

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

**MURILO EDUARDO GRATON**

**EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM APOCININA**  
**SOBRE A RESPOSTA VASOCONSTRITORA DA**  
**ANGIOTENSINA II EM RATOS ESPONTANEAMENTE**  
**HIPERTENSOS**

**ARAÇATUBA**

**2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

**MURILO EDUARDO GRATON**

**EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM APOCININA**  
**SOBRE A RESPOSTA VASOCONSTRITORA DA**  
**ANGIOTENSINA II EM RATOS ESPONTANEAMENTE**  
**HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Antoniali Silva  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lusiane Maria Bendhack

**ARAÇATUBA**

**2017**

Catálogo na Publicação (CIP)  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G772e Graton, Murilo Eduardo.  
Efeitos do tratamento crônico com apocinina sobre a resposta vasoconstritora da angiotensina II em ratos espontaneamente hipertensos / Murilo Eduardo Graton. - Araçatuba, 2017  
103 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Cristina Antoniali Silva

Coorientadora: Profa. Lusiane Maria Bendhack

1. NADPH oxidase 2. Angiotensinas 3. Ratos endogâmicos  
SHR 4. Espécies de oxigênio reativas 5. Hipertensão Título

CDD 612

## **DADOS CURRICULARES**

**Nascimento:** 28.09.1992, Araçatuba – SP.

**Filiação:** José Eduardo Graton

Selma Nazareth Pegoraro Graton

**2010/2014:** Curso de Graduação em Farmácia, Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium* de Araçatuba – UniSALESIANO.

**2015/2017:** Curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Modalidade Mestrado Acadêmico, pelo Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, pela Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

*Dedico este trabalho aos meus pais, **José** e **Selma**, pela vida, pelo amor e pela educação. Vocês muitas vezes escolheram viver os meus sonhos do que aos próprios, me ensinaram a nunca desistir e a acreditar sempre que eu poderia ser melhor. Sei que um 'obrigado' ainda é pouco, mas serei eternamente grato por tudo e por tanto amor! E a minha avó, **Aparecida**, por todo seu amor e carinho, que foram sempre essenciais para mim.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a Nossa Senhora por sempre me amparem, pelas infinitas graças e pela força em sempre continuar.

A Professora Cristina, minha orientadora, pelos ensinamentos, pelo carinho e pela paciência durante estes últimos seis anos. Seu exemplo de ser humano, professora e pesquisadora me inspiram. Muito obrigado, por tudo.

A Professora Lusiane, minha coorientadora, pelos conselhos, ensinamentos e dedicação que foram essenciais para minha formação e no desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' (UNESP) e a Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) pela oportunidade da realização e conclusão da minha iniciação científica e do meu mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas da FOA, em especial as professoras Dra Sandra Helena Penha de Oliveira, Dra Ana Cláudia Melo Stevanato Nakamune e Dra Dóris Hissako Sumida por cederem seus equipamentos e espaços para o desenvolvimento deste trabalho e por todos seus ensinamentos.

As professoras da banca examinadora, Professora Dra Cristina Antoniali Silva, Professora Dra Lusiane Maria Bendhack, Professora Dra Graziela Scialanti Ceravolo e Professora Dra Michele Mazzaron de Castro, pela disposição na participação desta comissão examinadora e pela contribuição na melhoria deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa da Professora Cristina, Simone Potje, Jéssica Troiano, Ligia Perassa, Daniela Souza, Bruno Homem, Luísa Costa, Helena Barroso e Daniela Navarro.

Ao grupo de pesquisa da Professora Lusiane, Marcella Grando, Michelle Paulo, Bruno Silva, Jeimison Duarte e Juliana Vercesi.

As funcionárias e aos funcionários da FOA, Valéria Zagatto, Cristiane Lui, Lilian Mada, Eliseide Navega, Camilo, Márcia, João, Ana Cláudia, Ana Paula, Maria Claudia, Cláudio, Luzia, Denise e Luiz, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho

Ao Professor Carlos Renato Tirapelli e seu aluno Gabriel Tavares do Vale, da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus professores da graduação, Ana Carolina Frade, Rossana Rosa, Vilma Colli, Fausto de Souza, Eliane Cervelatti, Valéria Rowe, André Rowe, Fátima Sato, Joice Cozza, José Zequetto, Paulo Geraldo, Natália Negreiros, Simone Fujii, Simone Terçariol, Simone Botini, Milena Tonon e Andrea Garcia pelos ensinamentos, conselhos, apoio e incentivos. E a todos aqueles outros grandes mestres que passaram em minha vida.

Aos meus pais, José e Selma, que sempre foram meu combustível para continuar a estudar e nunca me deixaram pensar em desistir. Além da vida, vocês me deram carinho e serei eternamente grato pelo amor incondicional de vocês.

A minha avó, Aparecida, pelo amor, pelo carinho, pela compreensão e pelas palavras de conforto.

Aos meus tios e tias, primos e primas da família Pegoraro por sempre torcerem por mim e vibrarem a cada vitória. Em especial as minhas tias, Eliana Mara, por me ensinar desde pequeno que a educação é nossa maior riqueza e que desistir é uma palavra que não deveria existir, e Celina Sueli, por me ensinar que nossas dificuldades não nos limitam e servem apenas para nos impulsionar.

Aos meus tios, Alexandre e Erotildes, minhas primas Juliana e Luciana, meus primos Antônio e Lucca, e ainda, minhas tias avós Júlia, Jandira e Aurora (*in memoriam*) e prima Luzia Anderlini, da família Graton, por todo carinho e amor que sempre tiveram comigo.

As minhas amigas, Simone Potje e Jéssica Troiano, que foram muito mais que minhas colegas de bancada, foram amigas que sempre estiveram meu lado em todos os momentos. Tudo isto foi muito mais fácil e prazeroso com vocês ao meu lado e muito obrigado pelos ensinamentos, amizade, viagens, conselhos, dedicação, paciência e companheirismo. Vocês são minhas irmãs de coração.

As minhas amigas de graduação, Jéssica Franco, Beatriz Reis, Carolina Germano, Pâmela Simenes e Gabrieli Bertechini pelos conselhos, amizade, incentivos e momentos que passamos juntos.

Aos amigos e do Departamento de Ciências Básicas, em especial do Laboratório de Farmacologia, da FOA, Simone Potje, Jéssica Troiano, Daniela Souza, Bruno Homem, Luísa Costa, Helena Barroso, Vitor Balera, Aline Takamyia, Dayane Queiroz, Letícia Vieira, Fernanda Demarqui, Kellen Tjioe, Carla Sipert, Caril, Amaral, Jéssica Pinatti, Carolina Linjardi, Mariana Souza, Caroline Shibuya, Emilly Silva, Flávia Verza, Talita Silva, Amanda Gomes, Sara Mattera, Fernando Chiba, Renato Felipe, Mariana Benites, Rodrigo Martins, Fernando Marani, Jhenifer Haiane, Mariana Caioá, Rita Nunes, Ariana Ferreira, Talita Silva, Keny Tirapelli, Lilian Xavier, Camila Stringhetta, Angela Nicola, Ricardo Almeida, Fernanda Fernandes, Melise Peres e Noélla Kill, pela amizade e apoio.

Aos meus amigos, Amanda Gomes e Yago Silva pela amizade e por serem essenciais em minha vida. E aos meus demais amigos, Odair Moura, Lucas Biagini, Débora Cavalcante, João Carlos, Marjorie Oliveira, Bruna Santiago, Túlio Felipe, Aline Yamamoto e Leandro Santos, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos da ETEC, Brenda Longhini, Henrique Custódio, Michelle Ramos e Gabriela Reis, pelos divertidos momentos, pela amizade e pelas risadas.



E por fim, a todos aqueles aqui não mencionados, mas que contribuíram de forma direta ou indireta durante esta caminhada. Obrigado!

***‘Palavras são, na minha nada humilde opinião, nossa inesgotável fonte de magia. Capazes de causar grandes sofrimentos, mas também de remediá-los’.***

*Alvo Dumbledore, por J. K. Rowling*

GRATON, M. E. **Efeitos do tratamento crônico com apocinina sobre a resposta vasoconstritora da angiotensina II em ratos espontaneamente hipertensos.** 2017. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

## RESUMO

A enzima NAD(P)H oxidase (NOX) é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO) no sistema cardiovascular e sua atividade e expressão podem ser regulada pela angiotensina (Ang) II. Demonstramos previamente que o tratamento crônico com apocinina, um inibidor de NOX, reduziu a pressão arterial e preveniu o desenvolvimento da disfunção endotelial em SHR. Estes efeitos da apocinina foram associados a redução de geração de ERO e ao aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico em células endoteliais de SHR. Dados de nosso laboratório mostraram que o tratamento com apocinina, também reduziu o efeito pressor da Ang II em SHR. A associação entre Ang II, via receptores AT<sub>1</sub>, e o estresse oxidativo tem sido implicada na patogênese da hipertensão. Levantamos a hipótese que a apocinina, ao alterar a sinalização redox, reduz a expressão de receptores AT<sub>1</sub> e a resposta vasoconstritora da Ang II em SHR. Neste estudo, avaliamos o efeito do tratamento crônico com apocinina sobre as respostas contráteis à Ang II em vasos sanguíneos de SHR e os mecanismos envolvidos nestes efeitos, utilizando ensaios bioquímicos, biomoleculares e funcionais. SHR foram tratados com apocinina (30 mg/Kg, v.o.) da 4<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> semana de vida e ratos Wistar foram utilizados como controle normotenso. Analisamos os efeitos da apocinina na capacidade antioxidante plasmática, expressão de NOX, geração de ERO, níveis de nitrato/ nitrito, expressão de receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, e respostas vasoconstritoras à Ang II em artéria mesentérica e aorta. O tratamento de SHR com apocinina aumentou a capacidade antioxidante plasmática, os níveis de nitrato/nitrito, não alterou a expressão de receptores AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub> em artérias mesentéricas, mas aumentou a expressão de AT<sub>2</sub>, mas não de AT<sub>1</sub>, em aorta de SHR. Além disto, o tratamento com apocinina diminuiu a expressão de NOX2 e p47phox e a produção de ERO. O tratamento com apocinina aumentou a modulação do endotélio e/ou da atividade da NOS sobre as respostas vasoconstritoras à Ang II em artérias mesentéricas de SHR, mas não alterou a reatividade de aortas de SHR à Ang II. A menor reatividade de artérias de

resistência à Ang II levaria a menor resistência vascular periférica e consequentemente a redução da pressão arterial média e do efeito pressor da Ang II em SHR tratados com apocinina, como observado previamente. O mecanismo de ação da apocinina envolvido neste efeito está associado a importantes alterações redox que determinam uma maior modulação endotelial dependente de NOS das respostas vasoconstritoras da Ang II, mas não envolve alterações na expressão de receptores AT<sub>1</sub> em vasos de SHR.

**Palavras-chave:** NADPH oxidase. Angiotensina. Ratos endogâmicos SHR. Espécies de oxigênio reativas. Hipertensão.

GRATON, M. E. **Effect of chronic treatment with apocynin on the vasoconstrictor response of angiotensin II in spontaneously hypertensive rats.** 2017. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

## **ABSTRACT**

NAD(P)H oxidase (NOX) is the major source of reactive oxygen species (ROS) in the cardiovascular system and its activity and expression could be regulated by angiotensin (Ang) II. We previously demonstrated that chronic treatment with apocynin, a NOX inhibitor, reduced blood pressure and prevented the development of endothelial dysfunction in SHR. These effects of apocynin have been associated with reduced generation of ROS and increased bioavailability of nitric oxide in endothelial cells of SHR. Data from our laboratory showed that treatment with apocynin also reduced the pressor effect of Ang II on SHR. The association between Ang II, via AT<sub>1</sub> receptors, and oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of hypertension. We hypothesized that apocynin, altering redox signaling, could reduce expression of AT<sub>1</sub> receptors and Ang II vasoconstrictor response in SHR. In this study, we evaluated the effect of chronic treatment with apocynin on the contractile responses to Ang II in blood vessels of SHR and the mechanisms involved in the effects of these on biochemical, biomolecular and functional assays. SHR were treated with apocynin (30 mg/kg, p.o.) from the 4<sup>th</sup> to the 10<sup>th</sup> week of life and Wistar rats were used as normotensive control. Analysis of the effects of apocynin on plasma antioxidant capacity, NOX expression, ROS generation, nitrate/ nitrite levels, expression of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors, and vasoconstrictor responses to Ang II on mesenteric and aortic arteries. Treatment of SHR with apocynin increased plasma antioxidant capacity, nitrate/ nitrite levels, did not alter AT<sub>1</sub> or AT<sub>2</sub> receptor expression in mesenteric arteries, but increased expression of AT<sub>2</sub>, but not AT<sub>1</sub>, in SHR aorta. In addition, treatment with apocynin decreased expression of NOX2 and p47phox and ROS generation. Treatment with apocynin increased endothelium modulation and/or NOS activity on Ang II vasoconstrictor responses in mesenteric arteries of SHR, but did not alter the reactivity to Ang II in aortas of SHR. The lower reactivity of Ang II in resistance arteries would lead to lower peripheral vascular resistance and consequently the

reduction of mean arterial pressure and Ang II pressor effect in SHR treated with apocynin, as previously observed. The mechanism of action of the apocynin involved in this effect is associated with important redox changes that determine a greater NOS-dependent endothelial modulation of the vasoconstrictor responses of Ang II, but does not involve expression in the expression of AT<sub>1</sub> receptors in SHR vessels.

**Keywords:** NADPH oxidase. Angiotensin. Inbred SHR Rats. Reactive oxygen species. Hypertension.

## LISTA DE ABREVIATURAS

% – porcentagem

μ – micro

μL – microlitro

μm – micrômetro

μmol/L – micromol por litro

2R-1C – 2-rins-1-clipe, rato hipertenso renal

Ang II – angiotensina II

AT<sub>1</sub> – receptor de angiotensina II do tipo 1

AT<sub>2</sub> – receptor de angiotensina II do tipo 2

BNF-β – beta naftoflavona

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> – glicose

CaCl<sub>2</sub> – cloreto de cálcio

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

DAF-2/DA - 4,5- diaminofluoresceína

DNA – ácido desoxirribonucleico

DOCA – acetato de desoxicorticosterona

DOCA-salt - rato tratado com acetato de desoxicorticosterona (DOCA) e NaCl (salt)

E- – anel de artéria, aorta ou mesentérica, com endotélio removido

E+ – anel de artéria, aorta ou mesentérica, com endotélio preservado

EC<sub>50</sub> – concentração necessária para 50% do efeito máximo

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF – fator de crescimento epidermal

EGTA – ácido trietilenoglicoldiamino tetra-acético

E<sub>max</sub> – efeito máximo

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial ou NOSIII

EPM – erro padrão da média

ERO – espécies reativas de oxigênio

Fe<sup>2+</sup> – íon ferro II

FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O – cloreto de ferro III hexaidratado

FeSO<sub>4</sub> – sulfato de ferro anidro

FGF- $\beta$  – fator de crescimento de fibroblastos básico um  
FRAP – ensaio do poder antioxidante redutor do ferro (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Power assay*)  
g – gramas  
GMPc – 3',5' guanosina monofosfato cíclico  
h – hora  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
HEK293 – células embrionárias de rim humano tipo selvagem 293  
HCl – ácido clorídrico  
IC – circunferência interna  
IGF-1 – fator de crescimento semelhante a insulina um  
IL-1 – interleucina-1  
iNOS – óxido nítrico sintase induzível ou NOSII  
KCl – cloreto de potássio  
Kg – quilogramas  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato de potássio monohidratado  
L – litro  
L-NAME – n-nitro-l-arginina metil éster  
log – logaritmo  
mg – miligramas  
MgSO<sub>4</sub> – sulfato de magnésio  
mL – mililitros  
mmHg – milímetro de mercúrio  
mmol/L – milimol por litro  
mN – miliNewton  
n – número amostral  
NAD(P)H – diidronicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NAD(P)H oxidase ou NOX – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase  
NaHCO<sub>3</sub> – bicarbonato de sódio  
ng –nanogramas  
nm – nanômetros  
nmol/L – nanomol por litro  
nNOS – óxido nítrico sintase neuronal ou NOSI  
NOS – óxido nítrico sintase (do inglês, *nitric oxide synthase*)



NOXO1 – NOX organizador 1

NP-40 – nonidet P-40

$O_2^-$  – ânion superóxido

$O_2$  – oxigênio molecular

$^{\circ}C$  – graus Celsius

$OH^-$  – radical hidroxil

$ONOO^-$  – peroxinitrito

PAS – pressão arterial sistólica

$pD_2$  – logaritmo negativo da EC50

pH – potencial hidrogeniônico

RIPA – tampão para ensaio de radioimunoprecipitação

$R-O^-$  – radical alcoxil

rpm – rotações por minuto

SHR – rato espontaneamente hipertenso (do inglês, *spontaneously hypertensive rat*)

SHRSP – rato espontaneamente hipertenso com predisposição ao acidente vascular encefálico (do inglês *stroke prone*)

TBS-T – tampão tris salina acrescido de Tween 20

TGF- $\beta$ 1 – fator transformador de crescimento beta um

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

TPTZ – tripiridiltriazina

UA – unidades arbitrárias

URL – unidade relativa de luz

v.o. – via oral

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

$\alpha$  – alfa

$\beta$  – beta

$\Delta$ PAM – variação da pressão arterial média

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Variação da Pressão Arterial Média (%  $\Delta$ PAM) em ratos Wistar (barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR tratados com apocinina (barras pretas) após a administração *in bolus* de Angiotensina II (ANG II) nas doses de 2,5 e 10 ng/kg (Perassa, 2013 – retirado e adaptado com permissão). 28
- Figura 2 – Capacidade antioxidante plasmática, em mmol/L de FeSO<sub>4</sub>, de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina, determinada pelo método de FRAP. 47
- Figura 3 – Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica da isoforma NOX1 (B) e de sua subunidade NOXO1 (C), em unidades arbitrárias, em homogenatos de aortas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina. 49
- Figura 4 – Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica da isoforma NOX2 (B) e de sua subunidade p47phox (C), em unidades arbitrárias, em homogenatos de aortas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina. 51
- Figura 5 – Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica da isoforma NOX4 (B), em unidades arbitrárias, em homogenatos de aortas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina. 52
- Figura 6 – Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica dos receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT<sub>1</sub>, B) e do tipo 2 (AT<sub>2</sub>, C), em unidades arbitrárias, em homogenatos de artérias mesentéricas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina. 54
- Figura 7 – Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica dos receptores

- de angiotensina II do tipo 1 (AT<sub>1</sub>, B) e do tipo 2 (AT<sub>2</sub>, C), em unidades arbitrárias, em homogenatos de aortas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina. 56
- Figura 8 – Produção de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) dependente de NOX, em unidades relativas de luz (URL)/ mg de proteínas, em homogenatos de aortas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina. 57
- Figura 9 – Níveis de nitrato/ nitrito, em nmol/ mg de proteínas, em homogenatos de aortas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina. 58
- Figura 10 – Curvas concentração-efeito para Angiotensina (Ang) II (0,1 nmolL – 1 µmol/L) em anéis do segundo e terceiro ramos de artéria mesentérica de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina, com (A) ou sem (B) endotélio, ou com endotélio na presença de L-NAME 100 µmol/L (C). 61
- Figura 11 – Curvas de concentração-efeito para Angiotensina (Ang) II (0,1 nmolL – 1 µmol/L) em anéis do segundo e terceiro ramos de artéria mesentérica de ratos Wistar (A), SHR (B) e SHR Tratado (C) com apocinina na presença (E+, símbolos pretos) ou ausência (E-, símbolos brancos) de endotélio. 62
- Figura 12 – Curvas de concentração-efeito para Angiotensina (Ang) II (0,1 nmolL – 1 µmol/L) em anéis do segundo e terceiro ramos de artéria mesentérica de ratos Wistar (A), SHR (B) e SHR Tratado (C) com apocinina, com (E+, símbolos pretos) ou com endotélio na presença de L-NAME (símbolos brancos) de endotélio. 63
- Figura 13 – Curvas de concentração-efeito para Angiotensina (Ang) II (0,1 nmolL – 0,1 µmol/L) em anéis de artéria aorta de ratos Wistar,

SHR e SHR Tratado com apocinina, com (A) ou sem (B) endotélio, ou com endotélio na presença de L-NAME 100  $\mu\text{mol/L}$  (C).

66

Figura 14 – Curvas de concentração-efeito para Angiotensina (Ang) II (0,1 nmolL – 1  $\mu\text{mol/L}$ ) em anéis de aorta de ratos Wistar (A), SHR (B) e SHR Tratado (C) com apocinina na presença (E+, símbolos pretos) ou ausência (E-, símbolos brancos) de endotélio.

67

Figura 15 – Curvas de concentração-efeito para Angiotensina (Ang) II (0,1 nmolL – 1  $\mu\text{mol/L}$ ) em anéis de aorta de ratos Wistar (A, círculos), SHR (B, triângulos) e SHR Tratado (C, quadrados) com apocinina, com (E+, símbolos pretos) ou com endotélio na presença de L-NAME 100  $\mu\text{mol/L}$  (símbolos brancos) de endotélio.

