas, and white and brown adipose tissues. Normotensive animals treated with HCQ exhibited reduced body weight during the last two weeks of treatment compared to basal and the vehicle group at the same time. Both treated and untreated hypertensive animals showed a similar increase in body weight. The Wistar rats treated with HCQ consumed less feed and water than their control group, and there was a reduction in water intake in SHR. HCQ treatment did not significantly alter SBP in either strain; however, it increased HR in Wistar rats. Left ventricular function and coronary and aortic reactivity were not affected by HCQ. The ventricular mass index (VMI) was lower in Wistar HCQ rats, and cardiomyocyte diameter was reduced in both normotensive and hypertensive treated rats. HCQ did not alter the expression or phosphorylation of ERK1/2 or the activity of matrix metalloproteinase 2 in either strain. Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) expression was higher in Wistar HCQ animals but not in hypertensive ones. HCQ increased lipid peroxidation levels and the activity of SOD, CAT, and glutathione peroxidase in both Wistar and SHR rats. Treatment also reduced perivascular collagen in Wistar and interstitial collagen in SHR. HCQ reduced the immunohistochemical labeling for interleukin-1 beta (IL-1 β) in the cardiac tissue of normotensive and

hypertensive rats. HCQ reduced mesenteric, retroperitoneal, and epididymal fat mass in normotensive animals but not in hypertensive ones. Liver and pancreas weights were not affected by HCQ in either strain. Thus, it can be concluded that HCQ treatment affects the metabolic profile and cardiac morphology differently between normotensive and hypertensive animals. Notably, HCQ demonstrated better benefits in SHR, promoting greater protective effects against hypertrophy, cardiac fibrosis, and oxidative stress.

Keywords: Hydroxychloroquine; cardiovascular changes; metabolic changes; cardiac contractility; hypertension; adipose tissue.

1. INTRODUÇÃO

A Cloroquina (CQ) é um fármaco amplamente utilizado no tratamento da malária e também conhecido por seu efeito anti-inflamatório, sendo utilizado para o tratamento de Artrite Reumatoide (AR) e Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (Schrezenmeier & Dörner, 2020). A CQ é derivada do quinino, uma substância extraída da casca da árvore de quina ou árvore de Cinchona, utilizado há centenas de anos para o tratamento da malária (Wallace, 1996). O primeiro relato de uso dessa substância é de 1630, quando a condessa de Cinchona foi curada da malária com o chá da casca da árvore de quina (Mates et al., 2007). Na década de 40 a CQ foi sintetizada e utilizada para tratar a malária por soldados durante a Segunda Guerra Mundial (Shippey et al., 2018). Há relatos de que antes de ser usada na guerra, a CQ já havia sido estudada pelos alemães, mas seu uso não foi aprovado devido à sua toxicidade em modelos aviários (Ben-Zvi et al., 2012).

Os soldados que utilizaram a CQ apresentaram melhoras nas erupções cutâneas e AR (Page, 1951). Esse achado deu origem ao primeiro ensaio clínico para investigar o uso de antimaláricos para o tratamento do LES, comprovando posteriormente a sua eficácia no tratamento de doenças autoimunes (Clark et al., 1993; Tsakonas et al., 1998). Em 1955 a forma sintética da Hidroxicloroquina (HCQ) foi introduzida, diferindo da CQ apenas por um grupo hidroxila (Figura 1), mantendo a eficácia e reduzindo a toxicidade (Ben-Zvi et al., 2012). Atualmente, a HCQ é um fármaco amplamente reconhecido por sua ação imunomoduladora, desempenhando um papel fundamental no tratamento de doenças autoimunes.

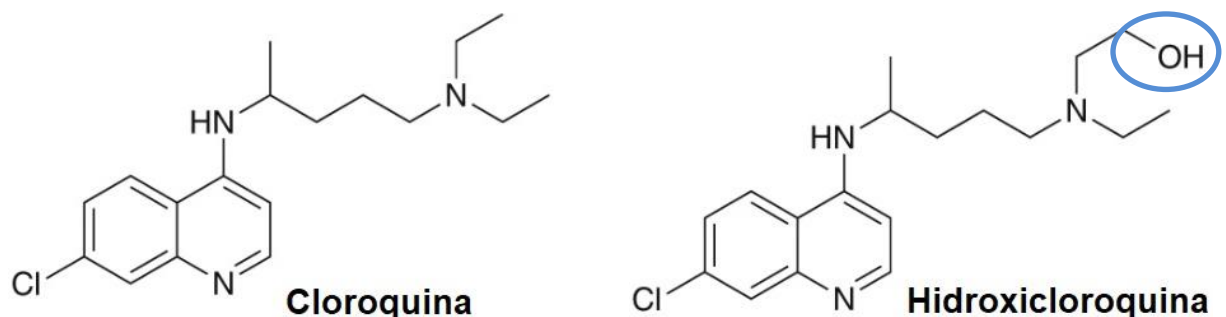


Figura 1 - Ilustração representativa da estrutura química da Cloroquina e Hidroxicloroquina.

Durante a pandemia de COVID-19, a HCQ foi amplamente estudada como um possível tratamento para a doença. Inicialmente, alguns estudos preliminares sugeriram que o medicamento poderia ter efeitos benéficos contra o SARS-CoV-2 (Andreani et al., 2020; J. Liu et al., 2020; Yao et al., 2020). Esses estudos iniciais geraram grande interesse e foram seguidos por vários ensaios clínicos em todo o mundo. No entanto, à medida que mais dados foram coletados, os resultados não conseguiram demonstrar benefícios significativos da HCQ no tratamento de COVID-19 (Boulware et al., 2020; Rosenberg et al., 2020) e, em alguns casos, apontaram para possíveis efeitos adversos. Como resultado, a maioria das principais organizações de saúde, incluindo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, não recomendam o uso de hidroxicloroquina para tratar COVID-19.

Dentre as principais indicações para o uso da HCQ, além da malária, pode-se destacar o LES, AR e Síndrome de Sjögren. O LES é uma doença autoimune crônica, que ocorre quando o sistema imunológico ataca seus próprios tecidos, gerando inflamação em diversas partes do corpo (Kaul et al., 2016). Essa inflamação multissistêmica está relacionada a erupções cutâneas, danos renais, danos pulmonares e cardiovasculares, dentre os quais podemos destacar aterosclerose e doença arterial coronariana (Sticherling & Kuhn, 2022). Assim como o LES, a AR também é uma doença inflamatória crônica e autoimune. A AR impacta o revestimento das articulações, ocasionando um inchaço doloroso que, com o tempo, pode levar à erosão óssea e deformidades articulares (Smolen et al., 2018). Além dos danos articulares, a AR está relacionada a danos nos olhos, pulmões, coração e vasos sanguíneos. A Síndrome de Sjögren é uma patologia autoimune inflamatória caracterizada por envolvimento de glândulas exócrinas. Tem como sinais clínicos boca e olhos secos, febre, dores nas articulações e sintomas neurológicos (Tian et al., 2021). Além disso, órgãos como pulmões, rins, fígado e pâncreas também podem ser afetados. Essa síndrome é classificada em primária, quando não há associação com outras doenças autoimunes e secundária, quando há associação com outras doenças autoimunes, como LES e AR (Qin et al., 2015).

1.1. Mecanismo de ação da HCQ

Os mecanismos de ação da HCQ têm sido objeto de investigação científica ao longo dos anos. Este composto tem demonstrado impacto significativo em diversos processos celulares. Uma das vias de ação da HCQ envolve a inibição da atividade lisossomal e da autofagia. Estudos prévios (Frustaci et al., 2012; Mauthe et al., 2018) evidenciaram que a HCQ se acumula nos lisossomos, levando ao aumento do pH dessas organelas e, conseqüentemente, inibindo a atividade enzimática lisossomal. Isso leva à disfunção da autofagia e ao processamento de antígenos, mecanismos cruciais em doenças autoimunes como o LES e a artrite reumatoide (Gies et al., 2020; Schrezenmeier & Dörner, 2020). A HCQ também afeta proteínas relacionadas à autofagia, como NQO2 e SEC23A, e modula o microambiente tumoral, influenciando fibroblastos e macrófagos associados ao câncer, o que pode explicar seu potencial na terapia oncológica (Low et al., 2023).

Além disso, a HCQ é conhecida por afetar as vias de sinalização do receptor Toll-like (TLR) por alterações no pH (Ewald et al., 2008). Este fármaco modula respostas imunológicas ao inibir a sinalização dos receptores Toll-like (TLR), particularmente TLR7 e TLR9, reduzindo a produção de citocinas e respostas inflamatórias (Aliede E. in 't Veld. et al., 2023; Kyburz et al., 2006). Ela afeta o equilíbrio das células T auxiliares, promovendo células T reguladoras e inibindo células T efetoras, o que é benéfico em doenças autoimunes (Long et al., 2024; Martinez et al., 2020). Além disso, a HCQ induz apoptose em células supressoras derivadas de células mieloides, aliviando sintomas do LES por meio da regulação positiva da expressão de CD81 (Ni et al., 2022).

A HCQ apresenta potenciais efeitos antivirais ao interferir na via endocítica e bloquear receptores de ácido siálico, o que pode inibir a entrada e a replicação viral (Satarker et al., 2020). Estudos mostram que a HCQ reduz a sinalização pró-inflamatória ao inibir a NADPH oxidase endossomal, envolvida na transdução de sinais de citocinas (Müller-Calleja et al., 2017). Ademais, An *et al.* (2015) destacaram a influência da HCQ na atividade da GMP-AMP cíclico sintase, inibindo a ligação de seu ligante (An et al., 2015).

1.2. Impacto cardiovascular e metabólico das doenças reumáticas

O LES e a AR são doenças autoimunes crônicas que afetam predominantemente mulheres em idade reprodutiva. Ambas são doenças autoimunes que desencadeiam respostas inflamatórias multissistêmicas, causando danos progressivos aos órgãos afetados (Kaul et al., 2016). O impacto dessas condições vai além das manifestações articulares, estendendo-se ao sistema cardiovascular, o que tem se tornado uma preocupação para pacientes com essas patologias (Aviña-Zubieta et al., 2017; Lazzerini et al., 2014; Munguia-Realpozo et al., 2019).

Estudos epidemiológicos têm estabelecido uma relação entre LES, AR e doenças cardiovasculares. Mulheres diagnosticadas com LES, conforme observado por (Tselios et al., 2017), enfrentam um aumento a longo prazo no número de eventos cardiovasculares ateroscleróticos, levantando a hipótese de que o uso de medicamentos destinados ao controle do LES possa contribuir para esse fenômeno. Aviña-Zubieta *et al.* (2017) corroboraram essas descobertas, destacando um risco ampliado de doenças cardiovasculares, especialmente no primeiro ano após o diagnóstico de LES (Aviña-Zubieta et al., 2017).

As alterações cardiovasculares não se limitam ao LES, estendendo-se à AR. Ahlers *et al.* (2020) observaram um aumento significativo no risco de insuficiência cardíaca em pacientes com AR (Ahlers et al., 2020). Estudos de Mantel *et al.* (2015) evidenciaram uma síndrome coronariana aguda mais grave em pacientes com AR, além de um risco aumentado de mortalidade a curto prazo (Mantel et al., 2015).

Além das repercussões no sistema cardiovascular, esses distúrbios autoimunes também induzem alterações metabólicas. Em pacientes com LES foi observada uma associação entre síndrome metabólica (SM) e síndrome coronariana (Sabio et al., 2009). Vadacca *et al.* (2009) sugeriram que níveis elevados de leptina podem servir como fator de risco adicional para doenças cardiovasculares em pacientes com LES e AR (Vadacca et al., 2009). Já foi descrito também que pacientes com AR exibem resistência à insulina e redução da atividade das células β , predispondo-os à SM e à formação de placas ateroscleróticas (Dessein et al., 2006).

Embora a HCQ tenha sido tradicionalmente reconhecida por seus efeitos benéficos na modulação do sistema imunológico, recentes descobertas destacam a complexidade das interações dessa substância com o sistema cardiovascular e metabólico. Dentre as complicações cardiovasculares relacionadas ao uso da HCQ,

destaca-se as arritmias ventriculares refratárias, hipertrofia ventricular, prolongamento do intervalo QT, insuficiência cardíaca com severa redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, hipertensão arterial pulmonar e disfunção valvular (Chatre et al., 2018; Chen et al., 2006). Essas manifestações são ligadas à formação de corpos mieloides sarcoplasmáticos e curvilíneos, induzindo espessamento da parede ventricular e, conseqüentemente, disfunção dos miócitos (Manohar et al., 2009).

Contrastando esses achados, estudos recentes apresentam evidências que apontam para um papel protetor da HCQ contra distúrbios cardiovasculares, especialmente em contextos inflamatórios como os observados no LES e na AR (Fasano et al., 2017). Bourke *et al.* (2015) demonstraram, em um modelo *in vivo* de lesão isquemia/reperfusão em ratos, que a HCQ promove uma proteção semelhante ao pré-condicionamento, mediada pelo aumento da fosforilação da quinase pró-sobrevivência ERK1/2 (Bourke et al., 2015).

Além dos potenciais benefícios cardiovasculares, a HCQ também exibe propriedades metabólicas benéficas. Estudos documentaram a capacidade da HCQ em reduzir os níveis de colesterol e diminuir o risco de diabetes mellitus tipo 2 (Sharma et al., 2016). Penn *et al.* (2010) relataram a associação entre o tratamento com HCQ e a redução do índice glicêmico em mulheres não diabéticas com LES ou AR (Penn et al., 2010). Além disso, Solomon *et al.* (2014) observaram melhorias nos perfis lipídicos em pacientes diabéticos com AR após 8 semanas de tratamento com HCQ (Solomon et al., 2014). Recentes descobertas também sugerem que a HCQ desempenha um papel crucial na melhoria da resistência à insulina e na atenuação da lipotoxicidade associada à obesidade (Qiao et al., 2019). Já foi descrito também a capacidade da HCQ em melhorar a obesidade induzida por dieta hipercalórica, por meio da estabilização do equilíbrio redox e da modulação da resposta inflamatória (Hasan et al., 2023a).

1.3. Hipertensão arterial sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição médica crônica globalmente prevalente, caracterizada por níveis elevados e persistentes da pressão arterial, afetando significativamente o sistema cardiovascular. É uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 1,28 milhão de indivíduos entre 30 e 79

anos são impactados por essa doença (World Health Organization, 2023). No Brasil, a situação é igualmente alarmante, com estimativas de 667.184 mortes relacionadas à HAS entre 2008 e 2017, conforme as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia 2020 (Barroso et al., 2021).

A hipertensão clínica pode ser classificada como primária ou essencial e secundária (Nadella & Howell, 2015). A hipertensão primária ou essencial abrange entre 85%-95% dos casos e tem sua origem não identificada. Já a hipertensão secundária é causada por condições subjacentes identificáveis, tais como estenose da artéria renal, adenoma adrenal, mutações de um único gene, entre outras (Harrison et al., 2021).

A fisiopatologia da HAS é multifatorial e envolve complexas interações entre fatores genéticos, ambientais e comportamentais (Foëx & Sear, 2004). Alterações na regulação do sistema renina-angiotensina, disfunção endotelial, aumento na resistência vascular periférica e desequilíbrio no sistema nervoso autônomo desempenham papéis importantes. Além disso, a inflamação crônica e a disfunção metabólica contribuem para a progressão da doença (Harrison et al., 2021).

Vários fatores de risco estão associados ao desenvolvimento da HAS. Entre eles, destacam-se a idade avançada, histórico familiar, obesidade, sedentarismo, consumo excessivo de sódio, tabagismo e ingestão excessiva de álcool (World Health Organization, 2023). Além desses, condições médicas subjacentes, como diabetes mellitus (Tsimihodimos et al., 2018), dislipidemia (Otsuka et al., 2015) e doença renal crônica (Burnier & Damianaki, 2023), também aumentam o risco de desenvolver hipertensão. A hipertensão também é reconhecida como um fator de risco significativo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo o infarto agudo do miocárdio (IAM) (Yan et al., 2021), acidente vascular cerebral (AVC) (Gorelick et al., 2020), insuficiência cardíaca (Rodeheffer, 2011) e também diabetes (Jia & Sowers, 2021) e doença renal crônica (Burnier & Damianaki, 2023).

A HAS tem estreita relação com as doenças metabólicas, uma vez que a obesidade e alta ingestão de sódio estão entre os principais fatores de risco para a hipertensão (Stanciu et al., 2023). A SM caracterizada pela presença de diversos fatores de risco, dentre eles a resistência à insulina, dislipidemia, e hipertensão, aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em pacientes com obesidade (Mottillo et al., 2010). Já foi demonstrado que a insulina possui ação anti-natriurética ao promover reabsorção de sódio e dessa forma pode contribuir para

o desenvolvimento da hipertensão em indivíduos com SM (Soleimani et al., 2023). O aumento na concentração de ácidos graxos livres promove estresse oxidativo e uma resposta pró-inflamatória (Tripathy et al., 2003), levando a um prejuízo na vasodilatação dependente de endotélio (Steinberg et al., 1997).

Vários modelos animais têm sido utilizados para estudar a HAS, como os de hipertensão neurogênica, renovascular, DOCA-Sal, coarctação da aorta e genéticos (Jr. et al., 2001). Dentre esses os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) se destacam pela semelhança com a hipertensão essencial em humanos (Takeshi, 1977). Nos primeiros estágios da hipertensão, os SHR apresentam um aumento no débito cardíaco (DC) e uma resistência periférica total (RPT) normal; no entanto, à medida que o estado hipertensivo se estabiliza, o débito cardíaco retorna ao normal e os vasos sanguíneos hipertrofiados resultam em uma resistência periférica total mais elevada (Dickhout & Lee, 1997; Mohammed-Ali et al., 2017; Smith & Hutchins, 1979). Além das alterações no DC e RPT, os SHR apresentam modificações na musculatura lisa vascular, culminando em hipertrofia ventricular esquerda e hiperatividade do sistema nervoso simpático e expressão elevada da enzima conversora de angiotensina (ECA) em órgãos como coração, rins e adrenais (Jr. et al., 2001; Lee et al., 2012).

O LES e a AR têm sido associados a diversas doenças cardiovasculares, sendo considerados fatores de risco para o desenvolvimento da HAS. Tratamentos com corticoides, imunossupressores e anti-inflamatórios não esteroides, comumente utilizados para controlar sintomas inflamatórios nessas condições, têm sido relacionados ao aumento da pressão arterial (Munguia-Realpozo et al., 2019; Panoulas et al., 2008). Estudos sugerem que a HAS em pacientes com AR pode não estar diretamente associada à inflamação sistêmica ou à resistência à insulina, mas sim à disfunção da homeostase vascular e lipídica, que parecem desempenhar um papel relevante na patogênese da HAS nesse contexto (Siriporn Manavathongchai et al., 2015).

Pesquisas realizadas por Taylor and Ryan (2017), utilizando um modelo de camundongos fêmeas (NZBWF1), que desenvolvem LES espontaneamente, revelaram múltiplos fatores contribuintes para a patogênese da hipertensão, incluindo citocinas inflamatórias, fator de necrose tumoral-alfa ((TNF)- α), estresse oxidativo, hiperatividade de células β e produção de autoanticorpos (Taylor & Ryan, 2017).

Apesar de estudos prévios já terem explorado a relação entre o uso da HCQ, doenças cardiovasculares e metabólicas, há uma lacuna sobre os efeitos desse fármaco em indivíduos hipertensos. Ademais, a dualidade dos efeitos da HCQ instiga uma análise aprofundada e uma compreensão mais completa buscando esclarecer se este fármaco pode apresentar efeitos prejudiciais adicionais na hipertensão arterial.

2.OBJETIVOS

2.1. Gerais

Ampliar os conhecimentos sobre os efeitos da Hidroxicloroquina na função cardiovascular e avaliar se estes efeitos são diferentes entre animais normotensos e hipertensos.

