

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

**MURILO EDUARDO GRATON**

**PAPEL DO TRATAMENTO CRÔNICO COM APOCININA NA  
BIODISPONIBILIDADE DE ÓXIDO NÍTRICO E GERAÇÃO DE  
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO  
EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

**ARAÇATUBA**

**2022**

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

**MURILO EDUARDO GRATON**

**PAPEL DO TRATAMENTO CRÔNICO COM APOCININA NA  
BIODISPONIBILIDADE DE ÓXIDO NÍTRICO E GERAÇÃO DE  
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO  
EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Tese 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 Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Assoc. Dr<sup>a</sup> Cristina Antoniali Silva

**ARAÇATUBA**

**2022**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Graton, Murilo Eduardo.

G772p      Papel do tratamento crônico com apocinina na bio-  
disponibilidade de óxido nítrico e geração de espécies  
reativas de oxigênio em ratos espontaneamente  
hipertensos / Murilo Eduardo Graton. – Araçatuba, 2022  
118 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Cristina Antoniali Silva

1. Hipertensão 2. Doenças cardiovasculares 3. Estresse  
Oxidativo 5. Ratos endogâmicos SHR I. T.

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 *Strictu Sensu* 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.

**2017/2021:** Curso de Pós-graduação *Strictu Sensu em* Ciências Fisiológicas, Modalidade Doutorado, 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, com período de estágio no exterior na Duke University, School of Medicine, em Durham, Carolina do Norte, Estados Unidos da América.

***DEDICATÓRIA***

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a quatro pessoas.*

*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!*

*Para minha avó, **Aparecida**, por todo seu amor e carinho, que foram sempre essenciais para mim. Seu riso, seu colo e seus conselhos sempre me deram força para continuar.*

*E para minha tia **Eliana**, que nos deixou recentemente, por sempre ter me apoiado e incentivado nos estudos, e estar presente em diferentes etapas importantes na minha vida. Você deixou para trás toda dor e sofrimento e partiu para junto do Pai, mas seu exemplo e seu amor ainda vivem em mim.*

## ***AGRADECIMENTOS***

## **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 dez anos de parceria. A senhora sempre terá minha admiração, carinho e gratidão. Seu exemplo de ser humano, professora e pesquisadora me inspiram. Muito obrigado, por tudo.

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, do meu mestrado e do meu doutorado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de doutorado no país (2017/18436-0) e no exterior (2019/13751-0).

Ao Professor Francis J. Miller da School of Medicine, Duke University, por ter aberto as portas de seu laboratório e ter me recebido durante o período do doutorado sanduíche. Seus ensinamentos, paciência e atenção foram e sempre serão importantes para mim.

A equipe do laboratório do Professor Francis J. Miller na School of Medicine, Duke University, Dra. Beilei Lei, Dra. Simone Sartoreto, Dr. Brandon Schickling, Dra. Jennifer Lucitti, Dra. Franziska Bollman e Sra. Kamie Snow, por todos os ensinamentos e discussões que tivemos no período do doutorado sanduíche.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas da FOA: 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, e Dr. Antonio Hernandes Chaves Neto, Dr. João Callera, Dr. Wilson Garcia e Dra. Rita Dornelles.



Ao grupo de pesquisa da Professora Cristina, Simone Potje, Jéssica Troiano, Mariana Santana, Heitor Ceolin, Jéssica Luíza, Priscila Scarpim, Emily Gonçalves, Andrea Oliveira, Ana Carolina e Jordana Resende.

As professoras presentes em meu Exame Geral de Qualificação, Professora Sandra Oliveira, Professora Ana Nakamune e Professora Roberta Okamoto pelos ensinamentos, compreensão e atenção para com este trabalho.

Aos professores presentes em minha Defesa de Tese, Professora Maria Franco, Professora Simone Potje, Professor Carlos Dias e Professora Graziela Ceravolo pela prontidão em aceitar o convite e pelos ensinamentos compartilhados durante esta etapa tão importante.

As funcionárias e aos funcionários da FOA, Valéria Zagatto, Cristiane Lui, Lilian Mada, Eliseide Navega, Samuel Patim, Camilo, Márcia, João, Ana Cláudia, Ana Paula, Arnaldo, Maria Claudia, Cláudio, Luzia, Denise e Luiz.

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 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 (*in memoriam*)

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 memorian*) 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 pessoas 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 agora Heitor e Martina, pelos conselhos, amizade, incentivos e momentos que passamos juntos.

Aos amigos do Departamento de Ciências Básicas da FOA: Victor Balera, Sabrina Tfaile, Aline Takamyia, Dayane Queiroz, Carla Sipert, Caril, Amaral, Carolina Linjardi, Mariana Souza, Emilly Silva, Flávia Verza, Talita Silva, Sara Mattera, Fernando Chiba, Thaís Tsosura, Ligia Perassa, Ariana Ferreira, Talita Silva, Camila Stringhetta, Fernanda Fernandes, Melise Peres e Noélle Kill, pela amizade e apoio.

Aos meus amigos de Durham e Chapel Hill, Alessandro Jammal, Taciana Albuquerque, Miriam Figueira, Júlia Quintanilha, Priscila Zenóbio, Thiago Cunha, Marina Martins, Vinícius Paiva, Mariana Brackmann, Ali Magine, João Ernani, Daniela Albuquerque, Evandro Barbosa, Thaís Barbosa, Catarina Tonet, Danilo Gomes, Ana Nogueira, Patrícia Farias, Rizzieri Pedruzzi, Camila Caetano, Lilian Clemente, Guilherme Oliveira, Fernando Motta, Karina Boaro, Laura Motta, Alice Motta e Heena Divecha por todos os bons momentos, festas, risadas, comemorações que tivemos juntos. Um ano longe de casa foi mais fácil com todos vocês. Um agradecimento

especial a Simone Sartoretto, você foi e é essencial, e talvez sem você eu não teria conseguido.

Aos meus amigos Yago Silva, Jeferson Alves, Odair Moura, Lucas Biagini, Débora Cavalcante, João Carlos, e Bruno Daniel pelos bons momentos.

Aos meus amigos Amanda Gomes, Victor Balera e Fernanda Demarqui por todos os momentos de diversão e alegria que passamos juntos.

Aos amigos da ETEC, Brenda Longhini, Henrique Custódio, Michelle Ramos, Gabriela Reis, Leonardo Belchior, e agora o Frederico, 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!

***EPÍGRAFE***

## EPÍGRAFE

*Equilíbrio e bom senso,  
eis o segredo da vida.  
(Eliaza M. Z. Pegoraro)*

GRATON, M. E. **Papel do tratamento crônico com apocinina na biodisponibilidade de óxido nítrico e geração de espécies reativas de oxigênio em ratos espontaneamente hipertensos.** 2022. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

## RESUMO

A enzima NAD(P)H oxidase (NOX) é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO) no sistema cardiovascular. A produção exacerbada de ERO associada com a redução da capacidade antioxidante pode levar ao estresse oxidativo, que pode causar a hipertensão arterial, principal fator para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares que são a principal causa de morte no mundo. Devido a essa importância, nossas ferramentas e abordagens terapêuticas são necessárias para auxiliar no controle e desenvolvimento da hipertensão arterial e suas complicações. Na primeira parte deste trabalho foram avaliados os efeitos dos tratamento crônico com apocinina em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) na produção de óxido nítrico (NO) e na geração de espécies reativas de oxigênio, bem como a eliminação destas espécies por parte dos sistemas antioxidantes. Na segunda parte deste trabalho, foram avaliadas as características antioxidantes e inibidoras de NOX da apocinina, e de um outro potencial candidato terapêutico, o ácido protocatecuico. Ambos estudos reforçam o potencial uso da apocinina como possível candidato para o tratamento de doenças cardiovasculares onde o estresse oxidativo é um dos principais alvos terapêuticos.

**Palavras-chave:** Apocinina. Hipertensão Arterial. Doença cardiovascular. Estresse Oxidativo. Ratos Espontaneamente Hipertensos.

GRATON, M. E. **Role of the chronic treatment with apocynin on the nitric oxide bioavailability and the reactive oxygen species generation in spontaneously hypertensive rats.** 2022. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

## **ABSTRACT**

NAD(P)H oxidases (NOX) enzymes are the major source of reactive oxygen species (ROS) in the cardiovascular system. The overproduction of ROS associated to the reduction of the antioxidant capacity lead to oxidative stress, which may cause hypertension, major risk factor for cardiovascular diseases which are the leading causes of death worldwide. Due to this importance, new therapeutical tools and approaches are need to control the development of hypertension and its complications. In the first part of this study, the effects of the chronic treatment with apocynin in spontaneously hypertensive rats (SHR) were evaluated on the nitrix oxide (NO) production and on the generation of ROS, as well the elimination of these species by the antioxidant systems. In the second part, the antioxidant and NOX inhibitory properties of apocynin were evaluated and compared to another potential therapeutical candidate, protocatechuic acid. Both studies suggest the potential use of apocynin as new candidate for the treatment of cardiovascular diseases where oxidative stress play an important role as therapeutical target.

**Keywords:** Apocynin. Hypertension. Cardiovascular disease. Oxidative stress. Spontaneously hypertensive rat.

## 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

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

CaCl<sub>2</sub> – cloreto de cálcio

Cav – caveolina

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

FGF-β – 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

Hsp90 – proteína de choque térmico 90

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<sub>2</sub><sup>-</sup> – ânion superóxido

O<sub>2</sub> – oxigênio molecular

°C – graus Celsius

OH<sup>-</sup> – radical hidroxil

ONOO<sup>-</sup> – peroxinitrito

PAS – pressão arterial sistólica

pD2 – logaritmo negativo da EC50

pH – potencial hidrogeniônico

RIPA – tampão para ensaio de radioimunoprecipitação

R-O<sup>-</sup> – 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-β1 – fator transformador de crescimento beta um

TNF-α – 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

α – alfa

β – beta

ΔPAM – variação da pressão arterial média

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 Estrutura química da apocinina (A) e do ácido protocatecuico (B). 62
- Figura 1.2 Capacidade antioxidante, em mmol/L FeSO<sub>4</sub>, de apocinina (círculos) e ácido protocatecuico (quadrados), nas concentrações de 0,1 nmol/L a 1 mmol/L. 62
- Figura 1.3 Determinação da porcentagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em nmol/mg de proteína, em anéis de aorta não estimulados (Controle, barras brancas), ou estimulados (100 µmol/L) com apocinina (barras pretas) ou protocatecuicos ácido (barras cinzas de ratos Wistar (A) e SHR (B). 65
- Figura 1.4 Porcentagem de quimioluminescência de lucigenina, em unidades de luz relativa (URL)/mg de proteína, em anéis de aorta não estimulados (Controle, barras brancas) ou estimulados (100 µmol/L) com apocinina (barras pretas) ou ácido protocatecuico (cinza barras de ratos Wistar (A) e SHR (B). 67
- Figura 1.5 Concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO), em unidades arbitrárias, em células endoteliais da veia umbilical humana. A intensidade de fluorescência foi detectada pela sonda dihidroetídio (DHE) sensível a ERO em células não estimuladas (Controle, barra branca) ou estimuladas (100 µmol/L) com apocinina (barra preta) ou ácido protocatecuico (barra cinza). 69
- Figura 1.6 Concentração de óxido nítrico (NO), em unidades arbitrárias, em células endoteliais da veia umbilical humana. A intensidade de fluorescência foi detectada pela sonda NO-sensível diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA) em células não estimuladas (Controle, barra branca) ou estimuladas (100 µmol/L) com apocinina (barra preta) ou ácido protocatecuico (barras cinza). 70

- Figura 1.7 Curvas cumulativas de concentração-efeito para fenilefrina (0,1 nmol/L – 100  $\mu$ mol/L) em anéis de aorta de ratos Wistar (A) e SHR (B) pré-incubados (100  $\mu$ mol/L) com apocinina (círculos pretos) ou protocatecuicos ácido (quadrados pretos) ou não incubados (Controle, quadrados brancos). 72
- Figura 1.8 Curvas cumulativas de concentração-efeito para acetilcolina (0,1 nmol/L – 100  $\mu$ mol/L) em anéis de aorta de ratos Wistar (A) e SHR (B) pré-incubados (100  $\mu$ mol/L) com apocinina (círculos pretos) ou ácido protocatecuico (quadrados pretos) ou não incubados (Controle, quadrados brancos). 74
- Figura 2.1 Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS, B), da eNOS fosforilada no resíduo de serina 1177 (p-eNOS ser1177, C) e a relação p-eNOS ser1177/ eNOS em homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar (barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR Tratado (barras pretas) com apocinina (30 mg/Kg). 36
- Figura 2.2 Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, B), da da óxido nítrico sintase induzível (iNOS, C) em homogenatos de artéria aorta de ratos Wistar (barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR Tratado (barras pretas) com apocinina (30 mg/Kg). 37
- Figura 2.3 Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, B), da da óxido nítrico sintase induzível (iNOS, C) em homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar (barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR Tratado (barras pretas) com apocinina (30 mg/Kg). 39
- Figura 2.4 Níveis plasmáticos de nitrato/nitrito, em nmol/mL, de ratos Wistar (barra branca), SHR (barra cinza) e SHR Tratado (barra preta) com apocinina (30 mg/Kg). Valores representam média  $\pm$  EPM, n = 5-6. \*p<0,05 entre SHR versus Wistar e SHR Tratado. 41
- Figura 2.5 Autorradiografias típicas e expressão proteica, em unidades arbitrárias, da guanilato ciclase solúvel (GCs) subunidades alfa 42

(GCs- $\alpha$ , B) e beta (GCs- $\beta$ , C) em homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar (barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR Tratado (barras pretas) com apocinina (30 mg/Kg).

- Figura 2.6 Autorradiografias típicas e expressão proteica, em unidades 45  
arbitrárias, da NOX1 (A), NOXO1 (B), NOX2 (C), p47phox (D) e  
NOX4 (E) em homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar  
(barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR Tratado (barras  
pretas) com apocinina (30 mg/Kg).
- Figura 2.7 Produção de ERO dependente de NOX detectada pela 47  
quimioluminescência da lucigenina, em unidades relativas de  
luz (URL)/ mg proteína, em homogenatos de leito mesentérico  
de ratos Wistar (barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR  
Tratado (barras pretas) com apocinina (30 mg/Kg).
- Figura 2.8 Níveis de espécies reativas ao ácido 2-tibarbitúrico 48  
(malondialdeído), em mmol/L/ mg de proteína, em homogenatos  
de leito mesentérico de ratos Wistar e SHR não tratados (barras  
brancas) e tratados com apocinina (barras pretas) 30 mg/Kg.
- Figura 2.9 Capacidade antioxidante, em mmol/L FeSO<sub>4</sub>/ mg de proteína, 49  
em homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar e SHR  
não tratados (barras brancas) e tratados com apocinina (barras  
pretas) 30 mg/Kg.
- Figura 2.10 50  
Níveis de ácido úrico, em mg/ mL de ácido úrico/ mg de proteína,  
em homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar e SHR  
não tratados (barras brancas) e tratados com apocinina (barras  
pretas) 30 mg/Kg.
- Figura 2.11 Expressão proteica, em unidades arbitrárias, da Bach1 em 51  
homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar e SHR não  
tratados (barras brancas) e tratados com apocinina (barras  
pretas) 30 mg/Kg.

Figura 2.12 Expressão proteica, em unidades arbitrárias, da Proteína 52 Associada Kelch Like ECH 1 (Keap1) em homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar e SHR não tratados (barras brancas) e tratados com apocinina (barras pretas) 30 mg/Kg.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.1 Atividade sequestrante de radicais livres dos compostos estudados. 42
- Tabela 2.1 Diluições dos anticorpos primários e secundários utilizados nos experimentos de Western Blotting. 71

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	25
1.1 INTRODUÇÃO .....	28
1.2 OBJETIVOS .....	31
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
1.3.1 Animais .....	33
1.3.2 Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos .....	33
1.3.3 Ensaio de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) .....	33
1.3.4 Ensaio de Trieno Autooxidável Conjugado (CAT) .....	34
1.3.5 Ensaio de eliminação de radicais DPPH .....	34
1.3.6 Tratamento dos anéis de aorta .....	35
1.3.7 Determinação da lipoperoxidação .....	35
1.3.8 Detecção da produção de ânion superóxido .....	35
1.3.9 Medição de [ERO] e [NO] em HUVEC.....	36
1.3.10 Reatividade vascular.....	36
1.3.10.1Avaliação dos efeitos de compostos fenólicos na contração induzida por fenilefrina .....	37
1.3.10.2Avaliação dos efeitos de compostos fenólicos no relaxamento induzido por acetilcolina .....	37
1.3.11 Drogas e reagentes .....	37
1.3.12 Análise estatística .....	38
1.4 RESULTADOS .....	40
1.4.1 Capacidade antioxidante dos compostos estudados.....	40
1.4.2 Avaliação da capacidade de eliminação direta de radicais livres e do efeito inibitório sobre a NOX.....	41
1.4.3 Apocinina e ácido protocatecuico podem diminuir biomarcadores de estresse oxidativo em SHR .....	42
1.4.4 Ambos compostos podem diminuir a produção de ERO nas aortas .....	45
1.4.5 A concentração de ERO é diminuída em HUVEC.....	46
1.4.6 A concentração de NO• é aumentada em HUVEC.....	47
1.4.7 Efeito dos compostos na contração induzida por fenilefrina .....	48



1.4.8 Relaxamento induzido por acetilcolina em aortas incubadas com os compostos .....	51
1.5 DISCUSSÕES .....	54
1.6 CONCLUSÕES .....	58
CAPÍTULO 2 .....	60
CAPÍTULO 2 .....	62
2.1 Introdução.....	62
2.2 OBJETIVOS .....	67
2.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	69
2.3.1 Animais .....	69
2.3.2 Tratamento.....	69
2.3.3 Preparo do homogenatos .....	70
2.3.4 Dosagem de Proteínas .....	70
2.3.5 Western Blotting.....	70
2.3.6 Determinação dos níveis de nitrato/nitrito.....	72
2.3.7 Análise Estatística.....	73
2.3.8 Drogas e Reagentes .....	73
2.4 RESULTADOS .....	75
2.4.1 A apocinina não altera a expressão de eNOS em leitos mesentéricos de SHR .....	75
2.4.2 A apocinina não altera a expressão da nNOS e da iNOS em aortas de SHR .....	76
2.4.3 A apocinina não altera a expressão da nNOS e da iNOS em leitos mesentéricos de SHR.....	78
2.4.4 Os níveis plasmáticos de nitrato/ nitrito são aumentados pelo tratamento crônico com apocinina .....	80
2.4.5 A apocinina não altera a expressão das subunidades $\alpha$ e $\beta$ da GCs .....	80
2.4.6 A expressão aumentada de NOX2 e p47phox é reduzida em artérias mesentéricas de SHR tratados com apocinina.....	82
2.4.7 A produção de ERO dependente de NOX é reduzida pelo tratamento com apocinina em SHR.....	84
2.4.8 O tratamento com apocinina reduziu o marcador de dano oxidativo em leito mesentérico de SHR.....	84

2.4.9 O tratamento com apocinina reduziu a capacidade antioxidante total em leito mesentérico de SHR tratados com apocinina .....	85
2.4.10 Os níveis de ácido úrico são reduzidos pelo tratamento com apocinina em SHR	86
2.4.11 O tratamento com apocinina não altera a via de sinalização do Nrf-2 .....	87
2.5 DISCUSSÕES .....	91
2.6 CONCLUSÕES .....	96
REFERÊNCIAS .....	98
ANEXOS .....	114
ANEXO 1. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – Capítulo 1. ....	115
ANEXO 2. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – Capítulo 2. ....	116

# ***CAPÍTULO I***

## **CAPÍTULO 1**

Neste primeiro capítulo desta tese, serão apresentados os resultados obtidos pela avaliação dos efeitos agudos da apocinina, em comparação ao ácido protocatecuico.

## ***INTRODUÇÃO***

## 1.1 INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são metabólitos do oxigênio molecular como resultado do metabolismo celular normal e são moléculas sinalizadoras essenciais que regulam vários processos fisiológicos, como ativação de fatores de transcrição, fosforilação de quinases, genes de defesa do hospedeiro e mobilização de sistemas de transporte de íons (SCHRAMM et al., 2012; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004). No entanto, a superprodução de ERO causa modificações adversas em macromoléculas, e estão envolvidas no desenvolvimento de diversas doenças. O desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor de oxidantes é chamado de estresse oxidativo (BIRBEN et al., 2012). O estresse oxidativo contribui para muitas condições patológicas, como a hipertensão (RODRIGO; GONZÁLEZ; PAOLETTO, 2011).

No sistema vascular, em condições fisiológicas as ERO regulam a função endotelial e o tônus vascular, mas em situações patológicas, as ERO têm um papel importante na angiogênese e rarefação, inflamação, hipertrofia, proliferação, migração, fibrose, remodelação vascular e disfunção endotelial associada à hipertensão (TOUYZ; BRIONES, 2011).

Durante a hipertensão, além dos processos multifatoriais que levam à elevação da pressão arterial (interação entre múltiplos sistemas de órgãos, muitos genes, estímulos ambientais, ativação do sistema renina-angiotensina, inflamação e outros) (TOUYZ; BRIONES, 2011), o estresse oxidativo contribui para a produção excessiva de ERO, diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO•) e diminuição da capacidade antioxidante (SEDEEK et al., 2009).

Existem duas maneiras para a eliminação de ERO. A primeira é a sua eliminação pela estimulação de sistemas antioxidantes endógenos ou pela administração de antioxidantes. A segunda é mais complexa e envolve a inibição de enzimas que catalisam a produção de ERO (SCHRAMM et al., 2012). As NAD(P)H oxidases (NOX) são a principal fonte de ERO nos tecidos vasculares (DIKALOV et al., 2014). A família NOX compreende sete isoformas, cada uma baseada em uma subunidade catalítica central distinta, e todas elas usam NADPH como doador de elétrons e catalisam a transferência de elétrons para o oxigênio molecular para gerar o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (SIRKER; ZHANG; SHAH, 2011b).

Várias abordagens para superar o estresse oxidativo na parede vascular têm sido estudadas como um possível tratamento para a hipertensão (SCHRAMM et al., 2012), e os compostos apocinina e ácido protocatecuico são candidatos.