68

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Diluições dos anticorpos primários e secundários utilizados nos experimentos de Western Blotting. 38
- Tabela 2 – Capacidade antioxidante da apocinina em solução (0,3 mg/L), em mmol/L de FeSO<sub>4</sub>, pelos dias de tratamento dos animais, determinada pelo método de FRAP. 46
- Tabela 3 – Valores de efeito máximo ( $E_{max}$ ) e potência ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-efeito para Angiotensina II em anéis do segundo e terceiro ramos de artéria mesentérica de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina, com (E+) ou sem endotélio (E-) ou com endotélio na presença de L-NAME 100  $\mu$ mol/L. 60
- Tabela 4 – Valores de efeito máximo ( $E_{max}$ ) e potência ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-efeito para Angiotensina II em anéis de aortas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina, com (E+) ou sem endotélio (E-) ou com endotélio na presença de L-NAME 100  $\mu$ mol/L. 65

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	HIPÓTESE.....	30
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	Objetivo Geral .....	32
3.2	Objetivos Específicos .....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
4.1	Animais .....	34
4.2	Tratamento.....	34
4.3	Determinação da capacidade antioxidante da apocinina em solução .....	35
4.4	Determinação da capacidade antioxidante plasmática dos animais .....	36
4.5	Avaliação da expressão proteica das isoformas NOX, 1, 2 e 4, suas subunidades, NOXO1 e p47phox e dos receptores de Ang II, AT <sub>1</sub> e AT <sub>2</sub> , em homogenatos de aorta ou artéria mesentérica.....	36
4.6	Determinação da produção de ânion superóxido em aortas .....	38
4.7	Avaliação dos níveis de nitrato/ nitrito em homogenatos de aorta .....	39
4.8	Reatividade vascular .....	40
4.8.1	Reatividade em artéria mesentérica .....	40
4.8.2	Reatividade em artéria aorta.....	41
4.9	Análise Estatística.....	42
4.10	Sais, Drogas e Reagentes .....	42
5	RESULTADOS .....	46
5.1	A capacidade antioxidante da solução de apocinina é mantida durante o tratamento.....	46
5.2	A apocinina aumenta a capacidade antioxidante plasmática em SHR .....	47
5.3	O tratamento crônico com apocinina não altera a expressão de NOX1 e sua subunidade NOXO1 .....	48
5.4	A expressão aumentada de NOX2 e p47phox em aortas de SHR é reduzida pela apocinina.....	50
5.5	O tratamento com apocinina não altera a expressão da NOX4 em aortas de SHR .....	52
5.6	A expressão de receptores AT <sub>1</sub> e AT <sub>2</sub> não está alterada em leito mesentérico de SHR.....	53

5.7	O tratamento com apocinina aumenta a expressão de receptores AT <sub>2</sub> , mas não de AT <sub>1</sub> , em aortas de SHR.....	55
5.8	O tratamento com apocinina diminui a produção de ânion superóxido em aortas de SHR .....	57
5.9	O tratamento com apocinina aumenta os níveis de nitrato/ nitrito em SHR .	58
5.10	O tratamento com apocinina reduz a contração de artérias de resistência de SHR à Ang II, por aumentar a atividade de NOS e a modulação do endotélio sobre a contração vascular .....	59
5.11	O tratamento com apocinina não altera a reatividade de aortas de SHR à Ang II.....	64
6	DISCUSSÃO.....	70
7	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS.....	82
	ANEXOS .....	99

# **INTRODUÇÃO**



## 1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é uma condição clínica multifatorial caracterizada pelos níveis elevados e sustentados de pressão arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg e/ou diastólica  $\geq 90$  mmHg, frequentemente associada com aumento do risco de eventos cardiovasculares, distúrbios metabólicos e alterações estruturais e funcionais em órgãos-alvo, sendo classificada como primária (ou essencial) e secundária (WEBER et al., 2014; MALACHIAS et al., 2016). A hipertensão arterial secundária ocorre com causa conhecida e abrange cerca de 5 % dos casos, enquanto que a hipertensão arterial primária corresponde a 95 % dos casos, é de causa desconhecida e ocorre pela interação de fatores genéticos e estilo de vida (POULTER; PRABHAKARAN; CAULFIELD, 2015). No Brasil, estima-se que 32,5 % dos adultos (36 milhões de pessoas) e 60 % dos idosos possuam hipertensão arterial (MALACHIAS et al., 2016). Resultados semelhantes são encontrados nos Estados Unidos, onde um terço da população adulta norte-americana, aproximadamente 75 milhões de pessoas, apresenta hipertensão arterial e destes, 46 % não controlam os níveis elevados de pressão arterial (MERAI et al., 2016).

Diferentes modelos experimentais foram desenvolvidos para o estudo da hipertensão arterial, dentre eles, o rato espontaneamente hipertenso (SHR, do termo em inglês *spontaneously hypertensive rats*) é um dos modelos mais estudados (PINTO; PAUL; GANTEN, 1998) por apresentar desenvolvimento da hipertensão arterial sem etiologia conhecida (TANASE, 1979), aumento dos níveis plasmáticos de angiotensina (Ang) II (BOLTERMANN et al., 2005), aumento de resistência vascular periférica sem expansão de volume (TRIPPODO; FROHLICH, 1981) e aumento da atividade simpática (LUNDIN; RICKSTEIN; THORÉN, 1984). Os SHR foram obtidos a partir do endocruzamento de ratos Wistar-Kyoto que apresentavam valores de pressão arterial aumentados, acima de 130 mmHg a partir da décima semana de vida (OKAMOTO; AOKI, 1963; ROMERO-NAVA et al., 2016), o que resultou em animais naturalmente hipertensos (OKAMOTO; AOKI, 1963). SHR apresentam valores de pressão arterial sistólica (PAS) semelhantes aos de Wistar-Kyoto nas três primeiras semanas de vida (DICKHOUT; LEE, 1997), mas valores aumentados de PAS são observados a partir da terceira ou quarta semana de vida destes animais (CLUBB JÚNIOR et al., 1987). Ainda, de forma semelhante à

observada em humanos (DHALLA; TEMSAH; NETTICADAN, 2000; HIGASHI; KIHARA; NOMA, 2012; PANZA et al., 1990), a disfunção endotelial e o estresse oxidativo precedem o desenvolvimento da hipertensão arterial em SHR (JAMESON et al., 1993; NABHA et al., 2005).

A disfunção endotelial é uma alteração vascular caracterizada pela perda da integridade e funcionalidade da camada endotelial que leva a um estado de vasoconstrição aumentado e reduzida capacidade de vasodilatação e a alterações estruturais e funcionais do músculo liso vascular (XIAO; LIU; WANG, 2014; MONTEZANO et al., 2015). Assim, os vasos sanguíneos perdem a habilidade fisiológica de dilatação e resistência vascular é mantida em níveis mais altos (VANHOUTTE, 2002).

Uma das causas da disfunção endotelial é o estresse oxidativo (CAI; HARRISON, 2000), estabelecido pela alteração de equilíbrio entre a produção de espécie reativas de oxigênio (ERO) e as defesas endógenas antioxidantes, em favor dos oxidantes (BETTERIDGE, 2000). Quando estabelecido, este desequilíbrio, ocorre conseqüentemente, diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) decorrente de inativação por reação com ERO, em especial com ânion superóxido ( $O_2^-$ ), que ao reagir com NO, leva à formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), outra ERO, associada aos danos vasculares e hipertensão arterial (SARAN; MICHEL; BORS, 1990; McINTYRE; BOHR; DOMINICZAK, 1999).

O NO é um fator vasodilatador endógeno produzido no organismo (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980) e desempenha um papel importante no controle do tônus vascular e regulação hemodinâmica, controlando o fluxo sanguíneo e pressão capilar (UMANS; LEVI, 1995), além de regular contração e proliferação de células do músculo liso vascular, agregação plaquetária e adesão de monócitos e moléculas nas paredes dos vasos sanguíneos (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; VANHOUTTE, 2002). O NO é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), que apresenta três isoformas, duas constitutivas e dependentes de cálcio para sua ativação (nNOS ou NOSI, isoforma neuronal; e, eNOS ou NOSIII, isoforma endotelial) e uma outra estimulada por citocinas (iNOS ou NOSII, isoforma induzível) (FÖRSTERMANN; BOISSEL; KLEINERT, 1998; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Em células endoteliais, estímulos fisiológicos, como o estresse de cisalhamento, e estímulos farmacológicos, como acetilcolina e ionóforo de cálcio, promovem aumento das concentrações intracelulares de cálcio, que se liga a

calmodulina, para a formação do complexo cálcio-calmodulina, que ativa a enzima eNOS e leva à formação de NO e L-citrulina, a partir do aminoácido L-arginina e de cofatores como NAD(P)H e tetrahydrobiopterina (GORREN et al., 2005).

Por sua vez, as ERO são produzidas em organismos vivos como resultado do metabolismo celular normal, e quando em concentrações baixas ou moderadas participam de diversos processos fisiológicos, controlando a função endotelial e tônus vascular, mas em altas concentrações, podem gerar modificações adversas em componentes celulares, como no DNA, lipídios e proteínas, alterando suas funções ou suas estruturas químicas, levando à inflamação, apoptose, proliferação, rarefação, fibrose e angiogênese, resultando em remodelamento vascular e disfunção endotelial, alterações associadas a hipertensão arterial (BIRBEN et al., 2012; SCHRAMM et al., 2012; TOUYZ; BRIONES, 2011).

As ERO são metabólitos do oxigênio molecular e algumas possuem elétrons desemparelhados em sua órbita externa o que leva a sua extrema reatividade química, como por exemplo, o ânion superóxido, o radical hidroxil ( $\text{OH}^-$ ), o NO e o radical alcóxil ( $\text{R-O}^-$ ). Outras ERO, embora não possuam elétrons desemparelhados, são capazes de trocar elétrons com outras moléculas, como é o caso do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o  $\text{ONOO}^-$  e o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) (GUZIK; HARRISON, 2006). Em vasos sanguíneos de diferentes modelos experimentais de hipertensão, incluindo SHR, a produção de ânion superóxido está aumentada (BOULOUMIE et al., 1997; SUZUKI et al., 1995).

O aumento da concentração de ERO está envolvido com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (MYTHRI et al., 2011; POWELL; SEJNOWSKI; BEHRENS, 2012; SHAERZADEH et al., 2011), câncer (VALKO et al., 2004), doenças pulmonares (MACNEE, 2001), nefropatias (GALLE et al., 2006) e doenças cardiovasculares (GUZIK; GRIENDLING, 2009), como aterosclerose, cardiomiopatia, hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca e hipertensão arterial (McINTYRE; BOHR; DOMINICZAK, 1999; PHAM-HUY; HE, PHUAM-HUY, 2008).

Em mamíferos, diferentes enzimas possuem a capacidade de transferir elétrons para o oxigênio molecular e produzir ânion superóxido, como por exemplo, as ciclooxigenases (SIMMONS; BOTTING; HLA, 2004), xantina oxidases (McCord; FRIDOVICH, 1968), lipooxigenases (WITTWER; HERSBERGER, 2007), óxido nítrico sintases (NOS) (VASQUEZ-VIVAR et al., 1998), citocromo P450 redutases (ZANGAR; DAVYDOV; VERMA, 2004) e algumas enzimas da cadeia transportadora

de elétrons (BOVERIS; CADENAS, 1975). No entanto, a produção de ERO por estas enzimas ocorre como um subproduto da principal atividade catalítica ou quando as mesmas apresentam atividade alterada. As enzimas cuja atividade é a produção de ERO são as enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NAD(P)H oxidase ou NOX) (SELEMIDIS *et al.*, 2008).

As enzimas NOX foram primeiramente identificadas em células fagocíticas sendo essenciais para suas funções microbidas (IYER; ISLAM; QUASTEL, 1963; ROSSI; ZATTI, 1964). Mais tarde, as NOX foram identificadas em células não fagocíticas, como células endoteliais, do músculo liso vascular e em fibroblastos (GRIENDLING *et al.*, 1994). A família das NOX compreende um conjunto de sete isoformas ou homólogos, que se diferem pela sua expressão, estrutura e função, que são NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2 (SCHRAMM *et al.*, 2012). De maneira geral, a estrutura das NOX consiste em três componentes citosólicos (p47phox, p67phox e p40phox), dois componentes ligados à membrana citoplasmática (gp91phox e p22phox) que formam o flavocitocromo b558 e constituem o sítio catalítico da enzima e uma proteína G de baixo peso molecular (rac 1 ou rac2). Sua ativação se dá pela migração dos componentes citosólicos para a membrana (BABIOR, 2004; DRUMMOND *et al.*, 2011). As isoformas NOX1, 2, 4 e 5 são expressas em células do sistema cardiovascular, no entanto, a NOX5 é encontrada apenas nestas células em humanos e não em roedores (SIRKER; ZHANG; SHAH, 2011).

A atividade e a expressão das enzimas NOX podem ser reguladas por diferentes fatores, tais como citocinas (IL-1, TNF- $\alpha$ , BNF- $\beta$ ), hormônios (insulina), fatores de crescimento (VEGF, TGF- $\beta$ 1, EGF, IGF-1, FGF- $\beta$ ), tensão de cisalhamento, trombina, serotonina, endotelina-1, bradicinina, prostaglandina, histamina, ácidos graxos não-esterificados e lipoproteínas de baixa densidade (RAY; SHAH, 2005; RHEE *et al.*, 2003, SCHRAMM *et al.*, 2012). Além disso, a Ang II é um dos estímulos mais potentes para a modulação da expressão e atividade das NOX (GRIENDLING *et al.*, 1994; RAJAGOPALAN *et al.*, 1996).

A Ang II é um octapeptídeo vasoativo e principal efector do sistema renina angiotensina que possui um papel importante na homeostase cardiovascular, renal e endócrina, regulando a pressão arterial, a liberação de aldosterona e a reabsorção de sódio (CHUNG *et al.*, 1998; RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2001; TOUYZ; SCHFFRIN, 1999). As ações da Ang II ocorrem pela sua ligação com os receptores de

angiotensina II do tipo I (AT<sub>1</sub>) e do tipo II (AT<sub>2</sub>), que possuem afinidade de ligação similar à Ang II, mas com efeitos opostos, e estão distribuídos heterogeneamente no cérebro e em tecidos periféricos (WILLIAMS *et al.*, 2010).

O receptor AT<sub>1</sub> é um receptor com sete domínios transmembrana acoplado a proteína G, expresso no homem pelo cromossomo 3 e em roedores pelos cromossomos 2 e 17, e está amplamente distribuído nos tecidos, como vasos sanguíneos, rins, coração, cérebro e glândula adrenal. Quando ativado leva ao aumento de contratilidade cardíaca, filtração glomerular, fluxo sanguíneo renal, hipertrofia cardíaca e vascular e liberação de aldosterona. A vasoconstrição mediada por interação da Ang II com receptor AT<sub>1</sub> está associada ao aumento da produção de ânion superóxido pela ativação de NOX na parede vascular (CHUNG *et al.*, 1998; TOUYZ; SCHFFRIN, 1999).

Em contrapartida, o receptor AT<sub>2</sub>, codificado pelo cromossomo 10 em humanos e roedores, também é um receptor com sete domínios transmembrana acoplado a proteína G, e é encontrado nas glândulas adrenais, útero, ovário, cérebro e endotélio vascular. O receptor AT<sub>2</sub> está envolvido no crescimento e desenvolvimento fetal, diferenciação celular, apoptose e vasodilatação (CHUNG *et al.*, 1998; TOUYZ; SCHFFRIN, 1999; GRISHKO *et al.*, 2003).

A Ang II está envolvida na patogenia de doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, hipertrofia ventricular esquerda, alterações estruturais no rim e no coração, diabetes e insuficiência cardíaca (TAUBMAN, 2003).

Embora existam muitos tratamentos eficazes e bem aceitos para a hipertensão arterial, um grande número de pacientes é resistente às diferentes terapias farmacológicas disponíveis atualmente, o que leva à necessidade do desenvolvimento de novos tratamentos anti-hipertensivos (CARRETERO; OPARIL, 2000; WU *et al.*, 2015). Estudos tem demonstrado um ótimo efeito da apocinina como um anti-hipertensivo (VIRDIS; GESI; TADDEI, 2016; WILLIAMS; GRIENLING, 2007).

A apocinina foi isolada primeiramente, em 1883, das raízes da planta *Apocynum cannabinum* e mais tarde, em 1971, das raízes da planta *Picrorhiza kurroa*, muito utilizada na medicina tradicional asiática (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008; YU *et al.*, 2008). É uma importante substância bioativa no sistema cardiovascular, estando envolvida com efeitos anti-inflamatórios, anti-hipertensivos, prevenção da doença vascular, lesão e remodelamento cardíaco (FENG *et al.*, 2016;

LIANG *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2015; SIMONYI *et al.*, 2012; WALLACE *et al.*, 2014; YE; LOWTHER; STAMBAS, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). A apocinina é uma acetofenona, da classe do metóxi-catecóis, com leve odor de baunilha, ponto de fusão de 115 °C, peso molecular de 166,17 g/mol, baixa toxicidade (LD50: 9 g/Kg), facilmente solúvel em água quente, álcool, benzeno, clorofórmio e éter (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008; YU *et al.*, 2008).

A apocinina é utilizada como inibidor de NOX em células fagocíticas (SIMONS *et al.*, 1990; STOLK *et al.*, 1994) e células não-fagocíticas (EL-SAWALHI; AHMED, 2014; MEYER *et al.* 1999; SUZUKI *et al.*, 1992) embora seu real e completo mecanismo de ação não tenha sido completamente elucidado.

A primeira evidência de que ela poderia ser utilizada como inibidor de NOX foi demonstrada por Simons *et al.* (1989) onde a apocinina foi capaz de inibir o *burst* oxidativo estimulado por zimosano em neutrófilos. Foi sugerido que a apocinina seja uma pró-droga metabolizada pelas mieloperoxidases em seu dímero ativo, a diapocinina, que seria mais eficiente que a apocinina em inibir as NOX (JOHNSON *et al.*, 2002; XIMENES *et al.*, 2007). As mieloperoxidases não são normalmente encontradas em células vasculares, no entanto, em situações de inflamação, granulócitos podem liberar mieloperoxidases que podem ser absorvidas pelas células vasculares por meio da proteína citoqueratina 1 (ABU-SOUD; HAZEN, 2000; ASTERN *et al.*, 2007). Stolk *et al.* (1994) sugeriram que a apocinina inibe a NOX por prevenir a fosforilação e translocação do componente citosólico p47phox para a membrana em neutrófilos. Heumüller *et al.* (2008) demonstraram em células HEK293 que expressavam NOX1, 2 ou 4, que as mieloperoxidases foram capazes de reduzir a produção de ânion superóxido, e que, em células endoteliais ou do músculo liso vascular tratadas com apocinina também houve redução da produção de ânion superóxido sem alteração na atividade das NOX, sugerindo que apocinina atuaria como um antioxidante. Schlüter *et al.* (2008) sugeriram que os efeitos da apocinina estariam relacionados não com a inibição de NOX, mas sim, com a inibição da enzima Rho quinase.

Em diferentes modelos experimentais de hipertensão arterial, o tratamento com apocinina por diferentes vias de administração apresentou efeitos cardiovasculares benéficos. Viridis *et al.* (2004) mostraram que a apocinina foi eficaz em prevenir o aumento da pressão arterial em camundongos com hipertensão induzida por Ang II. A apocinina foi capaz de prevenir as elevações de marcadores

de estresse oxidativo e de produção de ânion superóxido, mas não teve efeito sobre a pressão arterial em modelo de hipertensão induzida pela endotelina-1 e sódio (ELMARAQBY *et al.*, 2005). Em ratos com hipertensão induzida por mineralocorticoides (BESWICK *et al.*, 2001), glicocorticoides (PARK *et al.*, 2004), frutose (UNGER; PATIL, 2009) e dexametasona (HU *et al.*, 2006) a apocinina reduz a pressão arterial e a produção vascular de ânion superóxido. Costa *et al.* (2009) mostraram que em ratos hipertensos renais dois-rins-um-clipe (2R-1C), a apocinina previne o aumento do estresse oxidativo e desenvolvimento da hipertensão arterial.

Nosso laboratório recentemente investigou o impacto do tratamento crônico com apocinina sobre a pressão arterial, o endotélio vascular e a biodisponibilidade de NO em SHR. Os resultados mostraram que o tratamento com apocinina reduz a pressão arterial, previne o desenvolvimento da disfunção endotelial, normaliza os níveis sistêmicos e intracelulares de ERO, aumenta as concentrações intracelulares de NO e cálcio e a expressão proteica da eNOS, melhorando a função endotelial por um mecanismo associado, além da redução de ERO, ao aumento da biodisponibilidade de NO (PERASSA *et al.*, 2016).

Resultados de nosso laboratório (PERASSA, 2013) mostraram que SHR apresentam maiores efeitos pressores, dose-dependentes, à infusão com Ang II (2,5 ng/ kg:  $17,5 \pm 0,6$  %; 10 ng/ kg:  $29,2 \pm 0,8$  %,  $\Delta$ PAM, n = 5) em relação aos observado em ratos normotensos Wistar (2,5 ng/ kg:  $11,7 \pm 0,5$ ; 10 ng/ kg:  $22,1 \pm 0,6$  %,  $\Delta$ PAM, n = 5) e que estas respostas aumentadas em animais hipertensos foram revertidas em SHR tratados cronicamente com apocinina (2,5 ng/ kg:  $12,8 \pm 0,4$ ; 10 ng/ kg:  $21,3 \pm 0,3$  %  $\Delta$ PAM, n = 5), como pode ser observado na Figura 1.

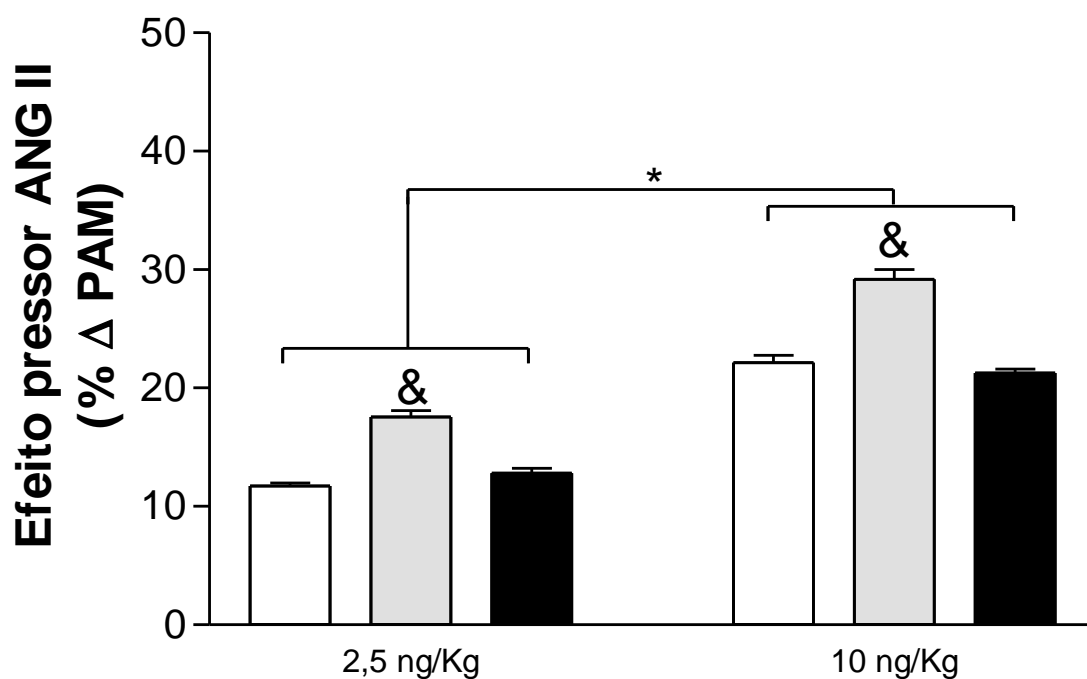


Figura 1 – Variação da Pressão Arterial Média (% ΔPAM) em ratos Wistar (barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR tratados com apocinina (barras pretas) após a administração *in bolus* de Angiotensina II (ANG II) nas doses de 2,5 e 10 ng/kg. \* $p < 0,05$  entre as 2 doses testadas de ANG II; & $p < 0,05$  entre SHR e outros grupos. (PERASSA, 2013 – retirado e adaptado com permissão).