2.2. Específicos

- Avaliar os efeitos do tratamento com a Hidroxicloroquina em animais normotensos e hipertensos sobre os seguintes parâmetros:
 - Pressão arterial e frequência cardíaca;
 - Função ventricular esquerda;
 - Reatividade vascular aórtica e coronariana;
 - Alterações morfológicas no coração;
 - Comportamento alimentar, evolução do peso corporal, adiposidade visceral e subcutânea;
 - Estresse oxidativo no coração.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Para este estudo foram utilizados ratos machos adultos normotensos da linhagem Wistar e ratos hipertensos da linhagem SHR com 16 semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os animais foram alocados no Departamento de Ciências Fisiológicas/ICB/UFG, com temperatura ambiente de aproximadamente 23°, ciclo de 12h claro/12h escuro e livre acesso à água e comida. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, medindo 41cmx35cmx16cm, com no máximo 5 ratos por caixa. Todos os protocolos utilizados foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Pró-Reitoria de Pesquisa da UFG (CEUA/UFG), sob número 087/22.

3.2. Tratamento

Após completarem 16 semanas de vida, os animais foram tratados com HCQ diariamente (40 mg/kg/dia), por gavagem durante 30 dias, sendo eutanasiados ao final do tratamento. Esta dose foi escolhida baseando-se em estudos prévios que avaliaram o efeito da HCQ em diferentes condições (Wang, Xi and Kukreja, 2017; Bai *et al.*, 2019).

Desta forma, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

Wistar:

- Veículo;
- HCQ;

SHR:

- Veículo;
- HCQ;

3.3. Massa corporal e ingestão alimentar

Durante todo o período experimental os animais tiveram o seu peso corporal e a ingestão de água e ração aferidos semanalmente. O consumo semanal médio de

cada caixa foi dividido pela quantidade de animais nela alojados e a quantidade de dias em que a ração e água estavam disponíveis.

3.4. Pletismografia de cauda

A pressão arterial sistólica e frequência cardíaca de todos os animais foram mensuradas por pletismografia de cauda (PowerLab/400 ADInstruments) sem contenção, duas vezes por semana, durante todo o período experimental. Em cada dia de aferição, foram realizadas três medidas em cada animal, sendo o valor final a média aritmética destas três medidas.

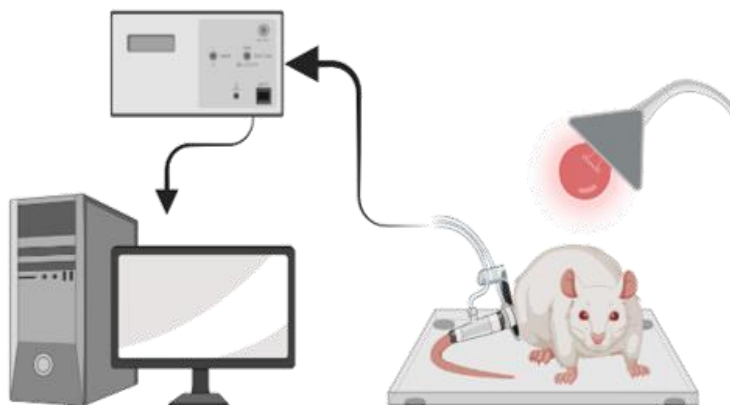


Figura 2 - Ilustração representativa da pletismografia de cauda.

3.5. Coração Isolado

Para avaliação da contratilidade cardíaca *ex-vivo*, os animais foram eutanasiados por decaptação, 10 minutos após terem sido heparinizados (200 U.I./mL de heparina) e foi utilizada a técnica de Langendorff, com pressão constante (Figura 2). A caixa torácica foi aberta, o coração retirado e colocado em um béquer com solução nutritora gelada de Krebs-Ringer (SKR) (Tabela 1) para diminuir o metabolismo miocárdico durante a canulação. O coração foi transferido para uma placa de Petri, também com solução nutritora gelada e os tecidos pulmonar e vascular, esôfago e traqueia, anexos ao coração, foram removidos. A artéria aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação e fixada a uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema de perfusão (Figura 3), com solução SKR

gaseificada (95% O₂, 5% CO₂), com temperatura regulada a 37°C. Após ter sido conectado ao sistema de perfusão, um dreno de polietileno PE-50 foi introduzido pelo átrio esquerdo (AE), conduzido até o ventrículo esquerdo (VE) e exteriorizado. Para análise da contratilidade cardíaca foi introduzido no VE, via AE, um balão conectado a um transdutor de pressão para registro da pressão intraventricular sistólica (PIVS), pressão intraventricular diastólica (PIVD), dP/dt máxima e mínima e FC.

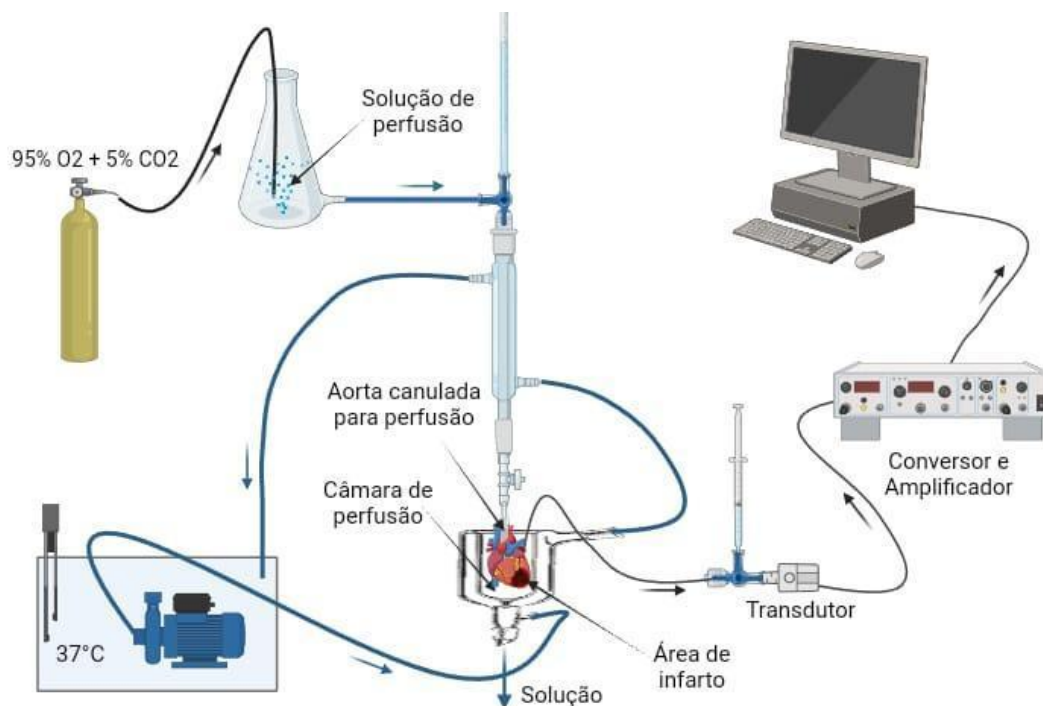


Figura 3 - Ilustração representativa da preparação de coração isolado de rato em sistema de pressão constante (técnica de Langendorff).

Tabela 1 - Composição da Solução de Krebs-Ringer.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	118,41
KCl	4,69
KH ₂ PO ₄	1,17
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,17
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25
C ₆ H ₁₂ O ₆	11,65
NaHCO ₃	26,24

3.5.1. Protocolo experimental de isquemia

Após um período de estabilização de 20 a 30 minutos, os corações isolados dos ratos foram submetidos ao protocolo de isquemia regional, pela oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda, durante 15 minutos. Após 15 minutos de isquemia, o fluxo para a artéria coronária foi liberado e os corações foram reperfundidos por mais 30 minutos (Figura 4).

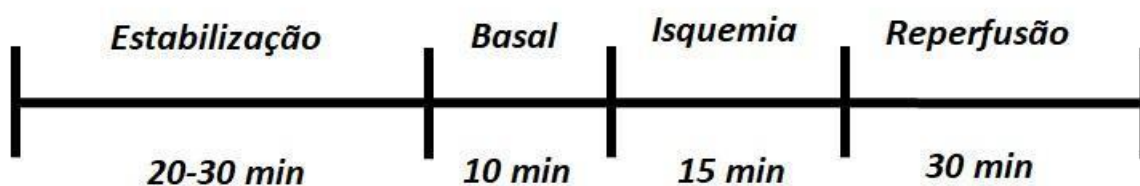


Figura 4 - Esquema do protocolo experimental de isquemia-reperfusão em coração isolado.

3.6. Reatividade vascular aórtica

Para a avaliação da reatividade vascular aórtica, anéis de aorta torácica descendente, livre de tecido adiposo e conectivo, foram montados em cubas contendo Solução de Krebs-Henseleit (SKH) (Tabela 2) gaseificada (95% O₂ e 5% CO₂), com temperatura a 37°C, fixados á hastes metálicas acopladas a transdutores de força (Figura 5). Os animais foram eutanasiados por decapitação 10 minutos após serem

heparinizados (200 U.I./mL de heparina). A cavidade torácica foi exposta e a aorta torácica descendente foi retirada e dividida em quatro anéis de 4 mm. Dois anéis tiveram o endotélio preservado e os outros dois foram retirados por fricção do endotélio com a haste metálica. Os anéis foram estabilizados por um período de 1 hora a uma tensão de 1,5 g. Para avaliação do relaxamento dependente de endotélio foi realizada curva dose-resposta cumulativas de acetilcolina (ACh 10⁻⁹ a 10⁻⁵mol/L) em vasos com endotélio. O relaxamento independente de endotélio foi avaliado realizado por curva cumulativa de nitroprussiato de sódio (NPS 10⁻¹¹ a 10⁻⁶ mol/L). Para avaliação da contração em vasos com endotélio e sem endotélio preservado, foi realizada curva dose-resposta cumulativa de fenilefrina (Phe 10⁻⁹ a 10⁻⁵).

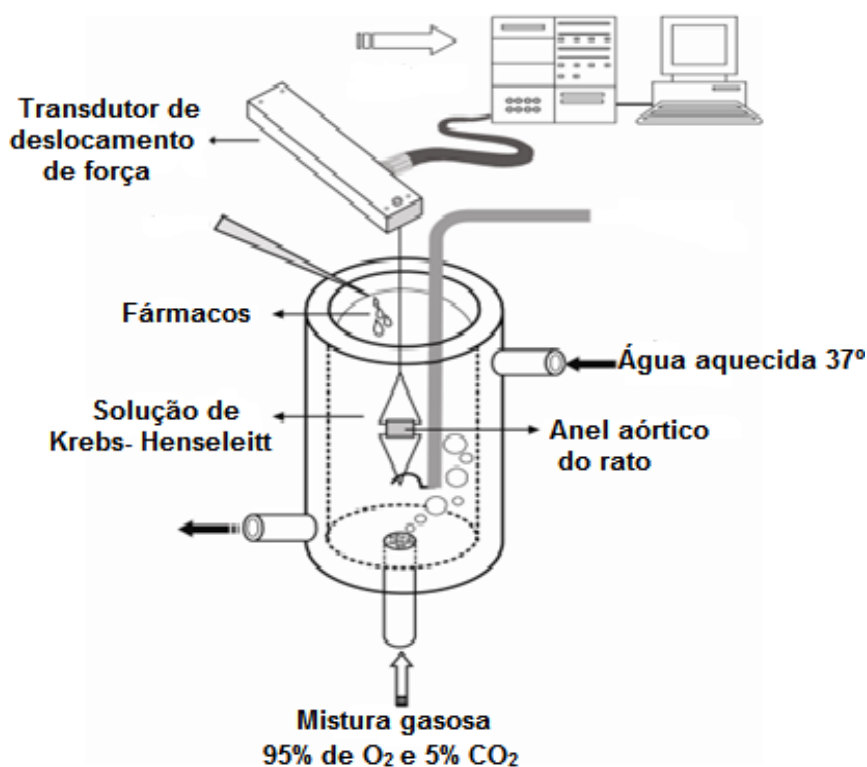


Figura 5 - Ilustração representativa da preparação de aorta isolada de rato em sistema de banho de órgãos (Yildiz, Seyrek and Gul, 2013).

Tabela 2 - Composição da Solução Krebs-Henseleit.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (mmol/L)
NaCl	118,6
KCl	4,6
KH₂PO₄	0,9
MgSO₄.7H₂O	2,4
CaCl₂.2H₂O	3,3
C₆H₁₂O₆	11,1
NaHCO₃	24,9

3.7. Histologia

3.7.1. Análise morfológica do ventrículo esquerdo

As análises morfológicas foram realizadas em tecidos de um segundo grupo de animais, cujos corações não foram utilizados para a técnica de coração isolado. Os animais foram submetidos a eutanásia por Tribromoetanol 2,5% (1ml/100gr). A caixa torácica foi aberta para extração do coração e o mesmo foi colocado em solução de cloreto de potássio (KCl, 4mM) para o relaxamento total das fibras cardíacas. Posteriormente, o VE foi dissecado e pesado separadamente. O terço médio do VE foi colocado em solução fixadora de Bouin (tabela 3) por um período de 4 horas para fixação do tecido e realização de processos histológicos. Após um período de fixação em Bouin por 4 horas, o material foi lavado com água destilada a cada 1 hora, durante 8 horas (sempre na geladeira). Passado esse tempo, os tecidos foram colocados em álcool 70% até o processamento histológico.

Tabela 3 - Composição da solução de Bouin.

Bouin (fixador)	
Reagente	Volume
Ácido pícrico concentrado	75ml
Formol	25ml
Ácido acético	5ml

Após ser retirado do álcool 70%, os tecidos passaram por soluções de concentrações crescentes de álcool (descritos na tabela 4) para o processo de desidratação, diafanização em Xilol e por fim inclusão em Paraplast.

Tabela 4 - Etapas realizadas para o processo de desidratação e diafanização do tecido até o emblocamento.

Bateria de desidratação	
Reagente	Período
Álcool 80%	Overnight
Álcool 95%	1 hora
Álcool Absoluto I	1 hora
Álcool Absoluto II	1 hora
Álcool Absoluto III	1 hora
Diafanização	
Reagente	Período
Xilol I	1 hora
Xilol II	1 hora
Parafina I	1 hora
Parafina II	1 hora
Paraplast	Emblocamento

Posteriormente ao emblocamento, os blocos foram seccionados em micrótomo (Leica RM2155, Nussloch, Germany) com cortes de 5µm de espessura, sendo 3 cortes (com intervalos de aproximadamente 100 µm entre eles) por lâmina de cada animal. Após os cortes, o material foi fixado às lâminas (Exacta 26x76x1x1.2m.m). As lâminas passaram por uma bateria de reidratação, posteriormente pela coloração com

picrossírius/hematoxilina (Tabela 5) para tecido cardíaco e hematoxilina/eosina (Tabela 6) para os demais tecidos e montagem utilizando-se Entellan® para aderirem a lâminulas (Precision®).

Tabela 5 - Procedimentos utilizados para desparafinização, coloração e montagem das lâminas.

Coloração Picrossírius/ Hematoxilina		
Reagente	Função	Período
Xilol I	Desparafinização	20 minutos
Xilol II	Desparafinização	20 minutos
Xilol III	Desparafinização	20 minutos
Álcool 100% I	Desparafinização	1 minuto
Álcool 100% II	Desparafinização	2 minutos
Álcool 70%	Hidratação	1 minuto
Álcool 50%	Hidratação	1 minuto
Água corrente	Hidratação	2 minutos
Picrossírius	Coloração	1 hora
Água corrente	Lavagem	2 segundos
Hematoxilina	Coloração	8 minutos
Água corrente	Lavagem	10 minutos
Álcool 95%	Desidratação	1 minuto
Álcool 100% (Absoluto I)	Desidratação	1 minuto
Álcool 100% (Absoluto II)	Desidratação	1 minuto
Álcool 100% (Absoluto III)	Desidratação	1 minuto
Xilol I	Diafanização	1 minuto
Xilol II	Diafanização	1 minuto
Xilol III	Diafanização	1 minuto
Entellan	Montagem	

Para captura das imagens histológicas foi utilizado o microscópio Zeiss AxioScope A1 e o software Zen Lite 2012. Assim, realizou-se 15 fotomicrografias (com objetiva de 40x) de cortes longitudinais dos cardiomiócitos para mensuração do diâmetro destas células cardíacas para determinação de hipertrofia celular. Estabeleceu-se um total de 40 cardiomiócitos por cada animal, considerando-se

apenas aqueles que apresentaram limites identificáveis e núcleos visíveis, excluindo regiões de grandes vasos. Para análise de colágeno intersticial e perivascular utilizou-se a objetiva de 20x e lente polarizada. Para análise do colágeno intersticial realizou-se 15 fotomicrografias e para o colágeno perivascular 5 fotomicrografias. Para quantificar o percentual de colágeno intersticial, foi aplicada uma grade-teste com sistema de 130 pontos. Os pontos coincidentes com colágeno foram quantificados, relativizados e expressos em valores percentuais por campo fotomicrográfico. A fibrose perivascular foi avaliada por meio da razão da área do colágeno dividida pela área do lúmen vascular. A análise das imagens capturadas foi realizada pelo *software Image Pro-Plus v 6.0*.

3.7.2. Imuno-histoquímica

Os cortes histológicos de coração (n = 4 animais por grupo) foram submetidos a reação de imuno-histoquímica para detectar IL-1 β . Depois de desparafinizados, os cortes foram reidratados em série decrescente de etanol, e submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6,0) a 100°C por 1 hora. Em seguida, foram lavados em tampão fosfato salino (PBS) por 3 vezes de 5 minutos. Para a detecção do anticorpo primário foi utilizado o kit *Leica BIOSYSTEMS NovoLink Polymer Detection System* (RE7150-K) que incluiu etapas sequenciais intercaladas com etapas de lavagem (PBS 3 x 5 minutos). O bloqueio da atividade endógena da peroxidase foi realizado pela aplicação do *Novocastra Protein Block*, por 5 minutos. Depois disso, os cortes foram incubados com o anticorpo primário (*Anti-human interleukin-1beta, P420B/Invitrogen*) diluído em albumina sérica bovina (BSA) a 1%, na concentração de 1:100 a 4 °C *overnight*. O controle negativo da reação foi obtido pela omissão do anticorpo primário. No dia seguinte, os cortes foram incubados com o *Post Primary Block* e o polímero, ambos por 1 hora cada. Por fim, os cortes foram revelados com diaminobenzidizina (*DAB Chromogen e NovoLink DAB Substrate Buffer*), contrastados com hematoxilina, desidratados em série crescente de etanol e montados em Entellan (MERK). Para quantificar as áreas como marcação positiva para IL-1 β , foram capturadas 25 fotomicrografias por grupo experimental em microscópio *Zeiss AxioScope (Zeiss, Germany)*. Todas as fotomicrografias foram obtidas com os mesmos padrões de iluminação e contraste. As imagens foram

analisadas no *software Fiji (Image J)*. Foi realizada deconvolução das imagens para separação dos canais DAB/hematoxilina e, em seguida, as áreas castanhas positivas (μm^2) para IL-1 β foram mensuradas por meio da ferramenta *color threshold*.

3.8. Western Blotting

Para análise da expressão proteica (figura 9), fragmentos dos ventrículos esquerdos foram retirados da região do ápice e da base e homogeneizados em tampão de digestão contendo PBS (NaCl 100 mM, Tris-base 50 mM, EDTA 2 H₂O mM, Na₄P₂O₇ 10 H₂O 50 mM, e MgCl₂ 1 mM, pH 8.0), 0.3% Triton X-100, 1% Nonidet P40, 0.5% deoxicolato de sódio, e NaF 20 mM. Também foi adicionado ao tampão, inibidores de protease e fosfatase (aprotinina, leupeptina, ortovanadato de sódio, PMSF).