A apocinina é uma acetofenona extraída inicialmente dos extratos da raiz da erva medicinal *Picrorhiza kurroa* nas montanhas do Himalaia (PETRÔNIO et al., 2013). Nosso grupo estudou os efeitos da apocinina e da geração de ERO. Em aortas de ratos Wistar, a apocinina promoveu um efeito hipotensor de longa duração, e foi mais potente induzindo relaxamento dependente e independente do endotélio do que seu dímero ativo, a diapocinina (POTJE et al., 2017b). Além disso, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), o tratamento crônico com apocinina reduziu a pressão arterial e biomarcadores de estresse oxidativo, reverteu a disfunção endotelial (PERASSA et al., 2016), aumentou a produção de NO• e reduziu a geração de ROS nos vasos sanguíneos de SHR (GRATON et al., 2019). A apocinina tem um mecanismo de ação controverso. Alguns estudos sugerem que seus efeitos dependem apenas de suas propriedades antioxidantes (HEUMÜLLER et al., 2008), enquanto outros estudos implicam sua capacidade de inibir NOX em células fagocitárias (SIMONS et al., 1990) e cardiovasculares (EL-SAWALHI; AHMED, 2014).

O ácido protocatecuico é um ácido fenólico de ocorrência natural, amplamente distribuído e presente na maioria das plantas comestíveis utilizadas na medicina popular, sendo um dos componentes biologicamente ativos de algumas plantas medicinais. Há evidências de que reduz o risco de doenças cardiovasculares devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e de radicais livres (SEMAMING et al., 2015).

***OBJETIVOS***



## 1.2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi estudar as propriedades antioxidantes e/ou inibidoras de NOX da apocinina em comparação com o ácido protocatecuico.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

## **1.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, aprovou todos os procedimentos utilizados neste estudo (Processo CEUA FOA 2016-00130).

### **1.3.1 Animais**

Este estudo utilizou ratos machos SHR de três meses de idade com pressão arterial sistólica (PAS) > 150 mmHg. Ratos Wistar da mesma idade (PAS < 110 mmHg) foram usados como controle normotenso. A PAS foi avaliada por pletismografia de cauda (PowerLab, ADInstruments, Austrália). Os animais foram alojados em ambiente termoneutro ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) em ciclo claro/escuro de 12 a 12 horas, com livre acesso a ração padrão e água. Ao atingir a idade de três meses, todos os animais foram utilizados nos experimentos descritos abaixo.

### **1.3.2 Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos**

A capacidade antioxidante dos compostos em solução foi medida pelo ensaio de poder antioxidante redutor férrico (FRAP), um método baseado na redução do complexo férrico tripiridiltriazina a  $\text{Fe}^{2+}$  em meio ácido (BENZIE; STRAIN, 1996). A apocinina e o ácido protocatecuico foram diluídos primeiro em dimetilsulfóxido e depois diluídos em água deionizada de 0,1 nmol/L a 1 mmol/L. Vinte microlitros (20  $\mu\text{L}$ ) de cada amostra, em duplicata, foram incluídos na solução de trabalho (composição, em mmol/L: tampão acetato 300,0; 2,4,6-tripiridil-s-triazina 10,0;  $\text{FeCl}_3$  20,0; 10:1 :1, pH 3,6, respectivamente). Após 30 min de incubação a  $37^\circ\text{C}$  no escuro, a absorbância foi estimada em 595 nm (Biotek, EUA). Os resultados foram expressos em mmol/L  $\text{FeSO}_4$ ; uma curva padrão de  $\text{FeSO}_4$  foi usada.

### **1.3.3 Ensaio de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)**

Os valores ORAC dos compostos estudados foram estimados conforme descrito anteriormente com modificações (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001).

Resumidamente, as misturas de reação (volume final de 200  $\mu\text{L}$ ) foram compostas por 130  $\mu\text{L}$  de fluoresceína (110 nmol/L), 50  $\mu\text{L}$  de AAPH (80 mmol/L) e 20  $\mu\text{L}$  de compostos testados ou Trolox (antioxidante de referência) ou PBS (controle). Todas as soluções foram preparadas em PBS. A reação foi incubada a 37 °C e a intensidade de fluorescência (470/520 nm) lida em intervalos de 5 min por 2,5 horas usando um leitor de placas (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek, EUA). Os valores de  $(F/F_0)$  foram plotados em função do tempo, e a integração da área sob a curva (AUC) medida e empregada para obter valores ORAC, de acordo com a seguinte equação:  $\text{ORAC} = ((\text{composto testado AUC} - \text{controle AUC})/(\text{AUC Trolox} - \text{controle AUC})) \times ([\text{Trolox}]/[\text{composto testado}])$ . Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores ORAC foram expressos como equivalentes de Trolox, que é a concentração de Trolox que causa o mesmo efeito dos compostos testados.

#### **1.3.4 Ensaio de Trieno Autooxidável Conjugado (CAT)**

Os valores de CAT dos compostos estudados foram estimados conforme descrito anteriormente com modificações leves (LAGUERRE et al., 2008). Resumidamente, as misturas de reação (volume final de 250  $\mu\text{L}$ ) foram compostas por 50  $\mu\text{L}$  de suspensão de óleo de Tung, 50  $\mu\text{L}$  de AAPH (5 mmol/L) e 50  $\mu\text{L}$  de compostos testados ou Trolox (antioxidante de referência) ou PBS (controle). Todas as soluções foram preparadas em PBS. As misturas de reação foram incubadas a 37 °C e a absorbância (273 nm) lida em intervalos de 5 min por 3 horas usando um leitor de placas (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek, EUA). Os valores de  $(A/A_0)$  foram plotados em função do tempo e a integração da área sob a curva (AUC) medida e empregada para obter os valores de CAT, de acordo com a seguinte equação:  $\text{CAT} = ((\text{composto testado AUC} - \text{AUC controle})/(\text{AUC Trolox} - \text{controle AUC})) \times ([\text{Trolox}]/[\text{composto testado}])$ . Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores de CAT foram expressos como equivalente de Trolox (TE). A emulsão foi preparada misturando 5 mg de óleo de Tung (sem remoção de tocoferóis) em 50 mL de PBS contendo 17  $\mu\text{mol/L}$  Brij 35. A solução foi vigorosamente agitada para produzir uma emulsão homogênea.

#### **1.3.5 Ensaio de eliminação de radicais DPPH**

As misturas de reação foram compostas por 50 µL de radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil (DPPH, 800 µmol/L) na ausência (controle) ou na presença de 50 µL dos compostos estudados, e o volume completado para 200 µL com etanol. As misturas de reação foram incubadas no escuro e a absorbância (517 nm) lida após 30 min usando um leitor de placas (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek, EUA). Todas as soluções foram preparadas em etanol. A capacidade de eliminação foi calculada usando a seguinte equação: % de eliminação = ((absorbância do controle – absorbância do composto estudado)/(absorbância do controle)) x 100. Os resultados foram expressos como 50% de concentração efetiva (EC<sub>50</sub>), de acordo com (SARONI ARWA et al., 2015). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### **1.3.6 Tratamento dos anéis de aorta**

Os animais foram decapitados após serem anestesiados com isoflurano em câmara saturada. A aorta torácica foi removida, colocada em uma placa de Petri contendo solução de Krebs (mmol/L: NaCl 130,0; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 14,9; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 5,5; CaCl<sub>2</sub> 1,6; pH 7,4), dissecada e cortada em anéis de 4 mm. Os anéis foram colocados por 30 min em solução de Krebs, 37°C, borbulhados (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) não incubados (Controle) ou incubados com apocinina ou ácido protocatecuico, 100 µmol/L. Os anéis foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até os experimentos. Este procedimento foi realizado para experimentos de quimioluminescência TBARS e lucigenina.

### **1.3.7 Determinação da lipoperoxidação**

A lipoperoxidação nos anéis aórticos foi avaliada pela concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando-se um kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Cayman, EUA). Os tecidos foram macerados individualmente em tampão RIPA e inibidor de protease e depois centrifugados a 1600×g, por 10 min a 4°C. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

### **1.3.8 Detecção da produção de ânion superóxido**

O ensaio de quimioluminescência da lucigenina foi utilizado para determinar a produção do ânion superóxido nos anéis incubados com os compostos estudados. A luminescência foi medida em luminômetro (Orion II, Berthold Detection Systems, Alemanha), e os resultados foram expressos como unidades de luz relativa (URL)/mg de proteína.

### **1.3.9 Medição de [ERO] e [NO] em HUVEC**

As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foram adquiridas das linhas celulares ATCC (EUA). As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com soro bovino fetal (FBS) 10% e usado nas passagens 4-6. Após privação do soro em meio de cultura por 12 h, as células confluentes ( $10^4$  células/poço) foram incubadas com apocinina ou ácido protocatecuico a 100  $\mu\text{mol/L}$  ou não (controle) por 12 h. Em seguida, as células foram incubadas com as sondas de fluorescência DHE (seletiva para ERO, 2,5  $\mu\text{mol/L}$ ), ou DAF-2DA (seletiva para  $\text{NO}^\bullet$ , 5  $\mu\text{mol/L}$ ), por 30 minutos. As análises fluorométricas foram realizadas em um espectrofluorômetro (BioTeK®) equipado com uma lâmpada de Xenon de 150 Watts (Excitação/Emissão, em nm: DHE 405/570 e DAF-2DA 488/530).

### **1.3.10 Reatividade vascular**

Os animais foram decapitados após serem anestesiados com isoflurano em câmara saturada. A aorta torácica foi removida, colocada em placa de Petri contendo solução de Krebs fria, dissecada e cortada em anéis de 4 mm. Os anéis foram colocados entre dois ganchos de aço inoxidável conectados a um transdutor de força isométrica (Letica Scientific Instruments, Espanha), mantidos por 60 min de um período de estabilização, em solução de Krebs, 37°C, pH 7,4, 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. Os anéis foram esticados até uma tensão de repouso de 2,0 g, a integridade funcional dos anéis foi testada com KCl 120 mmol/L e os anéis que contraíram  $\geq 1,5$  g foram considerados viáveis e utilizados para o estudo. A integridade do endotélio foi testada por relaxamento com acetilcolina (ACh, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) após contração induzida com fenilefrina (PE, 1  $\mu\text{mol/L}$ ) e apenas anéis com relaxamento  $\geq 70\%$  foram usados nos protocolos seguintes.

### **1.3.10.1 Avaliação dos efeitos de compostos fenólicos na contração induzida por fenilefrina**

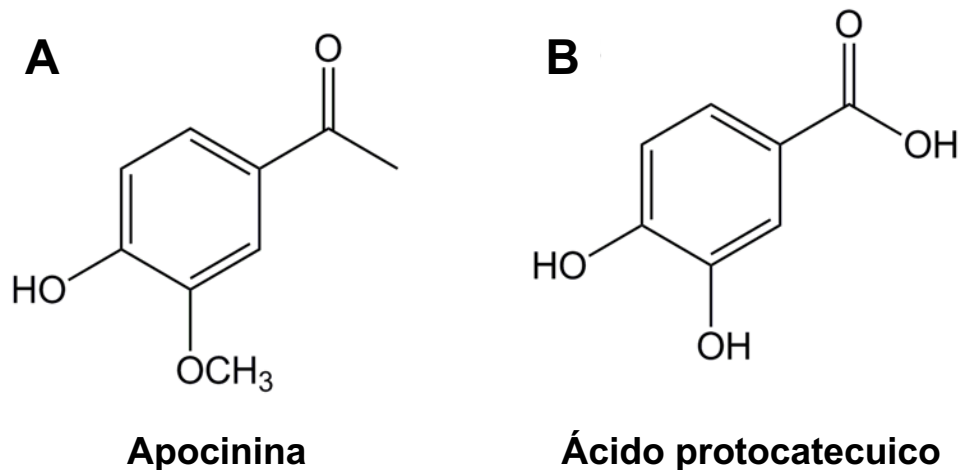
Os anéis foram incubados por 30 minutos com um dos compostos (apocinina ou ácido protocatecuico, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) por 30 minutos. Em seguida, foram realizadas curvas de contração cumulativa concentração-efeito para PE (0,1 nmol – 0,1  $\mu\text{mol/L}$ ). Anéis sem incubação de quaisquer compostos foram usados como controle.

### **1.3.10.2 Avaliação dos efeitos de compostos fenólicos no relaxamento induzido por acetilcolina**

Durante 30 minutos, os anéis foram estimulados com apocinina ou ácido protocatecuico (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ), e então contraídos com PE (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ). Após o platô, foram realizadas curvas de contração cumulativa concentração-efeito para ACh (0,1 nmol – 0,1  $\mu\text{mol/L}$ ). Anéis sem incubação de quaisquer compostos foram usados como controle.

### **1.3.11 Drogas e reagentes**

Apocinina (A10809, Fig. 1A), ácido protocatecuico (37580, Fig. 1B), acetilcolina (A6625), fenilefrina (P6126), dihidroetídio (DHE), diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA), 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, D9132), dicloridrato de 2,2'-Azobis(2-metilpropionamida) (AAPH, 440914), ( $\pm$ )-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico ácido (Trolox, 238813), Brij 35 (801962), óleo de Tung (440337) e fluoresceína (F6377) foram adquiridos de Sigma Aldrich (EUA). Lucigenina (L6868) foi obtida da ThermoFisher Scientific (EUA). O DMEM foi adquirido da Vitrocell (00025, Brasil) e o FBS da Gibco (12657029, América do Sul). O kit de ensaio TBARS foi adquirido da Cayman Chemical (10009055, EUA). Os demais sais e reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich.



**Figura 1.1.** Estrutura química da apocinina (A) e do ácido protocatecuico (B).

### 1.3.12 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), e n representa o número de aortas ou anéis de aorta usados nos experimentos, ou o número de experimentos independentes realizados com células isoladas. Todos os resultados foram comparados entre os grupos usando o teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA) e teste post-hoc de Tukey. GraphPad Prism 5 ou 6 (GraphPad Software Corporation, La Jolla, EUA) foi aplicado para analisar os resultados e fazer as figuras. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .



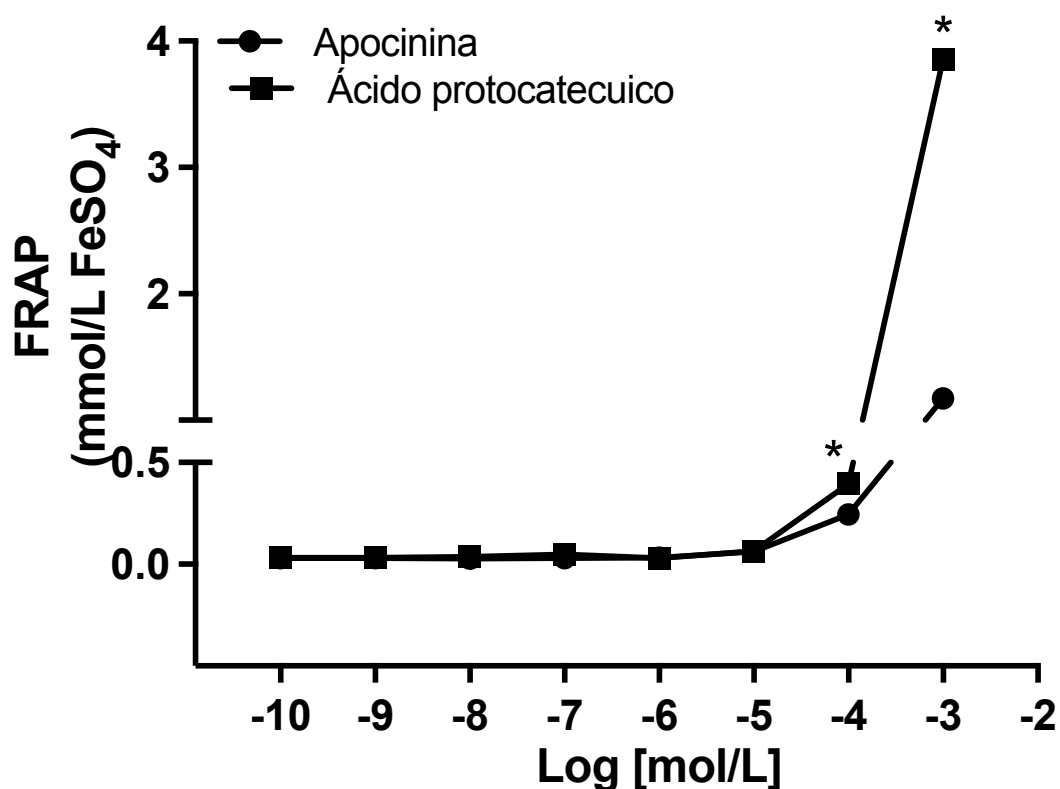
***RESULTADOS***

## 1.4 RESULTADOS

Os principais achados deste estudo são: (1) a apocinina e o ácido protocatecuico aumentam a capacidade antioxidante, (2) todos os compostos diminuem a geração de ROS, (3) os compostos mostraram capacidade de eliminação de radicais livres e efeito inibitório efetivo de NOX, (4) NO• e ROS foram moduladas pelos compostos em células isoladas, e (5) os efeitos vasomotores da fenilefrina e da acetilcolina foram alterados por esses compostos.

### 1.4.1 Capacidade antioxidante dos compostos estudados

Concentrações mais baixas dos compostos não demonstraram capacidade antioxidante significativa (0,1 nmol/L a 10 µmol/L). A capacidade antioxidante foi observada em concentrações superiores a 100 µmol/L (Apocinina:  $0,24 \pm 0,001$ ; Ácido protocatecuico:  $0,39 \pm 0,005$ ; mmol/L/FeSO<sub>4</sub>). Além disso, na concentração de 1 mmol/L o ácido protocatecuico ( $3,85 \pm 0,002$ ) apresentou maior capacidade antioxidante que a apocinina ( $1,17 \pm 0,05$ ) (Fig. 1.2).



**Figura 1.2.** Capacidade antioxidante, em mmol/L FeSO<sub>4</sub>, de apocinina (círculos) e ácido protocatecuico (quadrados), nas concentrações de 0,1 nmol/L a 1 mmol/L. \*  $p < 0,05$  Ácido protocatecuico *versus* Apocinina.

#### 1.4.2 Avaliação da capacidade de eliminação direta de radicais livres e do efeito inibitório sobre a NOX

Considerando a importância de discriminar entre a capacidade de sequestro direto de radicais livres e a inibição da atividade de NOX, a potência antioxidante dos compostos estudados foi avaliada por três ensaios adicionais diferentes (Tabela 1.1).

O primeiro foi o ensaio de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), que se baseia na eficácia dos compostos estudados em seqüestrar radicais livres de peroxila (ROO•) gerados pela termólise de AAPH a 37 °C (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001). A capacidade relativa de eliminação de radicais livres foi comparada e expressa como unidades equivalentes de Trolox.

Cada um dos compostos foi um melhor sequestrante de ROO• em comparação com Trolox, um derivado solúvel em água da vitamina E. O ácido protocatecuico foi, pelo menos, 1,5 vezes mais eficiente na eliminação que apocinina (Tabela 1).

O segundo método para avaliação da eficácia anti-radical foi o ensaio de degradação de trieno autooxidável conjugado (CAT). Este método baseia-se na medição da capacidade dos compostos estudados como inibidor da degradação do ácido graxo insaturado, ácido eleostearico, provocada por ROO• (PARACATU et al., 2014). É semelhante ao ensaio ORAC, mas imita mais de perto as condições biológicas, pois simula o início do processo de peroxidação lipídica. A Tabela 1.1 mostra a seguinte potência de eficácia inibitória ácido protocatecuico >> apocinina.

O terceiro método para avaliação da eficácia antioxidante foi o método DPPH, que se baseia na redução deste composto radical livre estável. Conforme observado na Tabela 1, o ácido protocatecuico foi significativamente mais eficaz do que a apocinina, que foi pelo menos 700 vezes mais fraco de um eliminador de DPPH em comparação com os outros compostos.

**Tabela 1.1.** Atividade sequestrante de radicais livres dos compostos estudados.

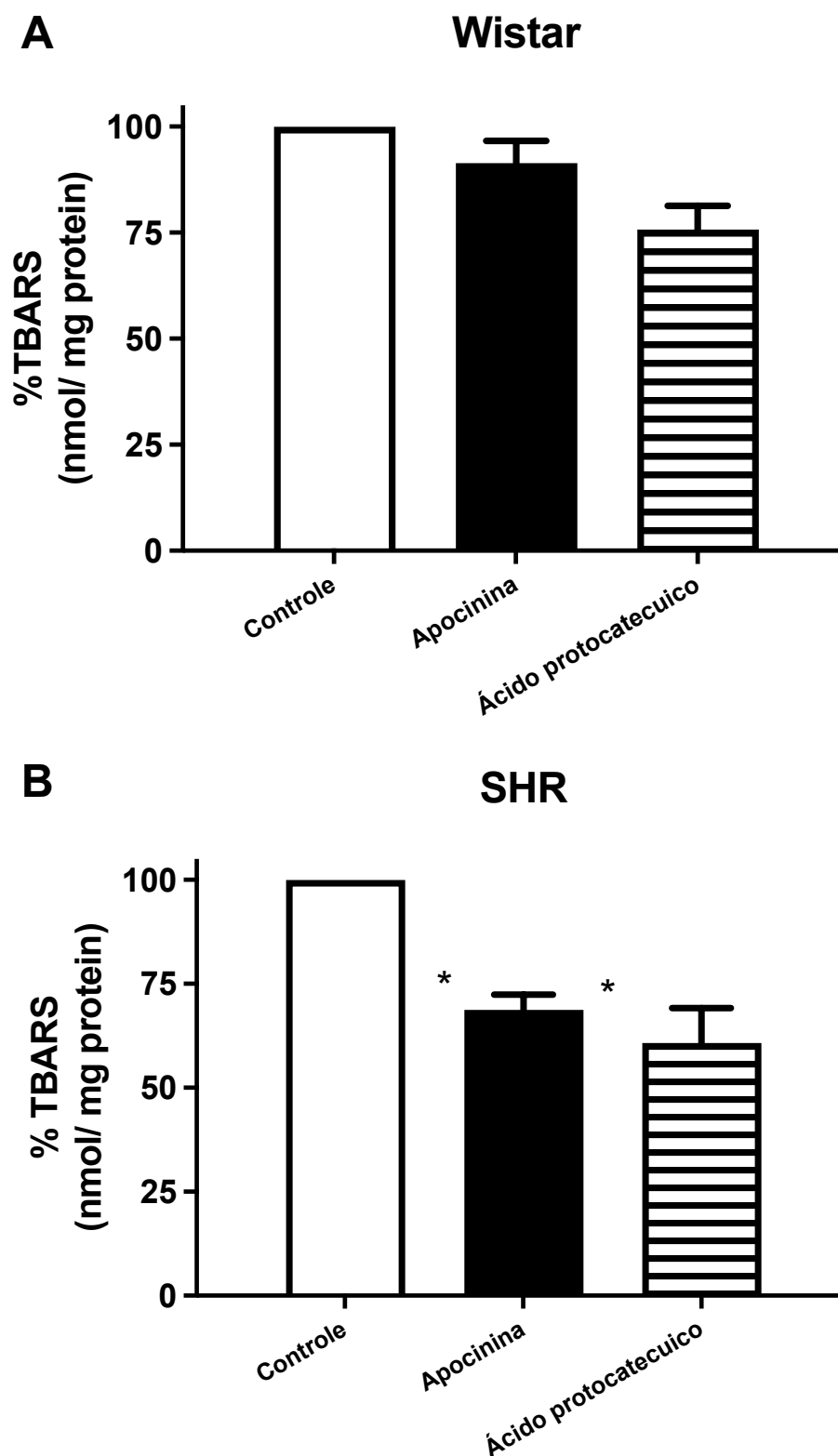
	ORAC <sup>a</sup>	CAT <sup>a</sup>	DPPH (EC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>
Apocinina	1.9 ± 0.2	0.11 ± 0.02	19343 ± 2152
Ácido protocatecuico	3.2 ± 0.2 <sup>#</sup>	0.63 ± 0.12 <sup>#</sup>	26 ± 5 <sup>#</sup>

<sup>a</sup> Equivalentes de Trolox (µmol de Trolox/µmol de composto). <sup>b</sup> EC<sub>50</sub> (µmol/L). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três experimentos. <sup>#</sup>p < 0.05 Ácido protocatecuico *versus* Apocinina.