Estes resultados nos levaram a investigar os mecanismos envolvidos no efeito da apocinina sobre as respostas vasoconstritoras estimuladas por Ang II em ratos espontaneamente hipertensos.



**HIPÓTESE**

## **2 HIPÓTESE**

Considerando que a apocinina é capaz de reduzir o efeito pressor da Ang II em SHR e que a Ang II é o principal estímulo para ativação das NOX, formulamos a hipótese de que o tratamento crônico com apocinina seria capaz de reduzir o efeito da Ang II em vasos sanguíneos de SHR.

# **OBJETIVOS**

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos plasmáticos e vasculares do tratamento crônico com apocinina que estariam envolvidos na menor resposta pressora a Ang II observada em SHR tratados.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Foram objetivos específicos deste trabalho:

- 1) Determinar se a capacidade antioxidante da apocinina em solução é mantida durante o tratamento dos animais.
- 2) Determinar se o tratamento crônico com apocinina altera a capacidade antioxidante plasmática de SHR.
- 3) Avaliar se o tratamento crônico com apocinina é capaz de alterar a expressão das isoformas e subunidades das enzimas NOX em SHR.
- 4) Verificar se o tratamento crônico com apocinina altera a expressão dos receptores de Ang II em vasos sanguíneos de SHR.
- 5) Verificar se o tratamento crônico com apocinina altera a geração de ânion superóxido em aortas de SHR.
- 6) Avaliar se os níveis de nitrato/ nitrito podem ser alterados pelo tratamento crônico com apocinina em aortas de SHR.
- 7) Analisar se o tratamento crônico com apocinina altera o papel modulador do endotélio e/ou da eNOS no efeito da Ang II em vasos de resistência e de condutância de SHR.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos e experimentos desenvolvidos neste estudo foram previamente aprovados pela Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, UNESP (Processo CEUA FOA 2015-00450).

### 4.1 Animais

A linhagem de SHR é mantida pelo Laboratório de Farmacologia no biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Estes animais foram obtidos através do endocruzamento entre ratos SHR machos e fêmeas que apresentaram pressão arterial sistólica maior ou igual a 150 mmHg, determinada pela técnica de pletismografia de cauda utilizando um pletismógrafo (PowerLab, ADInstruments, Melbourne, Austrália) para medida em ratos.

Os ratos Wistar, utilizados como controle normotenso, foram fornecidos pelo Biotério Central da mesma instituição.

Todos os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 – 24 °C), com ciclo de luz (12h/ luz e 12h/ escuro) e receberam água e ração *ad libitum*.

### 4.2 Tratamento

Os animais foram divididos em três grupos: Wistar (n = 20), SHR (n = 20) e SHR Tratado (n = 20). O grupo SHR Tratado recebeu apocinina (30 mg/Kg, v.o.) diluída na água de beber e os grupos não tratados beberam água sem apocinina. Todos os animais foram pesados a cada quatro dias, da 4<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> semana de vida, para ajuste da dose.

A dose de apocinina (30 mg/Kg) foi escolhida com base em estudos que observaram os efeitos pressores da apocinina, sem toxicidade aos animais tratados (BAUMER *et al.*, 2007; HAYASHI *et al.*, 2005; OELZE *et al.*, 2011; PECHANOVÁ; JENDEKOVÁ; VRANKOVÁ, 2009; PERASSA *et al.*, 2016). Ratos Wistar tratados

com apocinina não foram incluídos neste estudo uma vez que, como observado por nosso grupo (PERASSA *et al.*, 2016) e por outros autores (PALIEGE *et al.*, 2006), a apocinina não foi capaz de alterar a pressão arterial destes animais. Ao final da 10ª semana de vida, os animais foram utilizados nos experimentos descritos a seguir.

### **4.3 Determinação da capacidade antioxidante da apocinina em solução**

Inicialmente avaliamos se a capacidade antioxidante da solução de apocinina era mantida até 4 dias após seu preparo. A solução de apocinina na concentração de 0,3 mg/mL foi utilizada para tratamento dos SHR. Um volume específico de solução de apocinina, que seria utilizado para tratamento dos ratos, era preparado a cada 4 dias (tempo no qual a solução de apocinina permanecia disponível para os animais beberem até a substituição por uma nova solução).

A capacidade antioxidante da apocinina em solução foi determinada pelo método de FRAP (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Power assay*), descrito por Benzie e Strain (1996). Este método é baseado na capacidade de redução do complexo férrico tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) em  $\text{Fe}^{2+}$  por agentes redutores em meio ácido.

Durante quatro dias consecutivos uma alíquota de 1 mL desta solução de apocinina foi coletada, armazenada em microtubo plástico, congelado em nitrogênio líquido e mantido em freezer – 80 °C até a realização dos experimentos. Quinze microlitros (15  $\mu\text{L}$ ) de cada amostra, em duplicata, foi incluída ao meio de reação (reagente FRAP), contendo tampão acetato 300 mmol/L (pH 3,6), TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine) 10 mmol/L em HCl e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mmol/L (10:1:1, respectivamente). Após um período de 30 minutos de incubação a 37 °C no escuro, a absorbância foi estimada em 595 nm em leitora de placa (Biotek, Winooski, EUA). Os resultados foram expressos em mmol/ $\text{FeSO}_4$ , utilizando uma curva padrão de  $\text{FeSO}_4$ .

#### **4.4 Determinação da capacidade antioxidante plasmática dos animais**

Realizamos este experimento para avaliar se o tratamento crônico com apocinina, alteraria a capacidade antioxidante total sistêmica de SHR tratados.

Os animais foram anestesiados em câmara saturada de halotano e mortos por decapitação. O sangue de cada animal foi coletado em tubos de vidro contendo heparina e centrifugados (5810R, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a 3000 rpm, 4 °C por 15 minutos. O plasma foi removido por aspiração, separado em alíquotas identificadas, congelado em nitrogênio líquido e mantido em freezer – 80 °C até a realização dos experimentos. Utilizamos o método de FRAP, previamente descrito acima. Quinze  $\mu\text{L}$  (15  $\mu\text{L}$ ) de cada amostra, em duplicata, foram adicionadas ao meio de reação, incubados (30 minutos a 37 °C no escuro) e a absorbância foi estimada em 595 nm, em leitora de placas (Bio-Rad iMark, Bio-rad, Hercules, EUA). Os resultados foram expressos em  $\text{mmol}/\text{FeSO}_4$ , utilizando uma curva padrão de  $\text{FeSO}_4$ .

Para os experimentos de avaliação da capacidade antioxidante foram analisados os valores médios das amostras em duplicata e expressos média  $\pm$  EPM e comparados entre os grupos experimentais.

#### **4.5 Avaliação da expressão proteica das isoformas NOX, 1, 2 e 4, suas subunidades, NOXO1 e p47phox e dos receptores de Ang II, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, em homogenatos de aorta ou artéria mesentérica**

Realizamos estes experimentos para avaliar se o tratamento crônico com apocinina, alteraria a expressão das proteínas que estariam diretamente envolvidas com o efeito vasoconstritor da Ang II em SHR tratados.

Segmentos da aorta torácica e da artéria mesentérica foram removidos, dissecados de gordura perivascular, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer – 80 °C, separadamente, até o momento dos experimentos.



Os tecidos foram triturados em nitrogênio líquido e homogeneizados separadamente em tampão RIPA (Tris-base 65,2 mmol/L, NaCl 154 mmol/L, NP-40 1 %, deoxicolato de sódio 0,25 % e EDTA 0,8 mmol/L) suplementado com coquetel de inibidores de protease (Protease Inhibitor Mix, GE Healthcare, Little Chalfont, BKM, Reino Unido) com auxílio de um sonicador (Sonics Vibra Cell, Newtown, EUA). Os homogenatos foram centrifugados (10000 rpm a 4 °C por 20 minutos) e o sobrenadante foi coletado. A dosagem de proteínas no sobrenadante foi realizada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando como padrão a albumina bovina. Cem microgramas (100 µg) de proteínas totais foram misturadas com tampão de amostra Laemmli contendo mercaptoetanol e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % e depois, transferidas para membrana de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por uma hora com leite desnatado 5% em tampão tris-salina com Tween 20 (TBS-T) em temperatura ambiente. As membranas foram então incubadas por 12 horas a 4 °C com os anticorpos primários (Tabela 1). Após, as membranas foram lavadas com TBS-T, 3 vezes por 30 minutos, e incubadas com os anticorpos secundários correspondentes (Tabela 1) por 1 hora em temperatura ambiente. As membranas foram então incubadas com substrato para peroxidase quimioluminescente (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Little Chalfont, BKM, Reino Unido) e expostas a um filme radiográfico para a detecção das bandas. A expressão da  $\beta$ -actina foi utilizada para normalização dos resultados. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica com o *software* Image J. Os resultados foram comparados entre os grupos.

**Tabela 1 – Diluições dos anticorpos primários e secundários utilizados nos experimentos de Western Blotting.**

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Diluição (leite 5 %)</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Anticorpo secundário</b>	<b>Diluição (leite 1 %)</b>	<b>Fabricante</b>
Anti-NOX1	1:250	sc5821, Santa Cruz	Anti-cabra	1:1000	sc2004, Santa Cruz
Anti-NOXO1	1:500	sc92094, Santa Cruz	Anti-coelho	1:1000	sc2768, Santa Cruz
Anti-NOX2	1:250	sc5827, Santa Cruz	Anti- cabra	1:1000	sc2004, Santa Cruz
Anti-p47phox	1:500	sc14015, Santa Cruz	Anti- coelho	1:1000	sc2768, Santa Cruz
Anti-NOX4	1:2000	sc30141, Santa Cruz	Anti- coelho	1:1000	sc2768, Santa Cruz
Anti-AT <sub>1</sub>	1:250	sc1173, Santa Cruz	Anti- cabra	1:1000	sc2004, Santa Cruz
Anti-AT <sub>2</sub>	1:250	sc9040, Santa Cruz	Anti- coelho	1:1000	sc2768, Santa Cruz
Anti- $\beta$ -actina	1:16000	A5441, Sigma	Anti- camundongo	1:16000	sc2005, Santa Cruz

#### **4.6 Determinação da produção de ânion superóxido em aortas**

Realizamos estes experimentos para avaliar se o tratamento crônico com apocinina inibiria a atividade NOX em aortas de SHR tratados.

Para quantificar a produção de ânion superóxido dependente de NOX foi realizada a técnica de quimioluminescência da lucigenina (GYLLENHAMMAR, 1987; YOGI *et al.*, 2008).

A artéria aorta foi removida dos animais e dissecada em solução de Krebs-Henseleit 4 °C, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer – 80 °C até o experimento. Então, foram preparados homogenatos de aorta (10 % peso/volume) em tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20,0 mmol/L, EGTA 1,0 mmol/L, inibidor de protease, pH 7,4). A reação foi iniciada pela adição de NAD(P)H (0,1 mmol/L) na suspensão de volume final de 250  $\mu$ L, contendo 50  $\mu$ L de amostra, lucigenina 5  $\mu$ mol/L, e tampão de reação (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, sacarose 150 mmol/L, pH 7,4). A quimioluminescência foi medida em um luminômetro (Berthold detection systems, Pforzheim, Alemanha). A produção de ânion superóxido foi expressa em

unidades relativas de luz (URL)/ mg de proteína e normalizada pela concentração de proteínas, previamente determinada com reagente de ensaio para proteínas (Bio-rad Laboratories).

Na análise dos resultados dos experimentos de quimioluminescência da lucigenina, os valores obtidos da leitura em placas de 96 poços lidas em luminômetro foram expressos como média  $\pm$  EPM e comparados entre os grupos.

#### **4.7 Avaliação dos níveis de nitrato/ nitrito em homogenatos de aorta**

Realizamos estes experimentos para avaliar se a atividade de NOS em aortas seria alterada pelo tratamento crônico com apocinina. A atividade das NOS pode ser determinada, entre outros métodos, pela quantidade de nitrato/ nitrito nos tecidos vasculares, uma vez que o NO, produto da reação enzimática, por ser altamente instável, é metabolizado nestes subprodutos (LAUER *et al.*, 2001).

A artéria aorta foi removida dos animais e dissecada em solução de Krebs-Henseleit 4 °C, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer – 80 °C até a realização dos experimentos. As aortas foram homogeneizadas em tampão fosfato salina (200  $\mu$ L, 1,0  $\mu$ mol/L, pH 7,4) e centrifugadas (10000 g, 20 minutos, 24 °C). O sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente (14000 g, 30 minutos, 24 °C). Os níveis de nitrato/nitrito foram determinados utilizando kit colorimétrico e os resultados foram normalizados pela concentração de proteínas, determinada método de Bradford (1976). Os valores foram expressos em nmol/mg de proteína.

Na análise dos resultados dos experimentos de avaliação dos níveis de nitrato/ nitrito, os valores obtidos da leitura em placas de 96 poços lidas em leitora de placas (Bio-rad), foram expressos como média  $\pm$  EPM e comparados entre os grupos.

## 4.8 Reatividade vascular

### 4.8.1 Reatividade em artéria mesentérica

Realizamos estes experimentos para avaliar se o tratamento crônico com apocinina alteraria a contração vascular de artérias de resistência à Ang II e a modulação endotelial sobre esta contração.

O leito mesentérico foi removido dos animais e disposto com auxílio de agulhas em uma placa de Petri adaptada contendo solução de Krebs-Henseleit (composição em mmol/L: NaCl 118,0; KCl 5,9; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; CaCl<sub>2</sub> 2,5; MgSO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 24,9; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11,0; pH 7,4) 4 °C, onde foram isoladas as artérias mesentéricas. Após a remoção do tecido adiposo perivascular, foram cortados anéis de dois mm dos 2<sup>o</sup> e/ou 3<sup>o</sup> ramos da artéria mesentérica com auxílio de um estereomicroscópio (Labomed, Los Angeles, EUA).

Um fio de tungstênio de 40 µm de diâmetro foi transpassado no lúmen dos anéis e suas extremidades foram conectadas a dois parafusos do mesmo lado da câmara do miógrafo (Danish Myo Technology, Aarhus, Dinamarca). Um segundo fio de tungstênio de mesmo diâmetro também foi transpassado na mesma artéria e suas extremidades foram presas em dois novos parafusos do lado oposto da mesma câmara. O miógrafo foi conectado a um sistema de aquisição de dados (ADInstruments, Melbourne, Austrália) e a um computador para registro das variações de tensão isométricas obtidas. Nas câmaras, as artérias foram mantidas em solução de Krebs-Henseleit, 37 °C, pH 7,4 e suprimento gasoso de 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>.

Após um período de 20 minutos para estabilização das preparações, as artérias foram estiradas pouco a pouco até atingirem uma tensão de repouso ótima em relação ao seu diâmetro interno, através do cálculo da relação tensão/diâmetro obtida pela circunferência interna correspondente à pressão transmural de 100mmHg para um vaso relaxado *in situ* (IC<sub>100</sub>), com auxílio do *software* específico (DMT Normalization Module, ADInstruments). As artérias foram mantidas com uma circunferência interna IC<sub>1</sub>, calculada  $IC_1 = 0.90 \times IC_{100}$ , na qual o desenvolvimento de força é máximo, conforme descrito por Mulvany e Hapern (1977). O diâmetro luminal efetivo foi determinado de acordo com a equação  $l_1 = IC_1/\pi$ , e este valor

variou de 200 a 300  $\mu\text{m}$  nos vasos utilizados. Os anéis foram mantidos em tensão basal por 30 minutos em solução de Krebs-Henseleit, trocada a cada 10 minutos. Após a normalização, foi testada a integridade funcional das preparações. Para isto, elas foram estimuladas com solução de alta concentração de potássio (KCl 120 mmol/L) por 10 minutos. Foram consideradas viáveis as preparações que atingiram contração  $\geq 6$  mN. Alguns anéis tiveram o endotélio preservado (E+) e outros tiveram o endotélio removido (E-) mecanicamente. A presença do endotélio foi confirmada pelo relaxamento  $\geq 70$  % à acetilcolina (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e a ausência do endotélio foi confirmada pela ausência de relaxamento também estimulado pela acetilcolina, ambas após contração induzida por fenilefrina (1  $\mu\text{mol/L}$ ).

Após a lavagem das preparações, foram realizadas curvas cumulativas de concentração-efeito para Ang II (0,1 nmol/L – 0,1  $\mu\text{mol/L}$ ) em anéis E+, E- e E+ incubados por 30 minutos com L-NAME (100  $\mu\text{mol/L}$ ).

Na análise dos resultados obtidos nos experimentos de reatividade vascular, foram considerados os parâmetros farmacológicos de potência ( $pD_2 = -\log EC_{50}$ ) e eficácia ( $E_{\text{max}}$ ). Os resultados de tensão isométrica foram expressos como média  $\pm$  EPM. Os valores da concentração que produz 50 % da resposta máxima ( $EC_{50}$ ) foram calculados por regressão não linear dos mínimos quadrados, utilizando um software estatístico (Graph Pad Prism, versão 3.0).

#### **4.8.2 Reatividade em artéria aorta**

Realizamos estes experimentos para avaliar se o tratamento crônico com apocinina alteraria a contração vascular de artérias de condutância à Ang II e a modulação endotelial sobre esta contração.

Após anestesia com halotano em câmara saturada e decapitação dos animais, a artéria aorta foi dissecada e cortada em anéis de 4 mm em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Os anéis foram então posicionados entre dois ganchos de aço inoxidável conectados a um transdutor de força isométrica (Leticia Scientific Instruments, Barcelona, Spain) em uma câmara contendo solução de Krebs-Henseleit, 37  $^{\circ}\text{C}$ , pH 7,4 e suprimento gasoso de 95 % de  $\text{O}_2$  e 5 % de  $\text{CO}_2$ . Os anéis foram mantidos por um período de 1 h em tensão de repouso constante de 2 g para estabilização. Após, os anéis foram estimulados com

solução contendo alta concentração de potássio (KCl 120 mmol/L) por 15 minutos para testar a integridade funcional, e então foram lavadas com solução de Krebs até a reestabilização. Foram considerados viáveis aqueles anéis que atingiram contração  $\geq 1$  g. Alguns anéis tiveram o endotélio preservado e outros tiveram o endotélio removido mecanicamente. Para testar a integridade do endotélio, os anéis foram contraídos com fenilefrina 1  $\mu\text{mol/L}$  e relaxados com acetilcolina 0,1  $\mu\text{mol/L}$ . Anéis que apresentaram relaxamento à acetilcolina  $\geq 70$  % foram considerados com endotélio (E+) e anéis com relaxamento à acetilcolina  $\leq 10$  % foram considerados sem endotélio (E-).

Após a lavagem das preparações, foram realizadas curvas cumulativas de concentração-efeito para Ang II (0,1 nmol/L – 0,1  $\mu\text{mol/L}$ ) em anéis E+, E- e E+ incubados por 30 minutos com L-NAME (100  $\mu\text{mol/L}$ ), um inibidor inespecífico de isoformas NOS.

Na análise dos resultados obtidos nos experimentos de reatividade vascular, foram considerados os parâmetros farmacológicos de potência ( $pD_2 = -\log EC_{50}$ ) e eficácia ( $E_{max}$ ). Os resultados de tensão isométrica foram expressos como média  $\pm$  EPM. Os valores da concentração que produz 50 % da resposta máxima ( $EC_{50}$ ) foram calculados por regressão não linear dos mínimos quadrados, utilizando um software estatístico (Graph Pad Prism, versão 3.0).

## 4.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) dos valores obtidos e foram comparados pelos testes estatísticos, *t* de Student ou de variância (One-way ANOVA) seguido de pós-teste Tukey, utilizando o *software* GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, La Jolla, EUA). Foi adotado o nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ) para considerar as diferenças estaticamente significativas.

## 4.10 Sais, Drogas e Reagentes

Neste estudo foram utilizados os seguintes materiais de consumo:

**Sais:**

Os sais acetato de sódio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), cloreto de ferro III ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de ferro ( $\text{FeSO}_4$ ), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ ), fosfato de potássio monohidratado ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), ácido trietilenoglicoldiamino tetra-acético (EGTA,  $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$ ), sacarose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) e cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) foram adquiridos da Dinâmica (Diadema, Brasil). O TPTZ (2,4,6-tripiryridyl-s-triazine), Tris-base ( $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ), deoxicolato de sódio e NAD(P)H foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). A albumina bovina foi adquirida da Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA).

**Drogas:**

Apocinina (4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon), fenilefrina (L-phenylephrine hydrochloride), acetilcolina (acetylcholine chloride), Ang II e L-NAME ( $\text{N}_\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) foram obtidas da Sigma-Aldrich (EUA). A lucigenina (bis-N-methylacridinium nitrate) foi adquirida da Thermo Fisher Scientific (EUA).

**Líquidos:**

NP-40 (Nonidet P 40 Substitute), Tween-20, Laemmli (tampão de amostra concentrado) e mercaptoetanol foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA).

**Anticorpos**

Os anticorpos, primários e secundários, utilizados nos experimentos de Western Blotting foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA) ou Santa Cruz (EUA), conforme descrito na Tabela 1.

**Kits comerciais**

O kit para avaliar os níveis de nitrato/nitrito (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit) foi adquirido da Cayman Chemical (Ann Arbor, EUA). O kit peroxidase quimioluminescente (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) e o inibidor de proteases (Protease Inhibitor Mix) foram obtidos da GE Healthcare (Little

Chalfont, Reino Unido). Bradford protein assay (ensaio colorimétrico para quantificação de proteínas) foi adquirido da Bio-rad Laboratories (Hercules, EUA).



# **RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 A capacidade antioxidante da solução de apocinina é mantida durante o tratamento

A capacidade antioxidante da solução de apocinina, utilizada para tratamentos dos animais, permanece estável durante quatro dias (dia 0 ao dia 3), até que uma nova solução seja preparada, para ajuste da dose em função do ganho de peso dos animais (Tabela 2).