As proteínas foram quantificadas utilizando o método de *Bradford* (Bradford, 1976), para separação em gel de *SDS-PAGE*. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por eletroforese, incubadas com solução de bloqueio (leite desnatado, 5%) e detergente para evitar ligações inespecíficas. As membranas foram incubadas na presença do anticorpo primário contra as proteínas selecionadas (Tabela 6) e, posteriormente, com anticorpo secundário (anti-rabbit ou anti-mouse) para direcionamento de porções do anticorpo primário.

A reação foi revelada por quimioluminescência utilizando o kit ECL (*Thermo Scientific*®). Em todos os experimentos as concentrações de proteína foram normalizadas pelos níveis de expressão de GAPDH e analisados pelo *software ImageJ* (versão 1.54m).

Tabela 6 - Lista de anticorpos utilizados para o western blot.

Anticorpo primário	No. catálogo	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
pERK1/2	4370 (Cell Signaling)	1:3000	Anti-rabbit	1:4000
ERK1/2	9102L (Cell Signaling)	1:3000	Anti-rabbit	1:4000
Catalase	PA5-29650 (Invitrogen)	1:500	Anti-rabbit	1:500
SOD	13119 (Santa Cruz)	1:500	Anti-rabbit	1:500
GAPDH	32233 (Santa Cruz)	1:15000	Anti-mouse	1:30000

3.9. Zimografia

As amostras de ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em tampão de Lise, como descrito acima na técnica de *western blotting*. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de *Bradford* (Bradford, 1976) e as amostras foram separadas por eletroforese em gel de 8% de bis-acrilamida contendo gelatina 1%. Para retirada do SDS após a eletroforese, os géis foram agitados em solução de Triton (2,5% Triton X-100; 50 mM Tris, pH 7,4; 5 mM CaCl₂). A ativação de MMPs foram induzidas pela incubação dos géis em solução de Tris (pH 7,4), CaCl₂ e NaCl a 37 °C por 20 horas. Após esse período foi realizada a coloração (0,5% *Coomassie Brilliant Blue*, 30% metanol e 10% ácido acético e descorados (35% de metanol e 10% ácido acético).

Os géis foram fotografados e a atividade das MMPs foi determinada pela intensidade de bandas claras (por degradação da gelatina) identificadas de acordo com os pesos moleculares específicos (MMPs 130 kD, MMP-9 84 kD e MMP-2 62 kD) e analisadas pelo *software ImageJ* (versão 1.54m).

3.10. Análise do estresse oxidativo

3.10.1. Determinação do Teor de Proteína

A concentração total de proteína foi medida pelo método descrito por *Bradford* (1976) (Bradford, 1976) utilizando BSA como padrão.

3.10.2. Níveis de Peroxidação Lipídica

Para a mensuração da peroxidação lipídica (LPO), foi utilizado o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A estimativa de TBARS foi realizada por espectrofotometria, seguindo o método descrito por Ohkawa et al. (1979) (Ohkawa et al., 1979) com algumas modificações. As amostras foram incubadas com ácido tiobarbitúrico, ácido acético (pH 3,4) e SDS a 95 °C por 60 minutos. O produto da reação foi determinado em 532 nm. Para interpretação dos resultados, foi realizada uma curva de MDA, e os dados são expressos como equivalentes de MDA em nmol/mg de proteína.

3.10.3. Determinação da Atividade da Glutathiona Peroxidase

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi determinada com base no método descrito por Wendel (1981) (Wendel, 1981), com algumas modificações. Às amostras foram adicionados 50 mM de tampão fosfato de potássio, 4,28 mM de azida de sódio, 6 mM de glutathiona reduzida (GSH), 0,9 mM de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), 2 U/mL de glutathiona redutase (GR) e 4 mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As reações foram lidas a cada 15 segundos por um período de 5 minutos a 340 nm. A atividade específica foi definida em unidades (U) de GPx/mg de proteína. Uma unidade (U) da enzima consome 1 μmol de NADPH/min a 25 °C.

3.10.4. Atividade da Superóxido Dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada por espectrofotometria. O princípio deste método é a capacidade da enzima superóxido dismutase de inibir a auto-oxidação da adrenalina. A amostra foi incubada com bitartarato de adrenalina a 60 mmol/L, e a intensidade da cor foi medida em 480 nm, segundo o método de Misra e Fridovich (1972) (Misra & Fridovich, 1972), com algumas modificações. A atividade enzimática é expressa em unidades (U) de SOD/mg de proteína.

3.10.5. Atividade da Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada espectrofotometricamente pela decomposição do H₂O₂ em 240 nm, de acordo com o método descrito por Aebi (1984) (Aebi, 1984) com algumas modificações. A amostra foi incubada com 86 mmol/L de H₂O₂ e tampão fosfato de sódio (pH 7,0). A atividade enzimática é expressa em unidades (U) de CAT/mg de proteína. Uma unidade (U) da enzima decompõe 1 μmol de H₂O₂/min a pH 7,0 e 25 °C.

3.11. Análise estatística

Os dados estão expressos com média \pm erro padrão da média. Os dados da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca *in vivo*, acompanhamento de peso e ingestão alimentar foram analisados usando *two-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Sidak* e *Dunnett*. Os dados do experimento de coração e vaso isolados foram analisados usando *two-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Sidak*. Para análise dos parâmetros basais do coração isolado, peso dos tecidos e parâmetros morfológicos, expressões e atividades proteicas, estresse oxidativo e imunohistoquímica foi utilizado teste t de *student* não pareado. Para as análises estatísticas e a construção dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism* (versão 9.0.2).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da HCQ no peso corporal

O peso corporal dos animais foi avaliado durante todo o período experimental. O grupo Wistar veículo apresentou aumento do peso corporal nas duas últimas semanas de tratamento quando comparados à semana 0 de tratamento (Figura 6A). Os animais normotensos tratados com HCQ apresentaram um peso corporal menor nas duas últimas semanas de tratamento em comparação ao grupo veículo e a semana 0 de tratamento (Figura 6A). Nos animais hipertensos não houve diferença entre o peso dos animais controles e tratados com HCQ, mas ambos os grupos apresentaram aumento do peso corporal em comparação com a semana 0 de tratamento (Figura 6B).

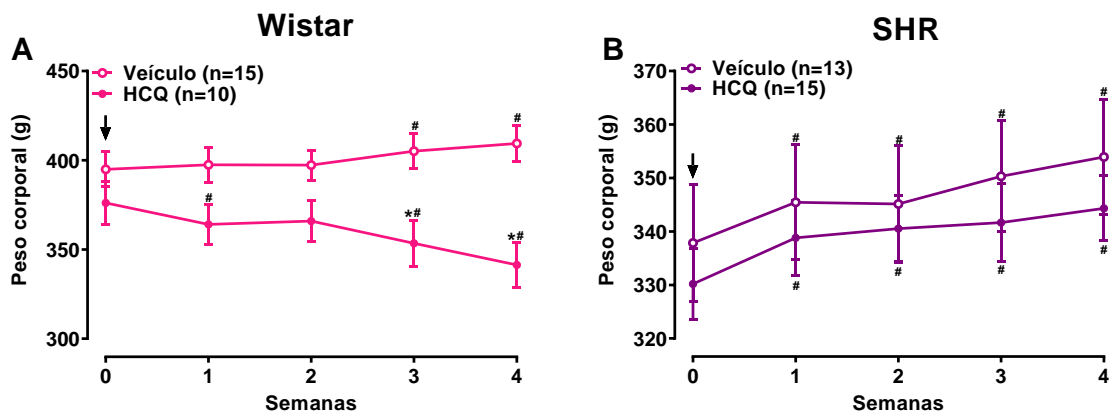


Figura 6 - Efeito da HCQ no peso corporal de ratos normotensos (A) e hipertensos (B). A seta indica o início do tratamento com salina ou HCQ. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Sidak (para comparação com o basal) * $P < 0,05$ vs veículo. # $P < 0,05$ vs semana 0.

A ingestão de água e ração também foi acompanhada durante todo período experimental. Foi observada redução na ingestão de ração e água dos Wistar tratados com HCQ quando comparados ao grupo veículo e nas semanas 1, 3 e 4 quando comparados à semana 0 de tratamento (Figura 7A e C). O tratamento não alterou a

ingestão de ração dos SHR, mas reduziu a ingestão de água desses animais (Figura 7B e D).

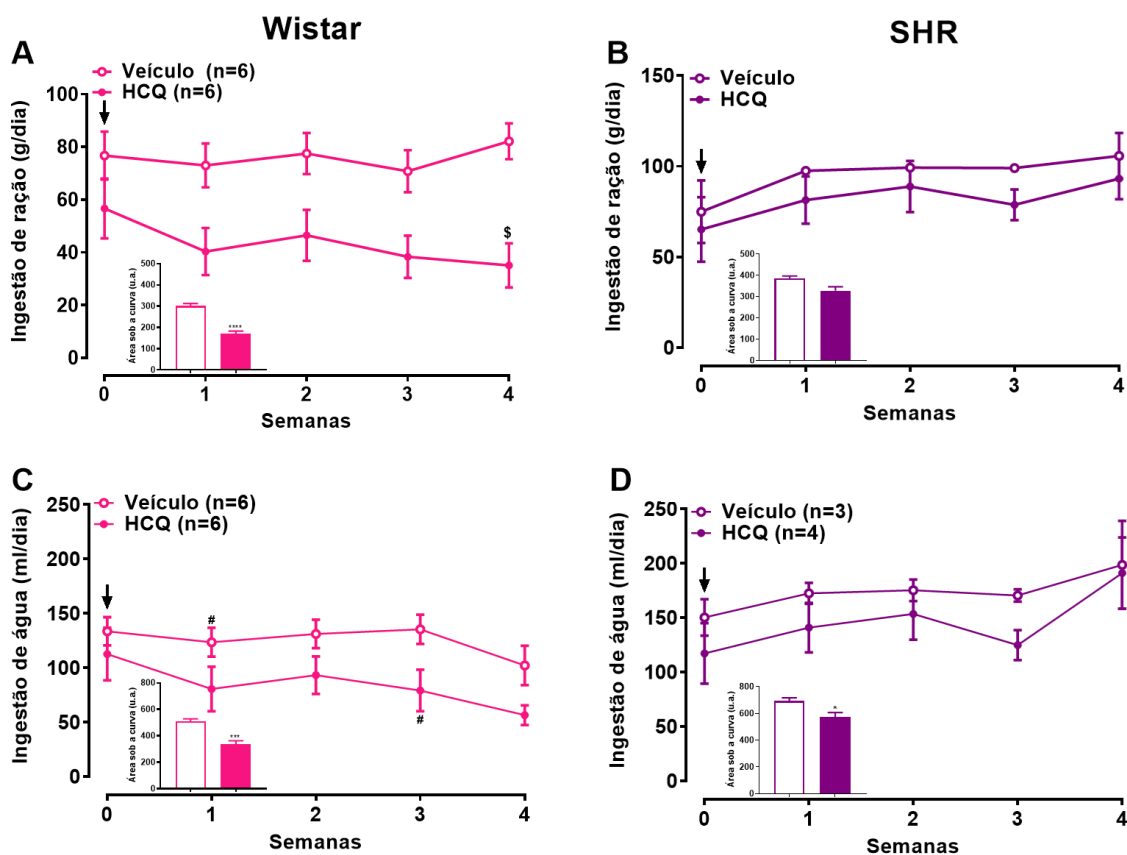


Figura 7 - Efeito da HCQ na ingestão de ração (A e B) e água (C e D) de ratos normotensos e hipertensos. A seta indica o início do tratamento com salina ou HCQ. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. *Two-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Sidak* (para comparação entre os grupos) e *Dunnett* (para comparação com o basal). \$P<0,05 vs veículo. #P<0,05 vs semana 0. *P<0,04. ***P<0,0003. ****P<0,0001.

4.2. Efeito da HCQ na pressão arterial sistólica e frequência cardíaca *in vivo* em ratos normotensos e hipertensos

Com o objetivo de avaliar os efeitos da HCQ na pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) *in vivo*, de modo não invasivo, foi feita pletismografia de cauda durante todo período experimental. Não foi observada nenhuma diferença na PA (Figura 8A) dos Wistar HCQ. Em relação a FC houve um aumento no grupo Wistar HCQ na segunda semana de tratamento em comparação com o grupo veículo, e

quando comparados a semana 0 de tratamento houve aumento da FC nas semanas 2 e 4 (Figura 8C). Não houve diferença na PA e FC dos SHR (Figura 8B e D).

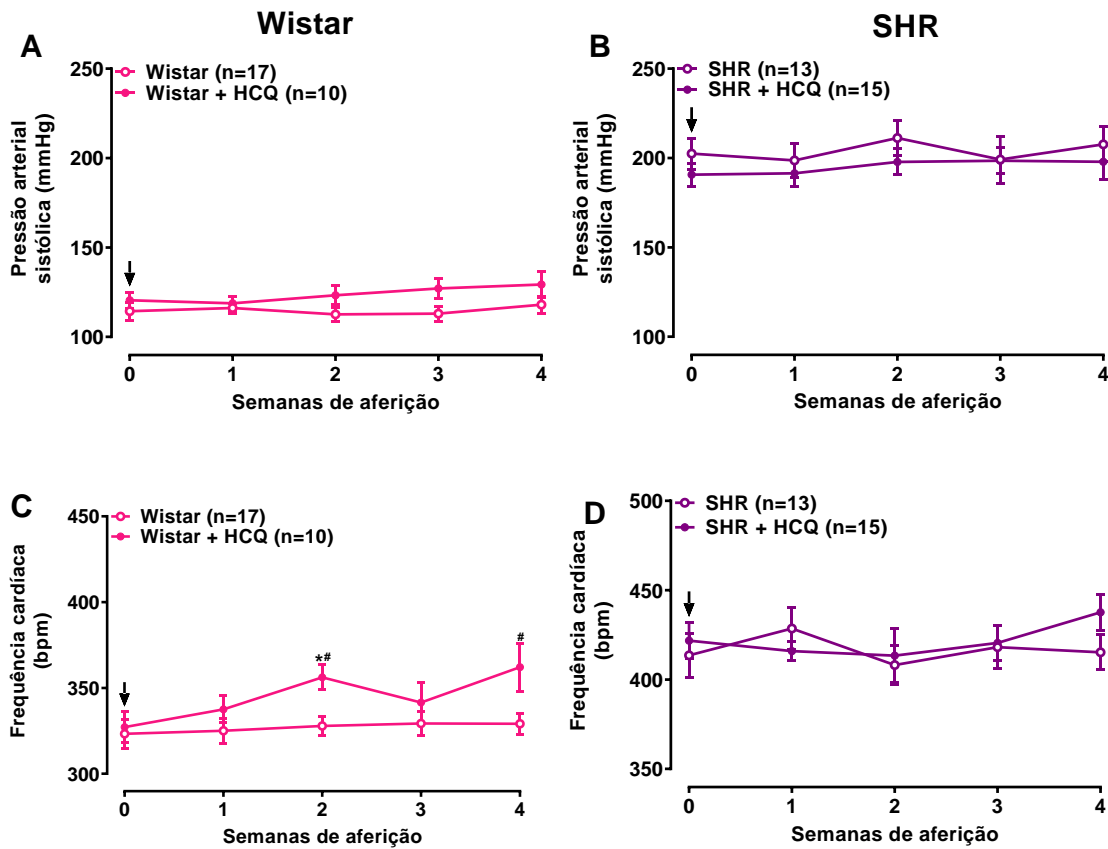


Figura 8 - Efeito da HCQ na PA (A e B) e FC (C e D) de ratos normotensos e hipertensos. A seta indica o início do tratamento com salina ou HCQ. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. *Two-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Sidak* (para comparação entre os grupos) e *Dunnnett* (para comparação com o basal). * $P < 0,05$ vs veículo. # $P < 0,05$ vs semana 0.

4.3. Efeito da HCQ na função ventricular esquerda *ex vivo* em ratos normotensos e hipertensos

Os efeitos da HCQ na função ventricular *ex vivo* foram avaliados em corações isolados, utilizando a técnica de Langendorff com pressão constante. Os parâmetros basais da função ventricular esquerda de ratos normotensos e hipertensos estão apresentados na tabela 6. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos parâmetros avaliados.

Tabela 7 - Parâmetros basais da função ventricular esquerda dos corações isolados dos ratos.

	Wistar		SHR	
	Veículo (n=8)	HCQ (n=5)	Veículo (n=6)	HCQ (n=7)
Fluxo (mL/min)	13,7 ± 0,9	12,8 ± 2,2	15,9 ± 3,4	12,9 ± 1,3
PIVS (mmHg)	97,7 ± 6,4	97,5 ± 12,1	120,0 ± 9,7	111,0 ± 12,2
PIVD (mmHg)	11,9 ± 0,6	11,8 ± 0,6	10,8 ± 0,6	10,6 ± 0,5
dP/dt max (mmHg/s)	1842 ± 121,0	1841 ± 199,4	2113 ± 162,8	2012 ± 214,4
dP/dt min (mmHg/s)	1491 ± 91,3	1495 ± 145,8	1649 ± 113,3	1608 ± 195,2
FC (Bpm)	241,5 ± 9,7	238,9 ± 8,3	209,2 ± 5,4	229,6 ± 9,7

Os dados estão expressos em média ± erro padrão da média e analisados por teste T de *student* não pareado. PIVS, pressão intraventricular sistólica; PIVD, pressão intraventricular diastólica; FC, frequência cardíaca.

Durante a isquemia do grupo veículo, foi observada uma redução na pressão intraventricular sistólica (PIVS), que retornou próximo aos valores basais durante a reperfusão nos dois grupos de animais. O tratamento com HCQ não alterou estas variações da PIVS tanto em Wistar como em SHR (Figura 9A e B). A pressão intraventricular diastólica (PIVD) foi aumentada durante a isquemia e retornou aos valores basais durante a reperfusão, tanto em corações de ratos Wistar como em SHR. O tratamento com HCQ não alterou essas variações (Figura 9C e D).

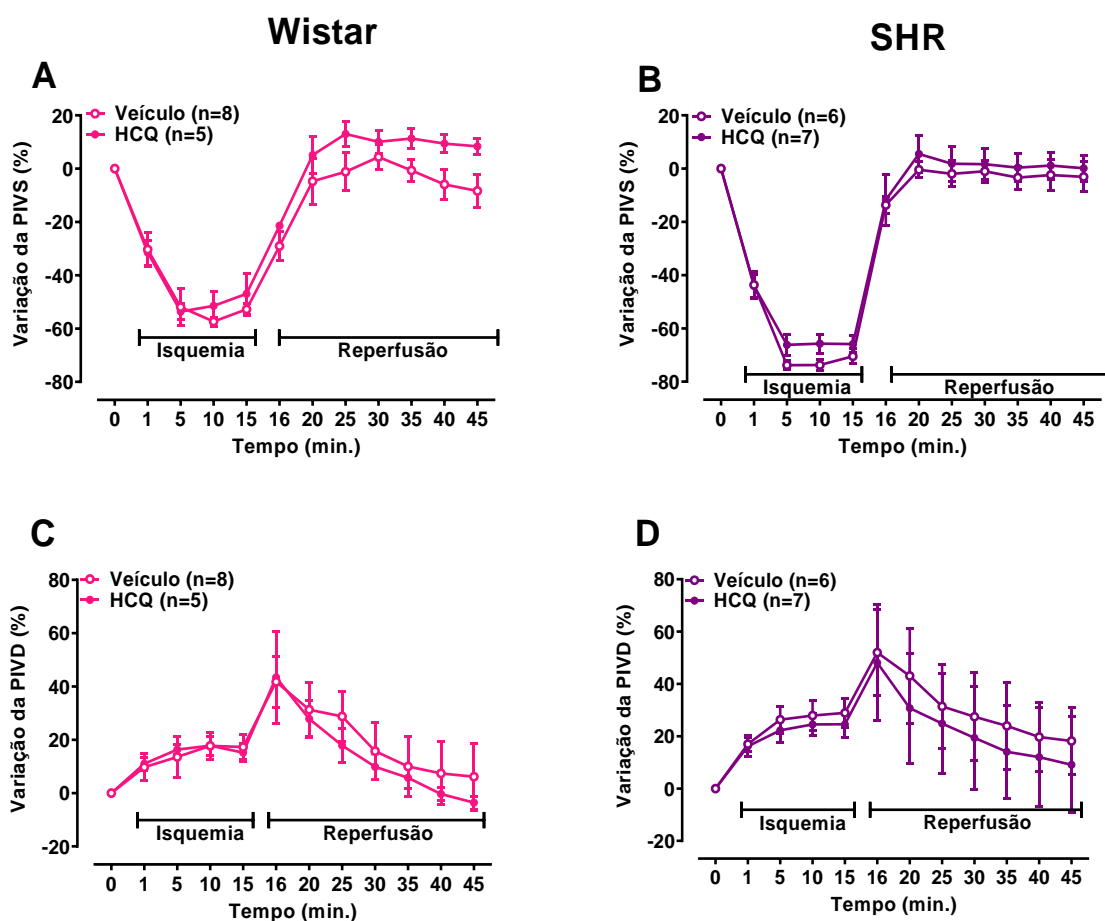


Figura 9 - Efeito da HCQ na PIVS (A e B) e PIVD (C e D) do coração isolado de ratos normotensos e hipertensos. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. *Two-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Sidak* para comparação entre os grupos.