### 1.4.3 Apocinina e ácido protocatecuico podem diminuir biomarcadores de estresse oxidativo em SHR

TBARS é um método bem estabelecido para medir a peroxidação lipídica, um indicador de estresse oxidativo (YAGI, 1998). Não foram observadas alterações nos níveis de TBARS nas aortas isoladas de ratos Wistar e incubadas com os compostos em relação aos níveis observados nas aortas não tratadas (Controle: 100,0; Apocinina: 91,4 ± 5,19; Ácido protocatecuico: 75,72 ± 5,64; nmol/mg de proteína, %, n = 6-7) (Figura 1.3A). Outros estudos também não relataram diferenças após o tratamento com inibidores de NOX ou antioxidantes em ratos normotensos, presumivelmente devido à ausência de estresse oxidativo nesses animais (PERASSA et al., 2016; TAIN et al., 2012).

Por outro lado, em aortas de SHR, modelo com estresse oxidativo vascular [28], foi observado que apocinina ( $68,7 \pm 3,66$ ,  $n = 5$ ) e ácido protocatecuico ( $60,7 \pm 8,4$ ,  $n = 5$ ) reduziram TBARS quando comparados a anéis não estimulados ( $100,0$ ,  $n = 5$ ) (Figura 1.3B).

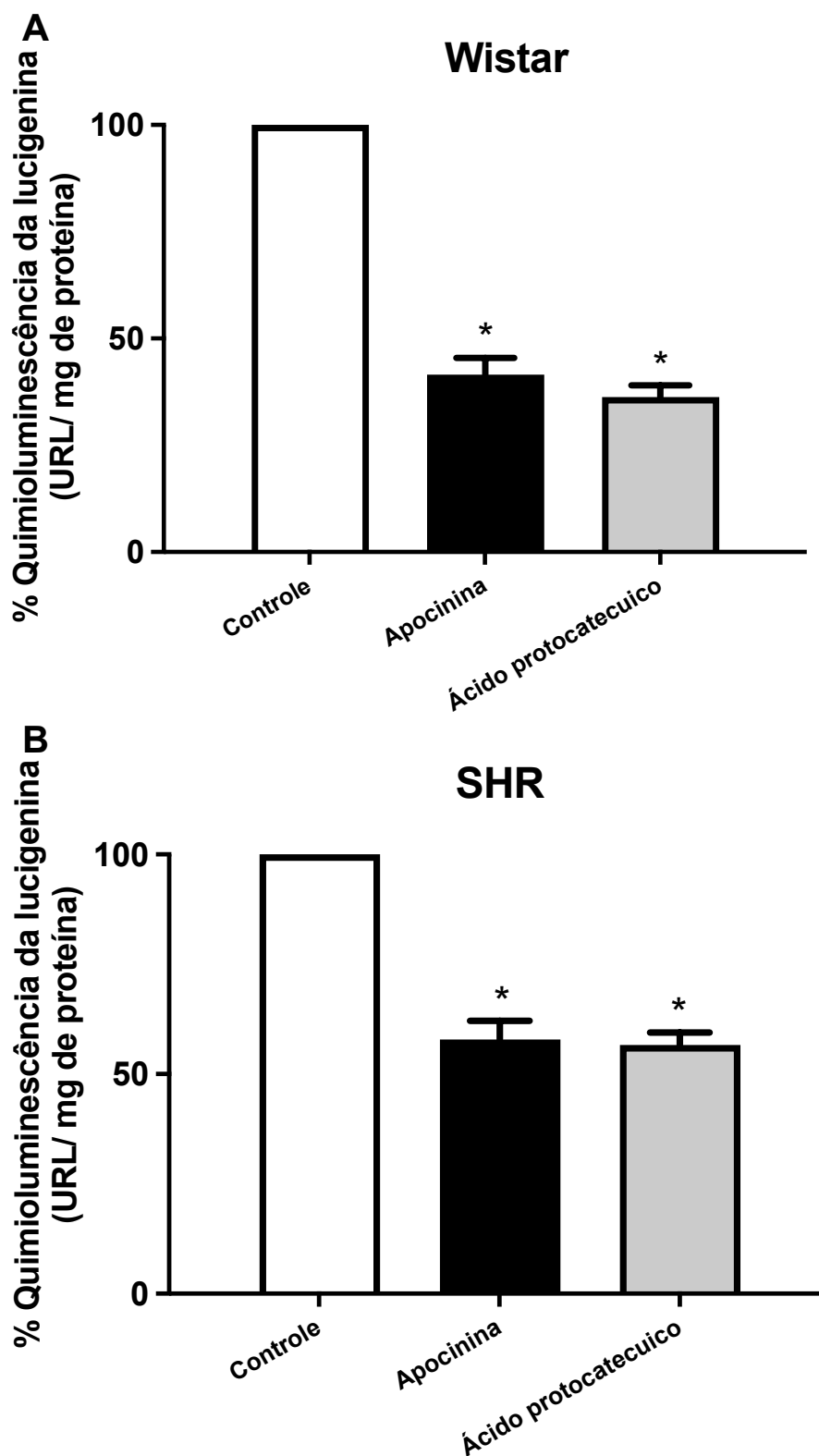


**Figura 1.3.** Determinação da porcentagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em nmol/mg de proteína, em anéis de aorta não estimulados (Controle, barras brancas), ou estimulados (100  $\mu$ mol/L) com apocinina (barras pretas) ou ácido protocatecuico (barras cinzas) de ratos Wistar (A) e SHR (B). Os valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados, n = 5-7. \* p < 0,05 *versus* controle.

#### **1.4.4 Ambos compostos podem diminuir a produção de ERO nas aortas**

Lucigenina é uma sonda para detecção de níveis de superóxido (GYLLENHAMMAR, 1987; LI et al., 1998).

Ambos os compostos foram capazes de diminuir o sinal de lucigenina nas células vasculares em ambos os ratos Wistar normotensos (Apocinina:  $41,5 \pm 3,9$ ; Ácido protocatecuico:  $36,3 \pm 2,7$ ; URL/mg de proteína, n = 9-10 , Figura 1.4A) e SHR (Apocinina:  $57,9 \pm 4,2$ ; Ácido protocatecuico:  $56,6 \pm 2,8$ ; URL/mg de proteína, n = 9-10, Figura 1.4B), respectivamente.

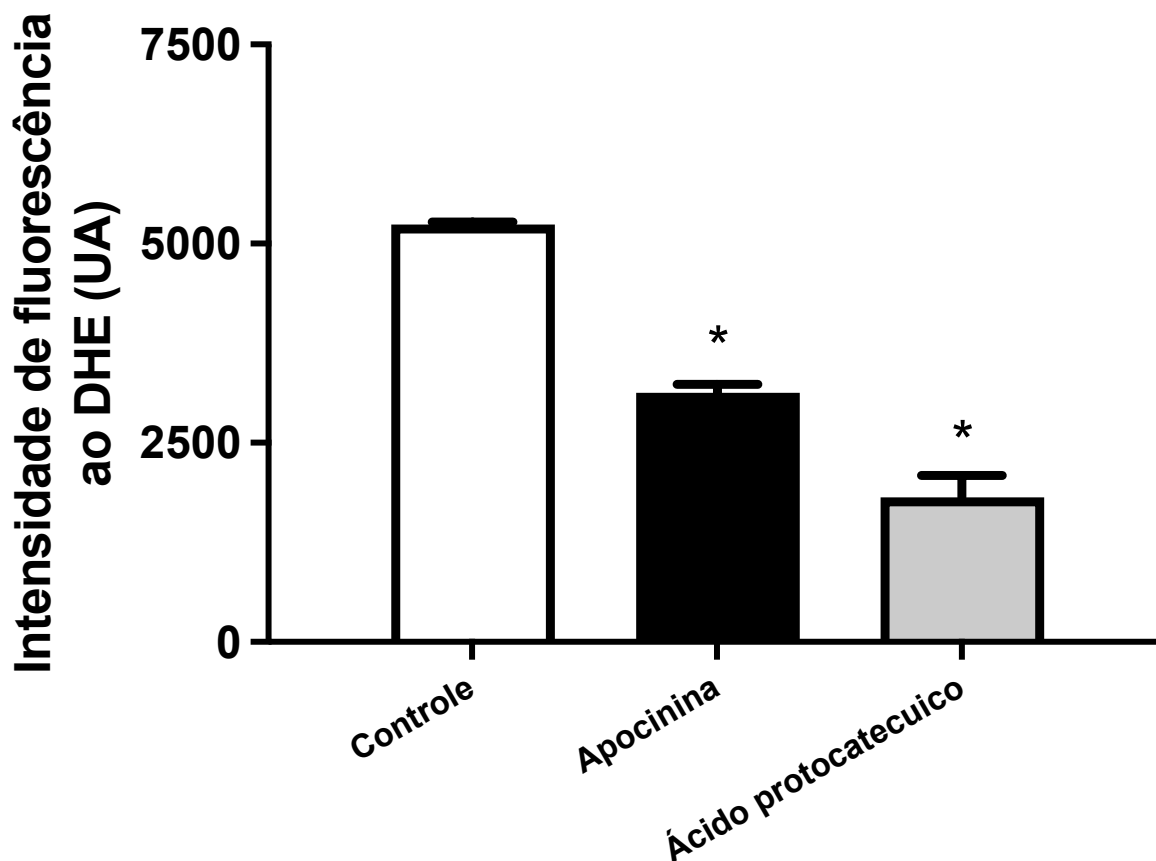


**Figura 1.4.** Porcentagem de quimioluminescência de lucigenina, em unidades de luz relativa (URL)/mg de proteína, em anéis de aorta não estimulados (Controle, barras brancas) ou estimulados (100  $\mu$ mol/L) com apocinina (barras pretas) ou ácido protocatecuico (cinza barras) de ratos Wistar (A) e SHR (B). Os valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados, n = 9-10. \* p < 0,05 *versus* Controle.

#### 1.4.5 A concentração de ERO é diminuída em HUVEC



Em HUVEC, apocinina ( $3131 \pm 103,2$  UA,  $n = 4$ ) e ácido protocatecuico ( $1813 \pm 278,5$  UA,  $n=4$ ) foram capazes de reduzir a intensidade de fluorescência do DHE quando comparado com células não estimuladas (controle:  $5238 \pm 32,6$  UA,  $n = 4$ ) (Figura 1.5).

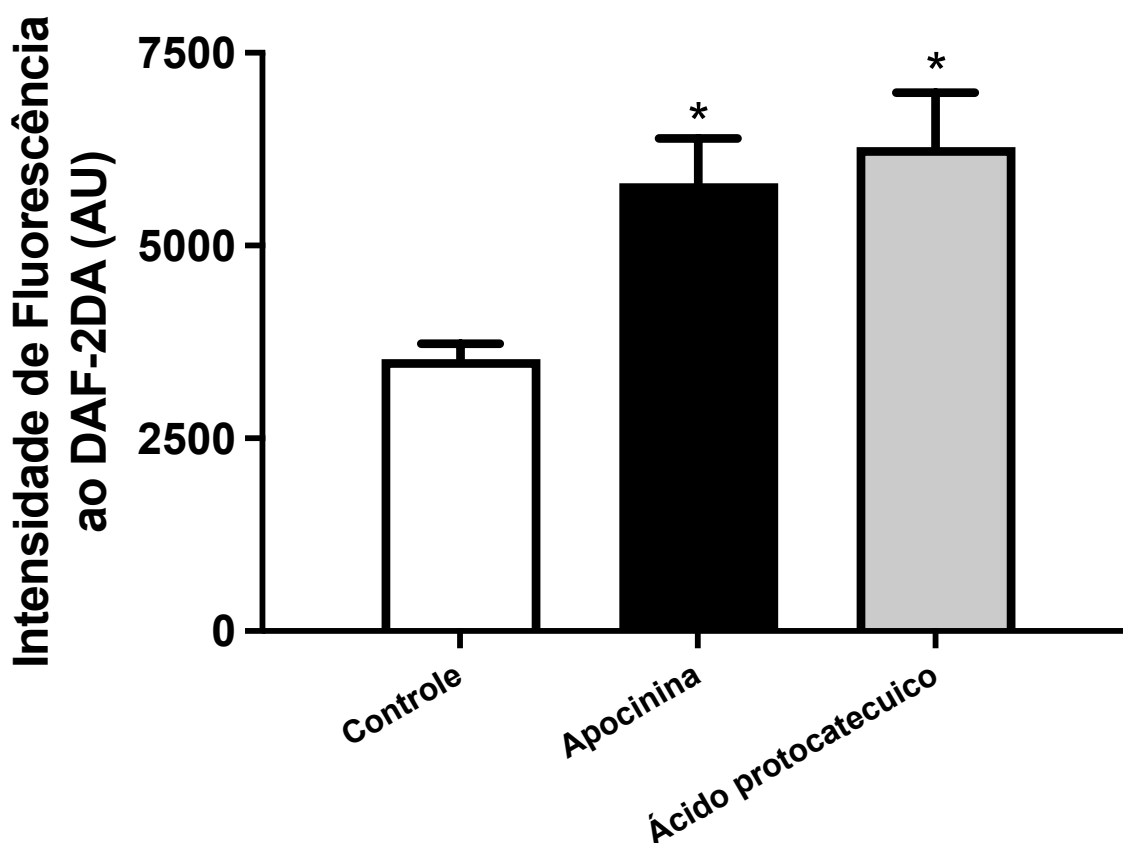


**Figura 1.5.** Concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO), em unidades arbitrárias, em células endoteliais da veia umbilical humana. A intensidade de fluorescência foi detectada pela sonda dihidroetídio (DHE) sensível a ROS em células não estimuladas (Controle, barra branca) ou estimuladas ( $100 \mu\text{mol/L}$ ) com apocinina (barra preta) ou ácido protocatecuico (barras cinza). Os valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados,  $n = 4$ . \*  $p < 0,05$  versus Controle.

#### 1.4.6 A concentração de $\text{NO}\cdot$ é aumentada em HUVEC

Em seguida, usamos a sonda de diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2 DA) permeável à membrana para a detecção dos níveis de óxido nítrico intracelular. DAF-2 DA é hidrolisado em DAF-2 e preso dentro da célula após reagir com  $\text{NO}\cdot$  (KOJIMA et al., 1998; QIU et al., 2001; ZHOU; HE, 2011).

Em HUVEC, apocinina ( $5808 \pm 548,1$  UA,  $n = 4$ ) e ácido protocatecuico ( $6281 \pm 701,3$  UA,  $n = 4$ ) aumentaram a intensidade de fluorescência de DAF-2DA, quando comparado ao grupo controle ( $3530 \pm 198,1$  UA,  $n = 4$ ) (Figura 1.6).



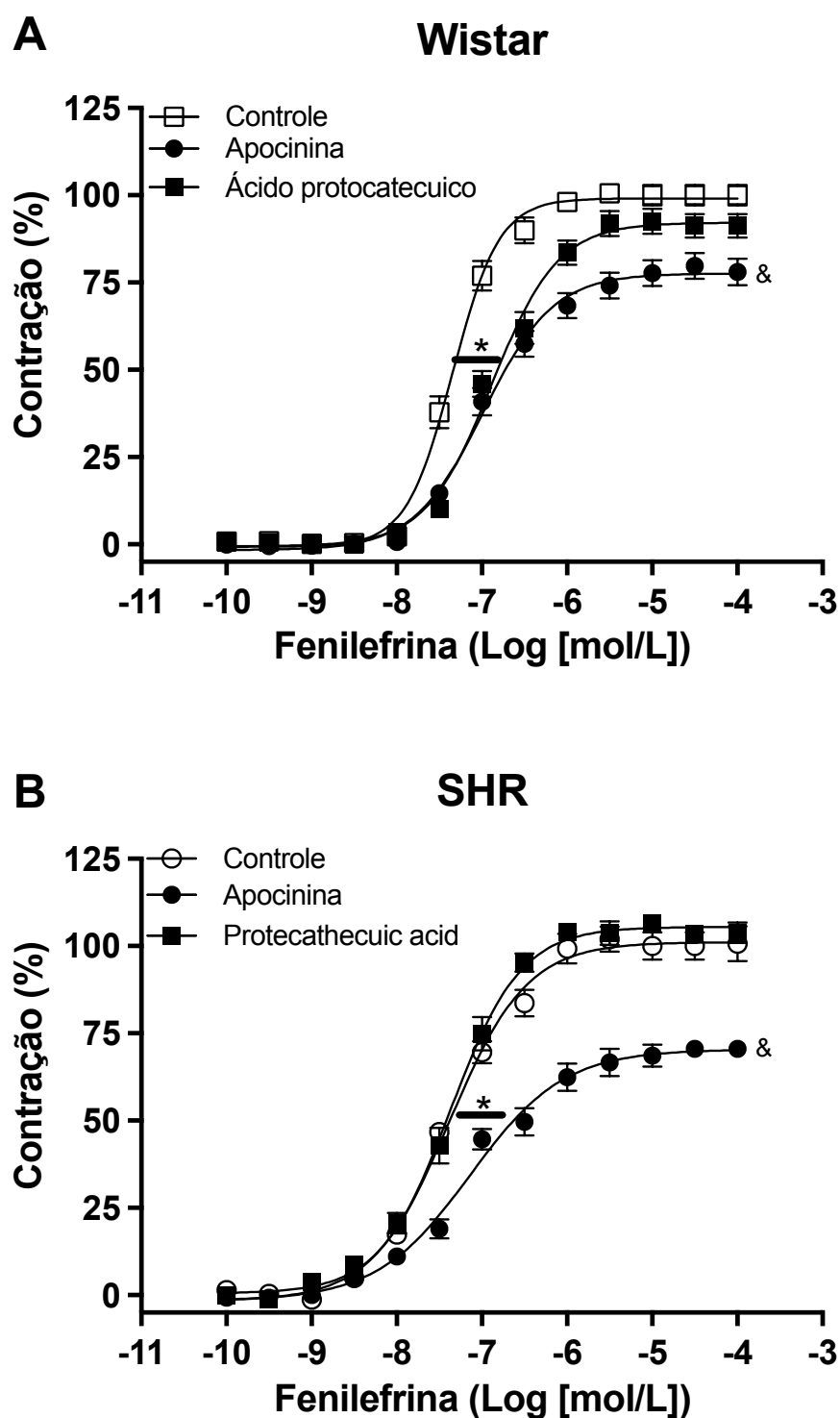
**Figura 1.6.** Concentração de óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), em unidades arbitrárias, em células endoteliais da veia umbilical humana. A intensidade de fluorescência foi detectada pela sonda NO-sensível diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA) em células não estimuladas (Controle, barra branca) ou estimuladas ( $100 \mu\text{mol/L}$ ) com apocinina (barra pretas ou ácido protocatecuico (barra cinza). Os valores representam a média  $\pm$  SEM dos resultados,  $n = 4$ . \*  $p < 0,05$  versus Controle.

#### 1.4.7 Efeito dos compostos na contração induzida por fenilefrina

A fenilefrina induziu a contração dos anéis da aorta de ambas as linhagens (Figura 1.7). A incubação com apocinina diminuiu o efeito máximo ( $E_{\text{max}}$ ) da fenilefrina em aortas de ratos Wistar quando comparado à curva controle (Controle:  $100,00 \pm 2,99$ ; Apocinina:  $78,02 \pm 3,77$ ; %,  $n = 5 - 6$ ), mas não foi observada significância estatística quando as aortas foram incubadas com ácido protocatecuico, embora também tenha sido obtido um decréscimo ( $91,25 \pm 3,37$ , %,  $n = 6$ ).

Observamos também que a incubação com todos os compostos diminuiu a potência ( $pD_2$ ) da fenilefrina quando comparada à curva controle (Controle:  $7,3 \pm 0,1$ ; Apocinina:  $6,9 \pm 0,1$ ; Ácido protocatecuico:  $6,9 \pm 0,1$ ) (Figura 1.7A) em anéis aórticos de ratos Wistar.

Nos anéis aórticos de SHR, a apocinina apresentou valor de  $pD_2$  menor quando comparado a outras curvas (Controle:  $7,38 \pm 0,1$ ; Apocinina:  $7,13 \pm 0,1$ ; Ácido protocatecuico:  $7,36 \pm 0,2$ ;  $n = 4-8$ ). Além disso, a apocinina também diminuiu o valor de  $E_{max}$  induzido pela fenilefrina quando comparado aos anéis não estimulados ou estimulados com os outros compostos aqui estudados (Controle:  $100,67 \pm 5,00$ ; Apocinina:  $70,56 \pm 0,90$ ; Ácido protocatecuico:  $100,80 \pm 2,95$ ;  $g, n = 4-8$ ) (Figura 1.7B).