**Tabela 2 – Capacidade antioxidante da solução de apocinina (0,3 mg/L), determinada nos dias zero ao terceiro dia após o preparo, pelo método de FRAP e expressa em mmol/L de FeSO<sub>4</sub>. Valores representam a média ± EPM, n = 2, dos valores obtidos da avaliação em duplicata.**

Dias	0	1	2	3
Capacidade antioxidante (mmol/L FeSO <sub>4</sub> )	2,36 ± 0,05	2,28 ± 0,09	2,34 ± 0,07	2,48 ± 0,03

## 5.2 A apocinina aumenta a capacidade antioxidante plasmática em SHR

Inicialmente comparamos a capacidade antioxidante plasmática de ratos normotensos Wistar a de SHR. Observamos que não houve diferença entre os valores obtidos no plasma de SHR ( $0,74 \pm 0,06$  mmol/L FeSO<sub>4</sub>, n = 5) e Wistar ( $0,71 \pm 0,02$  mmol/L FeSO<sub>4</sub>, n = 5) (Figura 2). No entanto, observamos que em SHR tratados com apocinina, a capacidade antioxidante plasmática ( $0,85 \pm 0,07$  mmol/L FeSO<sub>4</sub>, n = 5) foi aumentada se comparada ao plasma de SHR não tratados ou de ratos Wistar (Figura 2). Estes resultados mostraram que o tratamento crônico com apocinina promove efeitos sistêmicos e é eficaz em aumentar a capacidade antioxidante plasmática em SHR.

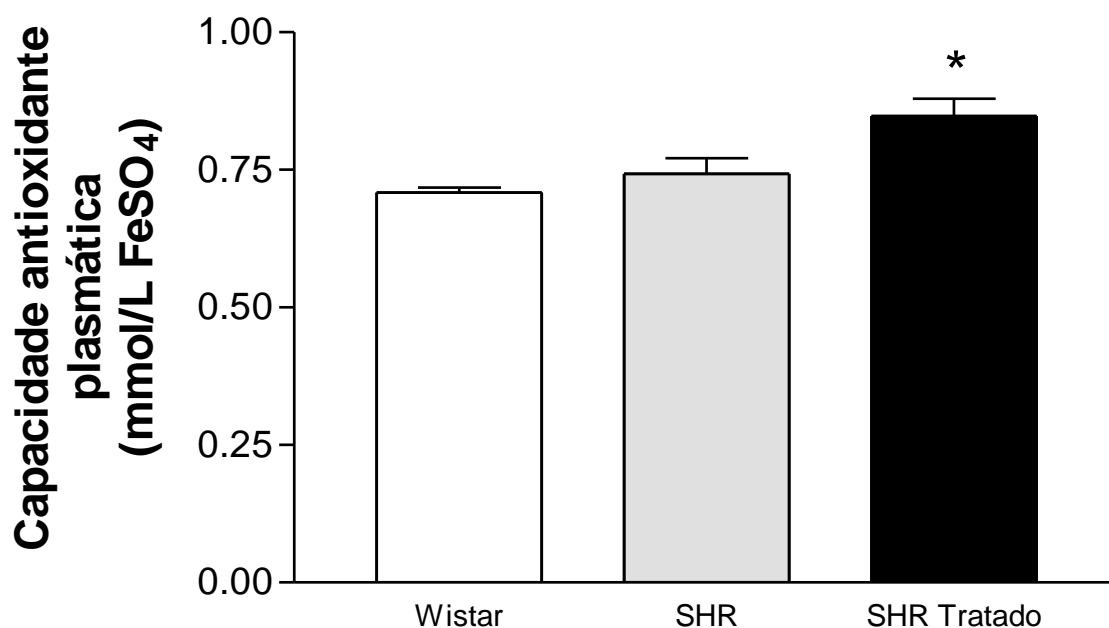


Figura 2 – Capacidade antioxidante plasmática, em mmol/L de FeSO<sub>4</sub>, de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina, determinada pelo método de FRAP. Valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados, n = 5. \*p<0,05 entre SHR tratado *versus* outros grupos.

Na etapa seguinte, fomos avaliar se o tratamento crônico com apocinina promoveria alterações importantes em tecidos vasculares de SHR tratados. Avaliamos possíveis alterações na expressão das isoformas NOX1, NOX2, NOX4, e da subunidade regulatória de NOX1, a NOXO1, e da NOX2, p47phox, dos receptores de Ang II, AT1 e AT2, a produção de ânion superóxido dependente da atividade NOX e a produção de nitrato/ nitrito.

### **5.3 O tratamento crônico com apocinina não altera a expressão de NOX1 e sua subunidade NOXO1**

Em nossos resultados, observamos que a expressão da isoforma NOX 1 não estava alterada entre os grupos estudados (Wistar:  $0,26 \pm 0,03$  UA; SHR:  $0,26 \pm 0,02$  UA; SHR tratado:  $0,26 \pm 0,02$  UA; n =5) (Figuras 3A e B). A expressão da subunidade regulatória NOXO1 também não estava alterada entre os grupos (Wistar:  $0,33 \pm 0,04$  UA; SHR:  $0,33 \pm 0,11$  UA; SHR tratado:  $0,26 \pm 0,05$  UA; n =5) (Figuras 3A e C).

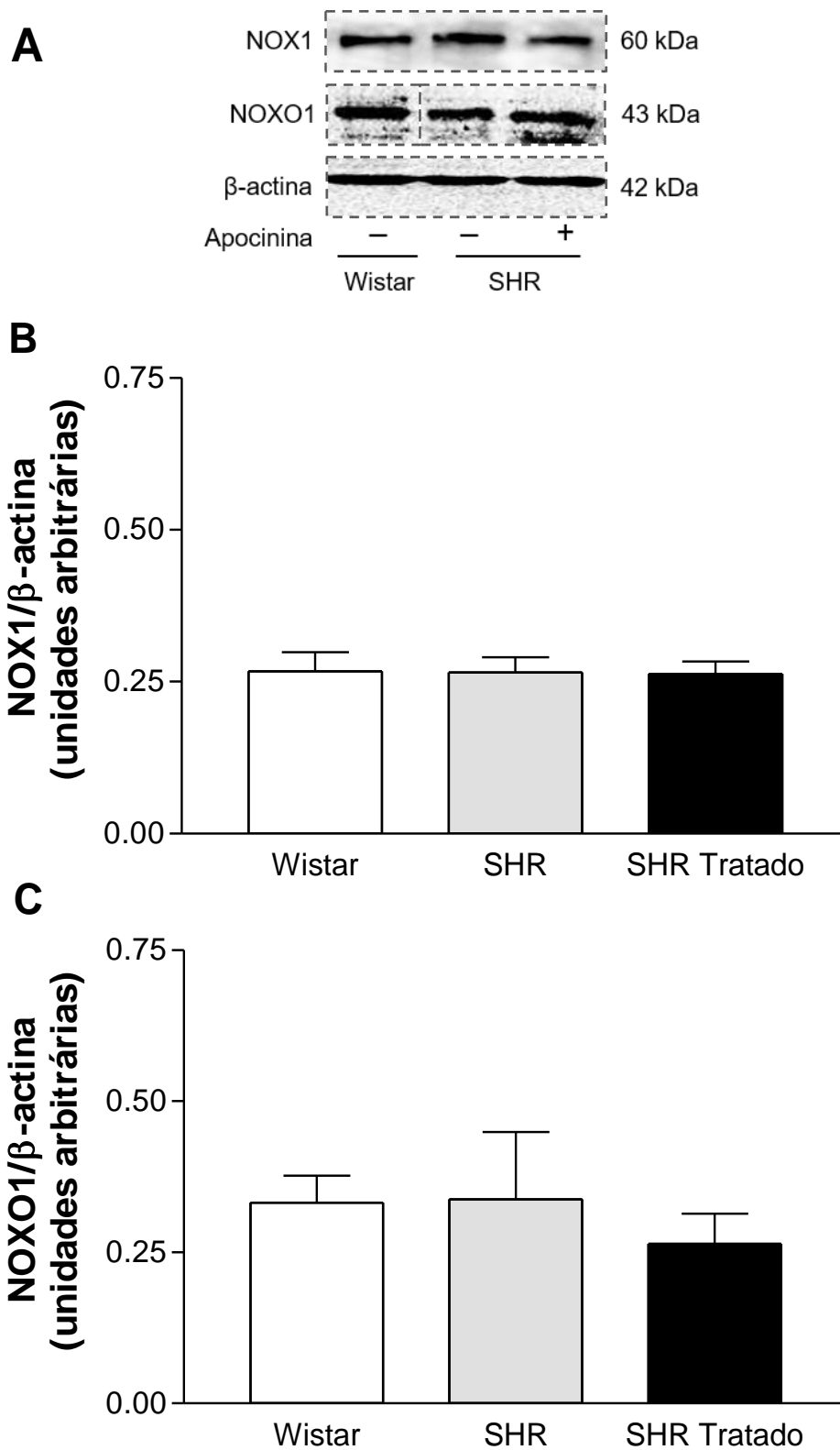


Figura 3 – Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica da isoforma NOX1 (B) e de sua subunidade NOXO1 (C), em unidades arbitrárias, em homogenatos de aortas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina. Valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados, n = 5.

#### **5.4 A expressão aumentada de NOX2 e p47phox em aortas de SHR é reduzida pela apocinina**

Ratos SHR apresentam uma maior expressão de NOX2 e de sua subunidade regulatória p47phox que ratos Wistar. Observamos que homogenatos de aorta de SHR apresentam uma expressão proteica de NOX2 ( $0,26 \pm 0,03$  UA,  $n = 5$ ) e sua subunidade p47phox ( $0,98 \pm 0,11$  UA,  $n = 5$ ) maior que ratos normotensos Wistar (NOX2:  $0,19 \pm 0,05$  UA; p47phox:  $0,74 \pm 0,14$  UA,  $n = 5$ ). Interessantemente, observamos que o tratamento crônico com apocinina foi capaz de reduzir significativamente a expressão destas proteínas (NOX2:  $0,16 \pm 0,04$  UA; p47phox:  $0,70 \pm 0,12$  UA,  $n = 5$ ) em aortas de SHR (Figuras 4A, B e C).

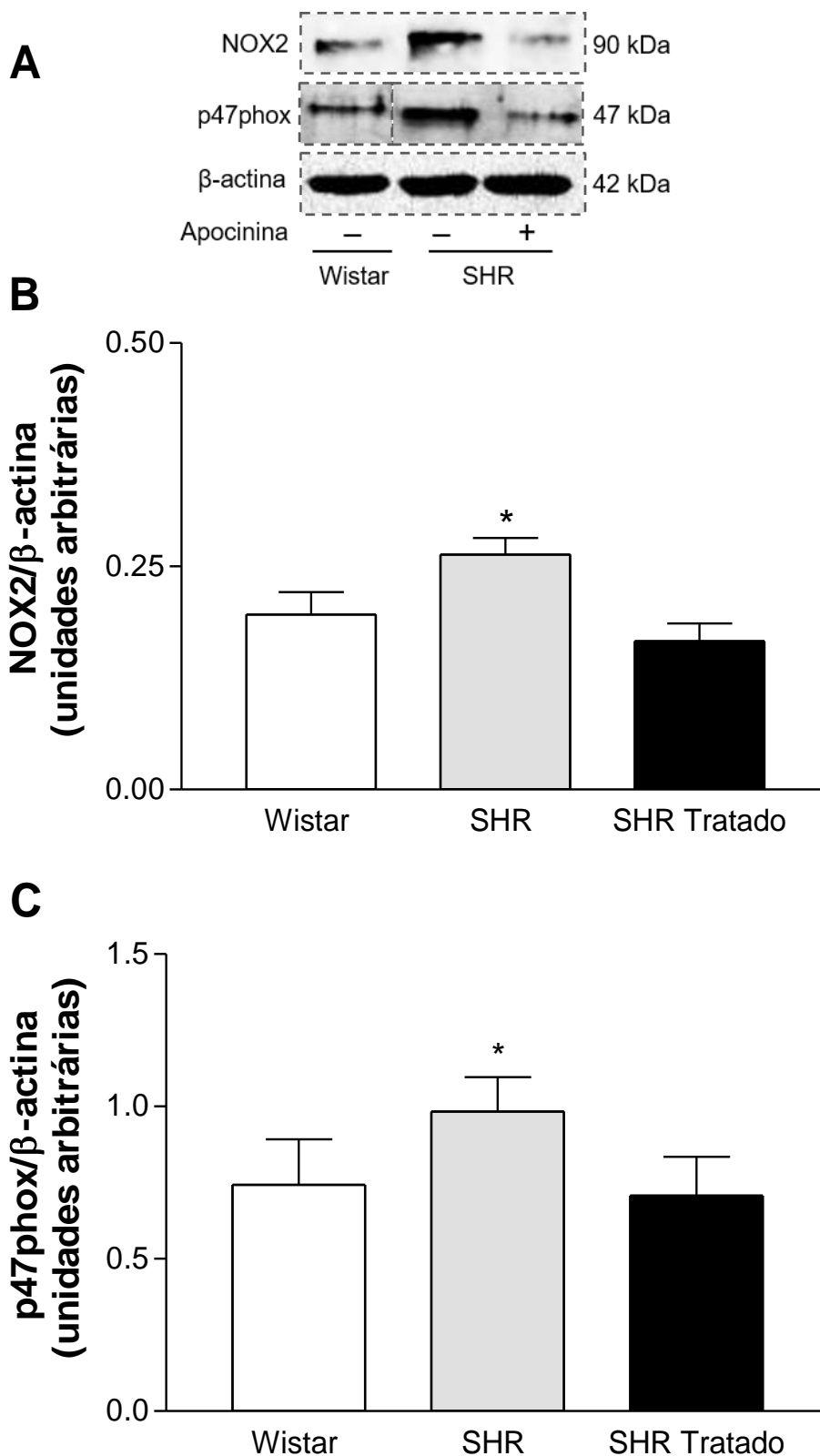


Figura 4 – Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica da isoforma NOX2 (B) e de sua subunidade p47phox (C), em unidades arbitrárias, em homogenatos de aortas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina. Valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados,  $n = 5$ . \* $p < 0,05$  entre SHR versus outros grupos.

## 5.5 O tratamento com apocinina não altera a expressão da NOX4 em aortas de SHR

Observamos que em homogenatos de aorta de ratos SHR a expressão de NOX4 ( $1,37 \pm 0,07$  UA,  $n = 5$ ), não está alterada se comparada a aortas de ratos normotensos Wistar ( $1,12 \pm 0,03$  UA,  $n = 5$ ) e que o tratamento crônico com apocinina não foi capaz de alterar a expressão desta isoforma em aortas de SHR ( $1,20 \pm 0,07$  UA,  $n = 5$ ) (Figuras 5A e B).

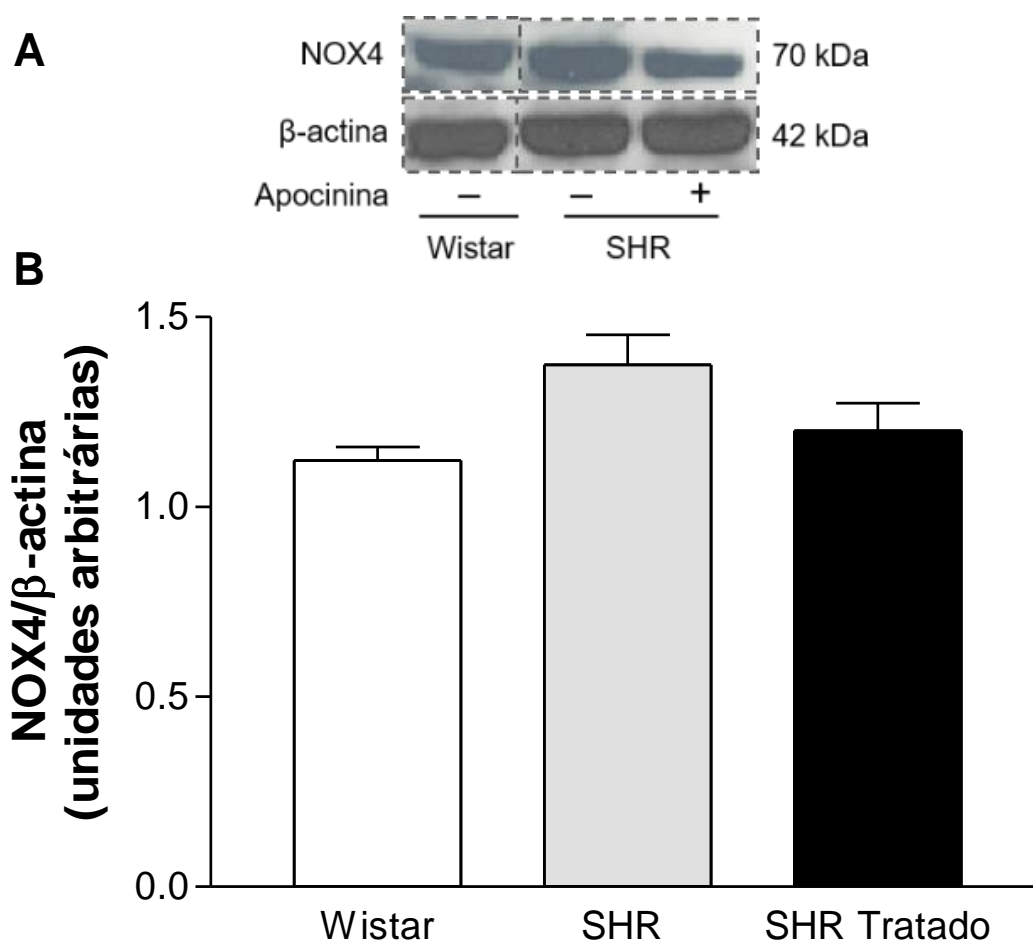
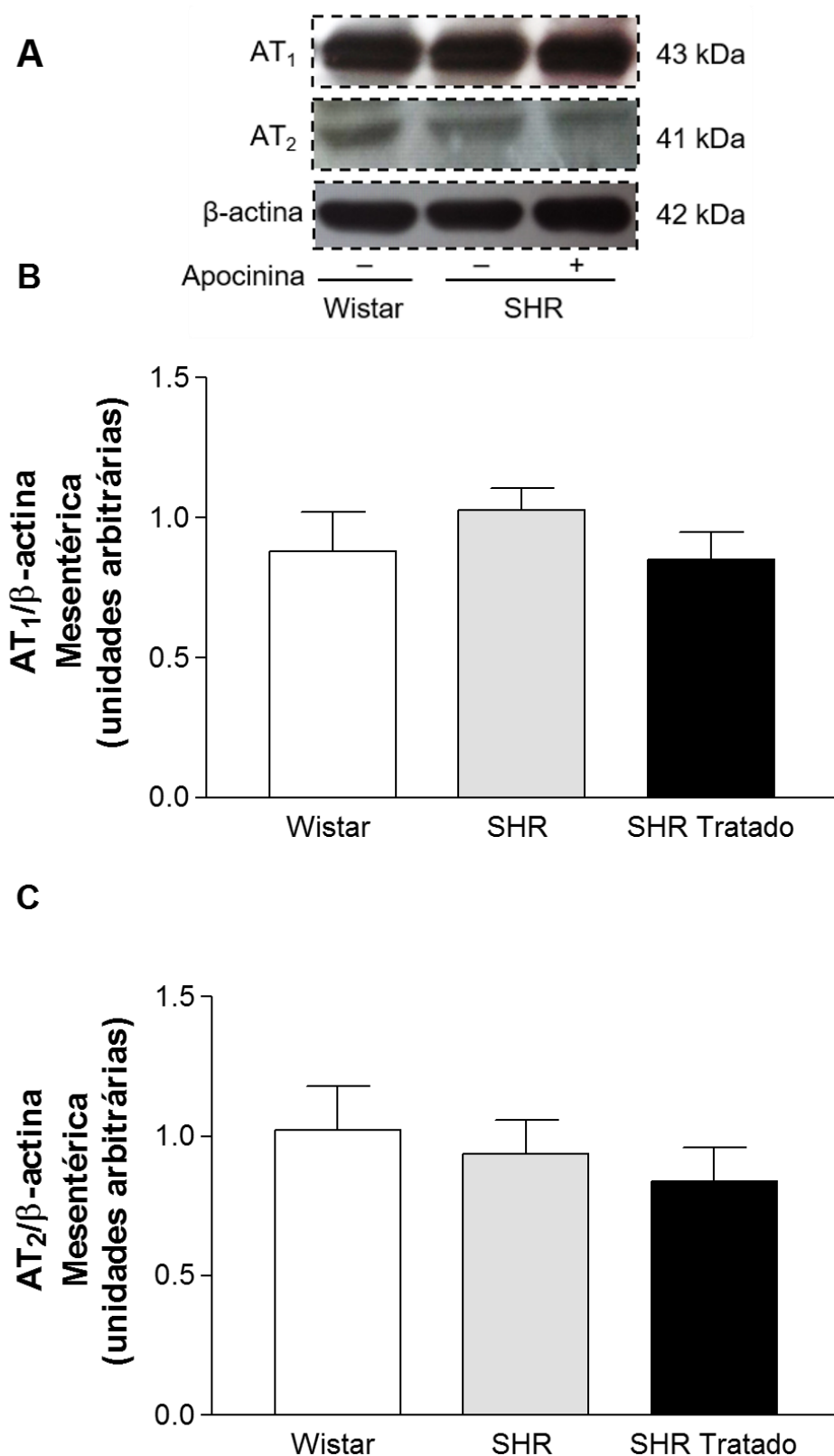


Figura 5 – Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica da isoforma NOX4 (B), em unidades arbitrárias, em homogenatos de aortas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina. Valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados,  $n = 5$ .



## **5.6 A expressão de receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> não está alterada em leito mesentérico de SHR**

A expressão dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> foi evidenciada em homogenatos de leito mesentéricos de ratos normotensos e hipertensos. Não houve diferença de expressão destas proteínas entre os grupos. Observamos ainda que o tratamento com apocinina em SHR não foi capaz de alterar a expressão de receptores AT<sub>1</sub> ( $0,84 \pm 0,08$  UA, n = 6) e de AT<sub>2</sub> ( $0,83 \pm 0,12$  UA, n = 5) nestes vasos se comparados aos vasos de SHR não tratados (AT<sub>1</sub>:  $1,02 \pm 0,07$  UA, n = 6; AT<sub>2</sub>:  $0,93 \pm 0,12$  UA, n = 5) ou de ratos normotensos Wistar (AT<sub>1</sub>:  $0,88 \pm 0,13$  UA, n = 6; AT<sub>2</sub>:  $1,02 \pm 0,15$  UA, n = 5) (Figuras 6A, B e C).



**Figura 6** – Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica dos receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT<sub>1</sub>, B) e do tipo 2 (AT<sub>2</sub>, C), em unidades arbitrárias, em homogenatos de artérias mesentéricas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina. Valores representam a média ± EPM dos resultados, n = 4-6.