Durante a isquemia do grupo veículo, foi observada uma redução da dP/dt máxima e mínima que retornou próximo aos valores basais durante a reperfusão nos dois grupos de animais. O tratamento com HCQ não alterou estas variações da dP/dt máxima e mínima em Wistar como em SHR (Figura 10A e B). A dP/dt mínima foi reduzida durante a isquemia e retornou aos valores basais durante a reperfusão tanto em corações de ratos Wistar como em SHR e o tratamento com HCQ também não alterou estas variações (Figura 10C e D).

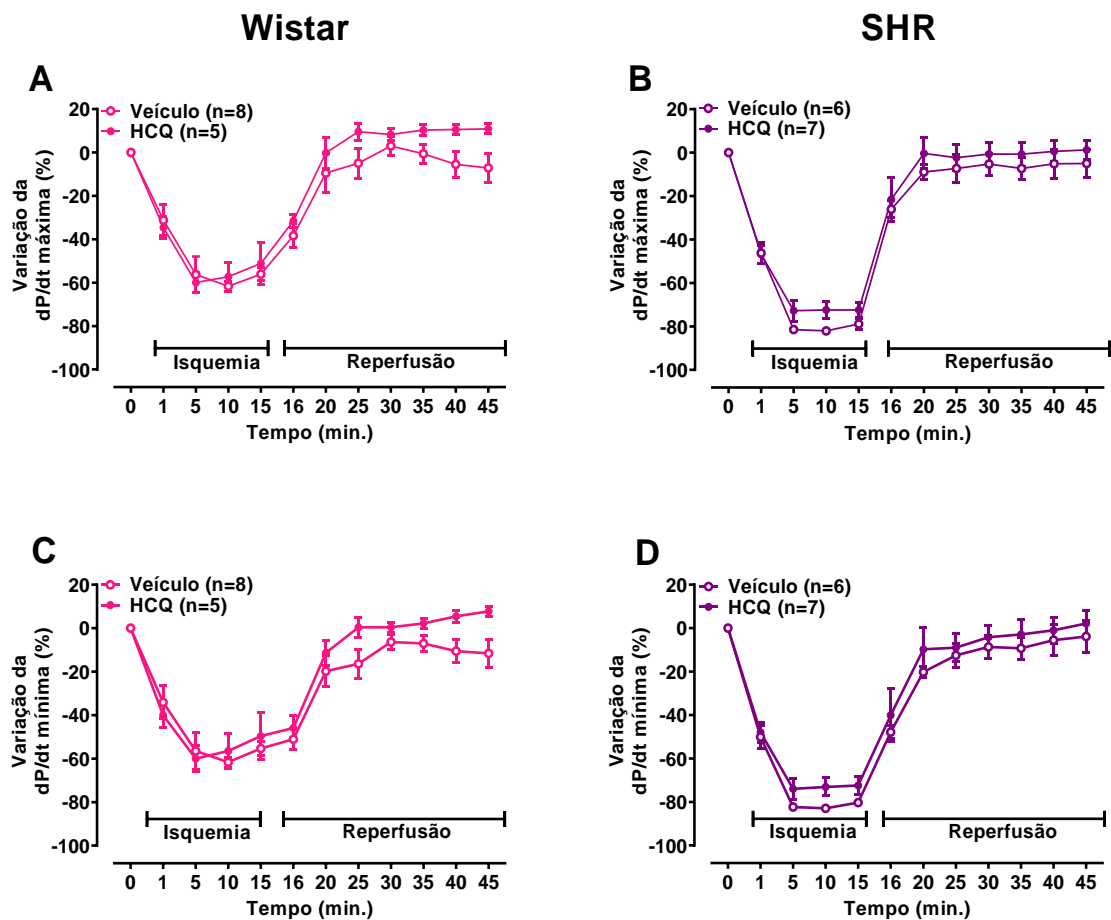


Figura 10 - Efeito da HCQ na dP/dt máxima (A e B) e dP/dt mínima (C e D) do coração isolado de ratos normotensos e hipertensos. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. *Two-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Sidak* para comparação entre os grupos.

Todos os grupos apresentaram redução do fluxo coronariano durante o período de isquêmico, retornando aos valores basais na reperusão, mas não houve diferença entre os grupos (Figura 11A e B). A FC foi aumentada em resposta a isquemia, retornando aos valores basais na reperusão e também não foi observada nenhuma diferença entre os grupos (Figura 11C e D).

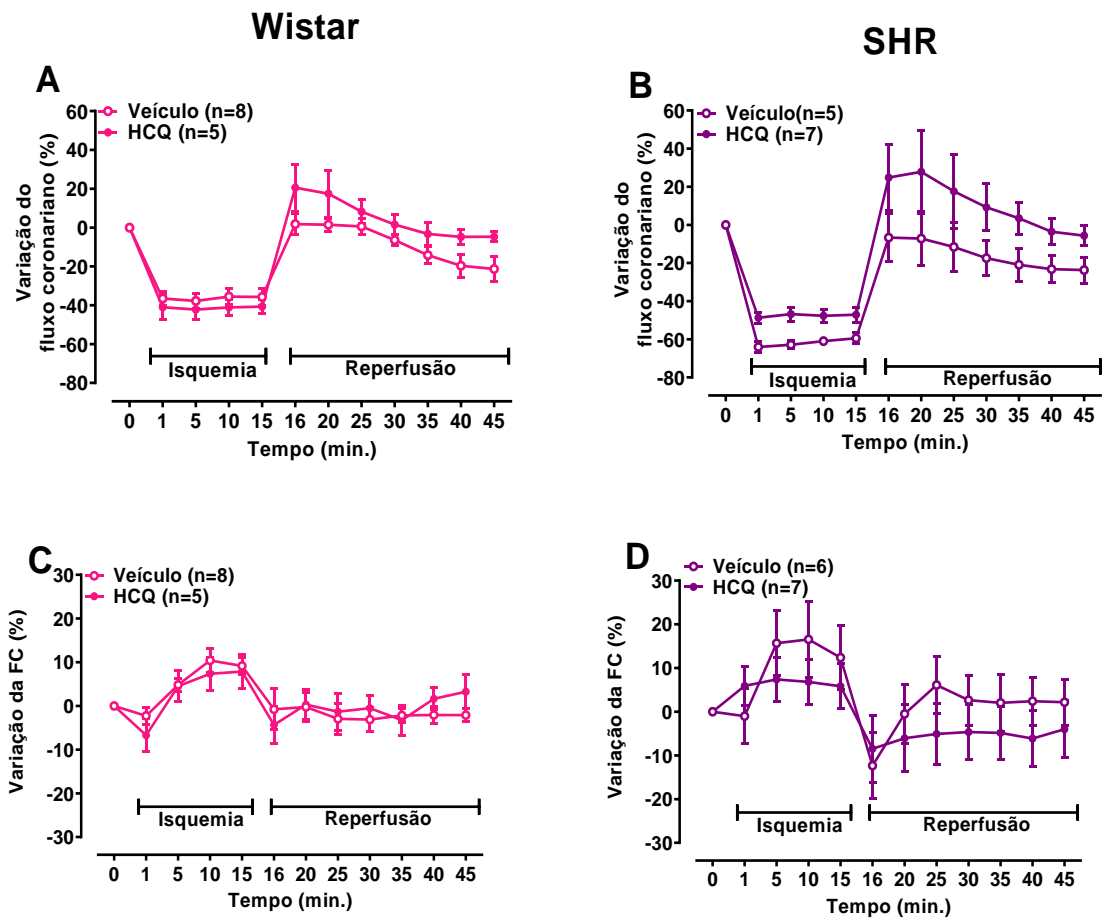


Figura 11 - Efeito da HCQ no fluxo coronariano (A e B) e FC (C e D) do coração isolado de ratos normotensos e hipertensos. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. *Two-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Sidak* para comparação entre os grupos.

Não foi observada nenhuma diferença significativa no tempo de arritmia de reperfusão (fibrilação e/ou taquicardia ventricular) (Figura 12A e B) entre os grupos experimentais.

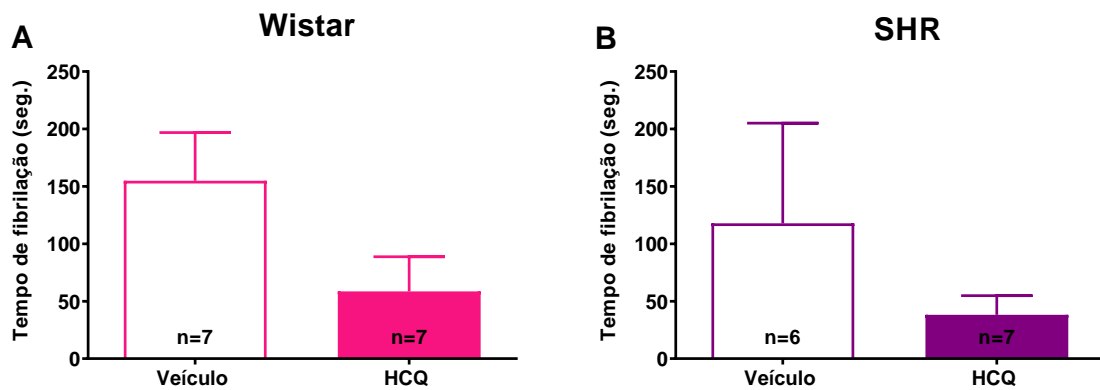


Figura 12 - Efeito da HCQ no tempo de fibrilação do coração isolado de ratos normotensos (A) e hipertensos (B). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado.

4.3. Efeito da HCQ em anéis de aorta torácica isolada de ratos normotensos e hipertensos

Com o objetivo de avaliar os efeitos do tratamento crônico com HCQ na reatividade vascular aórtica, anéis de aorta torácica descendente, na presença ou ausência de endotélio, foram montados em um sistema de banho de órgãos. Não houve diferença entre os grupos tanto no relaxamento dependente de endotélio (Figura 13A e B) como independente de endotélio (Figura 13C e D). Na contração em resposta a fenilefrina também não foi observada nenhuma diferença entre os grupos na presença (Figura 13E e F) ou ausência de endotélio (Figura 13G e H).

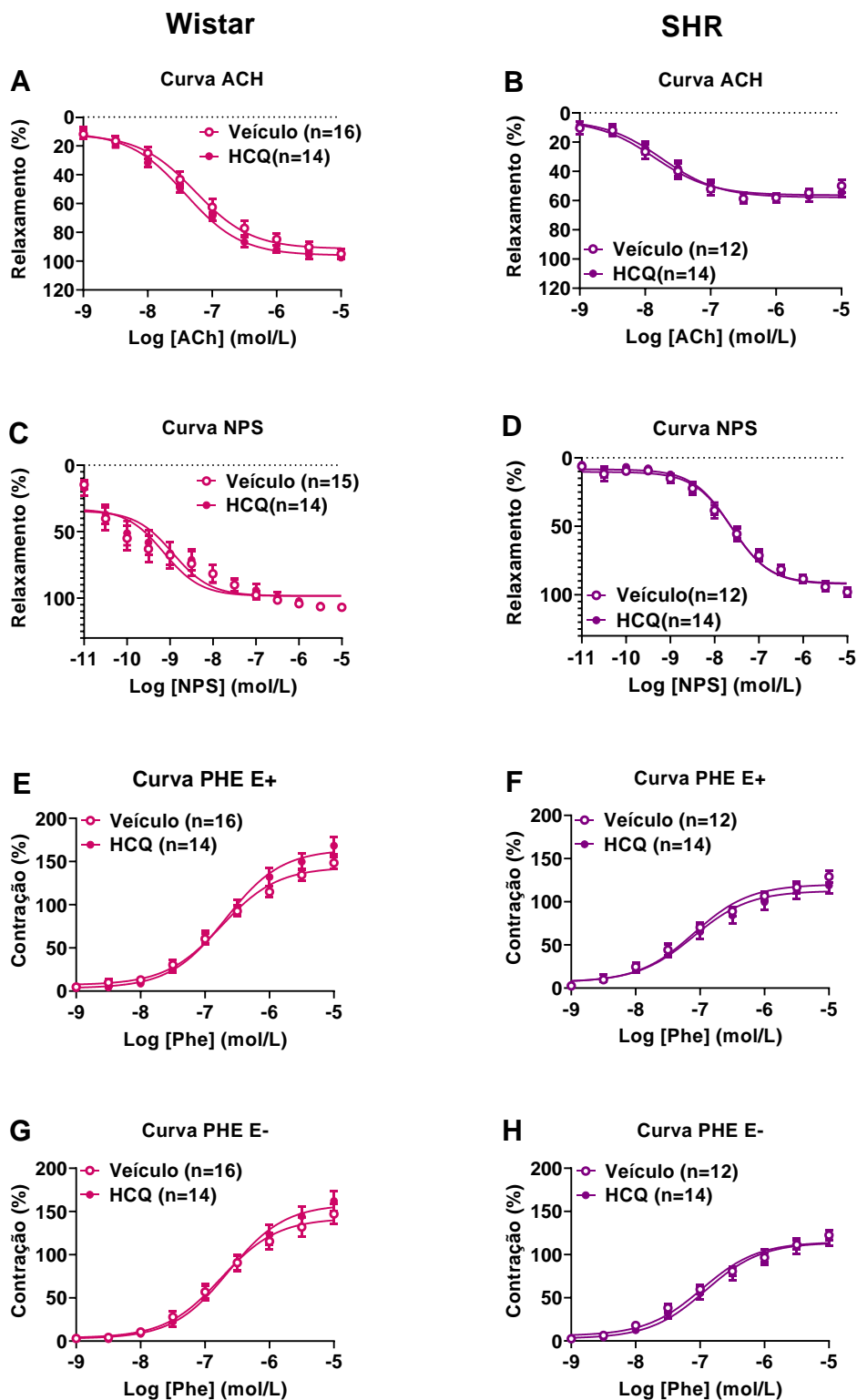


Figura 13 - Efeito da HCQ em anéis de aorta isolados de ratos normotensos e hipertensos. Vasorrelaxamento de anéis de aorta torácica induzido por ACh (A e B) e NPS (C e D). Vasoconstrição induzida por Phe na presença (E e F) e ausência de endotélio (G e H). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média e analisados por *Two-Way ANOVA* seguido do pós-teste de *Sidak*.

4.4. Efeito da HCQ no índice de massa ventricular e morfologia do ventrículo esquerdo

O índice de massa ventricular (IMV) dos ratos Wistar tratados foi menor em relação ao grupo veículo (Figura 14A). Já nos SHR não houve diferença entre os grupos (Figura 14B).

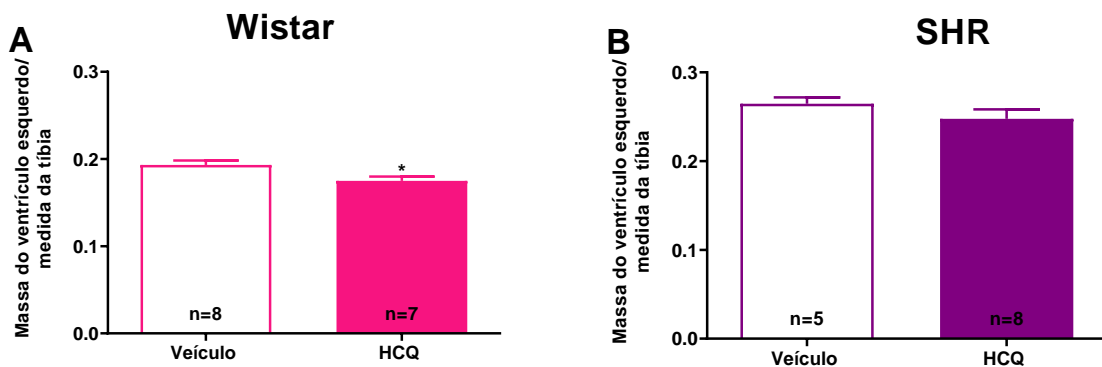


Figura 14 - Efeito da HCQ no IMV do ventrículo esquerdo de ratos normotensos (A) e hipertensos (B). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. * $P < 0,05$.

O diâmetro dos cardiomiócitos foi reduzido após o tratamento com HCQ, tanto nos animais normotensos (Figura 15A-C) como nos hipertensos (Figura 16A-C). O tratamento com HCQ não foi capaz de reduzir o colágeno intersticial no VE dos Wistar (Figura 15D-F), mas reduziu esse parâmetro no VE dos SHR (Figura 16D-F). Também foi observada redução do colágeno perivascular no VE dos animais normotensos (Figura 15G-I), o mesmo efeito não foi observado nos animais hipertensos (Figura 16G-I).