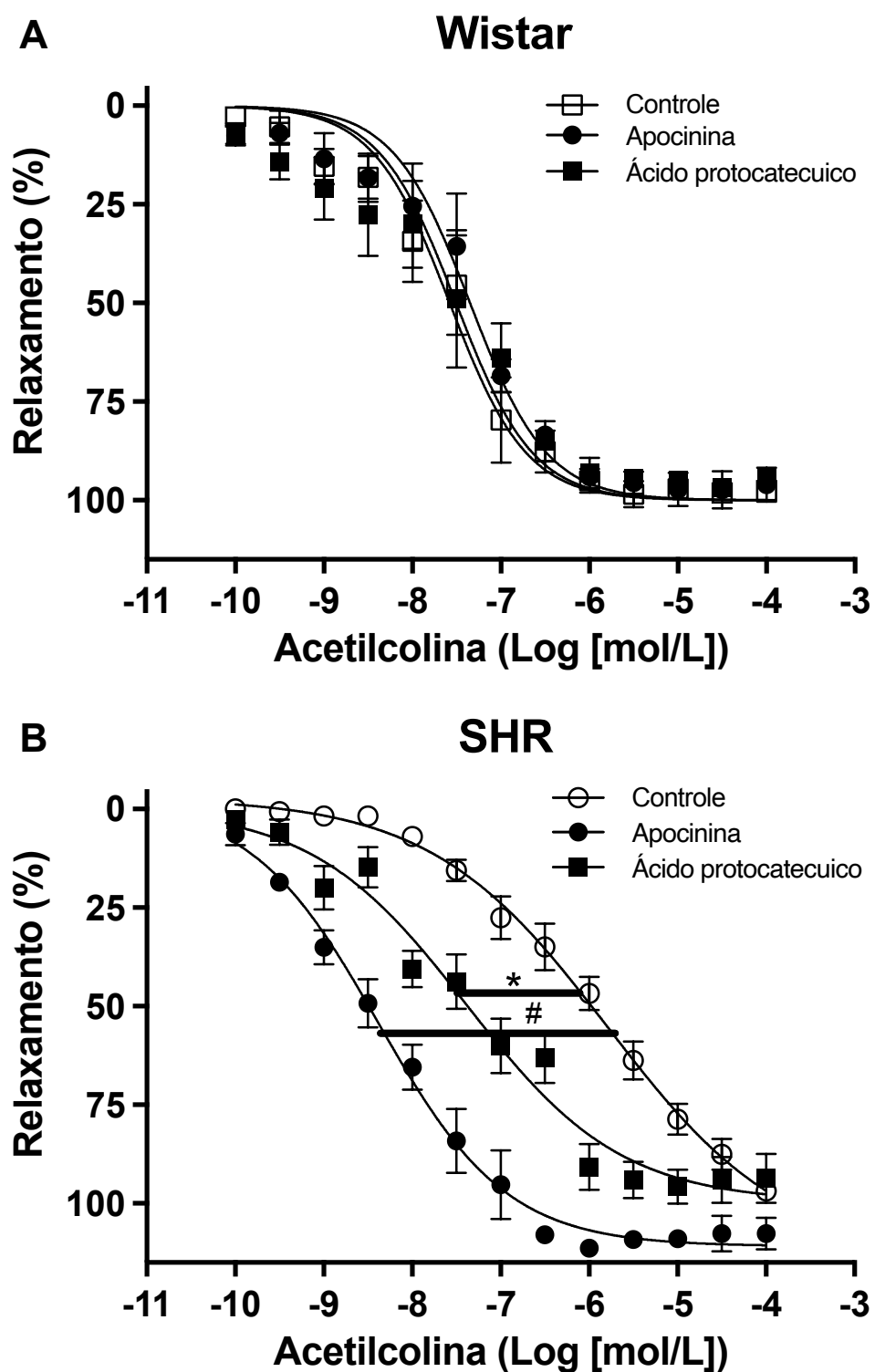
**Figura 1.7.** Curvas cumulativas de concentração-efeito para fenilefrina (0,1 nmol/L – 100  $\mu$ mol/L) em anéis de aorta de ratos Wistar (A) e SHR (B) pré-incubados (100  $\mu$ mol/L) com apocinina (círculos pretos) ou protocatecuicos ácido (quadrados pretos) ou não incubados (Controle, quadrados brancos). Os valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados, em porcentagem de contração, n = 4-8. A: \* p < 0,05 ratos Wistar valores de pD<sub>2</sub> todos os compostos *versus* controle, # p < 0,05 ratos Wistar valores Emax de Apocinina *versus* Controle. B: \* p < 0,05 SHR pD<sub>2</sub> valor de Apocinina *versus* outros, & p < 0,05 SHR Emax valores de Apocinina *versus* outros.

#### 1.4.8 Relaxamento induzido por acetilcolina em aortas incubadas com os compostos

A acetilcolina promoveu relaxamento em anéis de aorta de ratos Wistar e SHR (Fig. 8).

Nenhum dos compostos alterou o Emax (Controle:  $97,5 \pm 1,25$ ; Apocinina:  $96,0 \pm 4,12$ ; Ácido protocatecuico:  $94,2 \pm 1,26$ ; % de relaxamento,  $n = 3-4$ ) ou o  $pD_2$  (Controle:  $7,5 \pm 0,21$ ; Apocinina:  $7,3 \pm 0,15$ ; Ácido protocatecuico:  $7,5 \pm 0,31$ ;  $n = 3-4$ ) de acetilcolina na aorta de ratos Wistar (Figura 1.8A).

Neste, em aortas de SHR, o Emax de acetilcolina não foi alterado pelos compostos (Controle:  $96,8 \pm 1,56$ ; Apocinina:  $107,6 \pm 3,94$ ; Ácido protocatecuico:  $93,6 \pm 6,12$ ; % de relaxamento,  $n = 3-7$ ). No entanto, foi observado que o ácido protocatecuico ( $7,2 \pm 0,38$ ;  $n = 4-3$ ) aumentou o  $pD_2$  da acetilcolina ( $6,097 \pm 0,13$ ,  $n = 7$ ), sendo ainda mais significativo na aorta anéis incubados com apocinina ( $8,1 \pm 0,39$ ,  $n = 3$ ) (Figura 1.8B).



**Figura 1.8.** Curvas cumulativas de concentração-efeito para acetilcolina (0,1 nmol/L – 100  $\mu$ mol/L) em anéis de aorta de ratos Wistar (A) e SHR (B) pré-incubados (100  $\mu$ mol/L) com apocinina (círculos pretos) ou protocatecuicos ácido (quadrados pretos) ou não incubados (Controle, quadrados brancos). Os valores representam a média  $\pm$  EPM dos resultados, em porcentagem de relaxamento,  $n = 3-7$ . \*  $p < 0,05$  valores de SHR  $pD_2$  de ácido protocatecuico *versus* controle em ratos Wistar, #  $p < 0,001$  valores de SHR  $pD_2$  de apocinina e *versus* controle.

***DISCUSSÕES***

## 1.5 DISCUSSÕES

A capacidade redutora de um composto pode ser um indicador significativo de sua atividade potencial (KILIC; YEŞİLOĞLU; BAYRAK, 2014). Neste trabalho, foi observado que ambos os compostos estudados apresentam atividade antioxidante (Figura 1.2).

Antioxidantes são definidos como moléculas com capacidade de doar elétrons para eliminar a condição desemparelhada do radical e neutralizar os radicais livres. Essas moléculas podem reagir diretamente com ERO criando compostos menos nocivos ou podem regular a (dis)função de enzimas geradoras de ERO, inibindo sua atividade ou expressão (LÜ et al., 2010). Recentemente, mostramos que o tratamento *in vivo* com apocinina diminuiu a expressão e a atividade de NOX2 nas aortas e aumentou a capacidade antioxidante do plasma em SHR (GRATON et al., 2019; PERASSA et al., 2016). As enzimas NOX são a principal fonte de ânion superóxido vascular no organismo (DIKALOV et al., 2014).

O ácido protocatecuico mostrou uma capacidade antioxidante dependente da concentração (Fig. 1.2), conforme observado anteriormente (LI et al., 2011), e suas ações farmacológicas foram intimamente correlacionadas com suas atividades antioxidantes (KAKKAR; BAIS, 2014).

Com base nos resultados desses dados, escolhemos a concentração dos compostos utilizados para os experimentos subsequentes de TBARS, quimioluminescência de lucigenina, cultura celular e reatividade vascular.

Como mostrado anteriormente (Fig. 2), esses compostos apresentam capacidade antioxidante, que pode ser definida como a capacidade de uma substância inibir a degradação oxidativa, como a peroxidação lipídica (ROGINSKY; LISSI, 2005).

A redução da peroxidação lipídica parece estar associada à capacidade antioxidante desses compostos, uma vez que outros antioxidantes, como o ácido ascórbico e o  $\alpha$ -tocoferol, também foram capazes de diminuir esse marcador de estresse oxidativo (FREI, 1991; MOTOYAMA et al., 1998).

Entre as ERO, o  $O_2^{\bullet-}$  tem importância crítica no vaso sanguíneo devido à sua rápida reação com o  $NO^{\bullet}$  levando à formação de peroxinitrito e alteração acentuada



do tônus vascular promovendo vasoconstrição e alterando a vasodilatação (MÜNDEL et al., 2002).

A partir desses resultados, juntamente com os anteriores (Figura. 1.3), podemos prever que os compostos aqui estudados apresentaram características antioxidantes, devido à capacidade de seqüestrar ERO.

DHE é uma sonda adicional para a detecção de níveis intracelulares de  $O_2^{\bullet-}$  (CHEN; ROGERS; KAVDIA, 2013). Para minimizar a detecção do produto de oxidação de DHE não etídio específico ( $E^+$ ), foram utilizadas as configurações de excitação (405 nm) e emissão (570 nm) para otimizar a medição do produto específico de  $O_2^{\bullet-}$  2-hidroxi-etídio ( $2-OH-E^+$ ) (NAZAREWICZ; BIKINEYEVA; DIKALOV, 2013).

Um estudo anterior mostrou que a fluorescência de DHE foi maior na parede aórtica de SHR em comparação com WKY e o inibidor específico de NAD(P)H oxidase triazolo pirimidina VAS3947 inibiu ROS detectáveis por DHE em aortas de SHR (WIND et al., 2010). A apocinina foi capaz de diminuir a produção de ROS em HUVEC devido à redução da expressão e translocação de p47phox (SILVA SANTOS DE OLIVEIRA et al., 2018).

Resultados semelhantes que o ácido protocatecuico também foi capaz de aumentar a geração de  $NO^{\bullet}$  em HUVEC já foram previamente descritos (HAN et al., 2019).

O  $NO^{\bullet}$  é um importante fator que regula a função endotelial, incluindo a prevenção da adesão e agregação plaquetária, limitação da oxidação do colesterol, proliferação de células do músculo liso vascular e promove vasodilatação (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987).

Foi demonstrado anteriormente pelo nosso grupo que a apocinina e seu dímero ativo, diapocinina, promovem hiporreatividade à fenilefrina (POTJE et al., 2017a), associada à diminuição da geração de ERO em anéis aórticos de ratos Wistar. Dessa forma, embora ratos normotensos não apresentem níveis aumentados de ERO nos anéis aórticos, a apocinina e o ácido protocatecuico exercem uma proteção vascular neste vaso sanguíneo.

Uma vez que os animais SHR apresentam um aumento na geração de ERO, como observado por vários estudos (LASSEGUE, 2004; POTJE et al., 2019; TANITO et al., 2004), os compostos não foram capazes de alterar os efeitos da fenilefrina em anéis aórticos isolados em comparação com a curva controle.

A aorta SHR tem o relaxamento induzido pela acetilcolina prejudicado devido à disfunção endotelial (LUSCHER; VANHOUTTE, 1986).

A disfunção endotelial é caracterizada por biodisponibilidade prejudicada e produção de fatores relaxantes derivados do endotélio e está associada ao estresse oxidativo. A disfunção endotelial tem um papel importante na patogênese da hipertensão (SILVA; PERNOMIAN; BENDHACK, 2012).

Níveis elevados de peroxidação lipídica estão associados à origem e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MAJID et al., 1991)], e isso pode levar à disfunção endotelial e aumento da contratilidade, fatores importantes no dano vascular durante a hipertensão (MOTOYAMA et al., 1998). Isso é claramente bem demonstrado e discutido abaixo neste estudo nas Figuras 1.7 e 1.8, onde pode ser observado o efeito da apocinina e ácido protocatecuico nas curvas contráteis e relaxantes em resposta ao  $\alpha$ -agonista adrenérgico e agonista colinérgico, respectivamente.

Portanto, a eliminação de  $O_2^{\bullet-}$  parece ser útil na restauração da dilatação dependente do endotélio (KOJIMA et al., 1998; SILVA SANTOS DE OLIVEIRA et al., 2018), como também podemos demonstrar em vasos sanguíneos SHR (Fig. 8). Além disso, embora os SHR apresentem maior produção de ERO, todos os compostos foram capazes de oxidar as ERO e diminuir a quimioluminescência da lucigenina.

Estes achados estão de acordo com resultados anteriores que mostram os efeitos benéficos dos antioxidantes na atividade biológica do  $NO^{\bullet}$  e no relaxamento dependente do endotélio (CARR; FREI, 2000). Como a disfunção endotelial é um preditor independente de risco cardiovascular (SCHIFFRIN, 2008), esses dados fornecem novas informações sobre os benefícios do uso de drogas que atuam como antioxidantes ou inibem a produção de ERO, principalmente em distúrbios com disfunção endotelial acentuada. Em conjunto, os compostos testados neste estudo devem ser considerados no tratamento dessas doenças vasculares, principalmente a apocinina, que parece apresentar uma terapêutica mais eficaz nos casos de disfunção endotelial observada neste estudo.

**CONCLUSÕES**

## 1.6 CONCLUSÕES

Nosso estudo reforça a importância do uso de substâncias que combinem as habilidades de eliminação e/ou prevenção da geração de ERO e o restabelecimento da bioatividade do NO•.

Com base nos dados apresentados aqui, apocinina e o ácido protocatecuico são candidatos para futuras abordagens terapêuticas de condições patológicas cardiovasculares onde o estresse oxidativo é uma característica chave.

Futuros estudos devem ser realizados para investigar os efeitos *in vivo* e o mecanismo completo de ação dessas drogas sobre o estresse oxidativo e sua relação com a hipertensão.

## ***CAPÍTULO 2***

## **CAPÍTULO 2**

Neste segundo capítulo desta tese, serão apresentados os resultados obtidos pela avaliação dos efeitos do tratamento crônico com apocinina em ratos espontaneamente hipertensos.

## ***INTRODUÇÃO***

## CAPÍTULO 2

### 2.1 Introdução

A hipertensão arterial é uma condição multifatorial dependente de fatores genéticos, epigenéticos, sociais e ambientais, caracterizada pela elevação persistente da pressão arterial sistólica (PAS, maior ou igual a 140 mmHg) e/ou da pressão arterial diastólica (PAD, maior igual a 90 mmHg). Está frequentemente associada a alterações estruturais ou funcionais em órgãos alvos como coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos (MARKMAN FILHO et al., 2021).

A hipertensão arterial é o principal fator de risco evitável para doenças cardiovasculares e mortalidade por todas as causas em todo o mundo (MILLS; STEFANESCU; HE, 2020). Mais de 30% da população global adulta tem hipertensão e sua prevalência tem aumentado mundialmente com o envelhecimento da população e exposição a fatores associados ao estilo de vida, como dietas não saudáveis e sedentarismo (MILLS et al., 2016).

Modelos experimentais animais tem sido utilizados ao longos dos anos para entender a patogenia de diferentes doenças. Na hipertensão arterial, a utilidade destes modelos para o entendimento da patogênese, prevenção e tratamento da hipertensão e suas comorbidades depende de sua validade para representar as formas humanas de hipertensão, incluindo as respostas a sua terapia, bem como a qualidade dos estudos nesses animais. Por convenção, cada modelo animal de hipertensão tem ao menos um grau rudimentar de validade em demonstrar a característica primária de diagnóstico, um aumento da pressão arterial comparado aquele considerado nível considerado normal (LERMAN et al., 2019).

Alguns modelos são notoriamente destacados por apresentarem outros aspectos fenotípicos da hipertensão como idade de início, curso temporal, severidade, variabilidade e comorbidades associadas. Devido a importância clínica do dano em órgãos alvo associado a hipertensão arterial, alguns modelos tem maior similaridade com isto e com os distúrbios associados a hipertensão, entre eles, o rato espontaneamente hipertenso (PFEFFER et al., 1979; LERMAN et al., 2019).

O rato espontaneamente hipertenso (SHR, do termo em inglês *spontaneously hypertensive rats*) foram obtidos através do endocruzamento de ratos



Wistar-Kyoto que apresentam níveis elevados de pressão de arterial que resultou em animais naturalmente hipertensos (OKAMOTO; AOKI, 1963). Estes animais, assim como os humanos, ainda apresentam o desenvolvimento da hipertensão arterial sem etiologia desconhecida (TANASE, 1979), o aumento da resistência vascular periférica sem expansão de volume (TRIPPODO; FROHLICH, 1981) e o aumento da atividade simpática (LUNDIN; RICKSTEN; THORÉN, 1984).

Ainda, em semelhança com a hipertensão arterial humana, os SHR apresentam disfunção endotelial e estresse oxidativo (DHALLA; TEMSAH; NETTICADAN, 2000; HIGASHI; KIHARA; NOMA, 2012), fatores estes que precedem o desenvolvimento da hipertensão arterial nestes animais (JAMESON et al., 1993).

A disfunção endotelial é causada principalmente pela redução da disponibilidade de óxido nítrico (NO) e o principal mecanismo responsável por esta alteração é a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (TADDEI et al., 2002). Na disfunção endotelial ocorre uma alteração vascular levando a uma perda da integridade e funcionalidade da camada endotelial levando a um estado de vasoconstrição aumentada e capacidade de vasodilatação reduzida, associada ainda a alterações estruturais e funcionais do músculo liso vascular (XIAO; LIU; WANG, 2014).

O NO é um fator endógeno vasodilatador, com ações autócrinas e parácrinas, produzido nas células endoteliais (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980) e um importante regulador da homeostase vascular, neurotransmissor e defesa imunológica (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008). Ele é produzido pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) que apresenta três isoformas: neuronal (nNOS ou NOS I), induzida (iNOS ou NOS II) e endotelial (eNOS ou NOS III), sendo as isoformas I e III constitutivas e dependentes de cálcio para sua ativação, e a isoforma II estimulada por citocinas (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Nas células endoteliais, estímulos fisiológicos, como acetilcolina e tensão de cisalhamento, e farmacológicos, como acetilcolina e ionóforo de cálcio, levam ao aumento das concentrações intracelulares de cálcio, que por sua vez, liga-se a calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina, convertendo o aminoácido L-arginina e os cofatores fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD(P)H) e a tetrabiopterina (BH<sub>4</sub>), em NO e L-citrulina (GORREN et al., 2005).

Por sua vez, o estresse oxidativo resulta da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio associada ou não, a redução da capacidade antioxidante do organismo (BABIOR, 2004).

O ânion superóxido ( $O_2^-$ ) é a principal ERO no organismo e é sintetizado pela NADPH oxidase, que reduz um elétron do oxigênio usando NADPH como doador de elétron (BABIOR, 2004). A produção de ERO acontece por diferentes enzimas 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).

A NOX é uma enzima de sete isoformas, (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX 5, DUOX1 E DUOX2) (GRIENGLING, 2006). As subunidades homólogas catalíticas NOX1, NOX2 e NOX4 são encontradas em células vasculares (PARAVICINI; TOUYZ, 2008). Foi demonstrado que o SHR apresenta aumento da expressão gênica e proteica de NOX1, NOX2 e NOX4 e maior atividade da NADPH oxidase (BRIONES et al., 2011).

Primeiramente foram identificadas em células fagocíticas, sendo essenciais para suas funções microbicidas (IYER et al., 1961; ROSSI; ZATTI, 1964). Logo após, foram identificadas em células não-fagocíticas, como células endoteliais, do músculo liso vascular e em fibroblastos (GRIENGLING et al., 1994). De maneira geral, sua estrutura 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 (rac1 ou rac2). Sua ativação acontece 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, 2011a).

O  $O_2^-$  reage com o NO, diminuindo sua biodisponibilidade, e conseqüentemente formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), outra ERO que causa danos ao sistema vascular (MILLER et al., 1998; REY et al., 2002; SARAN et al., 2009). Desta maneira, a produção excessiva de  $O_2^-$  resulta em estresse oxidativo e agrava a disfunção endotelial.

O estresse oxidativo favorece a translocação e a transcrição do fator eritróide nuclear 2 relacionado ao fator 2 (Nrf-2) para o núcleo. O Nrf-2 desempenha um papel fundamental no sistema redox celular, é expresso em diferentes tecidos e regula a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, como glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e heme-oxigenase 1 (HO-1), por ligação aos elementos de resposta antioxidante nos segmentos promotores dos genes correspondentes (PECORELLI et al., 2013; ZHU et al., 2008).

O Nrf-2 está diminuído em SHR e contribui para reduzida capacidade antioxidante, aumentando desta forma o estresse oxidativo e disfunção vascular (EREJUWA et al., 2012). A ativação do Nrf-2 em SHR foi eficaz em aumentar a vasodilatação dependente do endotélio (WU et al., 2004), reverter o desequilíbrio redox (RA et al., 2015) e reduzir o estresse oxidativo e atenuar a progressão da hipertensão arterial (JAVKHEDKAR et al., 2015).

Nosso laboratório tem investigado o papel da 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, o aumento da biodisponibilidade de NO em artérias aorta e em artérias mesentéricas de SHR (GRATON et al., 2019b; PERASSA et al., 2016b).

Estes resultados nos levaram a investigar os mecanismos envolvidos nesse balanço entre a produção de NO e a eliminação de ERO em SHR tratados com apocinina.

Considerando que o tratamento com apocinina em SHR aumenta a biodisponibilidade de óxido nítrico e reduz a produção de espécies reativas de oxigênio, formulamos a hipótese de que estes efeitos seriam dependentes de um aumento da ação do sistema antioxidante, respectivamente.