## **5.7 O tratamento com apocinina aumenta a expressão de receptores AT<sub>2</sub>, mas não de AT<sub>1</sub>, em aortas de SHR**

Não foram observadas diferenças na expressão do receptor AT<sub>1</sub>, o receptor relacionado ao efeito vasoconstritor da Ang II, entre as aortas dos grupos estudados (Wistar:  $0,84 \pm 0,11$ ; SHR:  $0,87 \pm 0,05$ ; SHR tratado:  $0,78 \pm 0,12$  UA; n = 5) (Figuras 7A e B), ao passo que a expressão do receptor AT<sub>2</sub>, o receptor relacionado ao efeito vasodilatador da Ang II, estava diminuída em homogenatos de aorta de SHR ( $0,94 \pm 0,21$  UA, n = 5) quando comparados com ratos normotensos Wistar ( $1,35 \pm 0,21$  UA, n = 5) (Figuras 7A e C).

O tratamento com apocinina foi capaz de aumentar a expressão dos receptores AT<sub>2</sub> em aortas de SHR ( $1,33 \pm 0,30$  UA, n = 5) (Figuras 7A e C). Não observamos diferenças na expressão de receptores AT<sub>2</sub> entre aortas de SHR tratados e de ratos normotensos Wistar.

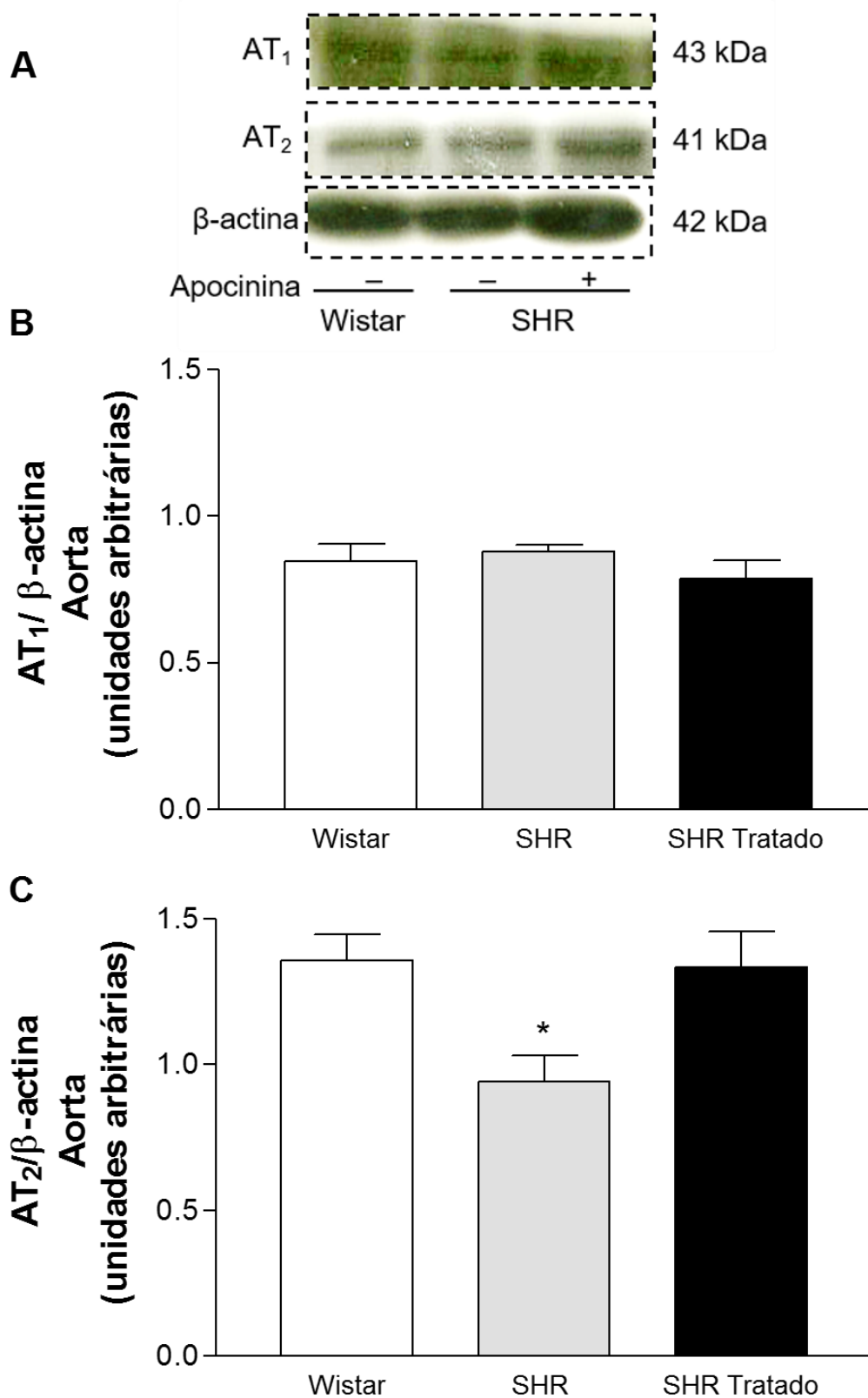


Figura 7 – Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica dos receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT<sub>1</sub>, B) e do tipo 2 (AT<sub>2</sub>, C), em unidades arbitrárias, em homogenatos de aortas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina. Valores representam a média ± EPM dos resultados, n = 5. \*p<0,05 entre SHR *versus* outros grupos.

## 5.8 O tratamento com apocinina diminui a produção de ânion superóxido em aortas de SHR

Por meio da técnica da quimioluminescência, foi possível observar que SHR ( $82,9 \pm 15,6$  URL/ mg proteína,  $n = 6$ ) apresentam níveis de produção de ânion superóxido aumentados em relação a ratos normotensos Wistar ( $48,2 \pm 1,8$  URL/ mg proteína,  $n = 5$ ). Além disto, o tratamento crônico com apocinina em SHR ( $46,0 \pm 6,6$  URL/ mg proteína,  $n = 7$ ), da quarta à décima semana de vida, foi capaz de reduzir significativamente estes níveis a valores semelhantes aos ratos Wistar (Figura 8).

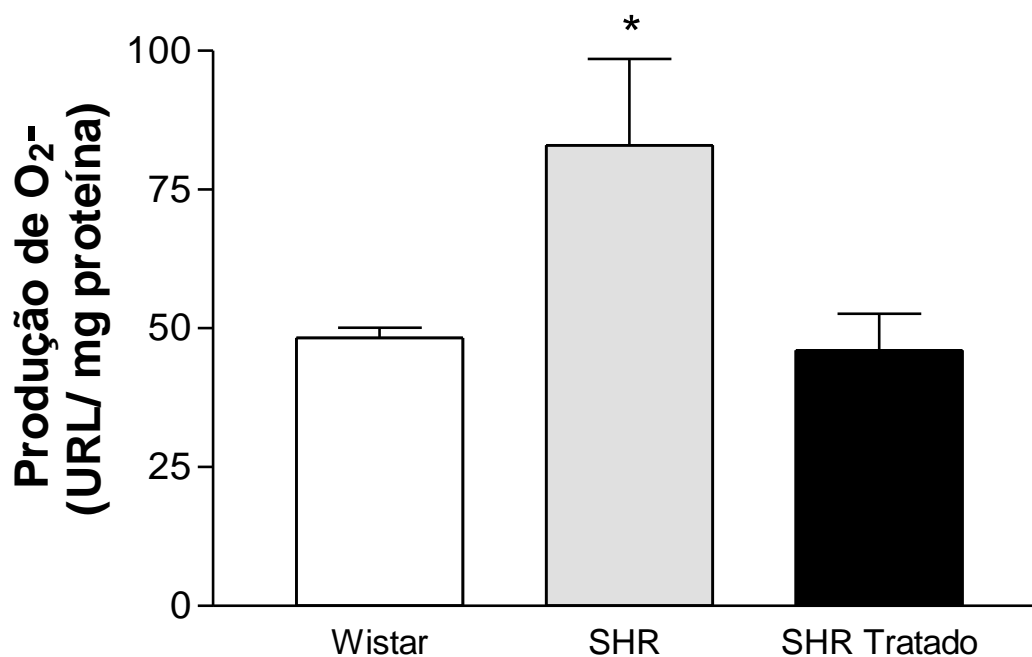


Figura 8 – Produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ), em unidades relativas de luz (URL)/ mg de proteínas, em homogenatos de aortas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina. Valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados,  $n = 5-7$ . \* $p < 0,05$  entre SHR *versus* outros grupos.

## 5.9 O tratamento com apocinina aumenta os níveis de nitrato/nitrito em SHR

Pode ser observado que em homogenatos de aorta de SHR houve redução dos níveis de nitrato/nitrito, um indicador de atividade de NOS, em SHR ( $16,3 \pm 1,7$  nmol/ mg proteína,  $n = 8$ ) em relação a ratos Wistar ( $20,2 \pm 2,9$  nmol/ mg proteína,  $n = 8$ ). E o tratamento com apocinina foi eficaz em elevar os níveis de nitrato/nitrito em ratos SHR tratados ( $19,6 \pm 2,8$  nmol/ mg proteína,  $n = 8$ ) (Figura 9).

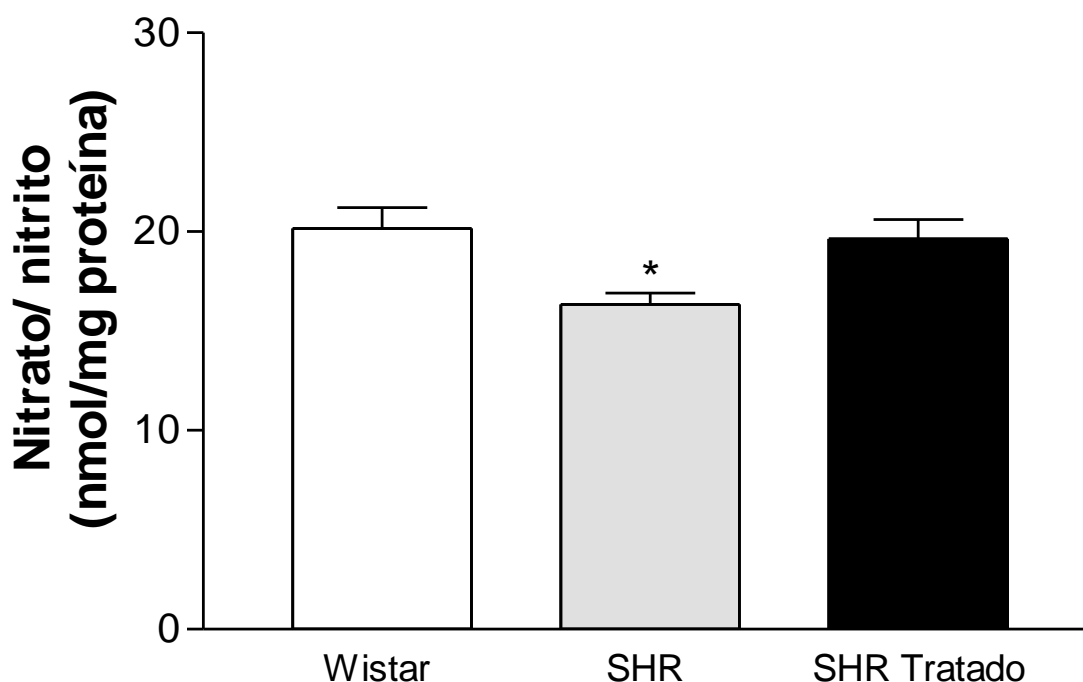


Figura 9 – Níveis de nitrato/nitrito, em nmol/ mg de proteínas, em homogenatos de aortas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina. Valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados,  $n = 8$ . \* $p < 0,05$  entre SHR versus outros grupos.

Na última etapa de nosso estudo, avaliamos se as alterações plasmáticas e vasculares associadas ao tratamento com apocinina poderiam alterar a resposta vasoconstritora à Ang II em vasos de SHR.

### **5.10 O tratamento com apocinina reduz a contração de artérias de resistência de SHR à Ang II, por aumentar a atividade de NOS e a modulação do endotélio sobre a contração vascular**

A Ang II induziu contração de forma concentração-dependente em anéis do segundo e terceiro ramos da artéria mesentérica de ratos Wistar e SHR (Figura 10).

Na presença do endotélio, as respostas contráteis induzidas pela Ang II foram significativamente maiores em artérias de resistência de SHR se comparadas as observada em artérias de ratos Wistar (Figura 10A). As artérias de SHR tratados com apocinina apresentaram o mesmo padrão de contração que as artérias de ratos normotensos Wistar. Estes resultados mostram que o tratamento com apocinina foi capaz de normalizar a resposta contrátil induzida pela Ang II em artérias de resistência de SHR (Figura 10A).

A remoção do endotélio vascular promoveu aumento do  $E_{max}$  das curvas concentração-efeito para Ang II em artérias de resistência de ratos Wistar e SHR (Figuras 11A e B). Porém, como pode ser observado na Figura 11C, o efeito da remoção do endotélio vascular sobre a contração à Ang II foi maior que em artérias de resistência de SHR tratados com apocinina. Nas artérias de resistência de SHR tratados com apocinina, a remoção do endotélio aumentou o  $E_{max}$  em torno de 100% em relação as artérias com endotélio.

A resposta observada nas curvas concentração-efeito para Ang II foi similar entre artérias de resistência sem endotélio, de SHR e de SHR tratado (Figura 10B). Artérias de resistência sem endotélio de ratos Wistar, ainda apresentaram contração menor à Ang II se comparadas a reatividade de artérias sem endotélio de ratos hipertensos (Figure 10B).

Estes resultados mostram que o endotélio vascular em artérias de resistência de SHR tratados passou a modular a contração à Ang II de uma forma mais importante do que o observado em artérias de resistência de SHR não tratados (Figuras 11B e C).

Para avaliarmos se este efeito do endotélio seria dependente da atividade da NOS, incubamos as artérias de resistência com inibidor inespecífico de NOS, L-NAME. Observamos que, a reatividade das artérias de resistência de Wistar, SHR e SHR tratados à Ang II, previamente incubadas com L-NAME, estavam aumentadas

em relação as respostas observadas em artérias não incubadas (Figuras 12A, B e C). No entanto, o efeito que o L-NAME promoveu nas artérias de resistência de SHR tratados com apocinina (Figura 12C) foi muito maior do que os efeitos observados nas artérias dos outros grupos (Figuras 12A e B).

Na presença de L-NAME, o  $E_{max}$  induzido pela Ang II em anéis de artérias de SHR tratados com apocinina foi ainda maior que o observado em artérias de SHR não tratados ou de ratos Wistar (Figura 10C), mostrando que a eficácia da Ang II em artérias de SHR tratados com apocinina foi maior do que a observada em artérias de ratos Wistar e SHR.

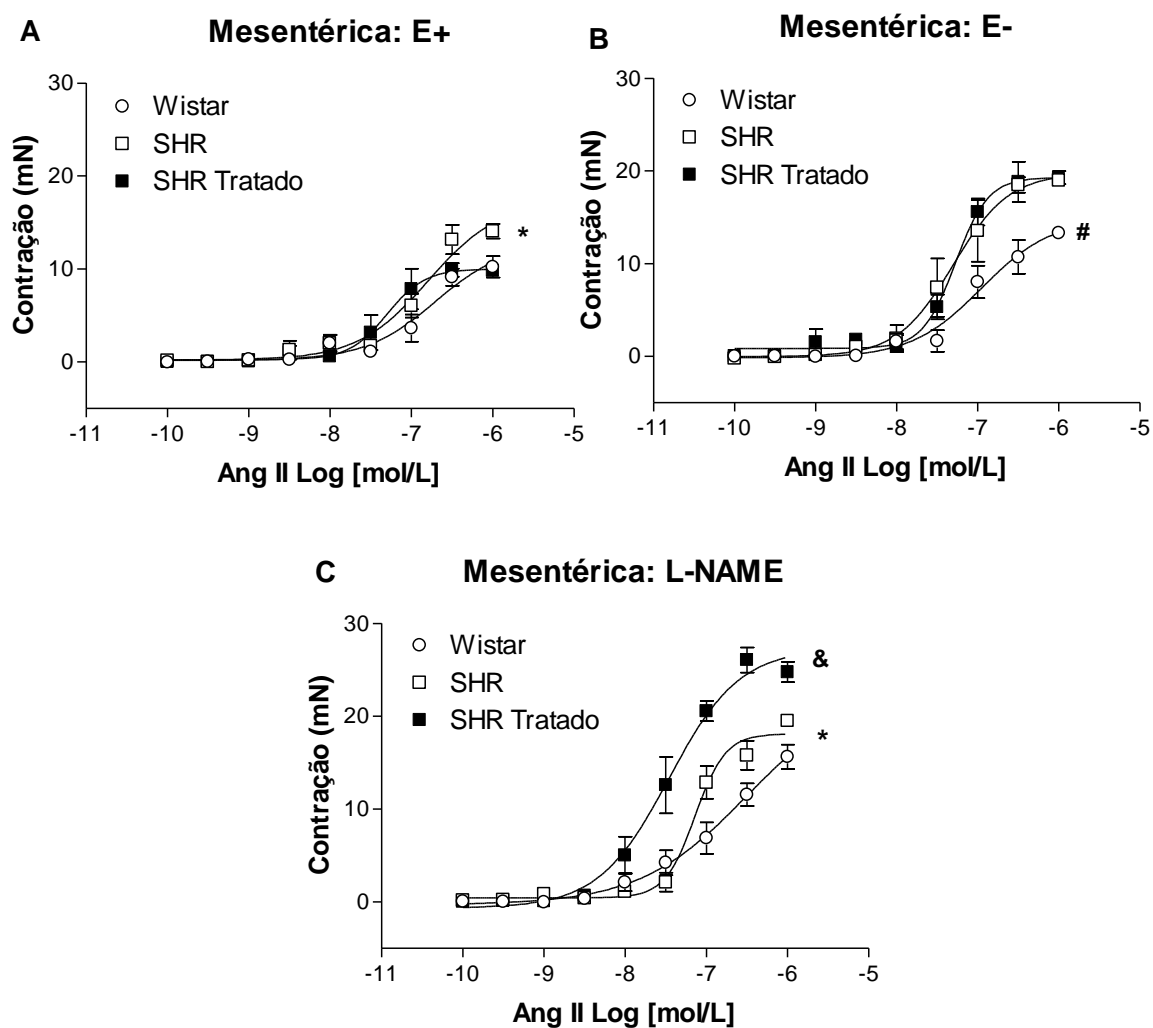
Em conjunto, os resultados dos experimentos funcionais obtidos até aqui, sugerem que o tratamento com apocinina promove aumento da atividade das NOS e aumento da modulação do endotélio vascular sobre a reatividade de artérias de resistência de SHR à Ang II.

Os valores de  $E_{max}$  e de  $pD_2$  das curvas concentração-efeito para Ang II em anéis do 2º e 3º ramos de artéria mesentérica dos grupos estudados podem ser observados na Tabela 3.

**Tabela 3 – Valores de efeito máximo ( $E_{max}$ ) e potência ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-efeito para Angiotensina II em anéis do segundo e terceiro ramos de artéria mesentérica de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina, com (E+) ou sem endotélio (E-) ou com endotélio na presença de L-NAME 100  $\mu$ mol/L.**

	Wistar		SHR		SHR Tratado	
	$E_{max}$	$pD_2$	$E_{max}$	$pD_2$	$E_{max}$	$pD_2$
E+	10,2±1,1	6,7±0,1	14,0±0,8	6,8±0,1	9,8±0,4	7,2±0,2
E-	13,2±0,6	6,6±0,1	19,0±0,6	6,6±0,1	19,2 ±0,7	7,3±0,2
L-NAME	15,6±1,3	7,0±0,2	19,5±0,4	7,1±0,08	24,7±1,09	7,4±0,1





**Figura 10 –** Curvas concentração-efeito para Angiotensina (Ang) II (0,1 nmol/L – 1  $\mu$ mol/L) em anéis do segundo e terceiro ramos de artéria mesentérica de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina, com (A) ou sem (B) endotélio, ou com endotélio na presença de L-NAME 100  $\mu$ mol/L (C). Valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados, n = 4-5. \* $p < 0,05$  valores de  $E_{max}$  de SHR versus outros grupos, # $p < 0,05$  valores de  $E_{max}$  de Wistar versus outros grupos, & $p < 0,05$  valores de  $E_{max}$  de SHR Tratado versus outros grupos.