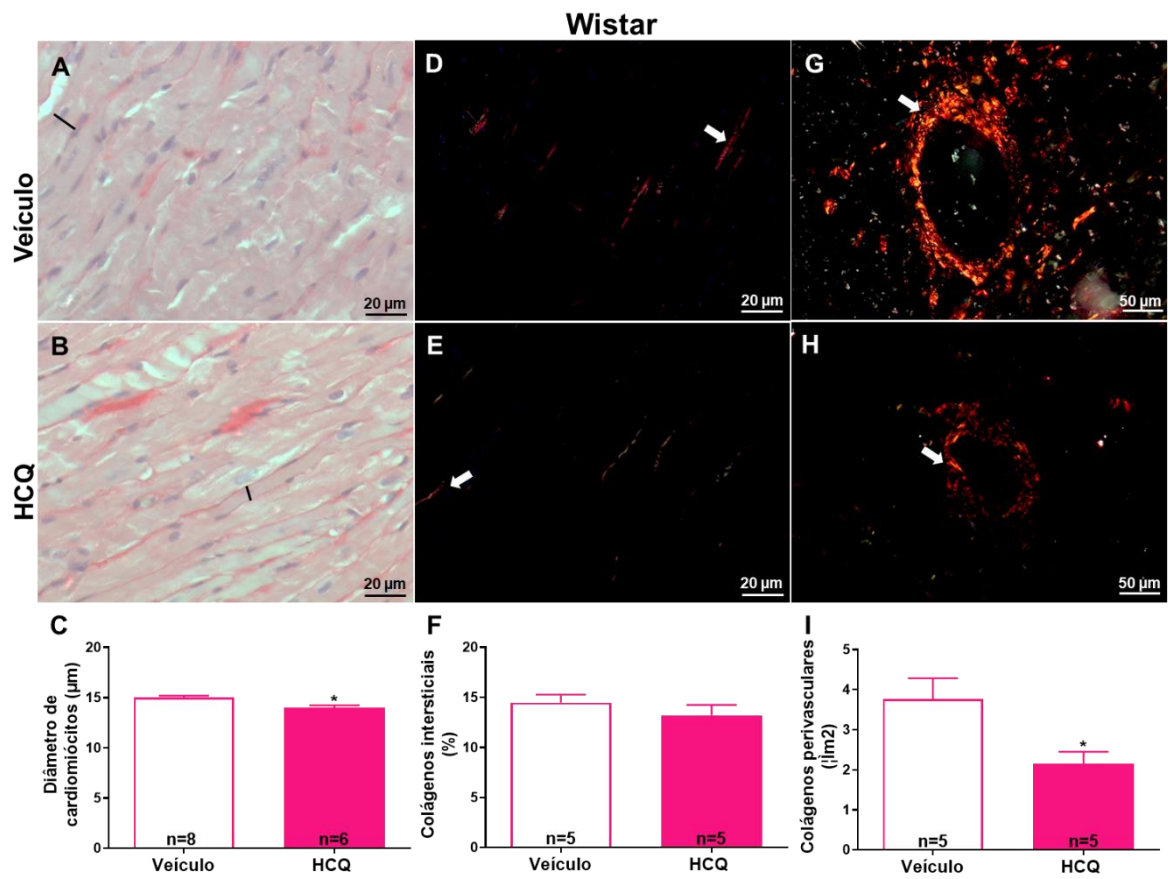


Figura 15 - Efeito da HCQ na morfologia do VE de ratos normotensos. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. * $P < 0,05$.

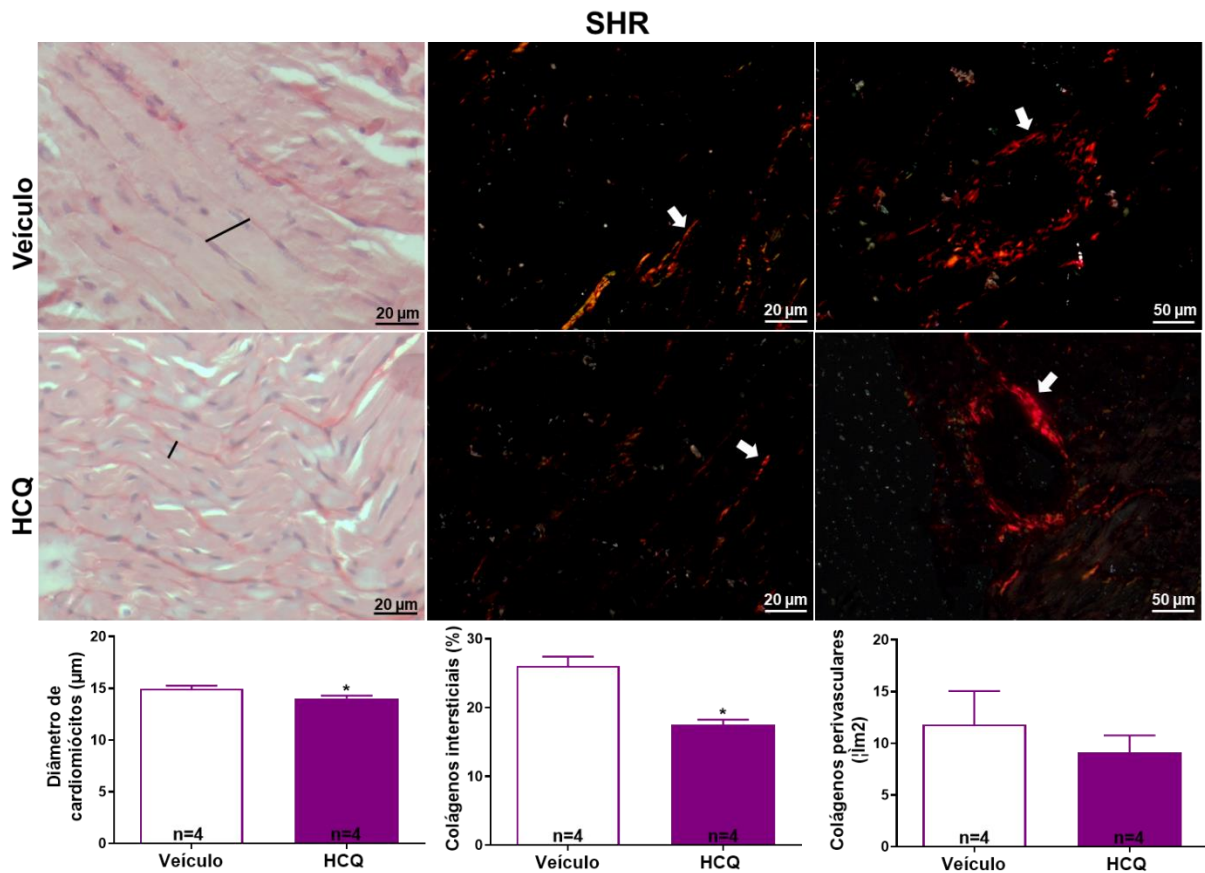


Figura 16 - Efeito da HCQ na morfologia do VE de ratos hipertensos. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. *P<0,05.

4.5. Efeito da HCQ na atividade de MMPs no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos

Foi avaliada a atividade das MMP no VE, no entanto foram detectadas apenas a pro-MMP2 (Figura 17A e B) e a MMP2 (Figura 17C e D). Nenhuma diferença estatística foi identificada entre os grupos.

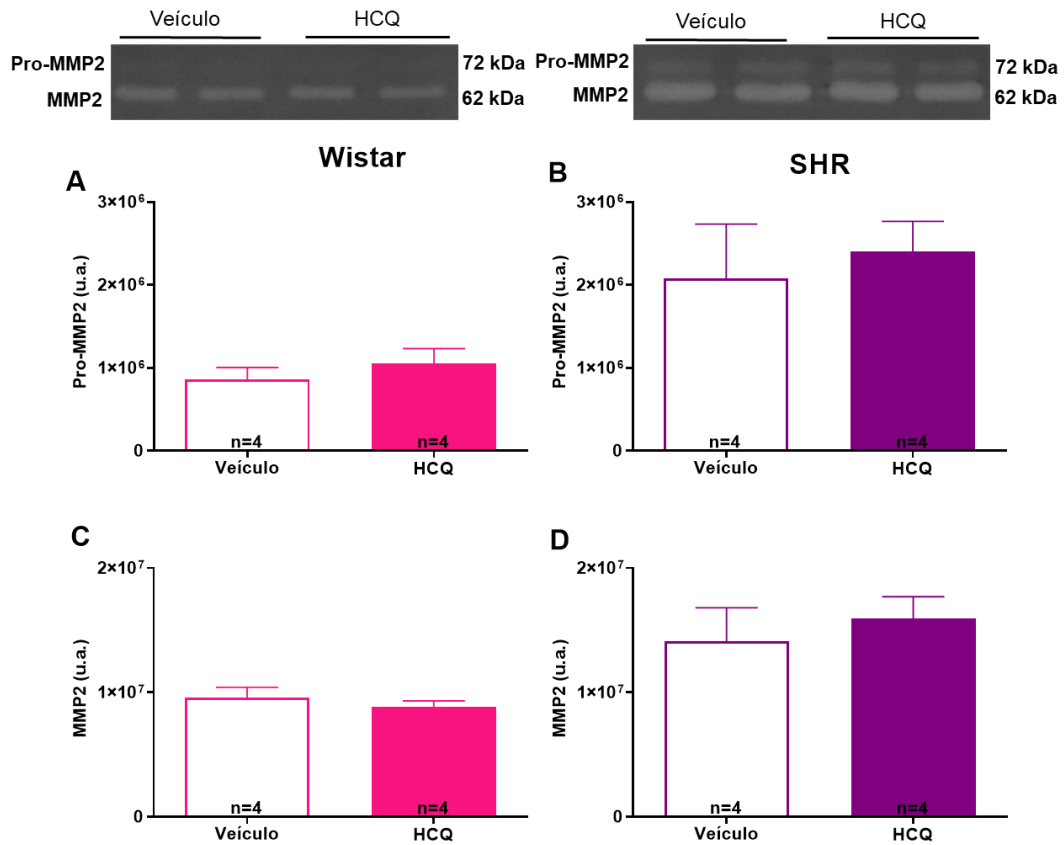


Figura 17 - Efeito da HCQ na atividade de MMPs (A-D) no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. *P<0,05.

4.6. Efeito da HCQ nos níveis de LPO, GPx, SOD e CAT no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos

Os níveis de LPO no ventrículo esquerdo de ratos normotensos e hipertensos é apresentado na figura 18. O tratamento com a HCQ aumentou os níveis de LPO em Wistar (Figura 18A) e SHR (Figura 18B) quando comparado ao grupo veículo. O tratamento com a HCQ também aumentou a atividade das enzimas GPx, SOD e CAT em Wistar (Figura 18C, E e G) e SHR (Figura 18D, F e H) quando comparados ao grupo veículo.

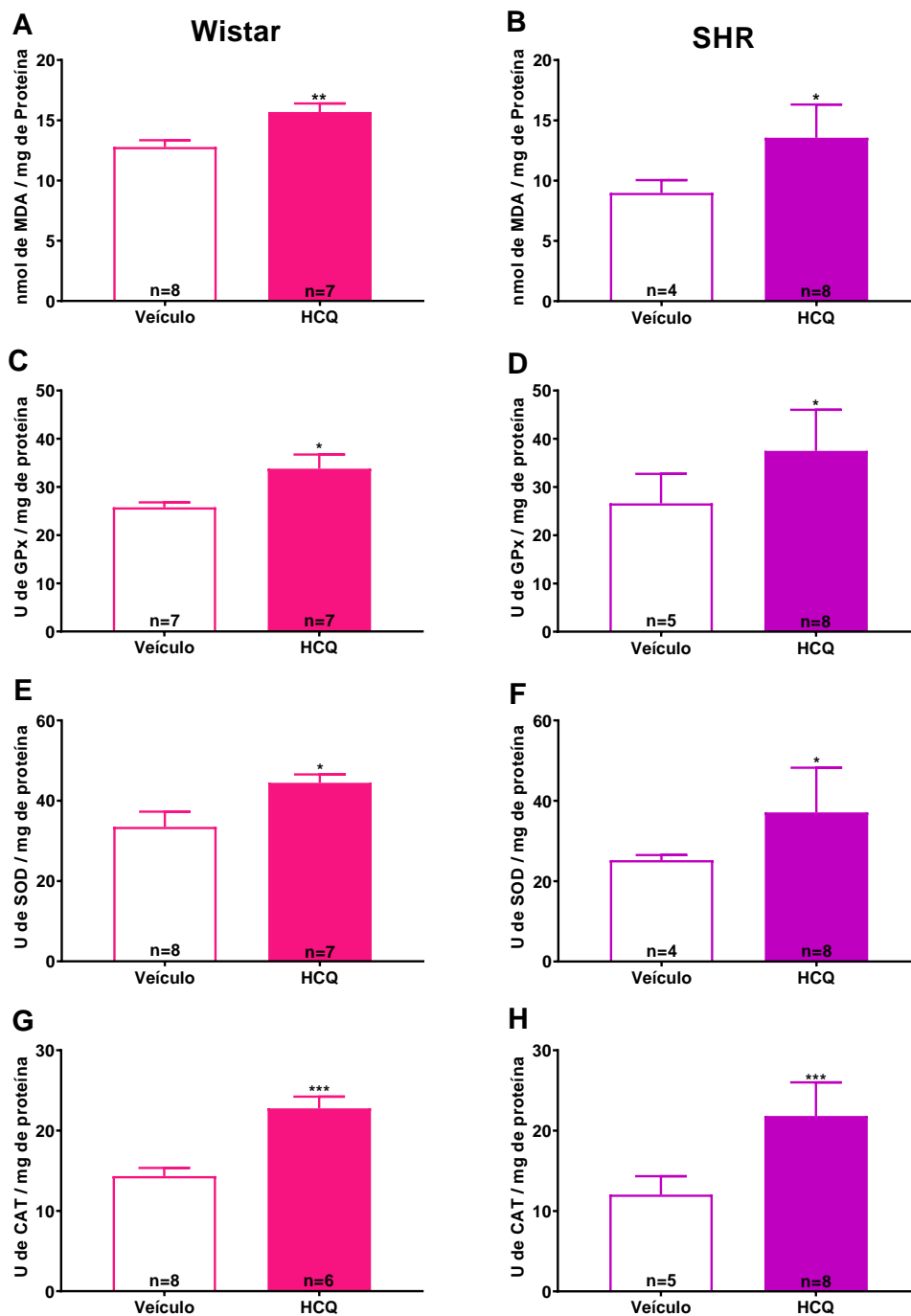


Figura 18 - Efeito da HCQ nos níveis de LPO (A e B), GPx (C e D), SOD (E e F) e CAT (G e H) no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de student não pareado. *P<0,05, **P<0,01, ***P< 0,00.

4.7. Efeito da HCQ na expressão de proteínas no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos

Para avaliação de proteínas no tecido cardíaco, foi realizada a técnica de *western blotting*. A figura 19 mostra a expressão de proteínas SOD. O tratamento com HCQ aumentou a expressão dessas proteínas em Wistar (Figura 19A), mas não houve alteração em SHR (Figura 19B). Avaliou-se ainda a expressão de proteínas CAT (Figura 20). O tratamento aumentou a expressão dessa proteína nos animais normotensos (Figura 20A), mas não houve alteração nos animais hipertensos (Figura 20B). Foi avaliada também a expressão das proteínas fosfo-ERK1/2 e ERK1/2 total, porém suas expressões não foram diferentes nos animais normotensos (Figura 21A e C) e hipertensos (Figura 21B e D).

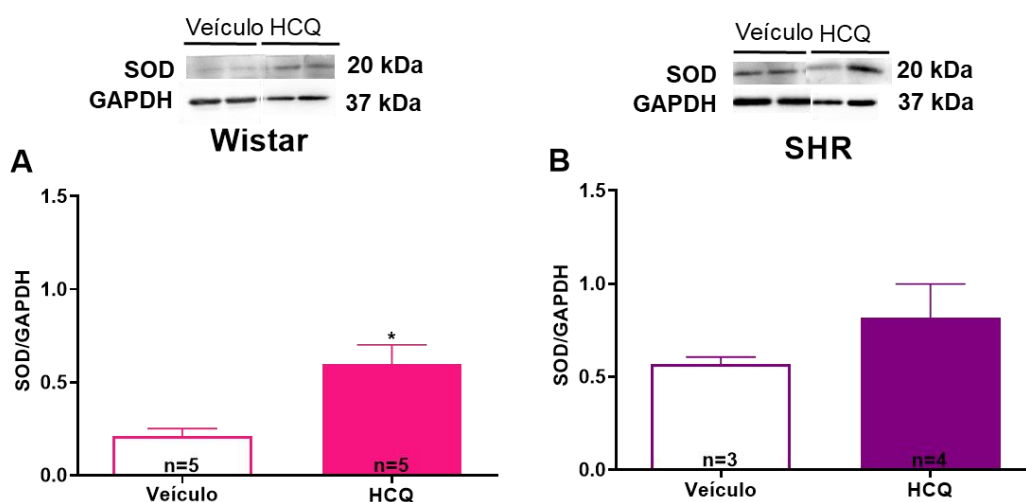


Figura 19 - Efeito da HCQ na expressão da proteína SOD (A e B) no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. * $P < 0,05$.

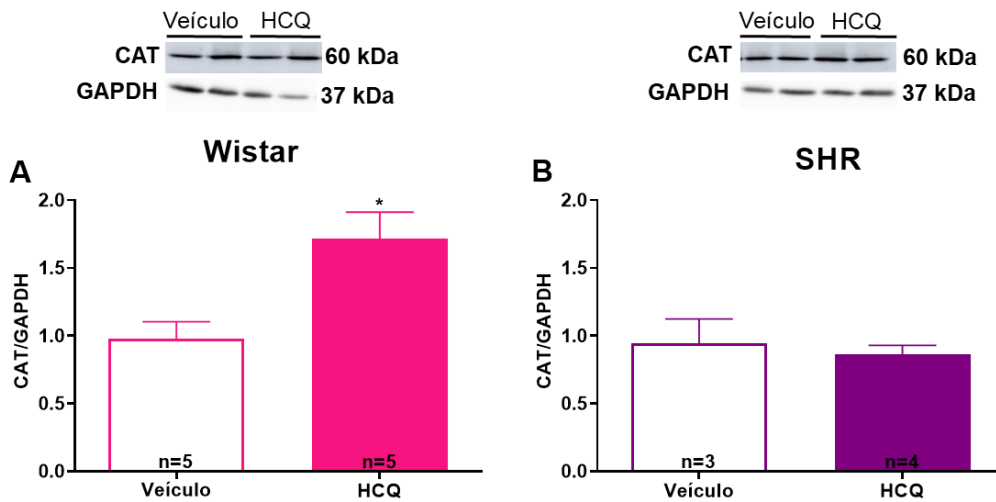


Figura 20 - Efeito da HCQ na expressão da proteína CAT (A e B) no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. * $P < 0,05$.

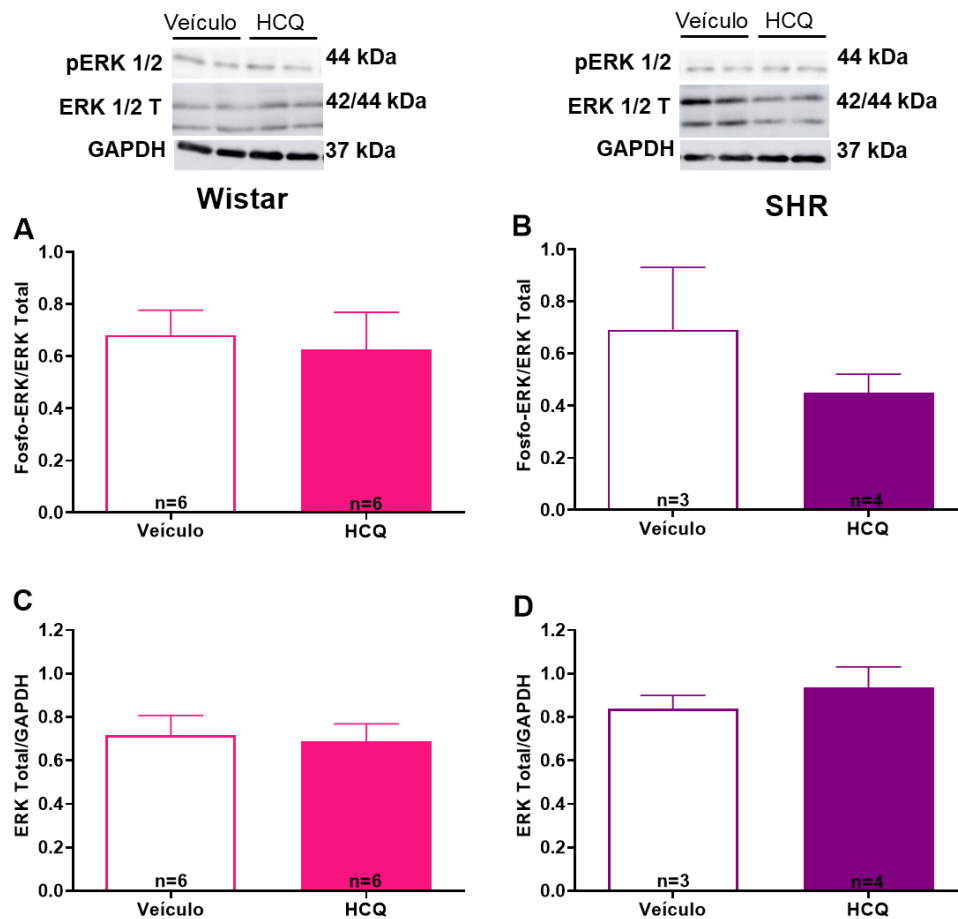


Figura 21 - Efeito da HCQ na expressão da proteína ERK 1/2 fosforilada (A e B) e ERK 1/2 total (C e D) no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado.