## ***OBJETIVOS***

## **2.2 OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações nos sistemas antioxidantes promovidas pelo tratamento com apocinina em ratos espontaneamente hipertensos.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos experimentais deste trabalho foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho (Processo CEUA FOA 00855-2017).

### 2.3.1 Animais

A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) é mantida e foi fornecida pelo Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA UNESP), no biotério do Departamento de Ciências Básicas (DCB). Os ratos Wistar foram fornecidos pelo Biotério Central da mesma instituição.

Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22-24°C) com ciclo de luz (12h/luz e 12h/escuro) e receberam ração padrão e água *ad libitum*. Para obtenção dos animais com 4 semanas de idade, o acasalamento, a prenhez de ratas SHR e o desenvolvimento dos filhotes até a 4ª semana foram acompanhados no biotério do DCB/ FOA UNESP. O acasalamento de SHR será feito entre ratos machos e fêmeas irmãos que apresentaram PAS maior ou igual a 150 mmHg, verificada por pletismografia de cauda utilizando um pletismógrafo de cauda (PowerLab, ADInstruments, Melbourne, Austrália).

### 2.3.2 Tratamento

Os animais foram divididos em quatro grupos: Wistar (n = 25), Wistar Tratado (n = 25), SHR (n = 25) e SHR Tratado (n = 25). O grupos tratados receberão apocinina (30 mg/Kg/dia, 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 4ª a 10ª 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.

Ao final da 10<sup>a</sup> semana de vida, os animais serão utilizados nos experimentos descritos a seguir.

### **2.3.3 Preparo do homogenatos**

As aortas e os leitos mesentéricos foram pesados, macerados e acrescidos de tampão fosfato-salina (PBS) 1x (1:4 m/v; pH 7,4; 4°C) + 25 µL de Inibidor de Protease. Após passagem pelo vórtex, o homogenato foi passado pelo sonicador (3x de 3 seg; amplitude 99) e centrifugado (10000 xg, 4°C, 20 minutos), aliqotado e armazenado em freezer -80°C até a realização dos experimentos.

### **2.3.4 Dosagem de Proteínas**

Foram quantificadas no homogenato através do método de Lowry et al. (1951) utilizando-se albumina bovina 0,1% (m/v) como padrão. As absorbâncias foram determinadas em 660 nm, em leitora Power Wave 340-Biotek, e os resultados expressos em mg/mL.

### **2.3.5 Western Blotting**

Os animais foram anestesiados em câmara saturada de halotano e mortos por decapitação. Segmentos da aorta e da artéria mesentérica foram removidos, dissecados de gordura perivascular em placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (composição em mmol/L: NaCl 130,0; 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, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer – 80 °C, separadamente, até o momento dos experimentos.

No dia do experimento, os tecidos foram trituradas com nitrogênio líquido e homogeneizados com 75 µL de tampão para ensaio de radioimunoprecipitação (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 25 µL de coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Protease Inhibitor Mix, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido)



utilizando um sonicador (Vibra Cell Sonics, Newtown, EUA) por três vezes de três segundos.

Os homogenatos foram centrifugados em 4°C, 10.000xg por 20 minutos para a separação do sobrenadante. Nas amostras de sobrenadante diluídas em 1:10, foi quantificada a concentração de proteínas, seguindo o método descrito por Lowry et al. (1951) e utilizando diferentes concentrações de soro albumina bovina como curva padrão. Sessenta microgramas (60 ug) de proteína total foram misturadas em tampão de Laemmli (Tris HCl 0,5 mol/L, duodecil sulfato de sódio 10%, azul de bromofenol 0,5%, glicerol, β-mercaptoetanol 5%) e submetidas à eletroforese em gel de poli-acrilamida 10%, em 30 V, em seguida, por 100 V para transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose.

Após este procedimento, foi realizado bloqueio com albumina de soro bovino 5 % em tampão TBS-T (Tris-salina acrescida de Tween 20), por 60 minutos em agitação em temperatura ambiente. Após, elas foram incubadas com anticorpo primário específico em leite desnatado 5% em período overnight sob agitação, em temperatura de 4 °C, de acordo com a Tabela 1. Após 3 lavagens de 10 minutos, com 10 mL de TBS-T em cada membrana, elas então foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho (A8275, Anti-rabbit IgG – Peroxidase inhibitor, Sigma Aldrich, St Louis, EUA, 1:1000) ou anti-camundongo (A9044, Anti-mouse IgG – Peroxidase inhibitor, Sigma Aldrich, St Louis, EUA, 1:10000), em agitação, por 60 minutos em temperatura ambiente.

**Tabela 2.1.** 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>
nNOS	1:500	4234S, Cell Signaling	Anti-cabra	1:1000	sc2004, Santa Cruz
iNOS	1:500	sc-650, Santa Cruz	Anti-coelho	1:1000	sc2768, Santa Cruz
p-eNOS Ser <sup>1177</sup>	1:1000	9571S, Cell Signaling	Anti-coelho	1:2000	sc2768, Santa Cruz

eNOS	1:1000	610297, BD Bioscience	Anti-coelho	1:1000	sc2768, Santa Cruz
GCs- $\alpha$	1:500	SAB1300812),, Sigma	Anti- coelho	1:1000	sc2768, Santa Cruz
GCs- $\beta$	1:500	SAB4501344, Sigma	Anti- coelho	1:1000	sc2768, Santa Cruz
Anti- $\beta$ -actina	1:5000	A5441, Sigma	Anti- camundongo	1:5000	sc2005, Santa Cruz

As membranas foram então incubadas com o substrato para peroxidase quimioluminescente (Kit ECL - Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, Little Chalfont, Reino Unido) e visualizadas usando ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica com o software ImageJ. Os resultados foram comparados entre os grupos.

### 2.3.6 Determinação dos níveis de nitrato/nitrito

Segmentos da artéria mesentérica foram removidos dos animais e dissecados em solução de Krebs-Henseleit 4 °C, congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer – 80 °C até a realização dos experimentos. As artérias 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).

O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA e centrifugados em 4°C, 10.000xg por 20 minutos. O plasma foi separado por aspiração e ultrafiltrado (UFC5010BK, Amicon Ultra-0.5 mL 10 kDa, Millipore, Burlington, EUA) em 14.000xg, 25 °C por 30 minutos.

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.

### 2.3.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e comparados entre os grupos. Será utilizado o teste estatístico mais adequado ao tipo de comparação feita, *t* de Student ou 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.

### 2.3.8 Drogas e Reagentes

Os sais cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ), bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ), glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) e cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ) foram adquiridos da Dinâmica (Diadema, Brasil). A albumina bovina foi adquirida da Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA). Apocinina (4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon), fenilefrina (L-phenylephrine hydrochloride), acetilcolina (acetylcholine chloride), foram obtidas da Sigma-Aldrich (EUA). NP-40 (Nonidet P 40 Substitute), Tween-20, Laemmli (tampão de amostra concentrado e mercaptoetanol foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA). Os anticorpos, primários e secundários, utilizados nos experimentos de Western Blotting foram obtidos da Cell Signaling (EUA), BD Bioscience (EUA), Sigma-Aldrich (EUA) ou Santa Cruz (EUA), conforme descrito na Tabela 2.1. 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

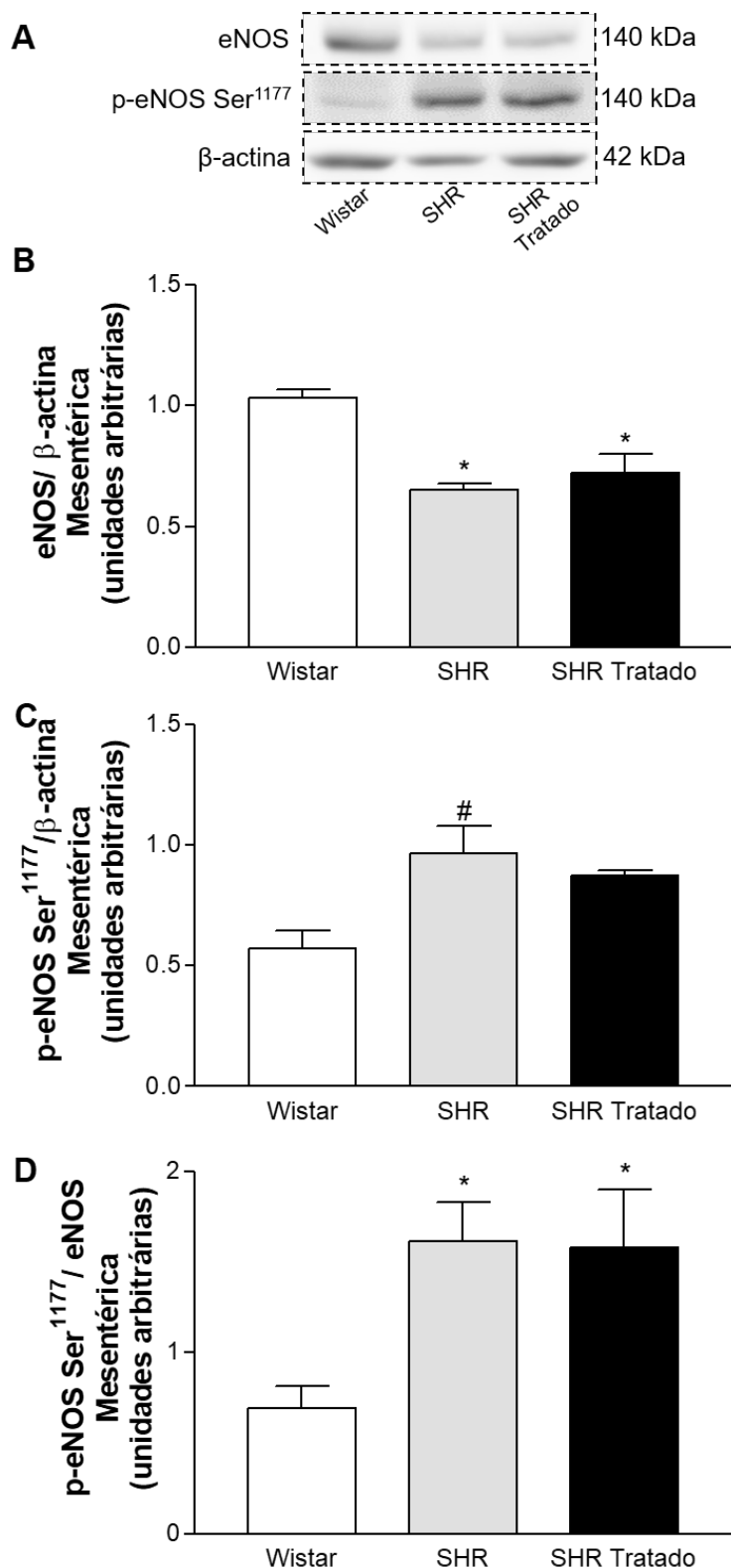
## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 A apocinina não altera a expressão de eNOS em leitos mesentéricos de SHR

Em leitos mesentéricos de SHR ( $0,65 \pm 0,02$ ,  $n = 4$ ) apresentaram menor expressão de eNOS que ratos Wistar ( $1,03 \pm 0,03$ ,  $n = 5$ ), com o já observado por Álvarez e colaboradores (2007). O tratamento com apocinina não alterou a expressão da eNOS em leito mesentérico de SHR ( $0,72 \pm 0,07$ ,  $n = 4$ ) (Figura 2.1 A e B).

A fosforilação da eNOS no resíduo de serina 1177 (p-eNOS ser<sup>1177</sup>) está aumentada em leito mesentérico de SHR ( $0,96 \pm 0,11$ ,  $n = 4$ ) quando comparado com ratos Wistar ( $0,57 \pm 0,07$ ,  $n = 5$ ), mas não foi em SHR tratados ( $0,87 \pm 0,02$ ,  $n = 4$ ) (Figura 2.1 A e C).

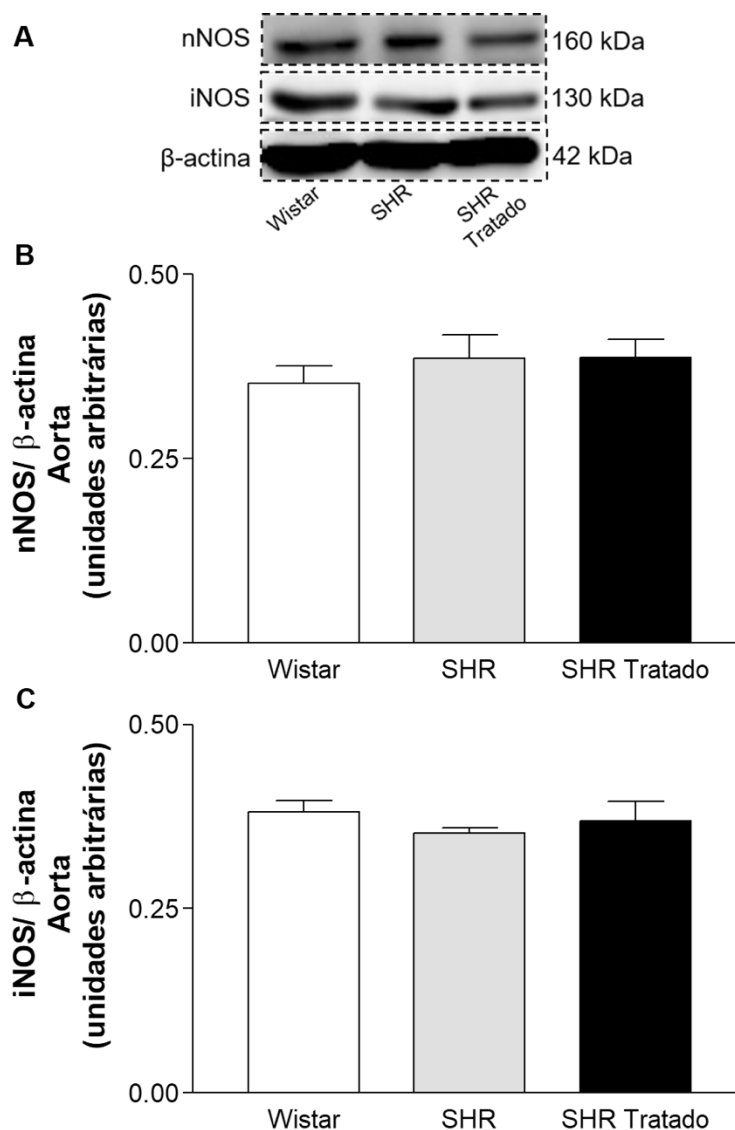
A relação entre a p-eNOS ser<sup>1177</sup> e a eNOS estava aumentada em leitos mesentéricos de SHR ( $1,61 \pm 0,21$ ,  $n = 6$ ) e SHR tratados ( $1,57 \pm 0,31$ ,  $n = 6$ ) quando comparados com ratos Wistar ( $0,69 \pm 0,11$ ,  $n = 6$ ) (Figura 2.1D).



**Figura 2.1.** Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS, B), da eNOS fosforilada no resíduo de serina 1177 (p-eNOS ser1177, C) e a relação p-eNOS ser<sup>1177</sup>/ eNOS em homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar (barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR Tratado (barras pretas) com apocinina (30 mg/Kg). Valores representam média  $\pm$  EPM, n = 5-6. \* $p < 0,05$  entre SHR e SHR Tratado *versus* Wistar, # $p < 0,05$  entre SHR *versus* outros grupos.

#### 2.4.2 A apocinina não altera a expressão da nNOS e da iNOS em aortas de SHR

Em leitões mesentéricos, não foram observadas diferenças na expressão proteica da isoforma neuronal da NOS (nNOS) (Wistar:  $0,35 \pm 0,02$ ; SHR:  $0,38 \pm 0,03$ ; SHR Tratado:  $0,38 \pm 0,02$ ,  $n = 5-6$ , Figura 2.2A e B) ou da isoforma induzível da NOS (iNOS) (Wistar:  $0,38 \pm 0,01$ ; SHR:  $0,35 \pm 0,01$ ; SHR Tratado:  $0,36 \pm 0,02$ ,  $n = 6$ , Figura 2.2A e C).



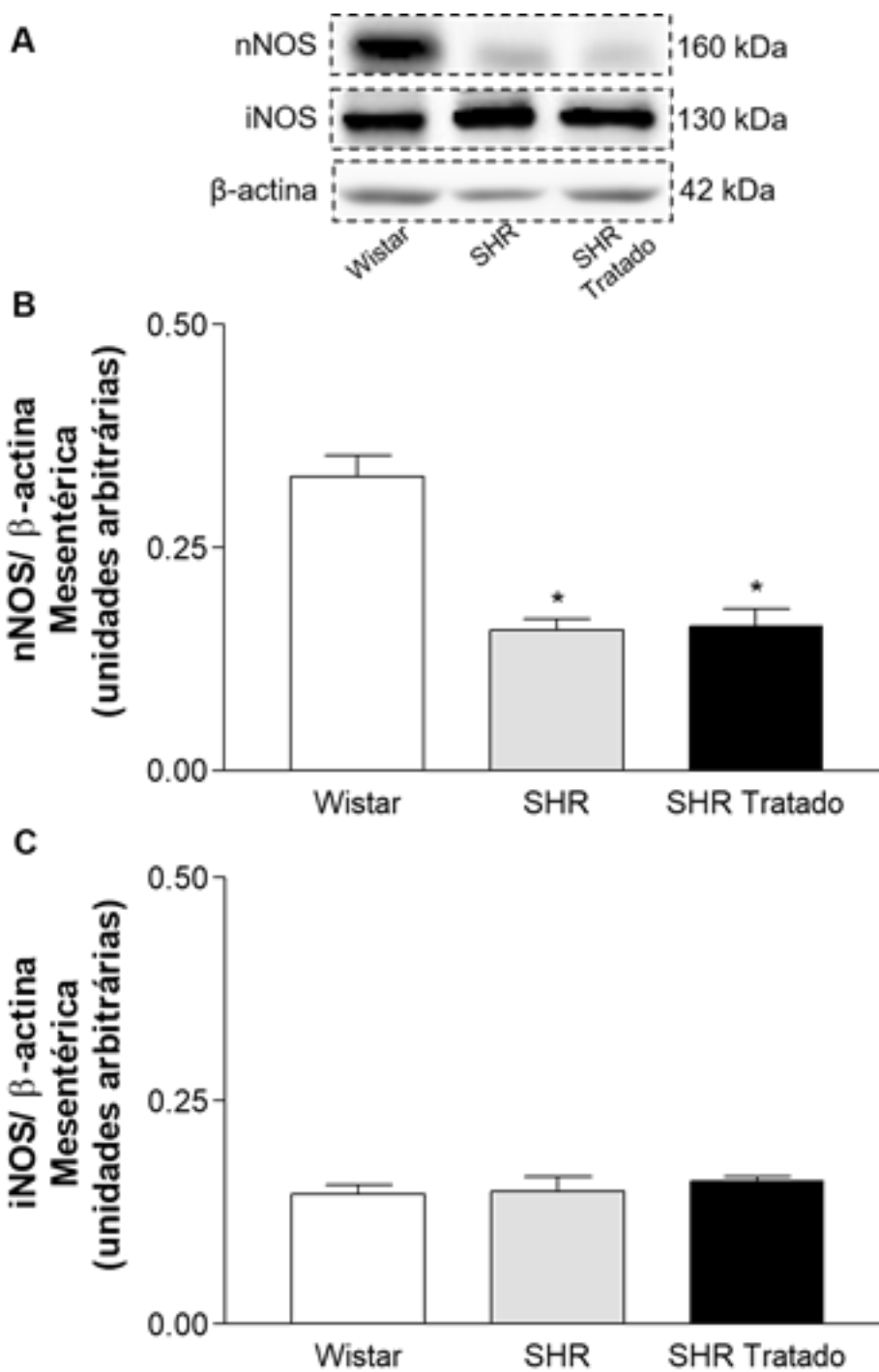
**Figura 2.2.**

Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, B), da da óxido nítrico sintase induzível (iNOS, C) em homogenatos de artéria aorta de ratos Wistar (barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR Tratado (barras pretas) com apocinina (30 mg/Kg). Valores representam média  $\pm$  EPM,  $n = 5-6$ .

### **2.4.3 A apocinina não altera a expressão da nNOS e da iNOS em leitos mesentéricos de SHR**

A expressão da nNOS em leitos mesentéricos de SHR ( $0,15 \pm 0,01$ ,  $n = 5$ ) quando comparado com ratos normotensos Wistar ( $0,32 \pm 0,01$ ,  $n = 6$ ). O tratamento com apocinina não foi capaz de alterar os níveis de expressão proteica de nNOS em leitos mesentéricos de SHR ( $0,15 \pm 0,01$ ,  $n = 6$ ) (Figura 2.3A e B). A expressão proteica da iNOS se mostrou similar em leitos mesentéricos dos grupos experimentais (Wistar:  $0,14 \pm 0,01$ ; SHR:  $0,14 \pm 0,01$ ; SHR Tratado:  $0,16 \pm 0,01$ ,  $n = 5-6$ , Figura 2.3A e C).

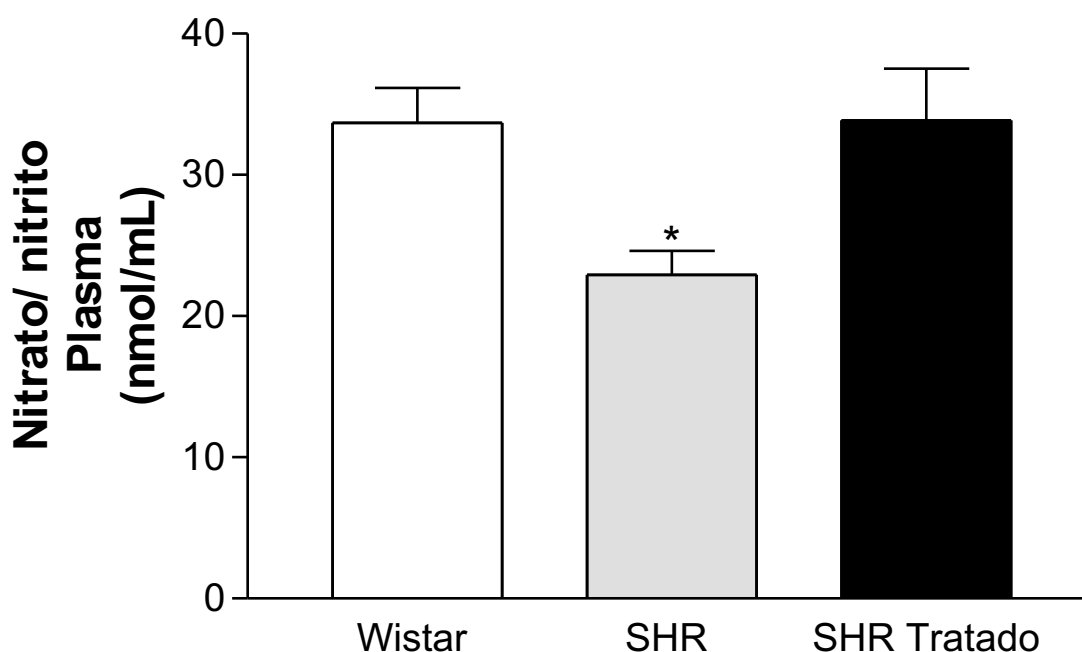




**Figura 2.3.** Autorradiografias típicas (A) e expressão proteica da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, B), da da óxido nítrico sintase induzível (iNOS, C) em homogenatos de leite mesentérico de ratos Wistar (barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR Tratado (barras pretas) com apocinina (30 mg/Kg). Valores representam média  $\pm$  EPM, n = 5-6. \* $p < 0,05$  SHR e SHR Tratado *versus* Wistar.