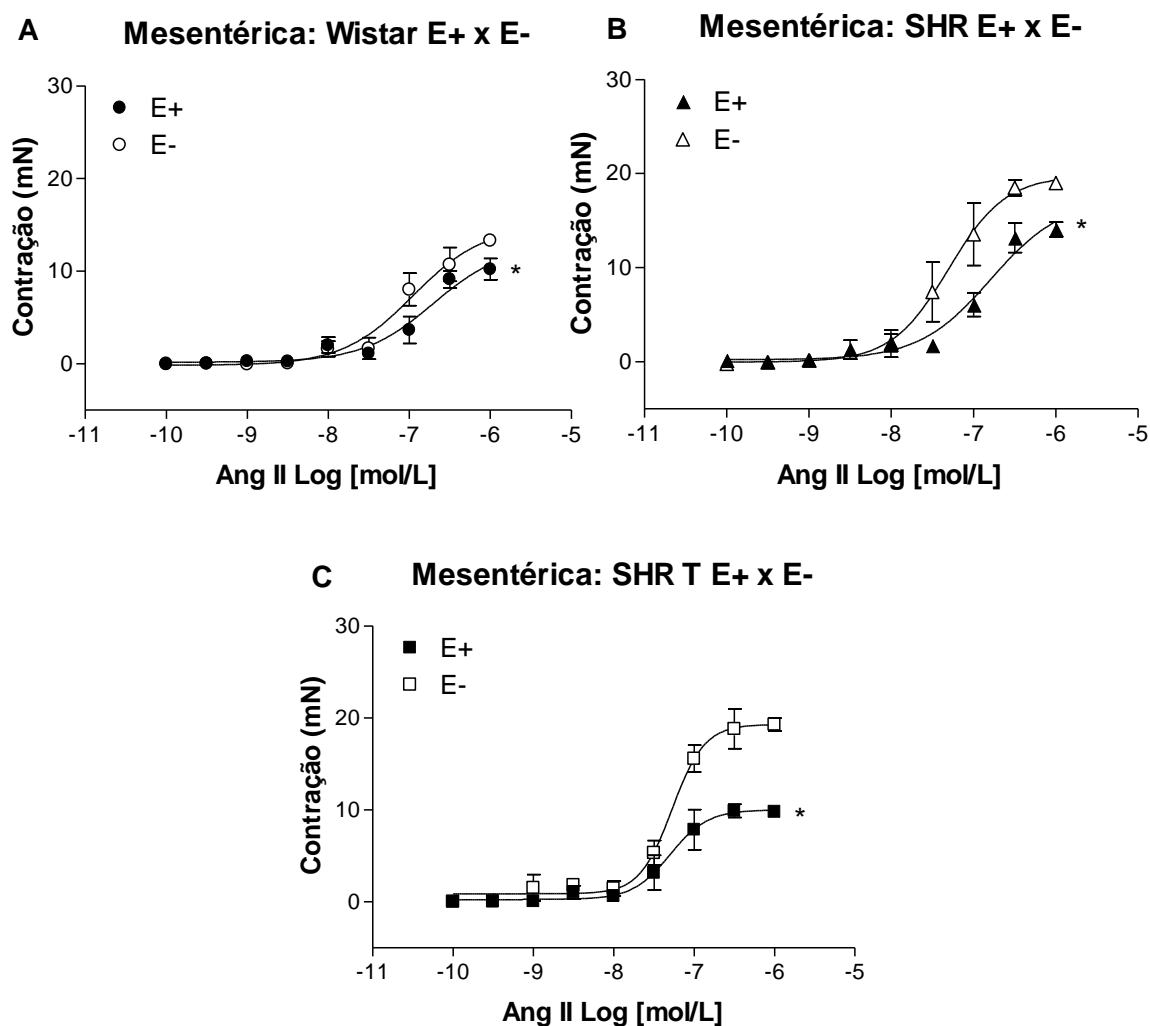
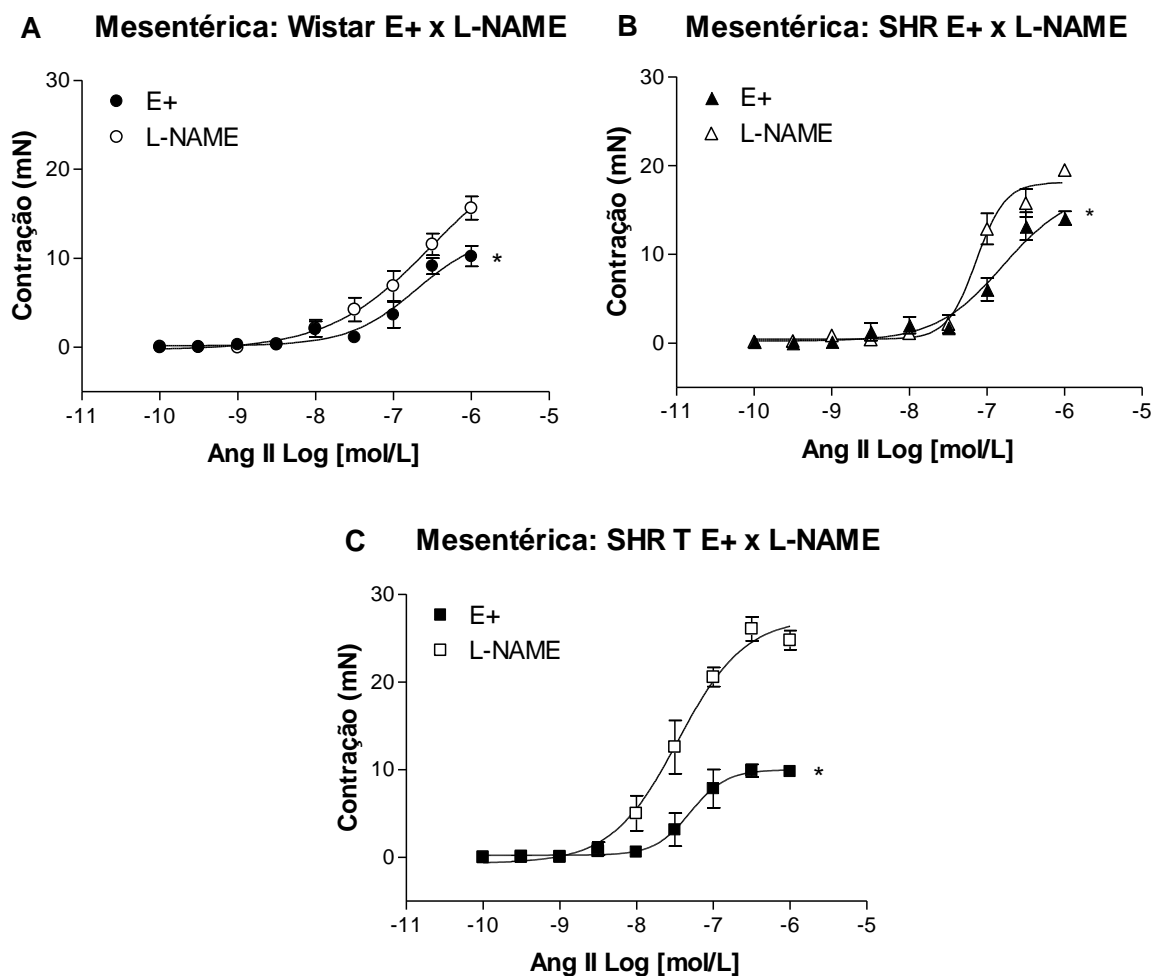


Figura 11 – Curvas de concentração-efeito para Angiotensina (Ang) II (0,1 nmolL – 1  $\mu$ mol/L) em anéis do segundo e terceiro ramos de artéria mesentérica de ratos Wistar (A), SHR (B) e SHR Tratado (C) com apocinina na presença (E+, símbolos pretos) ou ausência (E-, símbolos brancos) de endotélio. Valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados, n = 4-5. \*p<0,05 valores de  $E_{max}$  de E+ versus E-.



**Figura 12 –** Curvas de concentração-efeito para Angiotensina (Ang) II (0,1 nmolL – 1  $\mu$ mol/L) em anéis do segundo e terceiro ramos de artéria mesentérica de ratos Wistar (A), SHR (B) e SHR Tratado (C) com apocinina, com (E+, símbolos pretos) ou com endotélio na presença de L-NAME (símbolos brancos) de endotélio. Valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados, n = 4-5. \* $p < 0,05$  valores de  $E_{max}$  de E+ versus L-NAME.

Avaliamos também possíveis alterações funcionais associadas ao tratamento com apocinina em aortas de SHR.

### 5.11 O tratamento com apocinina não altera a reatividade de aortas de SHR à Ang II

Similarmente ao observado em artérias de resistência, a Ang II induziu contração de forma concentração-dependente em anéis de aorta torácica dos animais estudados (Figure 13A). No entanto, é possível verificar que o perfil das curvas concentração-efeito para Ang II em artéria de condutância (Figura 13) difere bastante do observado em artérias de resistência (Figura 10).

Em aortas com endotélio (Figura 13A), as respostas contráteis à Ang II se mostraram bastante variáveis nos diferentes grupos. Nestas condições, foi possível calcular e verificar diferença estatística entre os valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  das curvas de Ang II entre as aortas de ratos Wistar e SHR, mostrando que aortas de SHR foram mais reativas à Ang II do que as aortas de Wistar, mas o tratamento não alterou a resposta em aortas de SHR.

Observamos que a reatividade à Ang II foi muito maior em aortas sem endotélio de ratos Wistar (Figura 14A), que a observada em aortas com endotélio. A pré-incubação com L-NAME (Figura 15A) também aumentou significativamente a reatividade de aortas de Wistar à Ang II, mostrando o importante papel modulador do endotélio e da atividade de NOS sobre a contração induzida por Ang II em animais normotensos.

Em aortas de SHR e SHR tratados, a remoção do endotélio (Figura 14B e C, respectivamente) não alterou a contração de aortas à Ang II. Estes resultados sugerem que diferente do observado em aortas de Wistar, em aortas de SHR, não houve modulação endotelial sobre a contração por Ang II. Além disto, estes resultados mostraram que o tratamento com apocinina não foi capaz de reverter esta alteração.

A incubação com L-NAME promoveu aumento da contração de aortas de SHR (Figura 15B) e de SHR tratados (Figura 15C) à Ang II, mas estes efeitos não foram tão significativos se comparados ao observado em aortas de Wistar (Figura 15A). Este resultados sugerem que as NOS presentes no músculo liso vascular poderiam modular a reatividade de aortas de SHR e SHR tratados à Ang II. Podemos observar que o perfil das curvas concentração-efeito para Ang II em aortas sem endotélio (Figura 13B), ou com endotélio mas na presença de L-NAME (Figura

13C), foi semelhante entre SHR e SHR tratado. Estes resultados mostram que o tratamento com apocinina não alterou a reatividade de aortas de SHR à Ang II.

Os valores de  $E_{max}$  e de  $pD_2$  das curvas concentração-efeito para Ang II em anéis de artéria aorta dos grupos estudados podem ser observados na Tabela 4.

**Tabela 4 – Valores de efeito máximo ( $E_{max}$ ) e potência ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-efeito para Angiotensina II em anéis de aortas de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina, com (E+) ou sem endotélio (E-) ou com endotélio na presença de L-NAME 100  $\mu$ mol/L.**

	Wistar		SHR		SHR Tratado	
	$E_{max}$	$pD_2$	$E_{max}$	$pD_2$	$E_{max}$	$pD_2$
E+	0,22 $\pm$ 0,01	8,68 $\pm$ 0,1	0,59 $\pm$ 0,4	8,21 $\pm$ 0,2	0,41 $\pm$ 0,1	8,44 $\pm$ 0,08
E-	1,87 $\pm$ 0,2	8,53 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2	8,49 $\pm$ 0,3	0,44 $\pm$ 0,1	8,45 $\pm$ 0,08
L-NAME	1,55 $\pm$ 0,4	8,93 $\pm$ 0,15	1,12 $\pm$ 0,1	8,35 $\pm$ 0,2	1,16 $\pm$ 0,1	8,38 $\pm$ 0,2

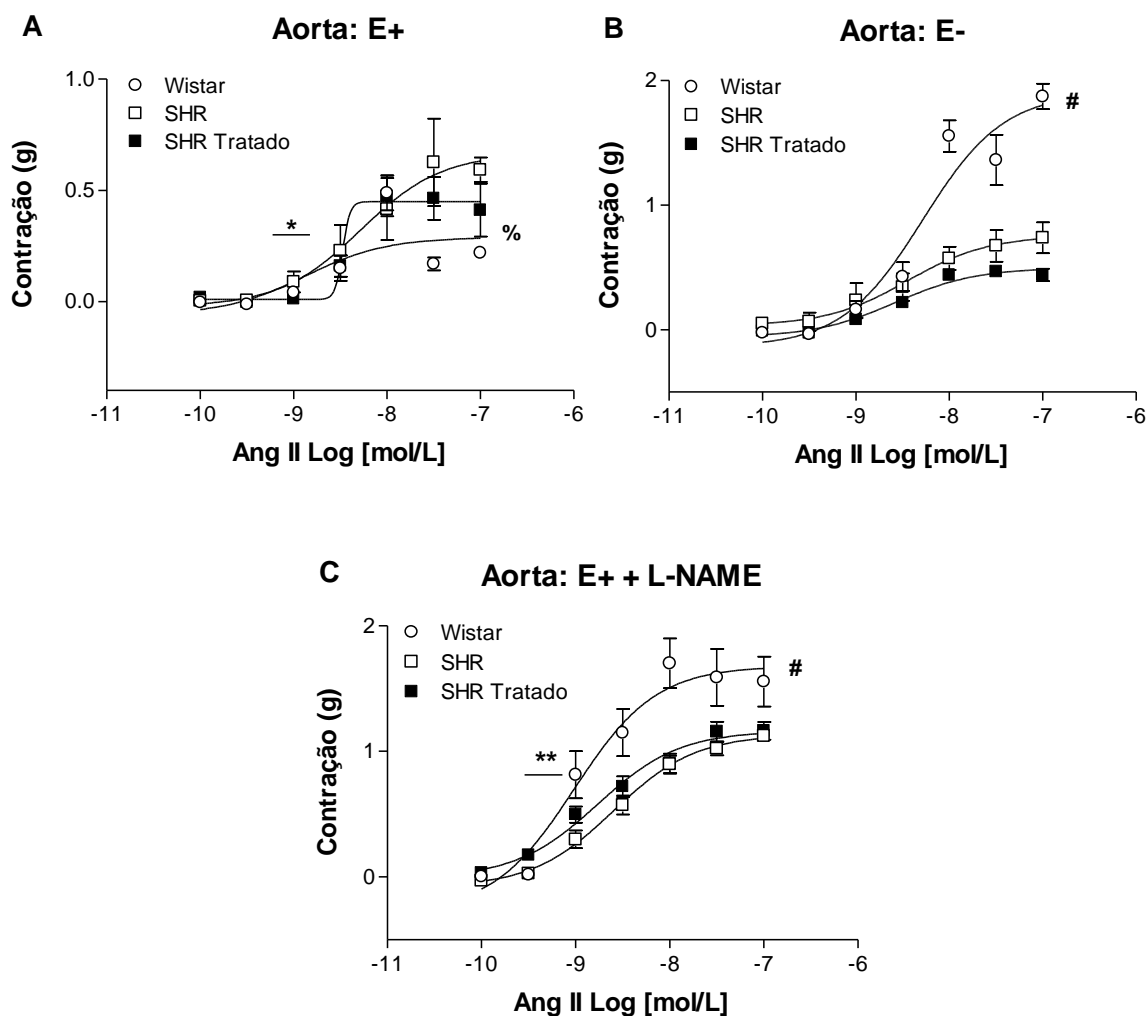


Figura 13 – Curvas de concentração-efeito para Angiotensina (Ang) II (0,1 nmol/L – 0,1  $\mu$ mol/L) em anéis de aorta de ratos Wistar, SHR e SHR Tratado com apocinina, com (A) ou sem (B) endotélio, ou com endotélio na presença de L-NAME 100  $\mu$ mol/L (C). Valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados, n = 4-5. %p<0,05 valores de  $E_{max}$  Wistar versus SHR. \*p<0,05 valores  $pD_2$  Wistar versus SHR. # p<0,05 valores de  $E_{max}$  Wistar versus outros grupos. \*\*p<0,05 valores de  $pD_2$  Wistar versus outros grupos.

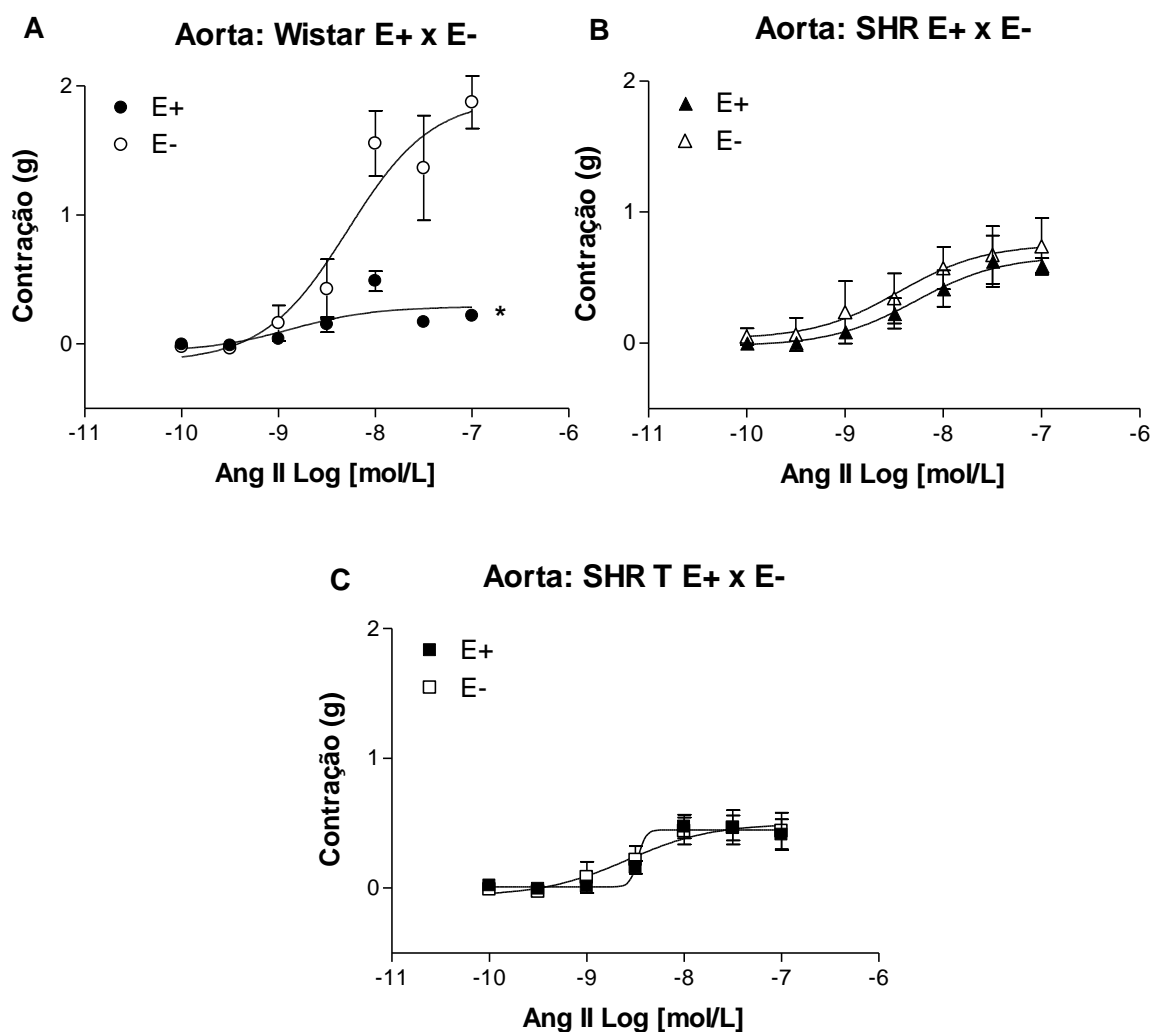


Figura 14 – Curvas de concentração-efeito para Angiotensina (Ang) II (0,1 nmolL – 1  $\mu$ mol/L) em anéis de aorta de ratos Wistar (A), SHR (B) e SHR Tratado (C) com apocinina na presença (E+, símbolos pretos) ou ausência (E-, símbolos brancos) de endotélio. Valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados, n = 4-5. \* $p < 0,05$  valores de  $E_{max}$  de E+ versus E-.

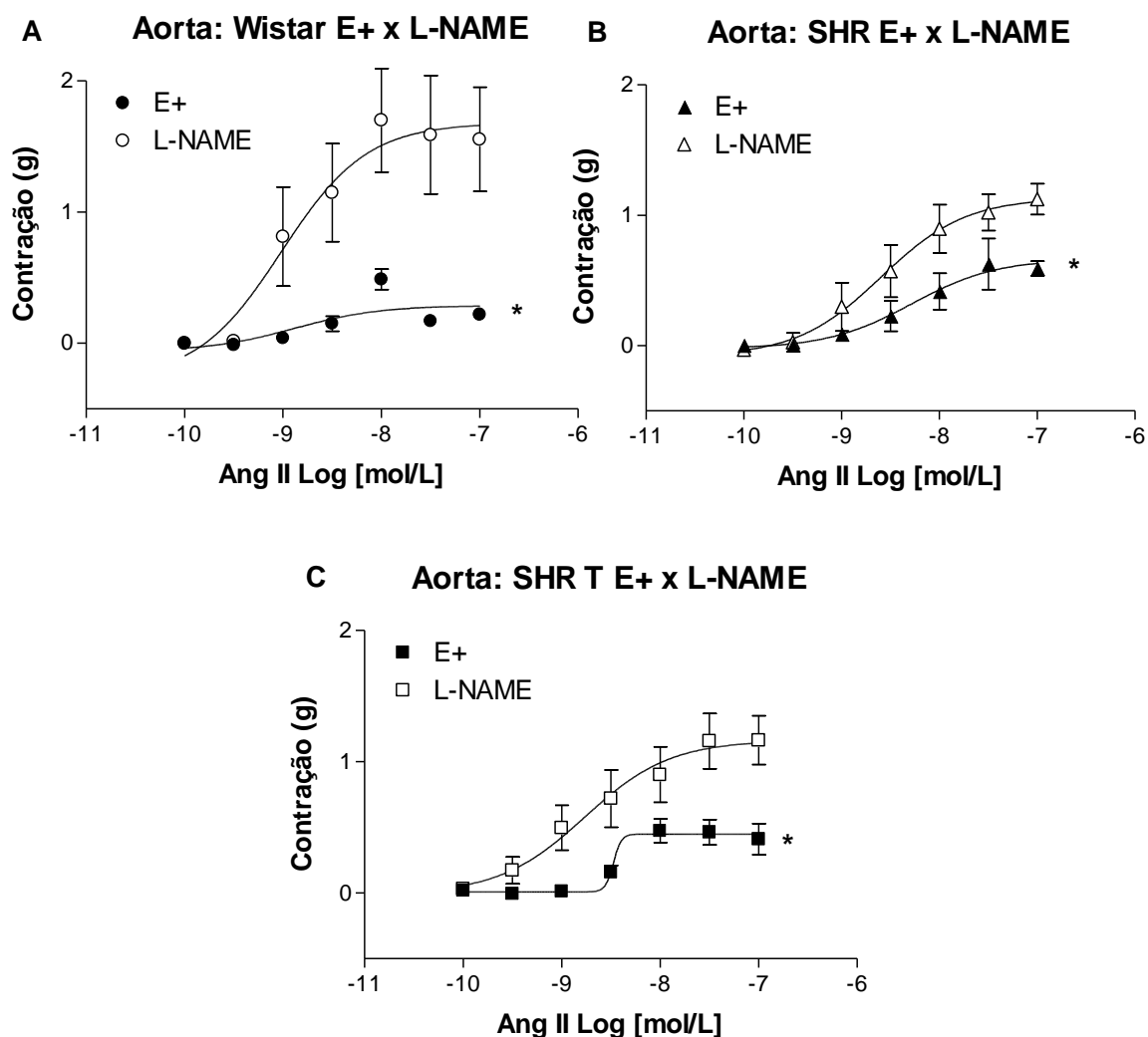


Figura 15 – Curvas de concentração-efeito para Angiotensina (Ang) II (0,1 nmol/L – 1  $\mu$ mol/L) em anéis de aorta de ratos Wistar (A, círculos), SHR (B, triângulos) e SHR Tratado (C, quadrados) com apocinina, com (E+, símbolos pretos) ou com endotélio na presença de L-NAME 100  $\mu$ mol/L (símbolos brancos) de endotélio. Valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados, n = 4-5. \*p<0,05 valores de  $E_{max}$  de E+ versus L-NAME.



**DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstramos novos efeitos do tratamento crônico com apocinina em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Os principais achados foram: (I) a apocinina aumentou a capacidade antioxidante plasmática de SHR; (II) o tratamento diminuiu a expressão de NOX2 e p47phox e (III) aumentou a expressão do receptor AT<sub>2</sub> em homogenatos de aortas de SHR; a apocinina é capaz de (IV) reduzir a geração de ânion superóxido e (V) aumentar a relação nitrato/ nitrito em aortas de SHR; a angiotensina (Ang) II promove contração de maneira concentração-efeito em anéis de (VI) artéria mesentérica e (VII) artéria aorta de SHR tratados com apocinina, e que, o endotélio participa desta resposta contrátil.

Os antioxidantes são moléculas com a capacidade de neutralizar radicais livres pela doação ou aceitação de elétrons com a finalidade de removê-los ou de gerar radicais menos ativos e menos danosos. Os antioxidantes podem ainda reduzir o estresse oxidativo pela inibição da expressão ou atividade de enzimas geradoras de radicais livres (LÜ *et al.*, 2010). Heumüller e colaboradores (2008) descreveram que a apocinina seria um antioxidante em células não-fagocíticas em cultura, uma vez que ela não foi capaz de bloquear a produção de ânion superóxido em células embrionárias de rim humano (HEK293) que apresentavam expressão aumentada de NOX1, 2 e 4. Foi descrito que o dímero ativo da apocinina, a diapocinina formada pela atividade de peróxido de hidrogênio e mieloperoxidases, seria responsável pela inibição das NOX em células vasculares (JOHNSON *et al.*, 2002). Recentemente, nós demonstramos que a diapocinina, assim como a apocinina, possui capacidade antioxidante e induz efeito hipotensor em ratos Wistar e efeito vasodilatador em artérias mesentéricas por reduzir as concentrações de ERO e aumentar a biodisponibilidade de NO em células endoteliais (POTJE *et al.*, 2017).

No presente estudo, observamos que a capacidade antioxidante da solução de apocinina, usada no tratamento por via oral de SHR, é mantida durante todo o período de tratamento (Tabela 2) e que o tratamento com apocinina aumentou a capacidade antioxidante plasmática de SHR quando comparados com SHR não

tratados (Figura 2), mostrando a eficácia da dose de 30 mg/Kg de apocinina nestes animais.

Na hipertensão arterial ocorre um aumento da geração de substâncias pró-oxidantes associada à redução das defesas antioxidantes (BISWAS *et al.*, 2008). Níveis reduzidos de antioxidantes endógenos, como já observado em SHR, podem ser a causa ou consequência do estresse oxidativo (PIEHL *et al.*, 2005). Como há uma relação direta entre o estresse oxidativo e o dano vascular, drogas que aumentam a capacidade antioxidante plasmática têm sido consideradas como uma das possíveis e novas abordagens terapêuticas para o tratamento da hipertensão arterial e de doenças cardiovasculares (HAMILTON *et al.*, 2004; PARAVICINI; TOUYZ, 2008). Vários estudos mostraram o efeito anti-hipertensivo da apocinina em modelos experimentais (BESWICK *et al.*, 2001; VIRDIS *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2009; MARTINEZ-REVELLES *et al.*, 2013; PERASSA *et al.*, 2016; UNGER; PATIL, 2009) e reforçam a sugestão do seu uso clínico.

Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que o tratamento com apocinina também promoveu alterações importantes nos vasos sanguíneos de ratos hipertensos tratados.

A apocinina reduz a expressão da isoforma NOX2 e de sua subunidade regulatória p47phox em aortas de SHR tratados. As NOX são uma família de enzimas que transferem elétrons através das membranas biológicas e tem como produto final de sua reação a geração de ânion superóxido (BEDARD; KRAUSE, 2007). Entre uma família de sete isoformas diferentes, as isoformas NOX1, 2, 4 e 5 são expressas nos tecidos cardiovasculares e participam da função cardíaca e vascular, mas também contribuem para o desenvolvimento da doença cardiovascular (LASSÈGUE; SAN MARTÍN; GRIENGLING, 2012). Nos vasos sanguíneos, as células endoteliais expressam NOX1, NOX2, NOX4 e NOX5, as células do músculo liso vascular expressam NOX1, NOX4 e NOX5, e os fibroblastos adventíciais expressam NOX2 e NOX4 (DRUMMOND *et al.*, 2011). Como o gene da NOX5 está presente apenas em humanos e não em roedores, o estudo desta isoforma ainda é um desafio experimental (MONTEZANO; TOUYZ, 2014).

A NOX1 é encontrada no endotélio, células do músculo liso vascular, fibroblastos, cardiomiócitos, microglia, cavéola e epitélio intestinal (NISIMOTO *et al.*, 2008). No endotélio e em células do músculo liso vascular pode ser regulada por fatores mecânicos, agentes vasoativos, citocinas pró-inflamatórias e fatores de

crescimento, e participa da produção de matriz extracelular, proliferação e migração de células do músculo liso vascular (MONTEZANO; TOUYZ, 2014). A NOX1 é regulada, colocalizada e requer a subunidade NOXO1 (NOX organizador 1) para sua ativação e produção de ERO (GUZIK *et al.*, 2002; SELEMIDIS *et al.*, 2008; SIU; GAO; CAI, 2016). Embora tenha sido descrita que sua atividade e expressão estejam aumentadas em modelos de hipertensão (DIKALOVA *et al.*, 2010; SHEEHAN *et al.*, 2011), em nosso estudo, não foram observadas alterações na expressão da NOX1 e NOXO1 em aortas de SHR (Figuras 3A, B e C) ou em SHR tratados se comparadas a observada em aortas de ratos normotensos Wistar.

A NOX2 é encontrada em toda a parede vascular e é ativada pela subunidade regulatória p47phox, a qual é ativada por fosforilação e forma um complexo com as outras subunidades citosólicas (p40phox e p67phox), translocando-se para a membrana, associando-se ao citocromo b558, levando a transferência de elétrons do oxigênio molecular para a produção de ânion superóxido, com utilização de NAD(P)H (LASSÈGUE; GRIENGLING, 2010; TOUYZ; YAO; SCHIFFRIN, 2003). A indução do gene da NOX2 é altamente regulada pela Ang II (DOUGLAS *et al.*, 2012). Diferentes estudos mostraram que o aumento da expressão de NOX2 está correlacionado com a redução do relaxamento vascular, dependente de endotélio, em aorta e mesentérica (PERASSA *et al.*, 2016; TAKENOUCHI *et al.*, 2009; ZEMSE; HILGERS; WEBB, 2007), de forma que a deleção da NOX2 em camundongos restaurou o efeito vasodilatador da acetilcolina em artérias cerebrais (GIROUARD *et al.*, 2006).

A correlação direta entre o aumento da expressão de NOX2 e a hipertensão tem sido observada em diferentes modelos experimentais como em SHRSP (com predisposição ao acidente vascular encefálico), camundongos com hipertensão induzida por Ang II, ratos com hipertensão induzida por aldosterona e fêmeas SHR (LASSÈGUE; CLEMPUS, 2003; PARK *et al.*, 2008; TROIANO *et al.*, 2016). A deleção de NOX2 reduz a hipertensão em ratos DOCA-salt (FUJII *et al.*, 2006) e dois-rins-um-clipe (2R-1C) (JUNG *et al.*, 2004). Foi sugerido que tratamentos que atuassem sobre a NOX2 poderiam ser utilizados para tratamento da hipertensão (LASSÈGUE; GRIENGLING, 2010). Em nosso estudo, observamos aumento da expressão da NOX2 e de sua subunidade regulatória p47phox em homogenatos de aorta de SHR quando comparados a homogenatos de aortas de ratos Wistar (Figuras 4A e B e 4A e C, respectivamente) e que o tratamento crônico com

apocinina foi eficaz em reduzir a expressão da NOX2 e de p47phox em aortas de SHR. Previamente, Stolk e colaboradores (1994) haviam demonstrado que a apocinina impede a translocação do p47phox do citoplasma para a membrana e leva a inibição de NOX em neutrófilos humanos. Juntos estes resultados sugerem que a apocinina inibe a atividade NOX2 em vasos de animais hipertensos.

Não observamos alterações na expressão da NOX4 entre homogenatos de aortas de ratos normotensos Wistar, SHR ou SHR tratados com apocinina (Figura 5A e B). A NOX4 está presente em todos os tipos celulares da parede vascular e é constitutivamente ativa nestes tecidos, não requerendo associação com subunidades regulatórias para sua ativação, já que sua regulação parece ocorrer através de alterações nos níveis de expressão. A atividade da NOX4 mantém a produção basal de ERO e pode ser estimulada por Ang II, TNF- $\alpha$ , glicose e fatores de crescimento (LASSÈGUE; GRIENGLING, 2010; SIRKER; ZHANG; SHAH, 2011). Seu papel patológico na hipertensão arterial, aterosclerose, diabetes e complicações cardíacas e renais ainda não está completamente esclarecido, mas alguns estudos sugerem que a NOX4 possua efeitos protetores devido a produção de peróxido de hidrogênio, que pode atuar como vasodilatador em alguns leitos vasculares (RAY *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2010).

Nossos resultados referentes aos efeitos da apocinina sobre a expressão de isoformas NOX e suas subunidades regulatórias foram rapidamente publicados (PERASSA *et al.*, 2016), uma vez que fomos os primeiros a demonstrar o efeito inibitório da apocinina sobre a expressão de NOX2 e p47phox em aortas de SHR tratados.

A produção de ânion superóxido, medida por quimioluminescência da lucigenina, foi praticamente duas vezes maior em aortas de SHR do que aortas de ratos normotensos Wistar (Figura 8). Viridis e colaboradores (2004) observaram resultados semelhantes em artérias mesentéricas e aortas de camundongos com hipertensão induzida por Ang II. Nossos resultados corroboram estudos prévios mostrando que SHR apresentam uma produção aumentada de ânion superóxido na parede vascular (NABHA *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 1995). As NOX seriam responsáveis pela produção de ERO em aortas (PAGANO *et al.*, 1995). A partir dos resultados obtidos em nosso estudo, podemos sugerir que a produção aumentada de  $O_2^-$  em aortas de SHR, seria dependente da maior expressão NOX2 e de sua subunidade regulatória p47phox. A produção aumentada de ânion superóxido

precede o desenvolvimento da hipertensão em SHR e contribui para a manutenção da resistência vascular periférica aumentada (CAI; HARRISON, 2000; KITIYAKARA; WILCOX, 1998).

Neste estudo demonstramos ainda que o tratamento crônico com apocinina foi capaz de reduzir a produção de ânion superóxido em aortas de SHR tratados (Figura 8) para níveis encontrados em aortas de ratos normotensos. Estes resultados podem ser relacionados à menor expressão da NOX2 e da p47phox observadas em aortas de SHR tratados com apocinina (Figuras 4A, B e C). A apocinina também foi capaz de reduzir a produção de ânion superóxido em aortas de camundongos com hipertensão induzida por Ang II (VIRDIS *et al.*, 2004), em ratos hipertensos tratados com frutose (UNGER; PATIL, 2009), em ratos DOCA-salt (BESWICK *et al.*, 2001) e em camundongos com hipercolesterolemia (KINKADE; STREETER; MILLER JÚNIOR, 2013).

Observamos que os reduzidos níveis de nitrato/ nitrito medidos em homogenatos de aorta de SHR, quando comparados a aortas de Wistar, são aumentados pelo tratamento crônico com apocinina (Figura 9). Estes resultados corroboram nossos achados prévios que mostraram que em SHR tratados cronicamente com apocinina há maior expressão proteica de eNOS em aortas e maior concentração de NO, detectada pela sonda fluorescente DAF-2/DA, em células endoteliais de aorta (PERASSA *et al.*, 2016). Nossos resultados reforçam a sugestão de uma possível aplicação clínica da apocinina, uma vez que, como sugeridas por Hamilton e colaboradores (2004), novas abordagens terapêuticas que aumentassem a biodisponibilidade de NO deveriam ser adotadas para o tratamento de doenças cardiovasculares.

Avaliamos também se o tratamento com apocinina poderia, além das diferentes alterações plasmáticas e vasculares discutidas acima, alterar a expressão proteica de receptores de Ang II em homogenatos de aorta e de leito mesentérico de SHR.

A Ang II é um hormônio que regula a atividade de NOX (GUZIK; HARRISON, 2006; SCHRAMM *et al.*, 2012) e tem um papel importante na disfunção cardiovascular, na hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, diabetes e remodelamento cardíaco (TAUBMAN, 2003). Em situações patológicas associadas ao estresse oxidativo, a sinalização da Ang II pode estar aumentada e levar ao desenvolvimento de disfunção endotelial, remodelamento vascular e inflamação,

através de suas ações mitogênica, pró-fibrótica e pró-inflamatória, contribuindo para a doença cardiovascular (CAT *et al.*, 2013). Estas respostas são mediadas entre os dois receptores de membrana AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (TOUYZ *et al.*, 1999), principalmente pelos receptores AT<sub>1</sub>.

A ativação do receptor AT<sub>1</sub> pela Ang II ativa a fosfolipase C e D que produzem diacilglicerol e inositol-3-fosfato e que por sua vez, medeiam a liberação de cálcio para ativação da proteína quinase C, a qual é capaz de fosforilar a p47phox e então ativar a NOX, levando a produção de ânion superóxido (MASSENET *et al.*, 2005; LYLE; GRIENGLING, 2006). A Ang II causa disfunção endotelial através da produção de ERO, dependente da atividade NOX (CIFUENTES *et al.*, 2000).

O receptor AT<sub>1</sub> é responsável pela maior parte das ações conhecidas da Ang II por ser mais expresso que os receptores AT<sub>2</sub> (KEMP *et al.*, 2016). Embora tenha sido descrito juntamente com o receptor AT<sub>1</sub>, os mecanismos envolvidos na função e ativação de AT<sub>2</sub> não foram ainda completamente descritos (CAREY, 2017). No entanto, ao receptor AT<sub>2</sub> têm sido atribuídas as ações antiproliferativas, pró-apoptóticas, natriuréticas e vasodilatadoras da Ang II (CAT *et al.*, 2013). Foi demonstrado que ativação do receptor AT<sub>2</sub> resulta em aumento da produção de NO, de 3',5' guanosina monofosfato cíclico (GMPc) que é um mensageiro secundário para o NO e de bradicinina que também é um estímulo para a produção de NO e que estes três componentes são os responsáveis pelos efeitos vasodilatadores da Ang II mediados por receptores AT<sub>2</sub> (ABADIR; CAREY; SIRAGY, 2003). Kemp e colaboradores (2016) demonstraram que a ativação dos receptores AT<sub>2</sub> é capaz de prevenir a retenção de sódio e reduzir a pressão arterial em ratas Sprague-Dawley com hipertensão induzida por Ang II.

Não observamos alterações na expressão de receptor AT<sub>1</sub> (Figuras 6A e B) ou de AT<sub>2</sub> (Figuras 6A e C) em artérias mesentéricas de SHR, corroborando resultados prévios que mostraram que a expressão de ambos os receptores não é diferente entre células isoladas do músculo liso vascular de artéria mesentérica de SHR e ratos Wistar-Kyoto (EL MABROUK; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2001). O tratamento com apocinina não promoveu alterações na expressão basal de receptores AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub> nas artérias de resistências de SHR (Figuras 6A, B e C).

Recentemente foi mostrado (LING *et al.*, 2017) que a expressão de receptores AT<sub>1</sub>, em aortas de camundongos com hipertensão induzida pela infusão de Ang II, estava aumentada e que o tratamento com ácido salvia-nólico B, uma

substância antioxidante, derivado da raiz de Danshen, promove redução da expressão de AT<sub>1</sub>.

Em nosso estudo, observamos que em aortas de ratos hipertensos (SHR), a expressão do receptor AT<sub>2</sub> (Figuras 7A e C), mas não de AT<sub>1</sub> (Figuras 7A e B), estava significativamente reduzida em comparação com aortas de ratos normotensos. Interessantemente, o tratamento crônico com apocinina, não alterou a expressão de AT<sub>1</sub>, mas aumentou a expressão de AT<sub>2</sub> em aortas de SHR (Figuras 7A e C), para níveis de expressão semelhantes aos observados em aortas de ratos normotensos.

Estudos prévios (ABADIR; CAREY, SIRAGY, 2003) mostraram que a ativação de receptores AT<sub>2</sub> leva a produção de NO. Ainda, Dao e colaboradores (2016) demonstraram que o NO regula positivamente a expressão e a transcrição gênica dos receptores AT<sub>2</sub> em células endoteliais, o que foi revertido pela inibição farmacológica da NOS com L-NAME. Baseados nestes estudos, podemos sugerir que o aumento dos níveis de NO, medido pela razão entre nitrato/ nitrito, que observamos em aortas de SHR tratados com apocinina (Figura 9) poderia ser associado ao aumento da expressão do receptor AT<sub>2</sub> (Figuras 7A e C) em homogenatos de aorta destes animais.

Como a ativação de receptores AT<sub>2</sub> tem sido associada a uma maior produção de NO/ GMPc, poderíamos considerar ainda que, em condições patológicas, o aumento do estresse oxidativo, reduziria a biodisponibilidade de NO e diminuiria o efeito vasodilatador mediado por ativação de receptores AT<sub>2</sub>, deixando a vasoconstrição, mediada pela ativação de receptores AT<sub>1</sub> sem oposição, contribuindo desta forma para o aumento da pressão arterial, como proposto previamente (SABUHI; ASGHAR; HUSSAIN, 2010). Nossos dados mostram, pela primeira vez, que a apocinina previne a disfunção endotelial em SHR (PERASSA et al., 2016) por, entre outros fatores acima citados, aumentar a expressão basal de receptores AT<sub>2</sub> em vasos de SHR.

Todos os efeitos da apocinina acima descritos poderiam ser associados as alterações de reatividade de vasos sanguíneos à Ang II observadas em SHR tratados.

Como mostramos previamente, o tratamento com apocinina reverte a disfunção endotelial em SHR (PERASSA et al., 2016) e o endotélio foi capaz de atenuar significativamente as contrações estimuladas por fenilefrina em aortas



intactas de SHR tratados com apocinina. Neste estudo, observamos que o tratamento com apocinina aumentou a modulação endotelial, dependente da atividade de NOS, sobre as respostas vasoconstritoras estimuladas por Ang II em artérias de resistência (2º ou 3º ramos de artéria mesentérica) de SHR (Figuras 10, 11 e 12). No entanto, observamos que a reatividade de aortas de SHR à Ang II, a qual não é modulada pelo endotélio vascular (Figura 14B), não foi alterada pelo tratamento com apocinina, uma vez que as curvas concentração-efeito à Ang II em aortas de SHR e SHR tratados se sobrepõem (Figura 14C). Outras NOS, sensíveis ao L-NAME e presentes no músculo liso vascular, possivelmente a iNOS (SINGH et al., 1996), modulam a reatividade de aortas de SHR (Figura 15B) e SHR tratados (Figura 15C) à Ang II. Como observamos (Figuras 13A, B e C), o tratamento com apocinina não altera a reatividade de aortas de SHR à Ang II. Este resultado não era o esperado, uma vez que o tratamento com apocinina além de reverter a disfunção endotelial, também aumentou a expressão de receptores AT<sub>2</sub> (Figuras 7A e C) em aortas de SHR.

A hiporreatividade à Ang II, dependente da maior modulação endotelial e atividade de eNOS, observada em artérias de resistência de SHR tratados com apocinina (Figura 10A) contribuiria para menor resposta pressora à Ang II observada em SHR tratados com apocinina (Figura 1).

Interessantemente, diferentes autores demonstraram que a reatividade à Ang II em SHR pode estar aumentada (BOHR; DOMINICZAK; WEBB, 1991; TOUYZ et al., 1999) ou inalterada (BODIN et al., 1993), mostrando que a resposta contrátil à Ang II é variável de acordo com o leito arterial utilizado.

Nossos resultados sugerem que o efeito anti-hipertensivo da apocinina estaria correlacionado com os efeitos plasmáticos e vasculares observados em ratos hipertensos tratados com esta droga.

**CONCLUSÕES**

## 7 CONCLUSÕES

Em suma, o tratamento crônico com apocinina reduz o efeito vasoconstritor da Ang II em artérias de resistência de SHR, a expressão de NOX2 e p47phox e a atividade NOX, aumenta a concentração de NO e a expressão de receptores AT<sub>2</sub> em aortas de SHR. Todos estes mecanismos estariam envolvidos na maior modulação endotelial sobre vasoconstrição à Ang II observada em artérias de resistência de SHR tratados com apocinina. E estes efeitos, poderiam ajudar na compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e tratamento da hipertensão arterial.

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

ABADIR, P. M.; CAREY, R. M.; SIRAGY, H. M. Angiotensin AT<sub>2</sub> receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B<sub>2</sub>-receptor–null mice. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 600-604, 2003.

ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 48, p. 37524–37532, 2000.

ASTERN, J. M. et al. Myeloperoxidase interacts with endothelial cell-surface cytokeratin 1 and modulates bradykinin production by the plasma Kallikrein-Kinin system. **Am. J. Pathol.**, v. 171, n. 1, p. 349–360, 2007.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 42–47, 2004.

BÄUMER, A. T. et al. The NAD(P)H oxidase inhibitor apocynin improves endothelial NO/superoxide balance and lowers effectively blood pressure in spontaneously hypertensive rats: comparison to calcium channel blockade. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 29, n. 5, p. 287-299, Jul. 2007.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol. Rev.**, v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Anal. Biochem.**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BESWICK, R. A. et al. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. **Hypertension**, v. 38, p. 1107-1111, 2001.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v. 49, n. 2, Suppl. 1, p. 3-8, 2000.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ. J.**, v. 5, n. 1, p.9-19, 2012.

BISWAS, S. K. et al. Hypertension increases pro-oxidant generation and decreases antioxidant defense in the kidney in early diabetes. **Am. J. Nephrol.**, v. 28, n. 1, p. 133-142, 2008.

BODIN, P. et al. High sensitivity of hypertensive aortic myocytes to norepinephrine and angiotensin. **Am. J. Physiol.**, v. 264, n. 2, pt. 1, p. C441–C445, 1993.

BOHR, D. F.; DOMINICZAK, A. F.; WEBB, R. C. Pathophysiology of the vasculature in hypertension. **Hypertension**, v. 18, n. 5, sup., p. III69-III75, 1991.

BOLTERMANN, R. J. et al. Effects of captopril on the renin angiotensin system, oxidative stress, and endothelin in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 943-947, 2005.