4.8. Efeito da HCQ na expressão de IL-1 β beta no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos

Marcações imuno-histoquímicas para interleucina-1 β (IL-1 β) foram observadas nas células do interstício cardíaco e no citoplasma dos cardiomiócitos de todos os grupos experimentais (Figura 22). O tratamento com HCQ diminuiu a área de IL-1 β nas linhagens Wistar (Figura 22A-C) e SHR (Figura 22D-F), contudo esta redução foi mais expressiva no grupo SHR tratado.

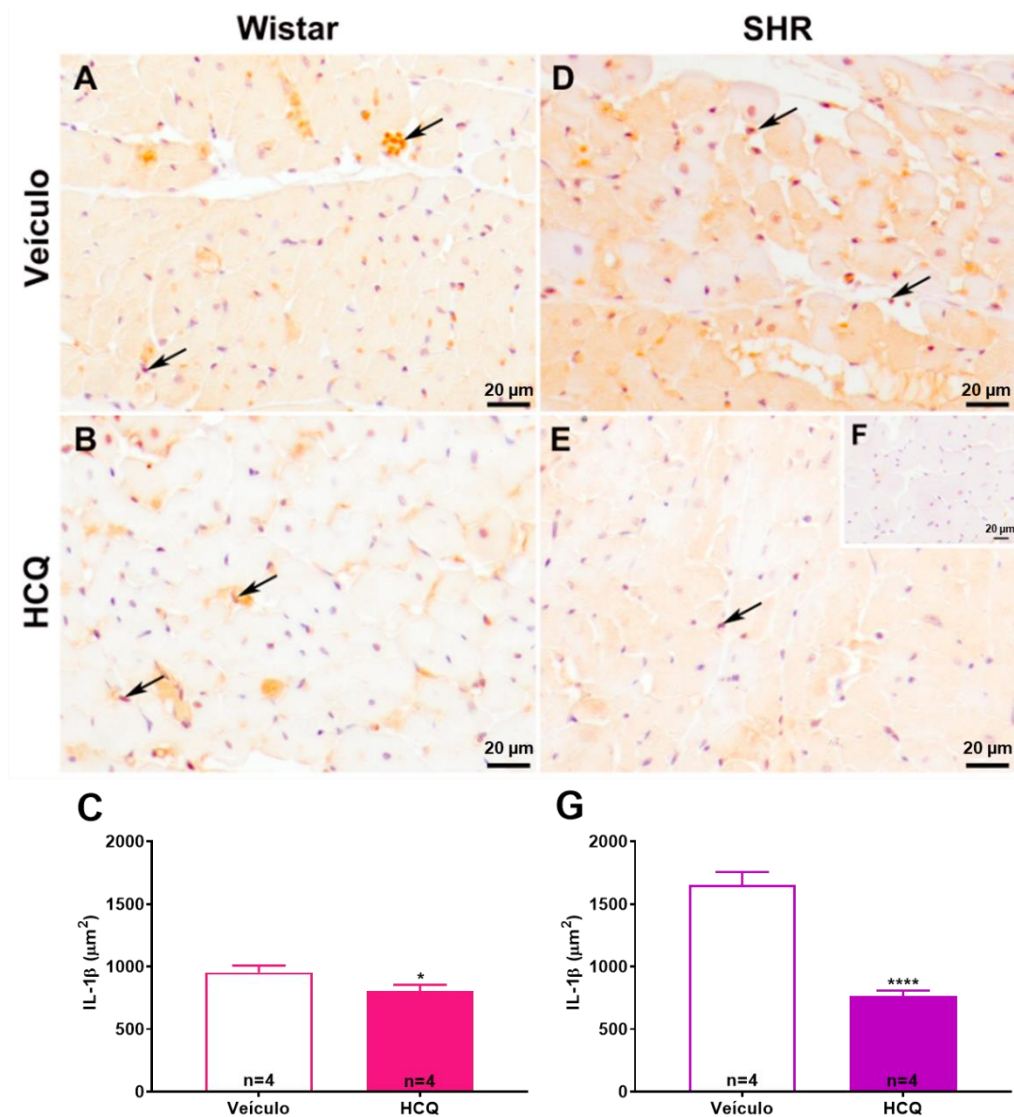


Figura 22 - Efeito da HCQ na marcação imuno-histoquímica para IL-1 β no tecido cardíaco de ratos normotensos (A-C) e hipertensos (D-F). Reação imuno-histoquímica para IL-1 β . Contra-coloração por hematoxilina. Marcações positivas (em castanho) estão indicadas pelas setas. (F) Controle negativo da reação. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. *P < 0,04, ****P < 0,0001.

4.9. Efeito da HCQ no peso do fígado e pâncreas de ratos normotensos e hipertensos

Para avaliar se o tratamento com HCQ estaria repercutindo em órgãos relacionados ao metabolismo, foi avaliado o peso de alguns desses órgãos. Não houve diferença entre os grupos nos índices de massa hepática (IMH) (Figura 23A e B) e massa do pâncreas (IMP) (Figura 23D e C).

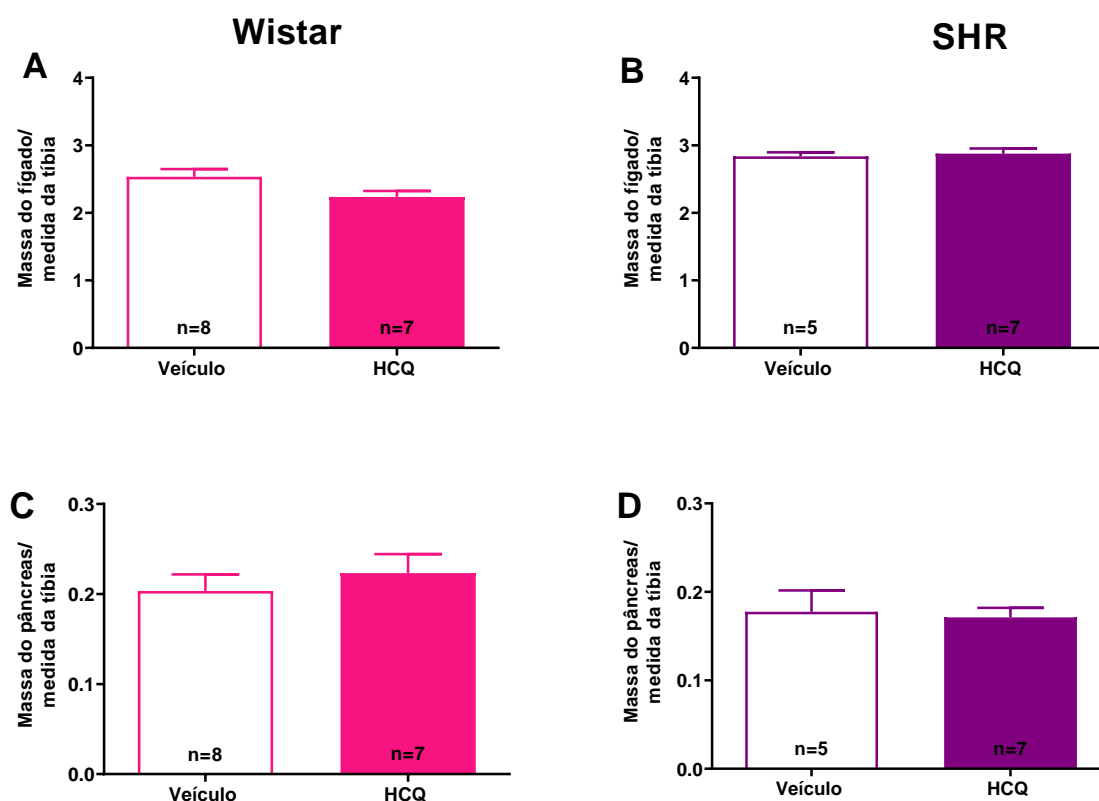


Figura 23 - Efeito da HCQ no IMH (A e B) e IMP (C e D) de ratos normotensos e hipertensos. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado.

Foi realizada também a pesagem do tecido adiposo marrom e branco. Não houve diferença entre os grupos em relação ao peso do tecido adiposo marrom (Figura 24A e B). A relação entre o peso da gordura inguinal e a medida da tibia não foi diferente entre os grupos (Figura 24C e D). A relação entre o peso da gordura mesentérica e a medida da tibia foi menor no grupo Wistar tratado quando comparada ao grupo veículo (Figura 24E), no entanto não houve diferença nos grupos de hipertensos (Figura 24F). A relação entre o peso da gordura e a medida da tibia também foi menor para as gorduras retroperitoneal (Figura 24G) e epididimal (Figura

24) dos ratos normotensos tratados com HCQ em comparação aos seus controles. Não houve diferença entre os grupos de hipertensos para esses parâmetros (Figura 24H e J).

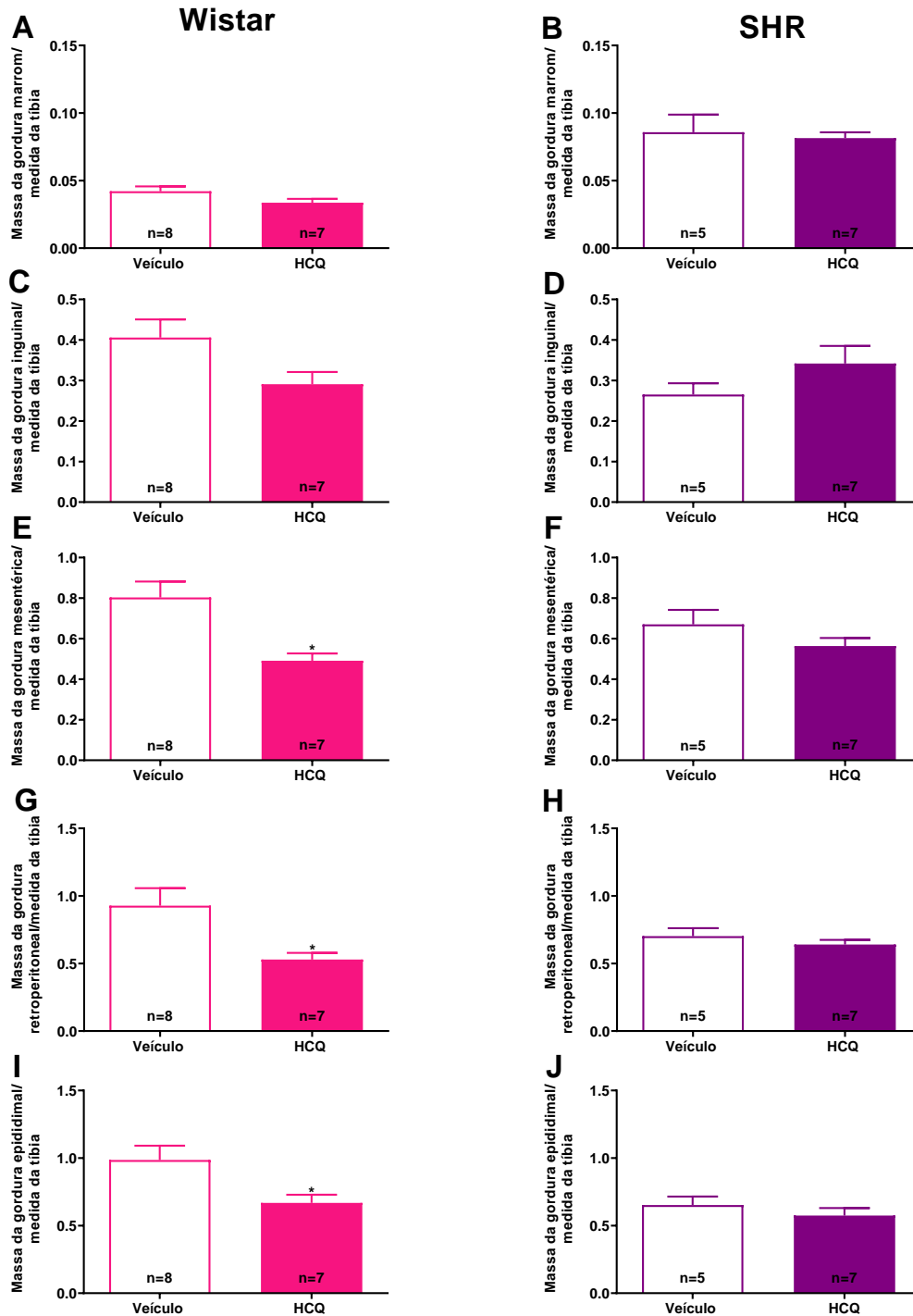


Figura 24 - Efeito da HCQ na relação entre o peso do tecido e o tamanho da tibia para a gordura marrom (A e B), gordura inguinal (C e D), gordura mesentérica (E e F), gordura retroperitoneal (G e H) e gordura epididimal (I e J) de ratos normotensos e hipertensos. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. *P<0,05.

5. DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo indicaram que a HCQ não promoveu alterações na função cardíaca e vascular. Além disso, a HCQ reduziu o IMV em animais normotensos, o diâmetro dos cardiomiócitos em ratos Wistar e SHR, bem como o conteúdo de colágeno perivascular e intersticial em animais normotensos e hipertensos, respectivamente. O tratamento com HCQ também diminuiu a massa das gorduras mesentérica, retroperitoneal e epididimal em animais normotensos. Observou-se ainda que a HCQ aumentou os níveis de peroxidação lipídica e a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx tanto nos ratos Wistar quanto nos SHR. No entanto, a expressão de SOD e CAT foi maior apenas nos animais Wistar HCQ, sem alterações nos hipertensos. Além disso, a HCQ reduziu a expressão IL-1 β no ventrículo em ambas linhagens, com essa redução sendo mais significativa no grupo SHR.

O tratamento com a HCQ reduziu o peso corporal de animais normotensos nas duas últimas semanas de tratamento. Esse resultado não foi observado nos animais hipertensos. Observou-se também redução no consumo alimentar e hídrico em Wistar, e redução da ingestão de água em SHR. Estudos anteriores demonstraram que a HCQ induz redução do peso corporal, sem afetar o apetite. A HCQ promoveu redução do peso corporal, mitigou a esteatose hepática e aumentou a sensibilidade à insulina, sem alterar a ingestão alimentar em um modelo de camundongo com obesidade (Qiao et al., 2019). Neste estudo os autores demonstraram que a HCQ diminuiu a adipogênese por ativação dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma tipo gama (PPAR γ), no entanto o mecanismo pelo qual a HCQ regula a lipogênese dependente de PPAR γ permanece desconhecido. Em ratos Wistar obesos, a HCQ, também reduziu o ganho de peso corporal, melhorou o estresse oxidativo, diminuiu a produção de adipocinas inflamatórias e reduziu o armazenamento de gordura (Hasan et al., 2023b). Os autores sugerem que esses efeitos da HCQ na obesidade são mediados pela adiponectina. A adiponectina é uma adipocitocina, liberada pelo tecido adiposo, que regula diversos processos metabólicos, tais como o controle da glicose e a oxidação de ácidos graxos e sua deficiência está relacionada com patologias como diabetes mellitus tipo 2 (Díez & Iglesias, 2003; Ghoshal et al., 2021). Desta forma uma possível explicação para a redução de peso dos ratos tratados com HCQ observada em nosso estudo poderia

ser a modulação da adipogênese. No entanto, mais experimentos são necessários para confirmar essa hipótese e também para investigar porque esse efeito não foi observado em SHR.

Para avaliar o possível efeito modulatório da HCQ sobre o sistema cardiovascular, a PA e FC *in vivo* foi acompanhada por pletismografia de cauda, além da avaliação da função do VE por preparação de coração isolado e reatividade aórtica por preparação de vaso isolado em banho de órgãos isolados. O tratamento com HCQ não promoveu nenhuma alteração na PA e FC, tanto em animais normotensos, como em hipertensos. Estes resultados corroboram com um estudo anterior que mostrou que a administração de HCQ na água dos animais, não foi capaz de alterar a PA e a função contrátil do VE, assim como observado no presente estudo (Capel et al., 2015). A função do VE e fluxo coronariano também não foram alteradas pelo tratamento, tanto em Wistar como em SHR. Esses resultados contrastam com estudos anteriores que mostraram que a HCQ influencia a função cardiovascular. Um estudo recente mostrou que a HCQ reduziu a pressão arterial e a proteinúria em ratas normotensas grávidas com pré-eclâmpsia e que esse efeito pode ser devido a restauração da disfunção endotelial (Choi et al., 2022). Um outro estudo utilizando camundongos com LES, o tratamento com HCQ durante 5 semanas, reduziu a PAS sem influenciar a FC (Gómez-Guzmán et al., 2014). Em um estudo com fatias de coração suína, a HCQ reduziu a força contrátil de forma dependente da concentração. Os autores sugeriram que o mecanismo de ação por trás desse efeito envolve a inibição dos canais de cálcio do tipo L (Wu et al., 2023). Os resultados contrastantes do presente estudo podem ser devido ao modelo animal utilizado, a dose de HCQ utilizada ou mesmo a duração do tratamento.

O tratamento com HCQ não induziu nenhuma alteração no tempo de arritmias no presente estudo. Vários estudos associaram o uso da HCQ ao prolongamento do intervalo QT, e incidências de arritmias (Chen et al., 2006; O'Laughlin et al., 2016; Villa Zapata et al., 2022). Em um estudo que analisou o eletrocardiograma de 819 pacientes com doenças reumáticas, tratados com HCQ, foi observada associação do tratamento ao prolongamento do intervalo QT em uma fração significativa dos pacientes (Hooks et al., 2020). Em outro estudo com pacientes com COVID-19 que fizeram o uso de HCQ durante internação, também foi observado prolongamento do intervalo QT, além de arritmia ventricular (Jankelson et al., 2020). No entanto, em um estudo de coorte com pacientes diagnosticados com LES, AR e Síndrome de Sjögren tratados com

HCQ, não foi observado aumento do risco de arritmias em comparação com pacientes que não fazem uso desse medicamento (Lo et al., 2021). Em outro estudo com 85 pacientes com LES e doenças do tecido conjuntivo, não houve aumento do intervalo PR e QTc associado ao tratamento com HCQ (Costedoat-Chalumeau et al., 2007). Apesar de haverem muitos estudos avaliando o risco de arritmias cardíacas associadas ao tratamento com HCQ, nenhum estudo avaliou esse risco no cenário da hipertensão. O fato de a HCQ não ter aumentado as arritmias cardíacas em SHR é um importante resultado, uma vez que a hipertensão é um fator de risco para o desenvolvimento de arritmias e que muitos pacientes que fazem uso de HCQ também tem diagnóstico de HAS.

A HCQ não alterou o relaxamento induzido pela Ach (dependente de endotélio) e NPS (independente de endotélio) nos animais normotensos e hipertensos. Da mesma forma, não houve nenhuma alteração na contração em resposta à Phe, tanto nos vasos com endotélio, como nos sem endotélio. Um estudo com camundongos fêmeas NZBWF1, uma linhagem que desenvolve LES espontaneamente, tratadas com HCQ apresentaram melhora na disfunção endotelial devido a hipertensão (Gómez-Guzmán et al., 2014). Neste estudo, foi observado que as aortas de camundongos NBWF1 exibiram uma diminuição na resposta vasodilatadora à Ach e um aumento na contração em resposta à Phe, ambos normalizados pela HCQ. Um outro estudo com pacientes com LES que fazem uso de medicação antimalárica, demonstrou aumento da vasodilatação da microvasculatura cutânea de forma independente do endotélio (Bengtsson et al., 2010). Já o estudo de Arslan *et al.* (2022) observou uma resposta vasodilatadora da HCQ em aorta isolada de ratos Wistar, de forma dependente e independente de endotélio (Arslan et al., 2022). O motivo pelo qual a HCQ não modificou a reatividade aórtica no presente estudo pode ser devido ao modelo animal utilizado, a via de administração ou até mesmo a dose utilizada.