#### 2.4.4 Os níveis plasmáticos de nitrato/ nitrito são aumentados pelo tratamento crônico com apocinina

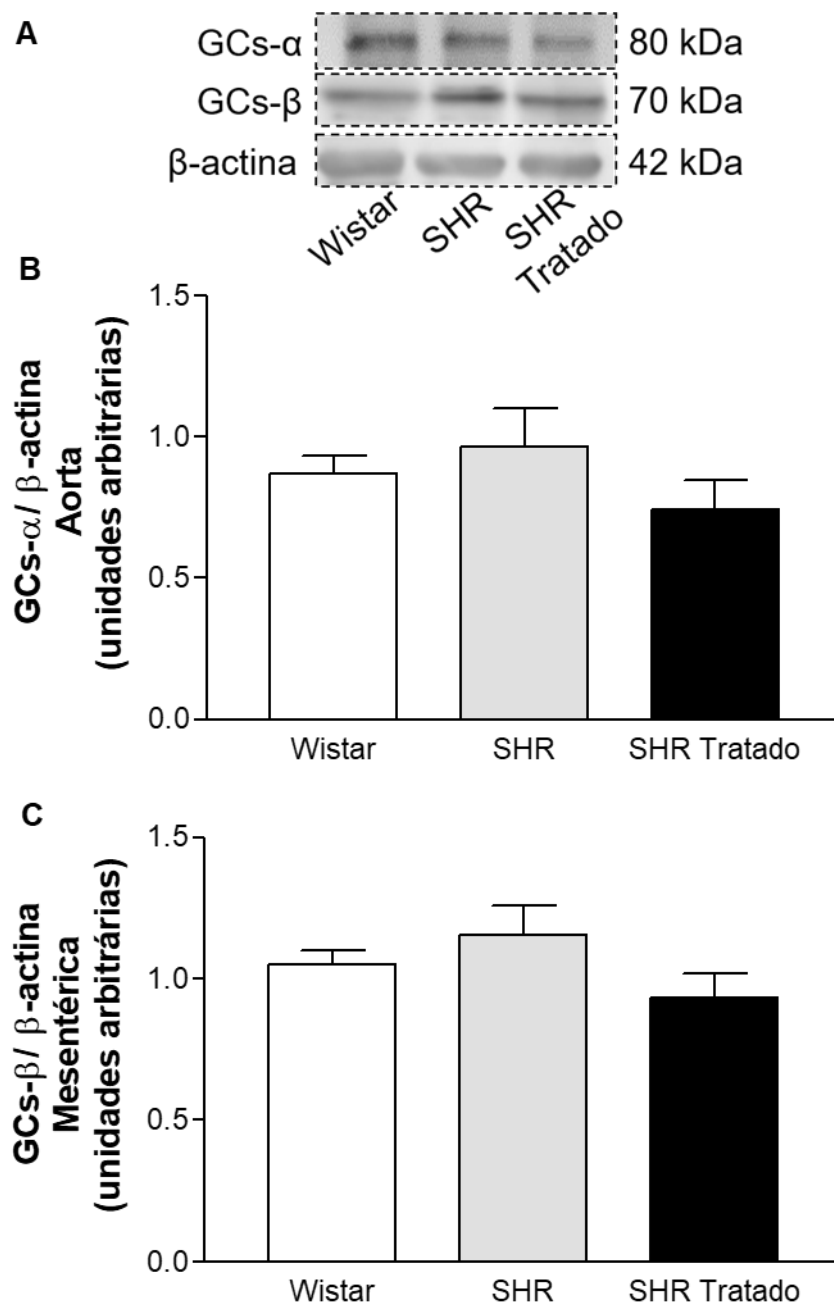
Os níveis plasmáticos de nitrato/ nitrito foram significativamente reduzidos em SHR ( $16,3 \pm 1,6$  nmol/mL,  $n = 8$ ) quando comparados com ratos normotensos Wistar ( $20,1 \pm 2,9$  nmol/mL,  $n = 8$ ). O tratamento com apocinina aumentou significativamente os níveis plasmáticos de nitrato/nitrito em SHR ( $19,6 \pm 2,7$  nmol/mL,  $n = 8$ ) (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Níveis plasmáticos de nitrato/nitrito, em nmol/mL, de ratos Wistar (barra branca), SHR (barra cinza) e SHR Tratado (barra preta) com apocinina (30 mg/Kg). Valores representam média  $\pm$  EPM,  $n = 5-6$ . \* $p < 0,05$  entre SHR *versus* Wistar e SHR Tratado.

#### 2.4.5 A apocinina não altera a expressão das subunidades $\alpha$ e $\beta$ da GCs

Não observamos diferenças na expressão proteica da GCs- $\alpha$  (Wistar:  $0,87 \pm 0,06$ ; SHR:  $0,96 \pm 0,1$ ; SHR Tratado:  $0,74 \pm 0,1$ , unidades arbitrárias,  $n = 6$ , Figura 2.5A e B) ou da GCs- $\beta$  (Wistar:  $1,05 \pm 0,04$ ; SHR:  $1,15 \pm 0,1$ ; SHR Tratados:  $0,93 \pm 0,08$ , unidades arbitrárias,  $n = 4$ , Figura 2.5A e C) em leitos mesentéricos dos diferentes grupos.



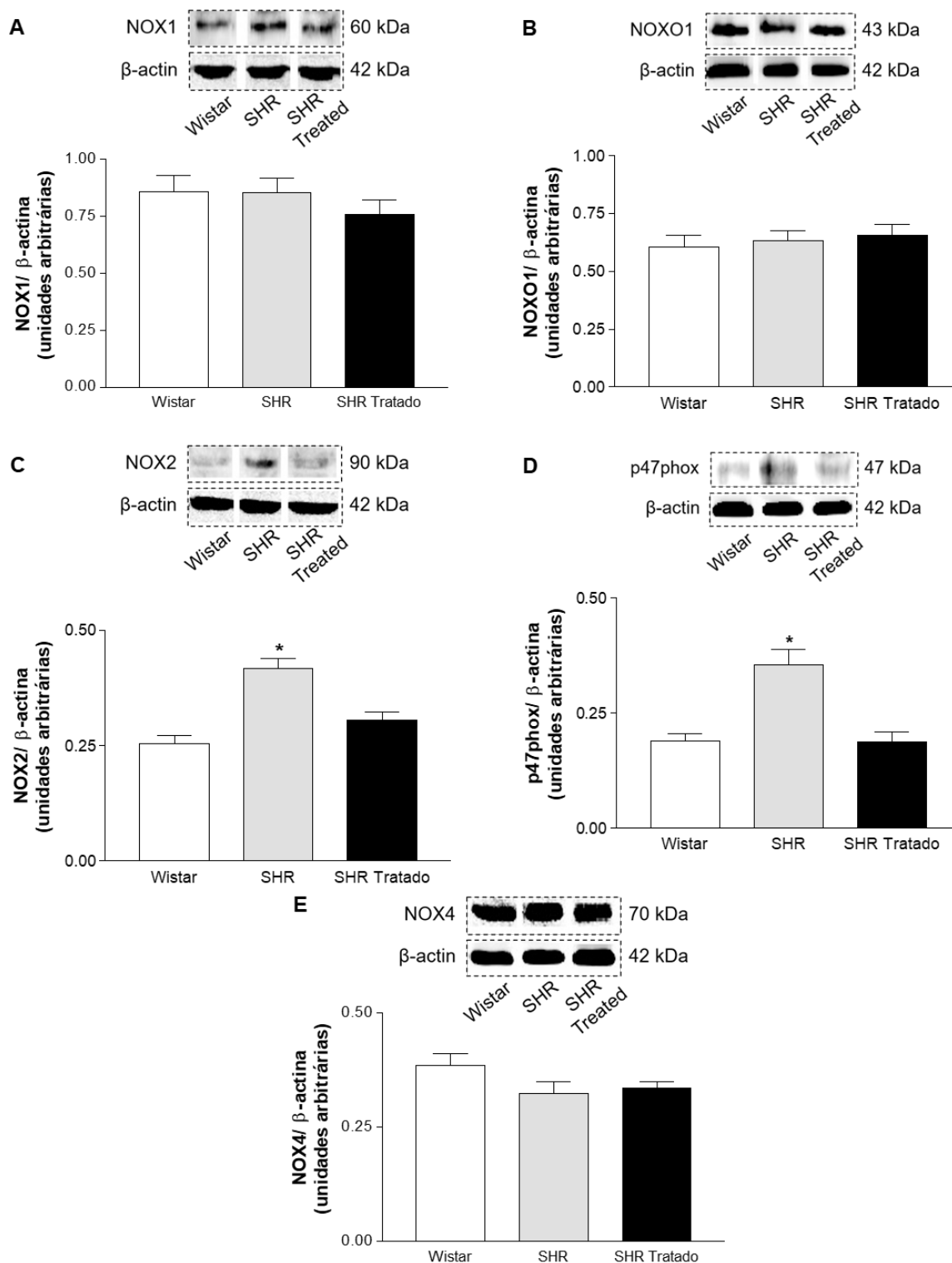
**Figura 2.5.** Autorradiografias típicas e expressão proteica, em unidades arbitrárias, da guanilato ciclase solúvel (GCs) subunidades alfa (GCs-α, B) e beta (GCs-β, C) em homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar (barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR Tratado (barras pretas) com apocinina (30 mg/Kg). Valores representam média ± EPM, n = 5-6.

#### **2.4.6 A expressão aumentada de NOX2 e p47phox é reduzida em artérias mesentéricas de SHR tratados com apocinina**

Não observamos diferenças em leitos mesentéricos, na expressão proteica da NOX1 (Wistar:  $0.85 \pm 0.07$ ; SHR:  $0.85 \pm 0.06$ ; SHR Tratado:  $0.75 \pm 0.06$ ;  $n = 6$ ) e NOXO1 (Wistar:  $0.60 \pm 0.05$ ; SHR:  $0.63 \pm 0.04$ ; SHR Tratado:  $0.65 \pm 0.04$ ;  $n = 6$ ) (Figura 2.6A e B) entre artérias mesentéricas dos diferentes grupos.

Neste estudo, a expressão proteica da NOX2 e p47phox em leito mesentérico foi significativamente maior em SHR ( $0.41 \pm 0.02$ ,  $n = 5$ ;  $0.35 \pm 0.03$ ,  $n = 5$ , respectivamente) quando comparados com ratos Wistar ( $0.25 \pm 0.01$ ,  $n = 5$ ;  $0.18 \pm 0.01$ ,  $n = 5$ , respectivamente) (Figura 2.6C e D). A expressão de NOX2 e suas subunidades regulatórias estão aumentadas na presença de fatores de risco cardiovascular, como a hipertensão arterial (SELEMIDIS et al., 2008).

Observamos neste estudo que o tratamento com apocinina foi eficaz em reduzir a expressão aumentada de NOX2 ( $0.30 \pm 0.01$ ,  $n = 6$ ) e de p47phox ( $0.18 \pm 0.02$ ,  $n = 5$ ) (Figura 6C e D) em leito mesentérico de SHR. Assim como a NOX1 e a NOXO1, a expressão de NOX4 não foi alterada em artérias mesentéricas dos grupos experimentais (Wistar:  $0.38 \pm 0.02$ ; SHR:  $0.32 \pm 0.02$ ; SHR Tratado:  $0.33 \pm 0.01$ ;  $n = 5$ ) (Figura 2.6E).

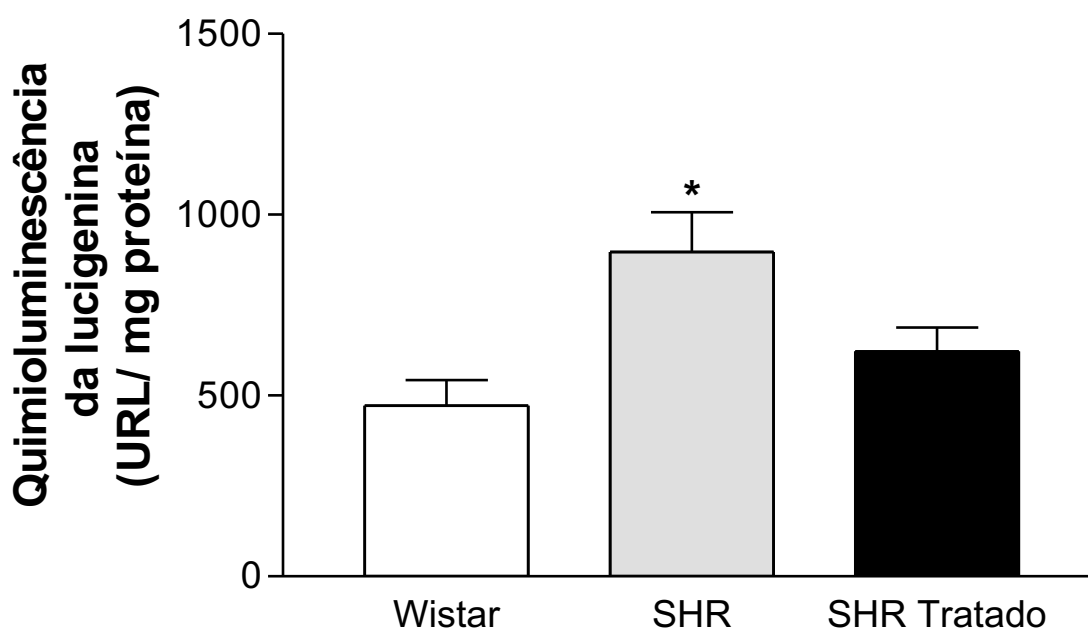


**Figura 2.6.** Autorradiografias típicas e expressão proteica, em unidades arbitrárias, da NOX1 (A), NOXO1 (B), NOX2 (C), p47phox (D) e NOX4 (E) em homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar (barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR Tratado (barras pretas) com apocinina (30 mg/Kg). Valores representam média  $\pm$  EPM, n = 5-6. \* $p < 0,05$  entre SHR versus outros grupos.

### 2.4.7 A produção de ERO dependente de NOX é reduzida pelo tratamento com apocinina em SHR

A produção de ERO dependente de NOX foi aproximadamente duas vezes maior em SHR ( $897.3 \pm 110.1$  URL/ mg proteína,  $n = 9$ ) do que em ratos Wistar ( $472.1 \pm 70.9$  URL/ mg proteína,  $n = 8$ ) (Figura 7). Este resultado pode estar relacionado com a maior expressão de NOX2 e p47phox (Figura 6C e D), uma vez que a NOX2 é maior fonte de ânion superóxido vascular (DIKALOV et al., 2014).

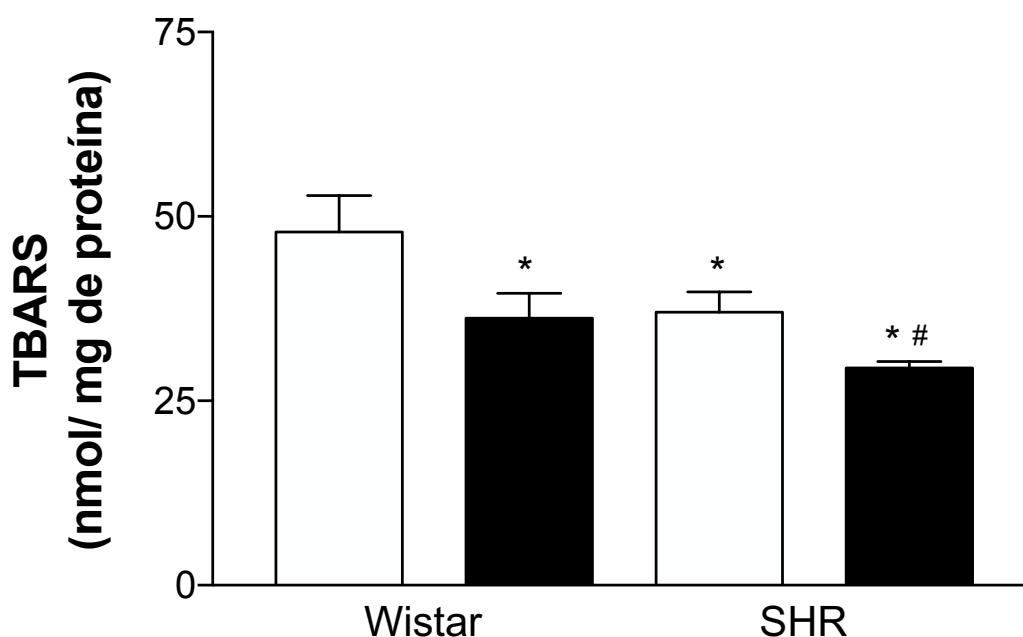
Assim, da mesma forma que foi observada uma redução da expressão de NOX2 e p47phox (Figura 2.6C e D) pelo tratamento com apocinina, observamos que o tratamento com apocinina reduziu e normalizou a produção de ERO em leitos mesentéricos de SHR tratados ( $621.9 \pm 65.7$  URL/ mg proteína,  $n = 7$ ) (Figura 2.7).



**Figura 2.7.** Produção de ERO dependente de NOX detectada pela quimioluminescência da lucigenina, em unidades relativas de luz (URL)/ mg proteína, em homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar (barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR Tratado (barras pretas) com apocinina (30 mg/Kg). Valores representam média  $\pm$  EPM,  $n = 9-10$ . \* $p < 0,05$  entre SHR *versus* outros grupos.

### 2.4.8 O tratamento com apocinina reduziu o marcador de dano oxidativo em leito mesentérico de SHR

De maneira diferente do esperado, leitões mesentéricos de ratos SHR ( $37,0 \pm 2,7$ ,  $n=6$ ) apresentaram menores valores de dano oxidativo quando comparados a ratos normotensos. O marcador de dano oxidativo, malondialdeído (MDA), foi reduzido pela apocinina em ratos normotensos Wistar (Não tratado:  $51,5 \pm 4,1$ ,  $n = 5$ ; Tratado:  $39,3 \pm 1,5$ ,  $n = 5$ ; nmol/ mg de proteína). A apocinina reduziu ainda mais estes valores em vasos de animais hipertensos ( $28,3 \pm 1,3$ ,  $n = 8$ ) (Figura 2.8).

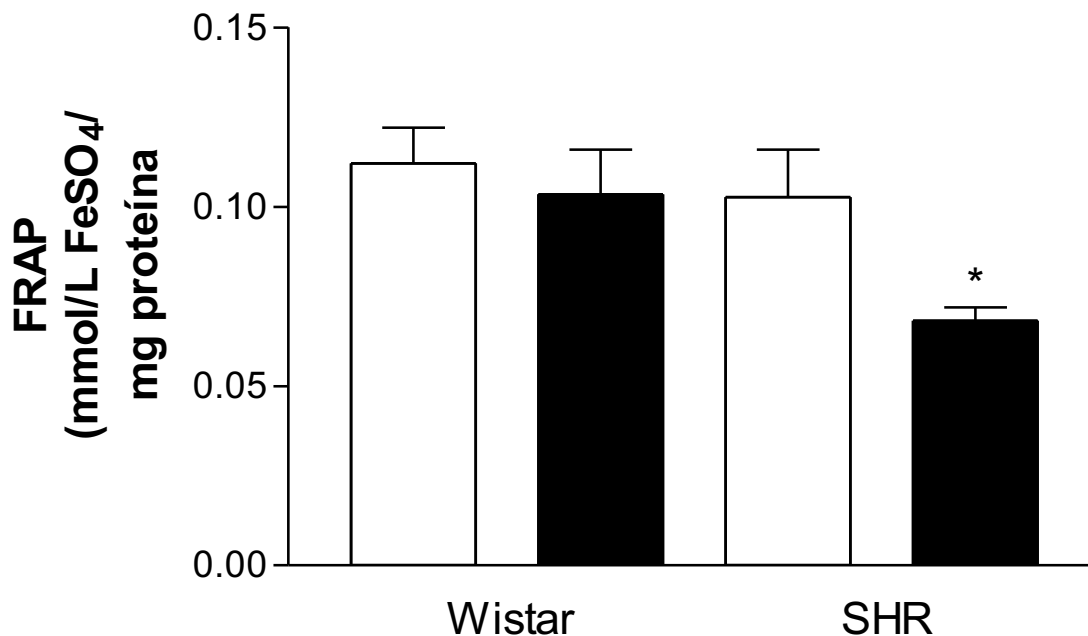


**Figura 2.8.** Níveis de espécies reativas ao ácido 2-tibarbitúrico (malondialdeído), em mmol/L/ mg de proteína, em homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar e SHR não tratados (barras brancas) e tratados com apocinina (barras pretas) 30 mg/Kg. \* $p < 0,05$  Wistar Não Tratado, SHR Não Tratado e SHR Tratado *versus* outros grupos. # $p < 0,05$  SHR Tratado *versus* outros grupos.