BOULOUMIE, A. et al. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. **Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 934–941, 1997.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. **FEBS Lett.**, v. 54, n. 3, p. 311–314, 1975.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ. Res.**, v. 87, n. 10, p. 840-844, 2000.

CAREY, R. M. Update on angiotensin AT2 receptors. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 26, n. 2, p. 91-96, 2017.

CARRETERO, O. A.; OPARIL, S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. **Circulation**, v. 101, n. 3, p. 329-335, 2000.

CAT, A. N. D. et al. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 19, n. 10, p. 1110-1120, 2013.

CHUNG, O. et al. Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors. **Kidney Int. Suppl.**, v. 67, p. S95–S99, 1998.

CIFUENTES, M. E. et al. Upregulation of p67(phox) and gp91(phox) in aortas from angiotensin II-infused mice. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 279, n. 5, p. H2234–H2240, 2000.

CLUBB JÚNIOR, F. J. et al. Myocardial cell growth and blood pressure development in neonatal spontaneously hypertensive rats. **Lab. Invest.**, v. 56, n. 2, p. 189-197, 1987.

COSTA, C. A. et al. Antioxidant treatment with tempol and apocynin prevents endothelial dysfunction and development of endovascular hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v. 22, n. 12, p. 1242-1249, Dec. 2009.

DAO, V. T. et al. Nitric oxide up-regulates endothelial expression of angiotensin II type 2 receptors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 112, p. 24-36, 2016.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **J. Hypertens.**, v. 18, n. 6, p. 655-673, 2000.

DICKHOUT, J. G.; LEE, R. M. K. W. Structural functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 29, n. 3, p. 781-789, 1997.

DIKALOVA, A. E. et al. Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium dependent relaxation via eNOS uncoupling. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 299, n. 3, p. H673-679, 2010.

DOUGLAS, G. et al. Endothelial-specific Nox2 overexpression increases vascular superoxide and macrophage recruitment in ApoE<sup>-/-</sup> mice. **Cardiovasc. Res.**, v. 94, n. 1, p. 20–29, 2012.

DRUMMOND, G. R. et al. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 10, n. 6, p. 453–471, 2011.

EL MABROUK, M.; TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Differential ANG II-induced growth activation pathways in mesenteric artery smooth muscle cells from SHR. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 281, n. 1, p. H30-39, 2001.

ELMARAQBY, A. A. et al. NADPH oxidase inhibition attenuates oxidative stress but not hypertension produced by chronic ET-1. **Hypertension**, v. 45, n. 2, p. 283–287, 2005.

EL-SAWALHI, M. M.; AHMED, L. A. Exploring the protective role of apocynin, a specific NADPH oxidase inhibitor, in cisplatin-induced cardiotoxicity in rats. **Chem. Biol. Interact.**, v. 207, p. 58–66, 2014.

FENG, W. et al. Apocynin attenuates angiotensin II-induced vascular smooth muscle cells osteogenic switching via suppressing extracellular signal-regulated kinase 1/2. **Oncotarget**, v. 7, n. 50, p. 83588-83600, 2016.

FÖRSTERMANN, U.; BOISSEL, J. P.; KLEINERT, H. Expressional control of the "constitutive" isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **FASEB J.**, v. 12, n. 10, p. 773-790, 1998.



FUJII, A. et al. Role of gp91phox containing NADPH oxidase in the deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 552, n.1-3, p. 131–134, 2006.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GALLE, J. et al. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. **Atherosclerosis**, v. 185, n. 2, p. 219–226, 2006.

GIROUARD, H. et al. Angiotensin II attenuates endothelium-dependent responses in the cerebral microcirculation through nox-2-derived radicals. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 26, n. 4, p. 826–832, 2006.

GORREN, A. C. et al. Tetrahydrobiopterin as combined electron/proton donor in nitric oxide biosynthesis: cryogenic UV-Vis and EPR detection of reaction intermediates. **Methods Enzymol.**, v. 396, p. 456–466, 2005.

GRIENGLING, K. K. et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, v. 74, n. 6, p. 1141-1148, 1994.

GRISHKO, V. et al. Apoptotic cascade initiated by angiotensin II in neonatal cardiomyocytes: role of DNA damage. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 285, n. 6, p. H2364-H2372, 2003.

GUZIK, T. J. et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 105, n. 14, p. 1656–1662, 2002.

GUZIK, T. J.; GRIENGLING, K. K. NADPH oxidases: molecular understanding finally reaching the clinical level? **Antioxid. Redox Signal.**, v. 11, n. 10, p. 2365–2370, 2009.

GUZIK, T. J.; HARRISON, D. G. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. **Drug Discov. Today**, v. 11, n. 11-12, p.524-533, 2006.

GYLLENHAMMAR, H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. **J. Immunol. Methods**, v. 97, n. 2, p. 209-213, Mar 1987.

HAMILTON, C. A. et al. Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease. **Clin. Sci.**, v. 106, n. 3, p. 219–234, 2004.

HAYASHI, T. et al. NADPH oxidase inhibitor, apocynin, restores the impaired endothelial-dependent and independent responses and scavenges superoxide anion in rats with type 2 diabetes complicated by NO dysfunction. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 7, n. 4, p. 334-343, Jul. 2005.

HEUMÜLLER, S. et al. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 211–217, 2008.

HIGASHI, Y.; KIHARA, Y.; NOMA, K. Endothelial dysfunction and hypertension in aging. **Hypertens. Res.**, v. 35, n. 11, p. 1039–1047, 2012.

HU, L. et al. Apocynin but not L-arginine prevents and reverses dexamethasone-induced hypertension in the rat. **Am. J. Hypertens.**, v. 19, n. 4, p. 413-418, 2006.

IYER, G. Y. N.; ISLAM, D. M. F.; QUASTEL, J. H. Biochemical aspects of phagocytosis. **Nature**, v. 192, p. 535–542, 1961.

JAMESON, M. et al. Endothelium-derived contracting factors in resistance arteries of young spontaneously hypertensive rats before development of overt hypertension. **Hypertension**, v. 21, n. 3, p.280-288, 1993.

JOHNSON, D. K. et al. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. **Endothelium**, v. 9, n. 3, p. 191-203, 2002.

JUNG, O. et al. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. **Circulation**, v. 109, n. 14, p. 1795–1801, 2004.

KEMP, B. A. et al. AT2 receptor activation prevents sodium retention and reduces blood pressure in angiotensin ii-dependent hypertension. **Circ. Res.**, v. 119, n. 4, p. 532-543, 2016.

KINKADE, K.; STREETER, J.; MILLER JÚNIOR, F. J. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin attenuates progression of atherosclerosis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 8, p. 17017-17028, 2013.

KITIYAKARA, C.; WILCOX, C. S. Antioxidants for hypertension. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 7, n. 5, p. 531-538, 1998.

LASSÈGUE, B.; CLEMPUS, R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 285, n. 2, p. R277–R297, 2003.

LASSÈGUE, B.; GRIENDLING, K. K. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 30, n. 4, p. 653–661, 2010.

LASSÈGUE, B.; SAN MARTÍN, A.; GRIENDLING, K. K. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. **Circ. Res.**, v. 110, n. 10, p. 1364-1390, 2012.

LAUER, T. et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 22, p. 12814-12819, 2001.

LIANG, C. F. et al. Toll-like receptor 4 mutation protects obese mice against endothelial dysfunction by decreasing NADPH oxidase isoforms 1 and 4. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 33, n. 4, p. 777-784, 2013.

LING, W. C. et al. Treatment with salvianolic acid B restores endothelial function in angiotensin II-induced hypertensive mice. **Biochem. Pharmacol.**, 2017. No prelo.

LIU, Y. et al. Apocynin attenuates cardiac injury in type 4 cardiorenal syndrome via suppressing cardiac fibroblast growth factor-2 with oxidative stress inhibition. **J. Am. Heart Assoc.**, v. 4, n. 7, p. e001598, 2015

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LÜ, J. M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 14, p. 840–860, 2010.

LUNDIN, S.; RICKSTEN, S. E.; THORÉN, P. Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. **Acta Physiol. Scand.**, v. 120, n. 2, p. 265-272, 1984.

LYLE, A. N.; GRIENDLING, K. K. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. **Physiology**, v. 21, p. 269–280, 2006.

MACNEE, W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 429, n. 1-3, p. 195-207, 2001.

MALACHIAS, M. V. B. et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 107, n. 3, sup. 3, p. 1-83, 2016.

MARTÍNEZ-REVELLES, S. et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. **Antioxid. Redox Signal**, v. 18, n. 1, p. 51-65, Jan. 2013.

MASSENET, C. et al. Effects of p47phox C terminus phosphorylations on binding interactions with p40phox and p67phox. Structural and functional comparison of p40phox and p67phox SH3 domains. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 14, p. 13752–13761, 2005.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 243, n. 21, p. 5753–5760, 1968.

McINTYRE, M.; BOHR, D. F.; DOMINICZAK, A. F. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. **Hypertension**, v. 34, n. 4, pt. 1, p. 539-545, 1999.

MERAI, R. et al. CDC Grand Rounds: a public health approach to detect and control hypertension. **Morb. Mort. Wkly. Rep.**, v. 65, n. 45, p. 1261-1264, 2016.

MEYER, J. W. et al. Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells: a potential atherogenic source of reactive oxygen species. **Endothelium**, v. 7, n. 1, p. 11–22, 1999.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONTEZANO, A. C. et al. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. **Can. J. Cardiol.**, v. 31, n. 5, p. 631-641, 2015.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 20, n. 1, p. 164-182, 2014.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circ. Res.**, v. 41, n. 1, p. 19–26, 1977.

MYTHRI, R. B. et al. Evaluation of markers of oxidative stress, antioxidant function and astrocytic proliferation in the striatum and frontal cortex of Parkinson's disease brains. **Neurochem. Res.**, v. 36, n. 8, p. 1452–1463, 2011.

NABHA, L. et al. Vascular oxidative stress precedes high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 27, n. 1, p. 71-82, 2005.

NISIMOTO, Y. et al. Activation of NAD(P)H oxidase 1 in tumour colon epithelial cells. **Biochem. J.**, v. 415, n. 1, p. 57–65, 2008.

OELZE, M. et al. Vascular dysfunction in streptozotocin-induced experimental diabetes strictly depends on insulin deficiency. **J. Vasc. Res.**, v. 48, n. 4, p. 275-284, Jan. 2011.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Circ. J.**, v.27, p. 282-293, 1963.

PAGANO, P. J. et al. An NADPH oxidase superoxide- generating system in the rabbit aorta. **Am. J. Physiol.**, v. 268, n. 6, pt. 2, p. H2274–H2280, 1995.

PALIEGE, A. et al. Effect of apocynin treatment on renal expression of expression of COX-2, NOS1, and renin in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 290, p. R694-R700, 2006.

PANZA, J. A. et al. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, n. 1, p. 22-27, 1990.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH Oxidases, Reactive oxygen species, and hypertension clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, v. 31, sup. 2, p. S170-S180, 2008.

PARK, Y. M. et al. Expression of NAD(P)H oxidase subunits and their contribution to cardiovascular damage in aldosterone/salt-induced hypertensive rat. **J. Korean Med. Sci.**, v. 23, n. 6, p. 1039–1045, 2008.

PARK, Y. M. et al. NAD(P)H oxidase inhibitor prevents blood pressure elevation and cardiovascular hypertrophy in aldosterone-infused rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 313, n. 3, p. 812-817, 2004.

PECHANOVÁ, O.; JENDEKOVÁ, L.; VRANKOVÁ, S. Effect of chronic apocynin treatment on nitric oxide and reactive oxygen species production in borderline and spontaneous hypertension. **Pharmacol. Rep.**, v. 61, n.1, p. 116-122, Jan./Feb. 2009.

PERASSA, L. A. **Efeito da apocinina na hipertensão, disfunção endotelial e hipertrofia ventricular esquerda em Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR)**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

PERASSA, L. A. et al. Apocynin reduces blood pressure and restores the proper function of vascular endothelium in SHR. **Vascul. Pharmacol.**, v. 87, p. 38-48, 2016.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **Int. J. Biomed. Sci.**, v. 4, n. 2, p. 89–96, 2008.

PIEHL, L. L. et al. Plasmatic antioxidant capacity due to ascorbate using TEMPO scavenging and electron spin resonance. **Clin. Chim. Acta**, v. 359, n. 1-2, p. 78-88, 2005.

PINTO, Y. M.; PAUL, M.; GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovasc. Res.**, v. 39, n. 1, p. 77-88, 1998.

POTJE, S. R. et al. Hypotensive and vasorelaxant effect of Diapocynin in normotensive rats. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 106, p. 148-157, 2017.

POULTER, N. R.; PRABHAKARAN, D.; CAULFIELD, M. Hypertension. **Lancet**, v. 386, n. 9995, p. 801–812, 2015.

POWELL, S. B.; SEJNOWSKI, T. J.; BEHRENS, M. M. Behavioral and neurochemical consequences of cortical oxidative stress on parvalbumin-interneuron maturation in rodent models of schizophrenia. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p. 1322–1331, 2012.

RAJAGOPALAN, S. et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. **J. Clin. Invest.**, v. 97, n. 8, p. 1916-1923, 1996.

RAY, R. et al. Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 31, n. 6, p. 1368–1376, 2011.

RAY, R.; SHAH, A.M. NADPH oxidase and endothelial cell function. **Clin. Sci.**, v. 109, n. 3, p. 217–226, 2005.

RHEE, S. G. et al. Cellular regulation by hydrogen peroxide. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 14, n. 8, sup. 3, p. S211–S215, 2003.

ROMERO-NAVA, R et al. Changes in protein and gene expression of angiotensin II receptors (AT1 and AT2) in aorta of diabetic and hypertensive rats. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 38, n. 1, p. 56-62, 2016.

ROSSI, F.; ZATTI, M. Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. **Experientia**, v. 20, n. 1, p. 21–23, 1964.

RUIZ-ORTEGA, M. et al. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. **Hypertension**, v. 38, n. 6, p. 1382-1387, 2001.

SABUHI, R.; ASGHAR, M.; HUSSAIN, T. Inhibition of NAD(P)H oxidase potentiates AT2 receptor agonist-induced natriuresis in Sprague-Dawley rats. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 299, n. 4, p. F815-820, 2010.

SARAN, M.; MICHEL, C.; BORS, W. Reactions of NO with O<sub>2</sub><sup>-</sup>: implications for the action of endothelium-derived relaxing factor. **Free Radic. Res. Commun.**, v. 10, n. 4-5, p. 221-226, 1990.



SCHLÜTER, T. et al. Apocynin-induced vasodilation involves Rho kinase inhibition but not NADPH oxidase inhibition. **Cardiovasc. Res.**, v. 80, n. 2, p. 271–279, 2008.

SCHRAMM, A. et al. Targeting NADPH oxidase in vascular pharmacology. **Vasc. Pharmacol.**, v. 56, n. 5-6, p. 216-231, 2012.

SELEMIDIS, S. et al. NADPH oxidases in the vasculature: Molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. **Pharmacol. Ther.**, v. 120, n. 3, p. 254–291, 2008.

SHAERZADEH, F. et al. Antioxidant and antiglycating activities of *Salvia sahendica* and its protective effect against oxidative stress in neuron-like PC12 cells. **J. Nat. Med.**, v. 65, n. 3-4, p. 455–465, 2011.

SHEEHAN, A. L. et al. Role for Nox1 NADPH oxidase in atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 216, n. 2, p. 321–326, 2011.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, n. 3, p. 387–437, 2004.

SIMONS, J. M. et al. Immunodulatory compounds from *Picrorhiza kurroa*: isolation and characterization of two anti-complementary polymeric fractions from an aqueous root extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 26, n. 2, p. 169–182, 1989.

SIMONS, J. M. et al. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 8, n. 3, p. 251–258, 1990.

SIMONYI, A. et al. The neuroprotective effects of apocynin. **Front. Biosci.**, v. 4, p. 2183-2193, 2012.

SINGH, A. et al. Inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells from prehypertensive spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Hypertens.**, v. 9, n. 9, p. 867-877, 1996.

SIRKER, A.; ZHANG, M.; SHAH, A. M. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical. **Basic Res. Cardiol.**, v. 106, n. 5, p. 735–747, 2011.

SIU, K. L.; GAO, L.; CAI, H. Differential roles of NOX1/NOXO1 and NOX2/p47phox in mediating endothelial redox responses to oscillatory and unidirectional laminar shear stress. **J. Biol. Chem.**, v. 291, n. 16, p. 8653-8662, 2016.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: molecular aptitudes. **Mediators Inflamm.**, v. 2008, p. 106507, 2008.

STOLK, J. et al. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy substituted catechol. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 11, n. 1, p. 95–102, 1994.

SUZUKI, H. et al. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. **Hypertension**, v. 25, n. 5, p. 1083-1089, 1995.

SUZUKI, Y. et al. Effect of NADPH oxidase inhibition on endothelial cell ELAM-1 mRNA expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 184, n. 3, p. 1339-1343, May 1992.

TAKENOUCHI, Y. et al. Gender differences in age-related endothelial function in the murine aorta. **Atherosclerosis**, v. 206, n. 2, p. 397–404, 2009.

TANASE, H. Genetic control of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Jikken Dobutsu**, v. 28, n. 4, p. 519-530, 1979.

TAUBMAN, M. B. Angiotensin II: a vasoactive hormone with ever-increasing biological roles. **Circ. Res.**, v. 92, n. 1, p. 9-11, 2003.

TOUYZ, R. M. et al. Role of AT2 receptors in angiotensin ii–stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. **Hypertension**, v. 33, n. 1, pt. 2, p. 366-372, 1999.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertens. Res.**, v. 34, n. 1, p. 5-14, 2011.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Activation of the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger modulates angiotensin II–stimulated Na<sup>+</sup>-dependent Mg<sup>2+</sup> transport in vascular smooth muscle cells in genetic hypertension. **Hypertension**, v. 34, n. 3, p. 442-449, 1999.

TOUYZ, R. M.; YAO, G.; SCHIFFRIN, E. L. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, n. 6, p. 981–987, 2003.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneously) hypertension: man and rat. **Circ. Res.**, v. 48, n. 3, p. 309-319, 1981.

TROIANO, J. A. et al. Decreased reactive oxygen species production and NOX1, NOX2, NOX4 expressions contribute to hyporeactivity to phenylephrine in aortas of pregnant SHR. **Life Sci.**, v. 144, p. 178–184, 2016.

UMANS, J. G.; LEVI, R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 771-790, 1995.

UNGER, B. S.; PATIL, B. M. Apocynin improves endothelial function and prevents the development of hypertension in fructose fed rat. **Indian J. Pharmacol.**, v. 41, n. 5, p. 208-212, 2009.

VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 266, n. 1-2, p. 37-56, 2004.

VANHOUTTE, P. M. Ageing and endothelial dysfunction. **Eur. Heart J. Suppl.**, v. 4, sup. A, p. A8-A17, 2002.

VASQUEZ-VIVAR, J. et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 16, p. 9220–9225, 1998.

VIRDIS, A. et al. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. **J. Hypertens.**, v. 22, n. 3, p. 535–542, 2004.

VIRDIS, A.; GESI, M. TADDEI, S. Impact of apocynin on vascular disease in hypertension. **Vascul. Pharmacol.**, v.87, p. 1-5, 2016.

WALLACE, K. et al. CD4(+) T cells are important mediators of oxidative stress that cause hypertension in response to placental ischemia. **Hypertension**, v. 64, n. 5, p. 1151-1158, 2014.

WEBER, M. A. et al. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. **J. Clin. Hypertens.**, v. 16, n. 1, p. 14-26, 2014.

WILLIAMS, P. J. et al. Expression of AT1R, AT2R and AT4R and their roles in extravillous trophoblast invasion in the human. **Placenta**, v. 31, n. 5, p. 448-455, 2010.

WILLIAMS, H. C.; GRIENGLING, K. K. NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents? **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 50, n. 1, p. 9-16, Jul. 2007.

WITTEWER, J.; HERSBERGER, M. The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 77, n. 2, p. 67–77, 2007.

WU, Z. et al. Maternal treatment of spontaneously hypertensive rats with pentaerythritol tetranitrate reduces blood pressure in female offspring. **Hypertension**, v. 65, n. 1, p. 232-237, 2015.

XIAO, L.; LIU, Y.; WANG, N. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 306, n. 3, p. H317–H325, 2014.

XIMENES, V. F. e al. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 457, n. 2, p. 134–141, 2007.

YE, S.; LOWTHER, S.; STAMBAS, J. Inhibition of reactive oxygen species production ameliorates inflammation induced by influenza A viruses via upregulation of SOCS1 and SOCS3. **J. Virol.**, v. 89, n. 5, p. 2672-2683, 2015.

YOGI, A. et al. Acute ethanol intake induces superoxide anion generation and mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rat aorta: a role for angiotensin type 1 receptor. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 264, p. 470-478, 2012.

YU, J. et al. The role of the methoxyphenol apocynin, a vascular NADPH oxidase inhibitor, as a chemopreventative agent in the potential treatment of cardiovascular diseases. **Curr. Vasc. Pharmacol.**, v. 6, n. 3, p. 204-217, 2008.

ZANGAR, R. C.; DAVYDOV, D. R.; VERMA, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 199, n. 3, p. 316–331, 2004.

ZEMSE, S. M.; HILGERS, R. H.; WEBB, R. C. Interleukin-10 counteracts impaired endothelium-dependent relaxation induced by ANG II in murine aortic rings. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 292, n. 6, p. H3103–H3108, 2007.

ZHANG, K. et al. Apocynin improving cardiac remodeling in chronic renal failure disease is associated with up-regulation of epoxyeicosatrienoic acids. **Oncotarget**, v. 6, n. 28, p. 24699-24708, 2015.

ZHANG, M. et al. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 42, p. 18121–18126, 2010.

**ANEXOS**

## ANEXOS

### Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Mecanismos envolvidos na modulação da biodisponibilidade de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio pela apocinina em ratos espontaneamente hipertensos**", Processo FOA nº 2015-00450, sob responsabilidade de Cristina Antoniali Silva apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 13 de Maio de 2015.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 08 de Agosto de 2017.


**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 08 de Setembro de 2017.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Mechanisms involved on modulation of nitric oxide and reactive oxygen species bioavailability by apocynin in spontaneously hypertensive rats**", Protocol FOA nº 2015-00450, under the supervision of Cristina Antoniali Silva presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 13, 2015.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** August 08, 2017.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** September 08, 2017.

  
**Profa. Dra. Maria Gisela Laranjeira**  
Coordenadora da CEUA  
CEUA Coordinator