O tratamento com HCQ reduziu o IMV dos animais normotensos, mas não alterou esse índice nos animais hipertensos. Já em relação ao diâmetro dos cardiomiócitos, o tratamento reduziu esse parâmetro em ambas linhagens. Além disso, houve redução do colágeno perivascular em Wistar e intersticial em SHR. Sabe-se que os SHR desenvolvem hipertrofia do VE e fibrose do tecido cardíaco em resposta à sobrecarga pressórica induzida pela hipertensão. A hipertrofia cardíaca induzida pela hipertensão é classificada como hipertrofia patológica, pois além de apresentar crescimento celular e síntese proteica, são observadas alterações como

fibrose, morte celular, reativação da expressão de genes fetais, alteração estrutural dos sarcômeros, angiogênese insuficiente e aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (Barry et al., 2008; Nakamura & Sadoshima, 2018; Samak et al., 2016). Um dos mecanismos de ação da HCQ é a modulação da resposta inflamatória e estudos anteriores já mostraram que ela inibe a função dos receptores *Toll-like* (TLR). Foi sugerido que essa inibição se dá por meio do efeito da HCQ no pH endossomal/lisossômico e também por ela se ligar aos ácidos nucleicos, inibindo a ligação do ácido nucleico ao TLR (Kužnik et al., 2011). Estudos anteriores demonstraram que a HCQ inibe a ativação dos macrófagos, além de diminuir a liberação de fatores inflamatórios e a apoptose durante a fibrose renal, através das vias de sinalização do TLR-9 e PI3K/AKT e fator nuclear kappa B (NF-κB) (D. Li et al., 2022; Zheng et al., 2021). Entre os mecanismos relacionados com a patogênese da hipertrofia e da fibrose, a via inflamatória desempenha importante papel, uma vez que citocinas inflamatórias como IL-1 e 6, TNF-α e as vias de sinalização ativadas pelo NF-κB e pelos TLR's, são frequentemente relacionados a essas condições (Zhang et al., 2023). De acordo com estes achados prévios, foi observado no presente estudo que a HCQ diminuiu a marcação imuno-histoquímica para IL-1β no ventrículo de ratos Wistar e SHR.

A fibrose cardíaca é caracterizada pela deposição excessiva de matriz extracelular (MEC), incluindo proteínas fibrilares (colágenos I e III) e não fibrilares e isso se dá principalmente devido a um desequilíbrio entre a síntese e a degradação da MEC (Giannandrea & Parks, 2014; Kong et al., 2014). As MMP's são as principais proteases que degradam a MEC e tem sua atividade regulada pelos inibidores teciduais endógenos de metaloproteinases (TIMPs) (DeLeon-Pennell et al., 2017). Um desequilíbrio entre MMP/TIMP leva a renovação desregulada da MEC, resultando em alterações estruturais e funcionais do VE (Kremastiotis et al., 2021). A HCQ também regula a atividade das MMP's. A expressão da MMP-1 foi regulada positivamente em fibroblastos com neurofibromatose tipo 1, através da atividade inibitória lisossomal da HCQ, de forma dependente do receptor de hidrocarboneto de arila e da fosforilação de ERK (Tsuji et al., 2021; Yumine & Tsuji, 2021). No entanto, em células tipo 5637 e T24 com câncer de bexiga, a HCQ bloqueia a autofagia e inibe a MMP-2, inibindo assim a invasividade do câncer (Chou et al., 2021). Sendo assim, um dos mecanismos pelo qual a HCQ reduziu a fibrose no presente estudo poderia ser devido a regulação da HCQ sobre a atividade das MMP's. No entanto, os resultados do experimento de

zimografia do presente estudo, demonstraram que o tratamento com HCQ não foi capaz de alterar a atividade da pro-MMP2 e da MMP2 em animais normotensos e hipertensos. A MMP-2, especificamente, está envolvida no metabolismo do colágeno tipo I e III, que são os principais tipos encontrados no coração (DeCoux et al., 2014; Spinale, 2002). A ausência de alteração na atividade da MMP-2 sugere que a redução da fibrose induzida pela HCQ pode estar mais relacionada à diminuição da síntese de colágeno do que ao aumento da degradação da matriz extracelular. A HCQ tem propriedades anti-inflamatórias e pode inibir a ativação de fibroblastos e miofibroblastos, reduzindo a produção de colágeno em resposta a estímulos inflamatórios e ao estresse oxidativo (Ramser et al., 2009; Torigoe et al., 2018; Wang et al., 2023). Outra possibilidade é que a HCQ possa estar regulando outras MMPs não detectadas neste estudo, como a MMP-9, ou inibindo TIMPs, modulando indiretamente o remodelamento tecidual. Essa redução na deposição de colágeno intersticial no VE de SHR é algo benéfico, já que ele está aumentado na hipertensão. No entanto, nos animais normotensos não, pois normalmente não há fibrose perivascular nesses animais, e nesse caso a HCQ poderia tornar os vasos mais suscetíveis a lesões ou disfunções ao longo do tempo. Desta forma, mais experimentos são necessários para investigar as vias utilizadas pela HCQ para redução do colágeno em animais normotensos e hipertensos.

O estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre ERO e defesas antioxidantes, desempenha um papel significativo na gênese de diversas patologias como câncer, distúrbios neurodegenerativos e doenças cardiovasculares (Chandimali et al., 2025; K. Li et al., 2024; Üremiş & Üremiş, 2025). Esse desequilíbrio leva à disfunção endotelial, remodelamento vascular e aumento da pressão arterial, contribuindo para a hipertensão e suas complicações (Arendshorst et al., 2024; Griendling et al., 2021; C. Liu et al., 2025). Já foi demonstrado que a hipertensão causada por angiotensina II cronicamente elevada é mediada em parte pelo radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), provavelmente por degradação do NO derivado do endotélio (Laursen et al., 1997). O estudo de Silva e et.al. mostrou que a disfunção endotelial nas artérias mesentéricas de camundongos hipertensos DOCA-Sal está associada à expressão e ao funcionamento reduzidos da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e à produção prejudicada de H_2O_2 derivado da nNOS (Silva et al., 2015). No presente estudo a HCQ apresentou um efeito paradoxal no equilíbrio redox de ratos Wistar e SHR. Embora tenha ocorrido um aumento nos níveis de LPO, sugerindo maior

estresse oxidativo, também houve um aumento das enzimas antioxidantes GPx, SOD e CAT, que são mecanismos de defesa celular contra o dano oxidativo. Esses achados estão de acordo com a literatura que demonstram que a interação da HCQ com as vias do estresse oxidativo é complexa, envolvendo efeitos pró-oxidantes e antioxidantes, dependendo do contexto. A HCQ pode aumentar os níveis de MDA e NO nos tecidos, indicando peroxidação lipídica e danos oxidativos (Uzar et al., 2012). Em modelos de esclerose múltipla em camundongos a HCQ reduziu a peroxidação lipídica *in vivo*, atenuando a neurodegeneração (Brown et al., 2021). A HCQ demonstrou reduzir os níveis de ROS em células endoteliais sob condições de alta glicose, mitigando o estresse oxidativo/nitrosativo (Rezabakhsh et al., 2017). No presente estudo a HCQ não alterou a expressão da ERK1/2 total e fosforilada em Wistar e SHR. A proteína ERK1/2 é uma molécula crucial na sinalização celular, envolvida em diversos processos fisiológicos, incluindo crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência celular e estresse oxidativo (Martin-Vega & Cobb, 2023; Postiglione et al., 2023). Pesquisas indicam que a HCQ pode aumentar a fosforilação de ERK1/2, promovendo a sobrevivência celular e proporcionando efeitos protetores contra a lesão por isquemia/reperfusão cardíaca (Bourke et al., 2015). O tratamento com HCQ leva à diminuição da fibrose muscular e ao aumento da regeneração de miofibras após lesão por isquemia/reperfusão do músculo esquelético por meio da diminuição da fosforilação de ERK1/2 (Edwards et al., 2020). A ausência de alteração na expressão total e fosforilada da ERK1/2 sugere que, apesar do estresse oxidativo induzido pela HCQ, essa via de sinalização específica não foi ativada. Isso pode indicar que a HCQ não regula a resposta ao estresse oxidativo por meio da via ERK1/2, ou que a ativação dessa via depende de outros fatores que não foram avaliados no presente estudo.

A HCQ promoveu redução significativa na relação entre o peso da gordura e o tamanho da tíbia das gorduras mesentérica, retroperitoneal e epididimal. Essas gorduras são classificadas como tecido adiposo branco. O tecido adiposo branco não se limita apenas a ser um órgão de armazenamento, mas tem a capacidade de produzir uma ampla gama de moléculas biologicamente ativas, incluindo numerosas adipocinas (Carbone et al., 2012). As adipocinas inflamatórias estimulam a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), desencadeando uma alteração no estado redox denominado estresse oxidativo. Dado que o tecido adiposo secreta adipocinas que geram ERO, ele é reconhecido como um local para a geração de estresse

oxidativo sistêmico (Hasan et al., 2023a). Dadas as propriedades anti-inflamatórias e a regulação da atividade redox induzidas pela HCQ, que já foram mencionadas no presente estudo, esse medicamento pode ter reduzido o peso das gorduras do tecido adiposo branco por essas vias. No entanto, experimentos complementares são necessários para elucidar os mecanismos de ação exatos da HCQ no presente estudo.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se observar que a HCQ não altera significativamente a pressão arterial, frequência cardíaca, função ventricular esquerda ou reatividade vascular de ratos normotensos ou hipertensos. No entanto, observou-se que o tratamento com HCQ promoveu redução do peso corporal e da ingestão de ração em ratos normotensos e de água em Wistar e SHR. Este fármaco diminuiu o índice de massa ventricular em Wistar e o diâmetro dos cardiomiócitos em ambas as linhagens, mas reduziu o colágeno perivascular apenas em Wistar e intersticial em SHR. Além disso, o tratamento aumentou a peroxidação lipídica e a atividade de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GPx, em ambos os grupos, sugerindo uma possível modulação do estresse oxidativo. A IL-1 β foi reduzida no tecido cardíaco de ratos normotensos e hipertensos, sugerindo uma possível modulação da via inflamatória. A massa de tecido adiposo foi reduzida pela HCQ apenas em animais normotensos.

Esses resultados indicam que, embora a HCQ não altere diretamente a função cardiovascular, ela pode induzir alterações diferentes entre animais normotensos e hipertensos. Portanto, são necessários mais estudos para compreender os mecanismos subjacentes a esses efeitos e suas implicações, especialmente em condições de hipertensão.

8. REFERÊNCIAS

- Ahlers, M. J. *et al.* (2020) 'Heart failure risk associated with rheumatoid arthritis–related chronic inflammation', *Journal of the American Heart Association*. American Heart Association Inc., 9(10), p. 14661. doi: 10.1161/JAHA.119.014661.
- Aliede E. in 't Veld., Grievink, H. W., van der Plas, J. L., Eveleens Maarse, B. C., van Kraaij, S. J. W., Woutman, T. D., Schoonakker, M., Klarenbeek, N. B., de Kam, M. L., Kamerling, I. M. C., Jansen, M. A. A., & Moerland, M. (2023). Immunosuppression by hydroxychloroquine: mechanistic proof in in vitro experiments but limited systemic activity in a randomized placebo-controlled clinical pharmacology study. *Immunologic Research*, 71(4), 617–627. <https://doi.org/10.1007/S12026-023-09367-3>
- An, J. *et al.* (2015) 'Cutting Edge: Antimalarial Drugs Inhibit IFN- β Production through Blockade of Cyclic GMP-AMP Synthase–DNA Interaction', *The Journal of Immunology*, 194(9), pp. 4089–4093. doi: 10.4049/jimmunol.1402793.
- Arendshorst, W. J., Vendrov, A. E., Kumar, N., Ganesh, S. K., & Madamanchi, N. R. (2024). Oxidative Stress in Kidney Injury and Hypertension. *Antioxidants* 2024, Vol. 13, Page 1454, 13(12), 1454. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX13121454>.
- Aviña-Zubieta, J. A. *et al.* (2017) 'Risk of Myocardial Infarction and Stroke in Newly Diagnosed Systemic Lupus Erythematosus: A General Population-Based Study', *Arthritis Care and Research*. John Wiley and Sons Inc., 69(6), pp. 849–856. doi: 10.1002/acr.23018.
- Bai, L. *et al.* (2019) 'Renoprotective effects of artemisinin and hydroxychloroquine combination therapy on IgA nephropathy via suppressing NF- κ B signaling and NLRP3 inflammasome activation by exosomes in rats', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier, 169, p. 113619. doi: 10.1016/j.bcp.2019.08.021.
- Ballabio, A. and Bonifacino, J. S. (2020) 'Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Springer US, 21(2), pp. 101–118. doi: 10.1038/s41580-019-0185-4.
- Barroso, W. K. S. *et al.* (2021) 'Brazilian guidelines of hypertension - 2020', *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 116(3), pp. 516–658. doi: 10.36660/abc.20201238.
- Ben-Zvi, I. *et al.* (2012) 'Hydroxychloroquine: From malaria to autoimmunity', *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. Nature Publishing Group, 42(2), pp. 145–153. doi: 10.1007/s12016-010-8243-x.
- Bonam, S. R., Wang, F. and Muller, S. (2019) 'Lysosomes as a therapeutic target',

Nature Reviews Drug Discovery, 18(12), pp. 923–948. doi: 10.1038/s41573-019-0036-1.

Bourke, L. *et al.* (2015) 'Hydroxychloroquine Protects against Cardiac Ischaemia/Reperfusion Injury in Vivo via Enhancement of ERK1/2 Phosphorylation', *PLoS ONE*, 10(12). doi: 10.1371/journal.pone.0143771.

Brandes, R. P. (2014) 'Endothelial dysfunction and hypertension', *Hypertension*. Lippincott Williams & Wilkins Hagerstown, MD, 64(5), pp. 924–928. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03575.

Brown, D., Moezzi, D., Dong, Y., Koch, M., & Yong, V. W. (2021). Combination of Hydroxychloroquine and Indapamide Attenuates Neurodegeneration in Models Relevant to Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 18(1), 387–400. <https://doi.org/10.1007/S13311-020-01002-5>

Burnier, M. and Damianaki, A. (2023a) 'Hypertension as Cardiovascular Risk Factor in Chronic Kidney Disease', *Circulation Research*. Lippincott Williams & Wilkins Hagerstown, MD, 132(8), pp. 1050–1063. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.122.321762.

Burnier, M. and Damianaki, A. (2023b) 'Hypertension as Cardiovascular Risk Factor in Chronic Kidney Disease', *Circulation Research*. Lippincott Williams & Wilkins Hagerstown, MD, 132(8), pp. 1050–1063. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.122.321762.

Capel, R. A. *et al.* (2015) 'Hydroxychloroquine reduces heart rate by modulating the hyperpolarization-activated current *I_f*: Novel electrophysiological insights and therapeutic potential', *Heart Rhythm*. Elsevier, 12(10), pp. 2186–2194. doi: 10.1016/j.hrthm.2015.05.027.

Chandimali, N., Bak, S. G., Park, E. H., Lim, H. J., Won, Y. S., Kim, E. K., Park, S. I., & Lee, S. J. (2025). Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review. *Cell Death Discovery* 2025 11:1, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-02278-8>.

Chatre, C. *et al.* (2018) 'Cardiac Complications Attributed to Chloroquine and Hydroxychloroquine: A Systematic Review of the Literature', *Drug Safety*. Springer International Publishing, 41(10), pp. 919–931. doi: 10.1007/s40264-018-0689-4.

Chen, C. Y., Wang, F. L. and Lin, C. C. (2006) 'Chronic hydroxychloroquine use associated with QT prolongation and refractory ventricular arrhythmia', *Clinical Toxicology*. Taylor & Francis, 44(2), pp. 173–175. doi: 10.1080/15563650500514558.

Choi, M. *et al.* (2022) 'Hydroxychloroquine reduces hypertension and soluble fms-like

kinase-1 in a N ω-nitro-L-arginine methyl ester-induced preeclampsia rat model', *Journal of Hypertension*. Lippincott Williams and Wilkins, 40(12), pp. 2459–2468. doi: 10.1097/HJH.00000000000003279.

Clark, P. *et al.* (1993) 'Hydroxychloroquine compared with placebo in rheumatoid arthritis: A randomized controlled trial', *Annals of Internal Medicine*. American College of Physicians, 119(11), pp. 1067–1071. doi: 10.7326/0003-4819-119-11-199312010-00002.

Cotroneo, J. *et al.* (2007) 'Hydroxychloroquine-induced restrictive cardiomyopathy: Correlation between clinical, Echocardiographic and pathologic findings', *European Journal of Echocardiography*. Oxford Academic, 8(4), pp. 247–251. doi: 10.1016/j.euje.2006.02.002.

Coutinho, M. F., Prata, M. J. and Alves, S. (2012) 'A shortcut to the lysosome: The mannose-6-phosphate-independent pathway', *Molecular Genetics and Metabolism*. Academic Press, 107(3), pp. 257–266. doi: 10.1016/j.ymgme.2012.07.012.

Dessein, P. H., Tobias, M. and Veller, M. G. (2006) 'Metabolic syndrome and subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis', *Journal of Rheumatology*, 33(12), pp. 2425–2432.

DeCoux, A., Lindsey, M. L., Villarreal, F., Garcia, R. A., & Schulz, R. (2014). Myocardial matrix metalloproteinase-2: inside out and upside down. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 0, 64. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2014.09.016>

Dickhout, J. G. and Lee, R. M. K. W. (1997) 'Structural and functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats', *Hypertension*. Lippincott Williams & Wilkins, 29(3), pp. 781–789. doi: 10.1161/01.HYP.29.3.781.

Díez, J. J. and Iglesias, P. (2003) 'The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease', *European Journal of Endocrinology*. Oxford Academic, 148(3), pp. 293–300. doi: 10.1530/eje.0.1480293.

Du, J. *et al.* (2020) 'Cellular endo-lysosomal dysfunction in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease', *Liver International*. Liver Int, 40(2), pp. 271–280. doi: 10.1111/liv.14311.

Ewald, S. E. *et al.* (2008) 'The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor', *Nature*, 456(7222), pp. 658–662. doi: 10.1038/nature07405.

Fasano, S. *et al.* (2017) 'Longterm hydroxychloroquine therapy and low-dose aspirin may have an additive effectiveness in the primary prevention of cardiovascular events in patients with systemic lupus erythematosus', *Journal of Rheumatology*. Journal of

Rheumatology, 44(7), pp. 1032–1038. doi: 10.3899/jrheum.161351.

Foëx, P. and Sear, J. W. (2004) 'Hypertension: Pathophysiology and treatment', *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain*. Oxford Academic, 4(3), pp. 71–75. doi: 10.1093/bjaceaccp/mkh020.

Forgac, M. (2007) 'Vacuolar ATPases: Rotary proton pumps in physiology and pathophysiology', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 8(11), pp. 917–929. doi: 10.1038/nrm2272.

Frustaci, A. *et al.* (2012) 'Inhibition of cardiomyocyte lysosomal activity in hydroxychloroquine cardiomyopathy', *International Journal of Cardiology*, 157(1), pp. 117–119. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.03.112.

Gashi, M. and Mirhom, M. (2017) 'The cell', in *Neuroscience for Psychiatrists*. Sinauer Associates, pp. 25–33. doi: 10.7326/0003-4819-119-6-199309150-00018.