#### 2.4.9 O tratamento com apocinina reduziu a capacidade antioxidante total em leito mesentérico de SHR tratados com apocinina

A capacidade antioxidante total foi avaliada nas artérias mesentéricas pelo método FRAP. Observamos que hipertensão não alterou os valores de FRAP (Figura 9). O tratamento com apocinina não alterou os valores de FRAP em ratos normotensos Wistar (Não tratado:  $0,11 \pm 0,01$ ,  $n = 10$ ; Tratado:  $0,10 \pm 0,01$ ,  $n = 10$ ; mmol/L  $\text{FeSO}_4$ / mg de proteína). No entanto, a apocinina reduziu os valores de FRAP em artérias

mesentéricas de ratos SHR (Não tratado:  $0,11 \pm 0,01$ ,  $n = 10$ ; Tratado:  $0,06 \pm 0,003$ ,  $n = 10$ ) (Figura 2.9).

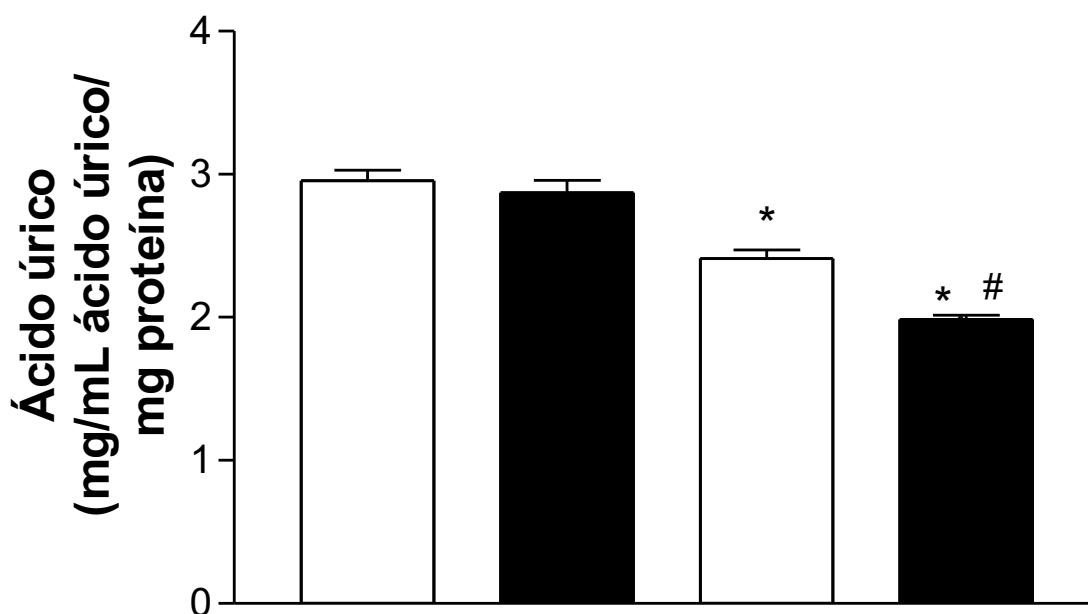


**Figura 2.9.** Capacidade antioxidante, em mmol/L FeSO<sub>4</sub>/ mg de proteína, em homogenatos de leite mesentérico de ratos Wistar e SHR não tratados (barras brancas) e tratados com apocinina (barras pretas) 30 mg/Kg. \* $p < 0,05$  SHR Tratado *versus* outros grupos.

#### 2.4.10 Os níveis de ácido úrico são reduzidos pelo tratamento com apocinina em SHR

O ácido úrico, antioxidante não enzimático, estava reduzido em leite mesentérico de SHR ( $2,4 \pm 0,1$ ,  $n = 6$ , mg/ mL de ácido úrico/ mg de proteína) quando comparado ao de ratos normotensos (Não tratado:  $2,9 \pm 0,2$ ,  $n = 8$ ; Tratado:  $2,8 \pm 0,1$ ,  $n = 5$ ). A apocinina reduziu de maneira significativa estes valores em ratos hipertensos ( $1,98 \pm 0,07$ ,  $n = 6$ ) (Figura 2.10), mas não alterou em ratos normotensos.

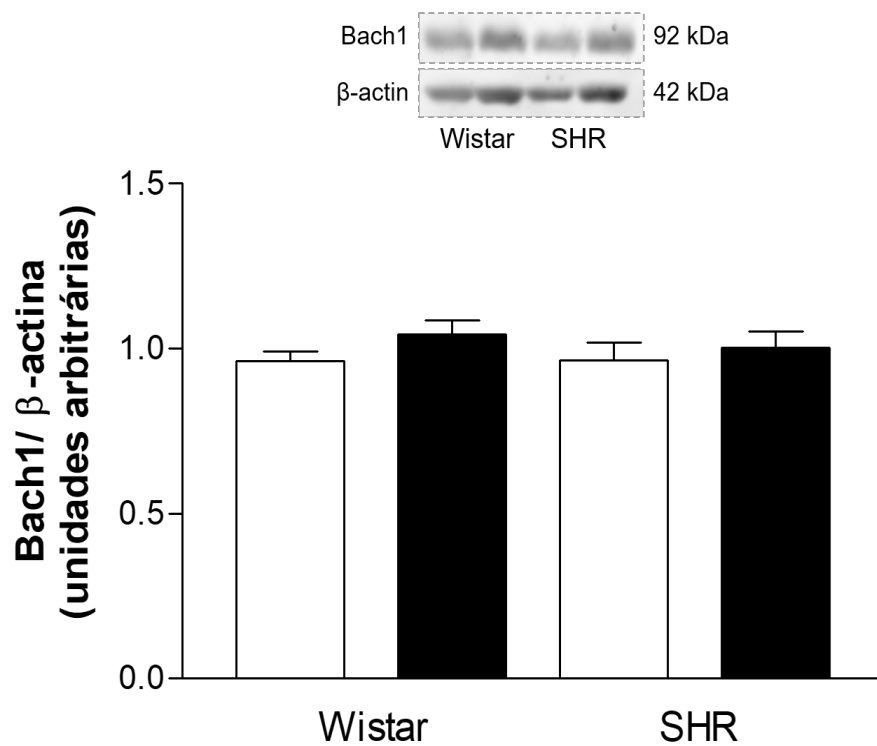




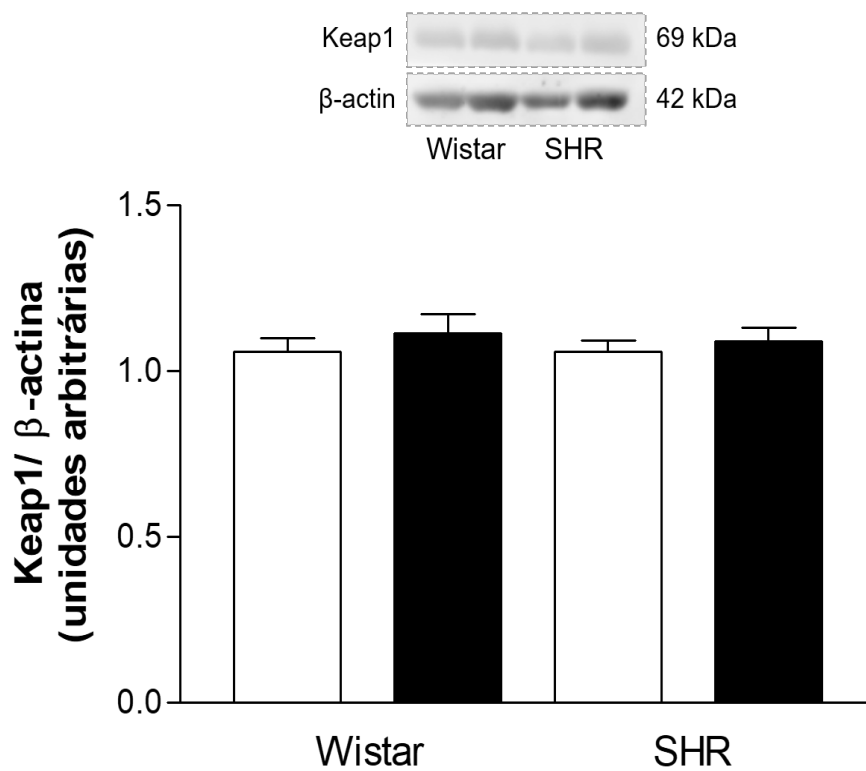
**Figura 2.10.** Níveis de ácido úrico, em mg/ mL de ácido úrico/ mg de proteína, em homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar e SHR não tratados (barras brancas) e tratados com apocinina (barras pretas) 30 mg/Kg. \* $p < 0,05$  SHR Não Tratado e SHR Tratado *versus* Wistar Não Tratado. # $p < 0,05$  SHR Tratado *versus* outros grupos.

#### 2.4.11 O tratamento com apocinina não altera a via de sinalização do Nrf-2

Não encontramos diferenças significativas na expressão proteica de enzimas envolvidas na via de sinalização do Nrf2, como Bach1 (Figura 1.11) e Keap1 (Figura 1.12), em leitos mesentéricos dos grupos experimentais (Bach1: Wistar Não Tratado:  $0,96 \pm 0,02$ ,  $n = 3$ ; Wistar Tratado:  $1,04 \pm 0,04$ ,  $n = 4$ ; SHR Não Tratado:  $0,96 \pm 0,05$ ,  $n = 4$ ; SHR Tratado:  $1,0 \pm 0,05$ ,  $n = 4$ ; unidades arbitrárias; Figura 12) (Keap1: Wistar Não Tratado:  $1,05 \pm 0,04$ ,  $n = 5$ ; Wistar Tratado:  $1,11 \pm 0,05$ ,  $n = 5$ ; SHR Não Tratado:  $1,05 \pm 0,03$ ,  $n = 4$ ; SHR Tratado:  $1,09 \pm 0,03$ ,  $n = 5$ ; unidades arbitrárias; Figura 2.11)



mesentérico de ratos Wistar e SHR não tratados (barras brancas) e tratados com apocinina (barras pretas) 30 mg/Kg.



(Keap1) em homogenatos de leito mesentérico de ratos Wistar e SHR não tratados (barras brancas) e tratados com apocinina (barras pretas) 30 mg/Kg.

***DISCUSSÃO***

## 2.5 DISCUSSÕES

O NO pode ser produzido pelas três diferentes isoformas da NO sintase (NOS): neuronal (nNOS ou NOS I), induzível (iNOS ou NOS II) e endotelial (eNOS ou NOS III). Todas elas utilizam o aminoácido L-arginina como substrato, os co-substratos nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>), e os cofatores flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina adenina mononucleotídeo (FMN) e tetrabiopterina (BH<sub>4</sub>) (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012).

A eNOS é constitutivamente expressa, geralmente regulada pelo complexo cálcio/ calmodulina e por fosforilação (FLEMING, 2003). Tem sua expressão reduzida em aortas de ratos e ratas SHR quando comparados com animais normotensos Wistar (POTJE et al., 2014; TROIANO et al., 2016). A apocinina aumentou, mas não normalizou a expressão da eNOS em aortas de SHR (PERASSA et al., 2016)

Os níveis de nitrato/ nitrito são usualmente utilizados para avaliar a atividade da óxido nítrico sintase endotelial (LAUER et al., 2001).

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 rapidamente oxidado ou reduzido resultando nestes subprodutos (LAUER et al., 2001).

Considerando que a expressão p-eNOS ser1177 e da relação entre a p-eNOS ser1177 e eNOS estão aumentadas em leitos mesentéricos de SHR (Fig.1.1) quando comparados aos de ratos Wistar, esperávamos que a concentração de nitrato/nitrito estivesse aumentada nestes vasos.

Os mecanismos envolvidos no efeito da apocinina sobre a atividade de eNOS não estão completamente elucidados. No entanto, a apocinina ao inibir a NOX e a produção de ânion superóxido, poderia aumentar a atividade de NOS e a biodisponibilidade de óxido nítrico em vasos sanguíneos de SHR, levando à reversão da disfunção endotelial associada à hipertensão. A apocinina melhora a função endotelial não apenas pela alteração da modulação da ERO vascular, mas também por aumentar a biodisponibilidade de NO através de seu efeito direto no aumento da expressão de eNOS em aortas de SHR (PERASSA et al., 2016) o que constitui um novo background para futuros estudos nessa área (VIRDIS et al 2016).

Estes resultados em artérias mesentéricas se diferem dos resultados encontrados em artérias aortas, que apresentam maior expressão de eNOS e níveis de nitrato/nitrito (GRATON et al., 2019), demonstrando que os efeitos da apocinina são mais evidentes em vasos sanguíneos de condutância, onde o vasorelaxamento é essencialmente dependente de NO, enquanto que outros fatores relaxantes dependentes de endotélio estão envolvidos no relaxamento de vasos de resistência, como as artérias mesentéricas (KANG et al., 2014).

A guanilato ciclase solúvel (GCs) é constituída de duas subunidades homólogas,  $\alpha$  e  $\beta$ , e é o primeiro receptor do óxido nítrico (NO) nas células do músculo liso. A ligação com o NO promove conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), promovendo relaxamento do músculo liso vascular (CHILDERS & GARCIN, 2018).

Quatro isoformas da família da NOX são expressas no sistema cardiovascular, NOX1, NOX2, NOX4 e NOX5, no entanto, a NOX5 não é expressa em roedores (SIRKER et al., 2011).

A NOX1 é expressa em todas as camadas da parede vascular e sua produção de ânion superóxido depende da subunidade regulatória citosólicas, NOXO1, que se liga à subunidade p22phox para formar o complexo ligado a membrana e produzir ânion superóxido (LASSÈGUE et al., 2012). Resultados semelhantes são encontrados em aortas de SHR tratados com apocinina (PERASSA et al., 2016), onde não foram encontradas diferenças na expressão de NOX1 e NOXO1.

A fosforilação da PKC promove ativação da p47phox e formação de um complexo com as outras subunidades citosólicas (p40phox e p67phox), translocando-se para a membrana e levando a transferência de elétrons ao oxigênio molecular para a produção de ânion superóxido pela NOX2 (TOUYZ et al., 2003).

A Ang II regula positivamente a indução do gene da NOX2 (DOUGLAS et al., 2012) e vários grupos tem demonstrado a relação entre aumento da expressão de NOX2 e diminuição do relaxamento dependente do endotélio em aortas e em artérias mesentéricas de animais hipertensos (PERASSA et al., 2012; TAKENOUCI et al., 2009; ZEMSE et al., 2007). Além disto, a deleção da NOX2 restaurou o efeito vasodilatador da acetilcolina em artérias cerebrais de camundongos (GIROUARD et al., 2006) e reduziu a hipertensão em ratos DOCA-salt (FUJII et al., 2006) e em camundongos 2R-1C (JUNG et al., 2004).

A grande capacidade de produzir níveis tóxicos de ERO, faz da NOX2 uma forte candidata como alvo terapêutico para tratamento das doenças cardiovasculares (SELEMIDIS et al., 2008).

Por prevenir a fosforilação e translocação da subunidade citosólicas da NOX2, p47phox, para a membrana celular, a apocinina tem sido considerada um inibidor de NOX (STOLK et al., 1994) em células fagocíticas (SIMONS et al., 1990) e não-fagocíticas (EL-SAWALHI; AHMED, 2014; SUZUKI et al., 1992).

Presente em todas as células da parede vascular e responsável pela produção basal de ERO, a NOX4 é constitutivamente expressa e não necessita de estimulação celular ou subunidades citosólicas regulatórias para sua ativação (BEDARD; KRAUSE, 2007). Perassa e colaboradores (2016) não observaram alterações na expressão de NOX4 em homogenatos de aorta de SHR tratados com apocinina.

As ERO produzidas pelas NOX, como o ânion superóxido, atuam em diferentes processos no organismo. Em condições fisiológicas, elas regulam proliferação e migração celular, expressão gênica e angiogênese, mas em condições patológicas, a ativação e expressão desreguladas da NOX levam a uma maior produção de ERO e ativação celular disfuncional (GIMENEZ et al., 2016).

Foi observada uma menor concentração de ERO em células endoteliais de aorta de SHR tratados com apocinina (PERASSA et al., 2016). Para avaliar se o tratamento com apocinina diminui o estresse oxidativo cardiovascular, foi avaliada também a produção de ERO dependente de NOX pelo ensaio da quimioluminescência da lucigenina em leitos mesentéricos de SHR.

A produção elevada de ERO na parede vascular (SUZUKI et al., 1995) precede o desenvolvimento da hipertensão arterial em SHR (KITIYAKARA; WILCOX, 1994) e contribui para a manutenção da resistência

Previamente demonstramos (GRATON et al., 2020) que o tratamento com apocinina reduziu a FRAP plasmática em SHR. Estes resultados sugerem que a CAT estaria reduzida em SHR tratados com apocinina. Como vimos nas figuras 6 e 7, o tratamento com apocinina reduziu a expressão de NOX2 e p47phox, e a atividade da lucigenina em leito mesentérico de SHR. Mais ainda, células endoteliais de aortas de SHR tratados com apocinina apresentaram menor fluorescência ao DHE (PERASSA et al., 2016). Estes dados em conjunto sugerem que a menor quantidade de ERO produzida no plasma e nas células vasculares de SHR tratados com apocinina

promoveria ambiente redox mais equilibrado, e desta forma, a capacidade antioxidante total seria reduzida.

Todos os resultados encontrados e demonstrados acima sugerem que a apocinina é eficaz em reduzir a atividade de mecanismos pró-oxidantes associados ao estresse oxidativo diretamente associado a hipertensão.

Com isso levantamos a hipótese que a apocinina poderia alterar a via de sinalização do Nrf-2, fator de transcrição associado a maior expressão e atividade de enzimas antioxidantes. No entanto, avaliando nossos resultados preliminares, não encontramos diferenças significativas na expressão proteica de enzimas envolvidas na via de sinalização do Nrf2, como Bach1 (Figura 1.11) e Keap1 (Figura 1.12).



**CONCLUSÕES**

## 2.6 CONCLUSÕES

Estes resultados reforçam o importante papel da apocinina na redução do estresse oxidativo por diferentes mecanismos, favorecendo desta forma, o aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico.

Estudos futuros para determinação da atividade e expressão de vias antioxidantes serão realizados para entendermos melhor os mecanismos envolvidos na alteração da sinalização redox promovida pela apocinina em ratos hipertensos.

## ***REFERÊNCIAS***

## REFERÊNCIAS

- ARNAL, J. F.; DINH-XUAN, A. T.; PUEYO, M.; DARBLADE, B.; RAMI, J. **Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology** *Cellular and Molecular Life Sciences* Birkhauser Verlag Basel, , 1999. DOI: 10.1007/s000180050358. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10442089/>. Acesso em: 20 jun. 2021.
- BABIOR, BM. NADPH oxidase. **Current opinion in immunology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 42–47, 2004. DOI: 10.1016/J.COI.2003.12.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14734109/>. Acesso em: 3 set. 2021.
- BASTIANI, Michele; PARTON, Robert G. Caveolae at a glance. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 123, n. 22, p. 3831–3836, 2010. DOI: 10.1242/JCS.070102.
- BENZIE, Iris F. F.; STRAIN, J. J. **The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”**: The FRAP Assay *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*. [s.l: s.n.].
- BIRBEN, E.; SAHINER, Umit Murat; SACKESEN, Cansin; ERZURUM, Serpil; KALAYCI, Omer. **Oxidative stress and antioxidant defense** *World Allergy Organization Journal* BioMed Central Ltd., , 2012. DOI: 10.1097/WOX.0b013e3182439613. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23268465/>. Acesso em: 28 ago. 2020.
- BLAIR, Alison; SHAUL, Philip W.; YUHANNA, Ivan S.; CONRAD, Patricia A.; SMART, Eric J. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 274, n. 45, p. 32512–32519, 1999. DOI: 10.1074/jbc.274.45.32512. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10542298/>. Acesso em: 20 jun. 2021.
- BRIONES, AM; F, Tabet; GE, Callera; AC, Montezano; A, Yogi; Y, He; MT, Quinn; M, Salaices; RM, Touyz. Differential regulation of Nox1, Nox2 and Nox4 in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR. **Journal of the American Society of Hypertension : JASH**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 137–153, 2011. DOI:

10.1016/J.JASH.2011.02.001. Disponível em:  
<https://europepmc.org/article/med/21419746>. Acesso em: 3 set. 2021.

CARR, Anita; FREI, Balz. The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 28, n. 12, p. 1806–1814, 2000. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00225-2.

CHEN, Juan; ROGERS, Steven C.; KAVDIA, Mahendra. Analysis of kinetics of dihydroethidium fluorescence with superoxide using xanthine oxidase and hypoxanthine assay. **Annals of Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 327–337, 2013. DOI: 10.1007/s10439-012-0653-x. Disponível em:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10439-012-0653-x>. Acesso em: 28 ago. 2020.

CONNER, Sean D.; SCHMID, Sandra L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature** **2003 422:6927**, [S. l.], v. 422, n. 6927, p. 37–44, 2003. DOI: 10.1038/nature01451. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature01451>. Acesso em: 26 ago. 2021.

DHALLA, NS; TEMSAH, RM; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of hypertension**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 655–673, 2000. DOI: 10.1097/00004872-200018060-00002. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10872549/>. Acesso em: 26 jul. 2021.

DIKALOV, Sergey I.; NAZAREWICZ, Rafal R.; BIKINEYEVA, Alfiya; HILENSKI, Lula; LASSÈGUE, Bernard; GRIENDLING, Kathy K.; HARRISON, David G.; DIKALOVA, Anna E. Nox2-Induced production of mitochondrial Superoxide in Angiotensin ii-mediated endothelial oxidative stress and hypertension. **Antioxidants and Redox Signaling**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 281–294, 2014. DOI: 10.1089/ars.2012.4918. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24053613/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

DRAB, Marek et al. Loss of Caveolae, Vascular Dysfunction, and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-Disrupted Mice. **Science**, [S. l.], v. 293, n. 5539, p. 2449–2452, 2001. DOI: 10.1126/SCIENCE.1062688. Disponível em:  
<https://science.sciencemag.org/content/293/5539/2449>. Acesso em: 28 jul. 2021.

DRUMMOND, Grant R.; SELEMIDIS, Stavros; GRIENDLING, Kathy K.; SOBEY, Christopher G. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nature Reviews. Drug Discovery**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 453, 2011.

DOI: 10.1038/NRD3403. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3361719/](#). Acesso em: 3 set. 2021.