Ghoshal, K. *et al.* (2021) 'Adiponectin Genetic Variant and Expression Coupled with Lipid Peroxidation Reveal New Signatures in Diabetic Dyslipidemia', *Biochemical Genetics*. Springer, 59(3), pp. 781–798. doi: 10.1007/s10528-021-10030-5.

Gómez-Guzmán, M. *et al.* (2014) 'Chronic hydroxychloroquine improves endothelial dysfunction and protects kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus', *Hypertension*. Lippincott Williams and Wilkins, 64(2), pp. 330–337. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03587.

Gorelick, P. B. *et al.* (2020) 'Blood Pressure Management in Stroke', *Hypertension*. Lippincott Williams and Wilkins, 76(6), pp. 1688–1695. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14653.

Griendling, K. K., Camargo, L. L., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2021). Oxidative Stress and Hypertension. *Circulation Research*, 128(7), 993–1020. <https://doi.org/10.1161>.

Gros, F. and Muller, S. (2023) 'The role of lysosomes in metabolic and autoimmune diseases', *Nature Reviews Nephrology*. Springer US, 19(6), pp. 366–383. doi: 10.1038/s41581-023-00692-2.

Harrison, D. G., Coffman, T. M. and Wilcox, C. S. (2021) 'Pathophysiology of Hypertension: The Mosaic Theory and Beyond', *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins, 128(7), pp. 847–863. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318082.

Hasan, M. A. *et al.* (2023a) 'Hydroxychloroquine improves high-fat-diet-induced obesity and organ dysfunction via modulation of lipid level, oxidative stress, and inflammation', *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. Taylor and Francis

Ltd., 10(1), pp. 368–379. doi: 10.1080/2314808X.2023.2211832.

Hasan, M. A. *et al.* (2023b) 'Hydroxychloroquine improves high-fat-diet-induced obesity and organ dysfunction via modulation of lipid level, oxidative stress, and inflammation', *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. Taylor & Francis, 10(1), pp. 368–379. doi: 10.1080/2314808X.2023.2211832.

Jia, G. and Sowers, J. R. (2021) 'Hypertension in Diabetes: An Update of Basic Mechanisms and Clinical Disease', *Hypertension*. Wolters Kluwer Health, 78(5), pp. 1197–1205. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17981.

Jr., R. F., Silva, V. J. D. da and Salgado, H. C. (2001) 'Artigos Modelos de hipertensão arterial', *Rev Bras Hipertens*, 8(January), pp. 19–29.

Kaul, A., Gordon, C., Crow, M. K., Touma, Z., Urowitz, M. B., Van Vollenhoven, R., Ruiz-Irastorza, G., & Hughes, G. (2016). Systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Disease Primers* 2:1, 2(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.39>

Kyburz, D., Brentano, F., & Gay, S. (2006). Mode of action of hydroxychloroquine in RA-evidence of an inhibitory effect on toll-like receptor signaling. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*, 2(9), 458–459. <https://doi.org/10.1038/NCPRHEUM0292>.

Laursen, J. B., Rajagopalan, S., Galis, Z., Tarpey, M., Freeman, B. A., & Harrison, D. G. (1997). Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine- induced hypertension. *Circulation*, 95(3), 588–593. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.95.3.588>

Lazzerini, P. E. *et al.* (2014) 'Arrhythmic risk in rheumatoid arthritis: The driving role of systemic inflammation', *Autoimmunity Reviews*, 13(9), pp. 936–944. doi: 10.1016/j.autrev.2014.05.007.

Lee, H. A. *et al.* (2012) 'Tissue-specific upregulation of angiotensin-converting enzyme 1 in spontaneously hypertensive rats through histone code modifications', *Hypertension*. Lippincott Williams & Wilkins Hagerstown, MD, 59(3), pp. 621–626. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.182428.

Li, K., Deng, Z., Lei, C., Ding, X., Li, J., & Wang, C. (2024). The Role of Oxidative Stress in Tumorigenesis and Progression. *Cells*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/CELLS13050441>.

Liu, C., Xiang, G., Liang, D., Zhao, X., Xiao, K., & Xie, L. (2025). Association of oxidative balance score with the risk of all-cause and CVD mortality in younger US adults with diabetes. *Scientific Reports* 2025 15:1, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-88132-y>.

Luzio, J. P. *et al.* (2014) 'The biogenesis of lysosomes and lysosome-related

organelles', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(9). doi: 10.1101/cshperspect.a016840.

Manohar, V. A. *et al.* (2009) 'Restrictive cardiomyopathy secondary to hydroxychloroquine therapy', *Journal of Rheumatology*, 36(2), pp. 440–441. doi: 10.3899/jrheum.080305.

Mantel, Ä. *et al.* (2015) 'Rheumatoid arthritis is associated with a more severe presentation of acute coronary syndrome and worse short-term outcome', *European Heart Journal*. Oxford Academic, 36(48), pp. 3413–3422. doi: 10.1093/eurheartj/ehv461.

Martin-Vega, A., & Cobb, M. H. (2023). Navigating the ERK1/2 MAPK Cascade. *Biomolecules*, 13(10), 1555. <https://doi.org/10.3390/BIOM13101555>.

Mates, M., Neshar, G. and Zevin, S. (2007) 'History of medicine: Quinines - past and present', *Harefuah*, 146(7), pp. 560–562. Available at: <https://europepmc.org/article/med/17803173> (Accessed: 13 January 2024).

Mauthe, M. *et al.* (2018) 'Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion', *Autophagy*, 14(8), pp. 1435–1455. doi: 10.1080/15548627.2018.1474314.

Mohammed-Ali, Z. *et al.* (2017) 'Animal Models of Kidney Disease', in *Animal Models for the Study of Human Disease: Second Edition*. Elsevier Inc., pp. 379–417. doi: 10.1016/B978-0-12-809468-6.00016-4.

Monteith, A. J. *et al.* (2016) 'Defects in lysosomal maturation facilitate the activation of innate sensors in systemic lupus erythematosus', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 113(15), pp. E2142–E2151. doi: 10.1073/pnas.1513943113.

Mottillo, S. *et al.* (2010) 'The metabolic syndrome and cardiovascular risk: A systematic review and meta-analysis', *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier, 56(14), pp. 1113–1132. doi: 10.1016/j.jacc.2010.05.034.

Munguia-Realpozo, P. *et al.* (2019) 'Systemic lupus erythematosus and hypertension', *Autoimmunity Reviews*. Elsevier, 18(10), p. 102371. doi: 10.1016/j.autrev.2019.102371.

Nadella, V. and Howell, S. J. (2015) 'Hypertension: pathophysiology and perioperative implications', *BJA Education*. Oxford Academic, 15(6), pp. 275–279. doi: 10.1093/bjaceaccp/mkv001.

Otsuka, T. *et al.* (2015) 'Dyslipidemia and the risk of developing hypertension in a

working-age male population', *Journal of the American Heart Association*. Wiley-Blackwell, 5(3). doi: 10.1161/JAHA.115.003053.

Page, F. (1951) 'TREATMENT OF LUPUS ERYTHEMATOSUS WITH MEPACRINE', *The Lancet*. Elsevier, 258(6687), pp. 755–758. doi: 10.1016/S0140-6736(51)91643-1.

Panoulas, V. F. *et al.* (2008) 'Hypertension in rheumatoid arthritis', *Rheumatology*. Oxford Academic, 47(9), pp. 1286–1298. doi: 10.1093/rheumatology/ken159.

Pauletto, P. and Rattazzi, M. (2015) 'Inflammation and Hypertension', *Chronic Kidney Disease and Hypertension*, 40(11), pp. 141–156. doi: 10.1007/978-1-4939-1982-6_14.

Penn, S. K. *et al.* (2010) 'Hydroxychloroquine and glycemia in women with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus', *Journal of Rheumatology*, 37(6), pp. 1136–1142. doi: 10.3899/jrheum.090994.

Pietrocola, F. and Bravo-San Pedro, J. M. (2021) 'Targeting Autophagy to Counteract Obesity-Associated Oxidative Stress', *Antioxidants 2021, Vol. 10, Page 102*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 10(1), p. 102. doi: 10.3390/ANTIOX10010102.

Pols, M. S. *et al.* (2013) 'HVps41 and VAMP7 function in direct TGN to late endosome transport of lysosomal membrane proteins', *Nature Communications*. Nat Commun, 4. doi: 10.1038/ncomms2360.

Postiglione, A. E., Adams, L. L., Ekhatior, E. S., Odelade, A. E., Patwardhan, S., Chaudhari, M., Pardue, A. S., Kumari, A., LeFever, W. A., Tornow, O. P., Kaoud, T. S., Neiswinger, J., Jeong, J. S., Parsonage, D., Nelson, K. J., Kc, D. B., Furdui, C. M., Zhu, H., Wommack, A. J., ... Newman, R. H. (2023). Hydrogen peroxide-dependent oxidation of ERK2 within its D-recruitment site alters its substrate selection. *IScience*, 26(10), 107817. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2023.107817>.

Qiao, X. *et al.* (2019a) 'Hydroxychloroquine improves obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis by regulating lipid metabolism', *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A., 10(JULY), p. 463660. doi: 10.3389/fphar.2019.00855.

Qiao, X. *et al.* (2019b) 'Hydroxychloroquine improves obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis by regulating lipid metabolism', *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media SA, 10(JULY). doi: 10.3389/fphar.2019.00855.

Qin, B. *et al.* (2015) 'Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: A systematic review and meta-analysis', *Annals of the Rheumatic Diseases*. BMJ Publishing Group, 74(11), pp. 1983–1989. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205375.

- Ramser, B., Kokot, A., Metze, D., Weiß, N., Luger, T. A., & Böhm, M. (2009). Hydroxychloroquine Modulates Metabolic Activity and Proliferation and Induces Autophagic Cell Death of Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(10), 2419–2426. <https://doi.org/10.1038/JID.2009.80>
- Rodeheffer, R. J. (2011) 'Hypertension and heart failure: The allhat imperative', *Circulation*, 124(17), pp. 1803–1805. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.059303.
- Ruilope, L. M. and Schmieder, R. E. (2008) 'Left ventricular hypertrophy and clinical outcomes in hypertensive patients', *American Journal of Hypertension*. Oxford Academic, 21(5), pp. 500–508. doi: 10.1038/ajh.2008.16.
- Sabio, J. M. *et al.* (2009) 'Metabolic syndrome is associated with increased arterial stiffness and biomarkers of subclinical atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus', *Journal of Rheumatology*. The Journal of Rheumatology, 36(10), pp. 2204–2211. doi: 10.3899/jrheum.081253.
- Saftig, P. and Klumperman, J. (2009) 'Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: Trafficking meets function', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 10(9), pp. 623–635. doi: 10.1038/nrm2745.
- Schrezenmeier, E. and Dörner, T. (2020) 'Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology', *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group, 16(3), pp. 155–166. doi: 10.1038/s41584-020-0372-x.
- Sharma, T. S. *et al.* (2016) 'Hydroxychloroquine use is associated with decreased incident cardiovascular events in rheumatoid arthritis patients', *Journal of the American Heart Association*. John Wiley and Sons Inc., 5(1). doi: 10.1161/JAHA.115.002867.
- Shippey, E. A., Wagler, V. D. and Collamer, A. N. (2018) 'Hydroxychloroquine: An old drug with new relevance', *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. Cleveland Clinic Journal of Medicine, 85(6), pp. 459–467. doi: 10.3949/ccjm.85a.17034.
- Shukla, A. M. *et al.* (2015) 'Impact of hydroxychloroquine on atherosclerosis and vascular stiffness in the presence of chronic kidney disease', *PLoS ONE*. PLOS, 10(9). doi: 10.1371/journal.pone.0139226.
- Silva, G., Silva, J. da, Diniz, T., Lemos, V., & Cortes, S. (2015). Endothelial Dysfunction in DOCA-salt Hypertensive Mice: A Role for nNOS-derived Hydrogen Peroxide. *The FASEB Journal*, 29(S1), 623.3. https://doi.org/10.1096/FASEBJ.29.1_SUPPLEMENT.623.3
- Smith, T. L. and Hutchins, P. M. (1979) 'Central hemodynamics in the developmental stage of spontaneous hypertension in the unanesthetized rat', *Hypertension*, 1(5), pp.

508–517. doi: 10.1161/01.HYP.1.5.508.

Smolen, J. S. *et al.* (2018) 'Rheumatoid arthritis', *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group, 4(1), pp. 1–23. doi: 10.1038/nrdp.2018.1.

Soleimani, M. *et al.* (2023) 'Pathogenesis of Hypertension in Metabolic Syndrome: The Role of Fructose and Salt', *International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 4294*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 24(5), p. 4294. doi: 10.3390/IJMS24054294.

Solomon, D. H. *et al.* (2014) 'Effect of hydroxychloroquine on insulin sensitivity and lipid parameters in rheumatoid arthritis patients without diabetes mellitus: A randomized, blinded crossover trial', *Arthritis Care and Research*, 66(8), pp. 1246–1251. doi: 10.1002/acr.22285.

Spinale, F. G. (2002). Matrix metalloproteinases: Regulation and dysregulation in the failing heart. *Circulation Research*, 90(5), 520–530. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000013290.12884>.

Stanciu, S. *et al.* (2023) 'Links between Metabolic Syndrome and Hypertension: The Relationship with the Current Antidiabetic Drugs', *Metabolites*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 13(1). doi: 10.3390/metabo13010087.

Steinberg, H. O. *et al.* (1997) 'Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation', *Journal of Clinical Investigation*, 100(5), pp. 1230–1239. doi: 10.1172/JCI119636.

Sticherling, M. and Kuhn, A. (2022) 'Lupus erythematosus', in *Braun-Falco's Dermatology*. StatPearls Publishing, pp. 923–939. doi: 10.1007/978-3-662-63709-8_54.

Takeshi, N. (1977) 'Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats', *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 57(534), pp. 364–370. Available at: <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/> (Accessed: 12 January 2024).

Taylor, E. B. and Ryan, M. J. (2017) 'Understanding mechanisms of hypertension in systemic lupus erythematosus', *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 11(1), pp. 20–32. doi: 10.1177/1753944716637807.

Tian, Y. *et al.* (2021) 'Advances in Pathogenesis of Sjögren's Syndrome', *Journal of Immunology Research*. Hindawi Limited, 2021. doi: 10.1155/2021/5928232.

Tripathy, D. *et al.* (2003) 'Elevation of Free Fatty Acids Induces Inflammation and Impairs Vascular Reactivity in Healthy Subjects', *Diabetes*, 52(12), pp. 2882–2887. doi:

10.2337/diabetes.52.12.2882.

Tsakonas, E. *et al.* (1998) 'A long-term study of hydroxychloroquine withdrawal on exacerbations in systemic lupus erythematosus', *Lupus*. Sage PublicationsSage CA: Thousand Oaks, CA, 7(2), pp. 80–85. doi: 10.1191/096120398678919778.

Tselios, K. *et al.* (2017) 'Evolution of risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in systemic lupus erythematosus: A longterm prospective study', *Journal of Rheumatology*, 44(12), pp. 1841–1849. doi: 10.3899/jrheum.161121.

Torigoe, M., Sakata, K., Ishii, A., Iwata, S., Nakayamada, S., & Tanaka, Y. (2018). Hydroxychloroquine efficiently suppresses inflammatory responses of human class-switched memory B cells via Toll-like receptor 9 inhibition. *Clinical Immunology*, 195, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2018.07.003>.

Tsimihodimos, V. *et al.* (2018) 'Hypertension and Diabetes Mellitus Coprediction and Time Trajectories', *Hypertension*. Lippincott Williams and Wilkins, 71(3), pp. 422–428. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10546.

Üremiş, N., & Üremiş, M. M. (2025). Oxidative/Nitrosative Stress, Apoptosis, and Redox Signaling: Key Players in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 39(1), e70133. <https://doi.org/10.1002/JBT.70133>.

Utai, B. M. F., Ada, G. S. U. N. and Ada, Y. W. (2019) 'Review Vacuolar-type ATPase : A proton pump to lysosomal trafficking', 95(6), pp. 261–277.

Uzar, E., Ozay, R., Evliyaoglu, O., Aktas, A., Ulkay, M. B., Uyar, M. E., Ersoy, A., Burakgazi, A. Z., Turkay, C., & Ilhan, A. (2012). Hydroxycycloquine-induced oxidative stress on sciatic nerve and muscle tissue of rats: a stereological and biochemical study. *Human & Experimental Toxicology*, 31(10), 1066–1073. <https://doi.org/10.1177/0960327111433183>.

Vadacca, M. *et al.* (2009) 'Adipokines and systemic lupus erythematosus: Relationship with metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors', *Journal of Rheumatology*, 36(2), pp. 295–297. doi: 10.3899/jrheum.080503.

Wakiya, R. *et al.* (2022) 'Supplemental hydroxychloroquine therapy regulates adipokines in patients with systemic lupus erythematosus with stable disease', *Clinical Rheumatology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 41(11), pp. 3345–3353. doi: 10.1007/s10067-022-06282-0.

Wallace, D. J. (1996) 'The history of antimalarials', *Lupus*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 5(SUPPL. 1). doi: 10.1177/0961203396005001021.

Wang, F. *et al.* (2020) 'In Vivo Remodeling of Altered Autophagy-Lysosomal Pathway

by a Phosphopeptide in Lupus', *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 9(10), p. 2328. doi: 10.3390/cells9102328.

Wang, F. and Muller, S. (2015) 'Manipulating autophagic processes in autoimmune diseases: A special focus on modulating chaperone-mediated autophagy, an emerging therapeutic target', *Frontiers in Immunology*. *Front Immunol*, 6(MAY). doi: 10.3389/fimmu.2015.00252.

Wang, H., Rao, P., Qiu, Y., & Xiang, L. (2023). Interaction mechanism between hydroxychloroquine sulfate and collagen: Insights from multi-spectroscopy, molecular docking, and molecular dynamic simulation methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 303, 123155. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2023.123155>.

Wang, R., Xi, L. and Kukreja, R. C. (2017) 'PDE5 inhibitor tadalafil and hydroxychloroquine cotreatment provides synergistic protection against type 2 diabetes and myocardial infarction in mice', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 361(1), pp. 29–38. doi: 10.1124/jpet.116.239087.

Watts, C. (2022) 'Lysosomes and lysosome-related organelles in immune responses', *FEBS Open Bio*. John Wiley and Sons Inc, 12(4), pp. 678–693. doi: 10.1002/2211-5463.13388.

Weyand, C. M. and Goronzy, J. J. (2021) 'The immunology of rheumatoid arthritis', *Nature Immunology*, 22(1), pp. 10–18. doi: 10.1038/s41590-020-00816-x.

World Health Organization (2023) 'Global Report on Hypertension'.

Wu, Q. *et al.* (2023) 'Hydroxychloroquine and azithromycin alter the contractility of living porcine heart slices', *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A., 14, p. 1127388. doi: 10.3389/fphar.2023.1127388.

Yan, J. *et al.* (2021) 'The outcomes of acute myocardial infarction patients comorbidity with hypertension and hyperhomocysteinemia', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 11(1), pp. 1–7. doi: 10.1038/s41598-021-02340-w.

Yang, L. *et al.* (2010) 'Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance', *Cell Metabolism*. *Cell Metab*, 11(6), pp. 467–478. doi: 10.1016/j.cmet.2010.04.005.

Yildiz, O., Seyrek, M. and Gul, H. (2013) 'Pharmacology of Arterial Grafts for Coronary Artery Bypass Surgery', *Artery Bypass*.

Zhu, S. yu *et al.* (2020) 'Lysosomal quality control of cell fate: a novel therapeutic target

for human diseases', *Cell Death and Disease*. Springer US, 11(9). doi:
10.1038/s41419-020-03032-5.