EL-SAWALHI, Maha M.; AHMED, Lamiaa A. Exploring the protective role of apocynin, a specific NADPH oxidase inhibitor, in cisplatin-induced cardiotoxicity in rats. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 207, n. 1, p. 58–66, 2014. DOI: 10.1016/j.cbi.2013.11.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24291008/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

EREJUWA, OO; SA, Sulaiman; MS, Ab Wahab; KN, Sirajudeen; S, Salleh; S, Gurtu. Honey supplementation in spontaneously hypertensive rats elicits antihypertensive effect via amelioration of renal oxidative stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, [S. l.], v. 2012, 2012. DOI: 10.1155/2012/374037. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22315654/>. Acesso em: 3 set. 2021.

FLEMING, Ingrid; BUSSE, Rudi. **Signal transduction of eNOS activation** **Cardiovascular Research** Elsevier, , 1999. DOI: 10.1016/S0008-6363(99)00094-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10690325/>. Acesso em: 20 jun. 2021.

FÖRSTERMANN, Ulrich; SESSA, William C. **Nitric oxide synthases: Regulation and function** **European Heart Journal** Oxford University Press, , 2012. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3345541/](#). Acesso em: 30 mar. 2021.

FREI, B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 54, n. 6, p. 1113S-1118S, 1991. DOI: 10.1093/ajcn/54.6.1113sa. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/54/6/1113S/4715261>. Acesso em: 28 ago. 2020.

FURCHGOTT, Robert F.; ZAWADZKI, John V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, [S. l.], v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980. DOI: 10.1038/288373a0.

GARCÍA-CARDEÑA, Guillermo; MARTASEK, Pavel; MASTERS, Bettie Sue Siler; SKIDD, Phillip M.; COUET, Jacques; LI, Shengwen; LISANTI, Michael P.; SESSA, William C. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. **Journal**

of **Biological Chemistry**, [S. l.], v. 272, n. 41, p. 25437–25440, 1997. DOI: 10.1074/jbc.272.41.25437. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9325253/>. Acesso em: 20 jun. 2021.

GORREN, Antonius C. F.; SØRLIE, Morten; ANDERSSON, K. Kristoffer; MARCHAL, Stéphane; LANGE, Reinhard; MAYER, Bernd. Tetrahydrobiopterin as Combined Electron/Proton Donor in Nitric Oxide Biosynthesis: Cryogenic UV–Vis and EPR Detection of Reaction Intermediates. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 396, p. 456–466, 2005. DOI: 10.1016/S0076-6879(05)96038-2.

GRATON, M. E.; POTJE, S. R.; TROIANO, J. A.; VALE, G. T.; PERASSA, L. A.; NAKAMUNE, A. C. M. S.; TIRAPELLI, C. R.; BENDHACK, L. M.; ANTONIALI, C. Apocynin alters redox signaling in conductance and resistance vessels of spontaneously hypertensive rats. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 134, 2019. a. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.026.

GRATON, Murilo E.; POTJE, Simone R.; TROIANO, Jéssica A.; VALE, Gabriel T.; PERASSA, Ligia A.; NAKAMUNE, Ana Cláudia M. S.; TIRAPELLI, Carlos R.; BENDHACK, Lusiane M.; ANTONIALI, Cristina. Apocynin alters redox signaling in conductance and resistance vessels of spontaneously hypertensive rats. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 134, p. 53–63, 2019. b. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.026.

GRIENGLING, KATHY K. NADPH Oxidases: New Regulators of Old Functions. **Antioxidants & redox signaling**, [S. l.], v. 8, n. 9–10, p. 1443, 2006. DOI: 10.1089/ARS.2006.8.1443. Disponível em: </pmc/articles/PMC1934428/>. Acesso em: 3 set. 2021.

GRIENGLING, KK; CA, Minieri; JD, Ollerenshaw; RW, Alexander. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circulation research**, [S. l.], v. 74, n. 6, p. 1141–1148, 1994. DOI: 10.1161/01.RES.74.6.1141. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8187280/>. Acesso em: 3 set. 2021.

GYLLENHAMMAR, Hans. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. **Journal of Immunological Methods**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 209–213, 1987. DOI: 10.1016/0022-1759(87)90461-3.

HAN, Lin; YANG, Qing; LI, Jia; CHENG, Feier; ZHANG, Yao; LI, Yunlong; WANG, Min.

Protocatechuic Acid-Ameliorated Endothelial Oxidative Stress through Regulating Acetylation Level via CD36/AMPK Pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 67, n. 25, p. 7060–7072, 2019. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b02647. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b02647>. Acesso em: 25 set. 2020.

HEUMÜLLER, Sabine; WIND, Sven; BARBOSA-SICARD, Eduardo; SCHMIDT, Harald H. H. W.; BUSSE, Rudi; SCHRÖDER, Katrin; BRANDES, Ralf P. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, [S. l.], v. 51, n. 2, p. 211–217, 2008. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.100214. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18086956/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

HIGASHI, Yukihiro; KIHARA, Yasuki; NOMA, Kensuke. **Endothelial dysfunction and hypertension in aging** *Hypertension Research* *Hypertens Res*, , 2012. DOI: 10.1038/hr.2012.138. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22972557/>. Acesso em: 26 jul. 2021.

IYER, G. Y. N.; ISLAM, M. F.; QUASTEL, J. H.; IYER, G. Y. N.; ISLAM, M. F.; QUASTEL, J. H. Biochemical Aspects of Phagocytosis. **Natur**, [S. l.], v. 192, n. 4802, p. 535–541, 1961. DOI: 10.1038/192535A0. Disponível em: <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/1961Natur.192..535I/abstract>. Acesso em: 3 set. 2021.

JAMESON, Michael; DAI, Fu Xiang; LÜSCHER, Thomas; SKOPEC, Joseph; DIEDERICH, Alice; DIEDERICH, Dennis. Endothelium-derived contracting factors in resistance arteries of young spontaneously hypertensive rats before development of overt hypertension. **Hypertension**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 280–288, 1993. DOI: 10.1161/01.HYP.21.3.280. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8386699/>. Acesso em: 26 jul. 2021.

JAVKHEDKAR, Apurva A.; QUIROZ, Yasmir; RODRIGUEZ-ITURBE, Bernardo; VAZIRI, Nosratola D.; LOKHANDWALA, Mustafa F.; BANDAY, Anees A. Resveratrol restored Nrf2 function, reduced renal inflammation, and mitigated hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, [S. l.], v. 308, p. 840–846, 2015. DOI: 10.1152/ajpregu.00308.2014.-Compelling. Disponível em: <http://www.ajpregu.org>. Acesso em: 3 set. 2021.

JOHANNES, Ludger; LAMAZE, Christophe. Clathrin-dependent or not: Is it still the



question? **Traffic**, [S. l.], v. 3, n. 7, p. 443–451, 2002. DOI: 10.1034/J.1600-0854.2002.30701.X.

KAKKAR, Sahil; BAIS, Souravh. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. **ISRN Pharmacology**, [S. l.], v. 2014, p. 1–9, 2014. DOI: 10.1155/2014/952943. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25006494/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

KILIC, Ismail; YEŞİLOĞLU, Yeşim; BAYRAK, Yüksel. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of ellagic acid. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S. l.], v. 130, p. 447–452, 2014. DOI: 10.1016/j.saa.2014.04.052.

KOJIMA, Hirotatsu; NAKATSUBO, Naoki; KIKUCHI, Kazuya; KAWAHARA, Shigenori; KIRINO, Yutaka; NAGOSHI, Hiroshi; HIRATA, Yasunobu; NAGANO, Tetsuo. Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 70, n. 13, p. 2446–2453, 1998. DOI: 10.1021/ac9801723. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9666719/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

LAGUERRE, Mickaël; LÓPEZ-GIRALDO, Luis J.; LECOMTE, Jérôme; BARÉA, Bruno; CAMBON, Emmanuelle; TCHOBO, Paul Fidèle; BAROUH, Nathalie; VILLENEUVE, Pierre. Conjugated autoxidizable triene (CAT) assay: A novel spectrophotometric method for determination of antioxidant capacity using triacylglycerol as ultraviolet probe. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 380, n. 2, p. 282–290, 2008. DOI: 10.1016/j.ab.2008.06.006.

LASSEGUE, B. Reactive oxygen species in hypertension\*1An update. **American Journal of Hypertension**, [S. l.], v. 17, n. 9, p. 852–860, 2004. DOI: 10.1016/j.amjhyper.2004.02.004. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajh/article-lookup/doi/10.1016/j.amjhyper.2004.02.004>. Acesso em: 29 ago. 2020.

LE LAY, Soazig; KURZCHALIA, Teymuraz V. Getting rid of caveolins: Phenotypes of caveolin-deficient animals. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [S. l.], v. 1746, n. 3, p. 322–333, 2005. DOI: 10.1016/J.BBAMCR.2005.06.001.

LERMAN, Lilach O. et al. Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From

the American Heart Association. **Hypertension**, [S. l.], v. 73, n. 6, p. e87–e120, 2019. DOI: 10.1161/HYP.0000000000000090. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/HYP.0000000000000090>. Acesso em: 26 jul. 2021.

LI, Xican; WANG, Xiaozhen; CHEN, Dongfeng; CHEN, Shuzhi. Antioxidant Activity and Mechanism of Protocatechuic Acid in vitro. **Functional Foods in Health and Disease**, [S. l.], v. 1, n. 7, p. 232, 2011. DOI: 10.31989/ffhd.v1i7.127. Disponível em: <https://www.ffhdj.com/index.php/ffhd/article/view/127/260>. Acesso em: 28 ago. 2020.

LI, Yunbo; ZHU, Hong; KUPPUSAMY, Periannan; ROUBAUD, Valerie; ZWEIER, Jay L.; TRUSH, Michael A. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 4, p. 2015–2023, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.4.2015. Disponível em: <https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/validation-of-lucigenin-bis-n-methylacridinium-as-a-chemiluminescent-probe-for-detecting-superoxide-anion-radical-production-by-enzymatic-and-cellular-systems>. Acesso em: 28 ago. 2020.

LÜ, Jian Ming; LIN, Peter H.; YAO, Qizhi; CHEN, Changyi. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 840–860, 2010. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>. Acesso em: 28 ago. 2020.

LUNDBERG, Jon O.; WEITZBERG, Eddie; GLADWIN, Mark T. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery** 2008 7:2, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 156–167, 2008. DOI: 10.1038/nrd2466. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd2466>. Acesso em: 27 jul. 2021.

LUNDIN, S.; RICKSTEN, SE; THORÉN, P. Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. **Acta physiologica Scandinavica**, [S. l.], v. 120, n. 2, p. 265–272, 1984. DOI: 10.1111/J.1748-1716.1984.TB00133.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6711341/>. Acesso em: 26 jul. 2021.

LUSCHER, T. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, [S. l.],

v. 8, n. 4, p. 344–348, 1986. DOI: 10.1161/01.HYP.8.4.344. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2870025/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

MAJID, Sabhiya; KHANDUJA, Krishan L.; GANDHI, Rajinder K.; KAPUR, Sanjay; SHARMA, Rati R. **INFLUENCE OF ELLAGIC ACID ON ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM AND LIPID PEROXIDATION IN MICE***Biochemical Pharmacology*. [s.l.: s.n.].

MARKMAN FILHO, Brivaldo et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial-2020 Barroso et al. *Arq Bras Cardiol. [S. l.]*, v. 116, n. 3, p. 516–658, 2021. DOI: 10.36660/abc.20201238. Disponível em: <https://doi.org/10.36660/abc.20201238>. Acesso em: 19 jul. 2021.

MILLER, Francis J.; GUTTERMAN, David D.; RIOS, C. David; HEISTAD, Donald D.; DAVIDSON, Beverly L. Superoxide Production in Vascular Smooth Muscle Contributes to Oxidative Stress and Impaired Relaxation in Atherosclerosis. **Circulation Research**, [S. l.], v. 82, n. 12, p. 1298–1305, 1998. DOI: 10.1161/01.RES.82.12.1298. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.RES.82.12.1298>. Acesso em: 3 set. 2021.

MILLS, Katherine T.; JD, Bundy; TN, Kelly; JE, Reed; PM, Kearney; K, Reynolds; J, Chen; J, He. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. **Circulation**, [S. l.], v. 134, n. 6, p. 441–450, 2016. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018912. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27502908/>. Acesso em: 26 jul. 2021.

MILLS, Katherine T.; STEFANESCU, Andrei; HE, Jiang. The global epidemiology of hypertension. **Nature reviews. Nephrology**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 223, 2020. DOI: 10.1038/S41581-019-0244-2. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7998524/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32444444/). Acesso em: 19 jul. 2021.

MOTOYAMA, Takeshi et al. Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina. **Journal of the American College of Cardiology**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 1672–1679, 1998. DOI: 10.1016/S0735-1097(98)00447-1.

MÜNZEL, Thomas; AFANAS'EV, Igor B.; KLESCHYOV, Andrei L.; HARRISON, David G. **Detection of superoxide in vascular tissue***Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* Lippincott Williams & Wilkins, , 2002. DOI:

10.1161/01.ATV.0000034022.11764.EC. Disponível em:  
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.0000034022.11764.EC>. Acesso em:  
28 ago. 2020.

NAZAREWICZ, Rafal R.; BIKINEYEVA, Alfiya; DIKALOV, Sergey I. Rapid and specific measurements of superoxide using fluorescence spectroscopy. **Journal of Biomolecular Screening**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 498–503, 2013. DOI: 10.1177/1087057112468765. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23190737/>. Acesso em: 29 ago. 2020.

OKAMOTO, Kozo; AOKI, Kyuzo. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **JAPANESE CIRCULATION JOURNAL**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 282–293, 1963. DOI: 10.1253/jcj.27.282. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13939773/>. Acesso em: 26 jul. 2021.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 49, n. 10, p. 4619–4626, 2001. DOI: 10.1021/jf010586o. Disponível em:  
<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>. Acesso em: 28 ago. 2020.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, [S. l.], v. 327, n. 6122, p. 524–526, 1987. DOI: 10.1038/327524a0. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3495737/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

PARACATU, Luana Chiquetto; FARIA, Carolina Maria Quinello Gomes; QUINELLO, Camila; RENNÓ, Camila; PALMEIRA, Patricia; ZERAIK, Maria Luiza; DA FONSECA, Luiz Marcos; XIMENES, Valdecir Farias. Caffeic acid phenethyl ester: Consequences of its hydrophobicity in the oxidative functions and cytokine release by leukocytes. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/793629. Disponível em:  
[https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1015031172?subset\\_publication\\_citations=pub.1040645975](https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1015031172?subset_publication_citations=pub.1040645975). Acesso em: 28 ago. 2020.

PARAVICINI, Tamara M.; TOUYZ, Rhian M. **NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities.** *Diabetes care*, 2008. DOI: 10.2337/dc08-s247.

PECORELLI, Alessandra; BOCCI, Velio; ACQUAVIVA, Alessandra; BELMONTE, Giuseppe; GARDI, Concetta; VIRGILI, Fabio; CICCOLI, Lucia; VALACCHI, Giuseppe. NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. *[S. l.]*, 2013. DOI: 10.1016/j.taap.2012.12.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.12.001>. Acesso em: 3 set. 2021.

PERASSA, L. A. et al. Apocynin reduces blood pressure and restores the proper function of vascular endothelium in SHR. **Vascular Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 87, 2016. a. DOI: 10.1016/j.vph.2016.06.005.

PERASSA, Ligia A. et al. Apocynin reduces blood pressure and restores the proper function of vascular endothelium in SHR. **Vascular Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 87, p. 38–48, 2016. b. DOI: 10.1016/j.vph.2016.06.005.

PETRÔNIO, Maicon S.; ZERAIK, Maria Luiza; DA FONSECA, Luiz Marcos; XIMENES, Valdecir F. Apocynin: Chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. **Molecules**, *[S. l.]*, v. 18, n. 3, p. 2821–2839, 2013. DOI: 10.3390/molecules18032821. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23455672/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

PFEFFER, JM; MA, Pfeffer; MC, Fishbein; ED, Frohlich. Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. **The American journal of physiology**, *[S. l.]*, v. 237, n. 4, 1979. DOI: 10.1152/AJPHEART.1979.237.4.H461. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/495731/>. Acesso em: 26 jul. 2021.

POTJE, S. R.; TROIANO, J. A.; GRATON, M. E.; XIMENES, V. F.; NAKAMUNE, A. C. M. S.; ANTONIALI, C. Hypotensive and vasorelaxant effect of Diapocynin in normotensive rats. **Free Radical Biology and Medicine**, *[S. l.]*, v. 106, 2017. a. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.026.

POTJE, Simone R.; GRANDO, Marcella D.; CHIGNALIA, Andreia Z.; ANTONIALI, Cristina; BENDHACK, Lusiane M. Reduced caveolae density in arteries of SHR contributes to endothelial dysfunction and ROS production. **Scientific Reports**, *[S. l.]*, v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-43193-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31040342/>. Acesso em: 4 maio. 2021.

POTJE, Simone R.; TROIANO, Jéssica A.; GRATON, Murilo E.; XIMENES, Valdecir F.; NAKAMUNE, Ana Cláudia M. S.; ANTONIALI, Cristina. Hypotensive and vasorelaxant effect of Diapocynin in normotensive rats. **Free Radical Biology and**

**Medicine**, [S. l.], v. 106, p. 148–157, 2017. b. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.026. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28192231/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

QIU, Weiping; KASS, David A.; HU, Qinghua; ZIEGELSTEIN, Roy C. Determinants of shear stress-stimulated endothelial nitric oxide production assessed in real-time by 4,5-diaminofluorescein fluorescence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 286, n. 2, p. 328–335, 2001. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5401. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11500041/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

RA, Lopes; KB, Neves; RC, Tostes; AC, Montezano; RM, Touyz. Downregulation of Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor and Associated Antioxidant Genes Contributes to Redox-Sensitive Vascular Dysfunction in Hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, [S. l.], v. 66, n. 6, p. 1240–1250, 2015. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06163. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26503970/>. Acesso em: 3 set. 2021.

REY, Federico E.; LI, Xiao-Chun; CARRETERO, Oscar A.; GARVIN, Jeffrey L.; PAGANO, Patrick J. Perivascular Superoxide Anion Contributes to Impairment of Endothelium-Dependent Relaxation. **Circulation**, [S. l.], v. 106, n. 19, p. 2497–2502, 2002. DOI: 10.1161/01.CIR.0000038108.71560.70. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.CIR.0000038108.71560.70>. Acesso em: 3 set. 2021.

RODRIGO, Ramón; GONZÁLEZ, Jaime; PAOLETTO, Fabio. **The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension** *Hypertension Research*, , 2011. DOI: 10.1038/hr.2010.264. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21228777/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

ROGINSKY, Vitaly; LISSI, Eduardo A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 92, n. 2, p. 235–254, 2005. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.08.004.

ROSSI, F.; ZATTI, M. Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. **Experientia**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 21–23, 1964. DOI: 10.1007/BF02146019. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/4379032>. Acesso em: 3 set. 2021.

ROTHBERG, Karen G.; HEUSER, John E.; DONZELL, William C.; YING, Yun Shu; GLENNEY, John R.; ANDERSON, Richard G. W. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. **Cell**, [S. l.], v. 68, n. 4, p. 673–682, 1992. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90143-Z.

SARAN, Manfred; MICHEL, Christa; BORS, Wolf; CZAPSKI, G. Reaction of No With O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Implications for the Action of Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF). <http://dx.doi.org/10.3109/10715769009149890>, [S. l.], v. 10, n. 4–5, p. 221–226, 2009. DOI: 10.3109/10715769009149890. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10715769009149890>. Acesso em: 3 set. 2021.

SARONI ARWA, Phanuel; ZERAIK, Maria Luiza; FARIAS XIMENES, Valdecir; DA FONSECA, Luiz Marcos; DA SILVA BOLZANI, Vanderlan; SIQUEIRA SILVA, Dulce Helena. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 174, p. 410–418, 2015. DOI: 10.1016/j.jep.2015.08.041.

SCHIFFRIN, Ernesto L. **Oxidative stress, nitric oxide synthase, and superoxide dismutase: A matter of imbalance underlies endothelial dysfunction in the human coronary circulation***Hypertension*, , 2008. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103226. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18071058/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

SCHRAMM, Agata; MATUSIK, Paweł; OSMENDA, Grzegorz; GUZIK, Tomasz J. **Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology***Vascular Pharmacology*Elsevier Inc., , 2012. DOI: 10.1016/j.vph.2012.02.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22405985/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

SEDEEK, Mona; HÉBERT, Richard L.; KENNEDY, Chris R.; BURNS, Kevin D.; TOUYZ, Rhian M. **Molecular mechanisms of hypertension: Role of Nox family NADPH oxidases***Current Opinion in Nephrology and Hypertension*Curr Opin Nephrol Hypertens, , 2009. DOI: 10.1097/MNH.0b013e32832923c3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19430333/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

SEMAMING, Yoswaris; PANNENGPETCH, Patchareewan; CHATTIPAKORN, Siriporn C.; CHATTIPAKORN, Nipon. **Pharmacological properties of**

**protocatechuic acid and its potential roles as complementary medicine***Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*Hindawi Publishing Corporation, , 2015. DOI: 10.1155/2015/593902.

SILVA, Bruno R.; PERNOMIAN, Laena; BENDHACK, Lusiane M. **Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension***Frontiers in Physiology*Front Physiol, , 2012. DOI: 10.3389/fphys.2012.00441. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23227009/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

SILVA SANTOS DE OLIVEIRA, Jessica; DA SILVA SANTOS, Gabriela; ALFREDO MORAES, João; MATTOS SALIBA, Alessandra; CHRISTINA BARJA-FIDALGO, Thereza; LUÍZA MATTOS-GUARALDI, Ana; EMY NAGAO, Prescilla. Reactive oxygen species generation mediated by NADPH oxidase and PI3K/Akt pathways contribute to invasion of *Streptococcus agalactiae* in human endothelial cells. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, [S. l.], v. 113, n. 6, p. 1–8, 2018. DOI: 10.1590/0074-02760170421.

SIMONS, Jos M.; 'T HART, Bert A.; IP VAI CHING, Theo R. A. M.; VAN DIJK, Hans; LABADIE, Rudi P. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 251–258, 1990. DOI: 10.1016/0891-5849(90)90070-Y. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2160411/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

SIRKER, Alexander; ZHANG, Min; SHAH, Ajay M. **NADPH oxidases in cardiovascular disease: Insights from in vivo models and clinical studies***Basic Research in Cardiology*Basic Res Cardiol, , 2011. a. DOI: 10.1007/s00395-011-0190-z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21598086/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

SIRKER, Alexander; ZHANG, Min; SHAH, Ajay M. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. **Basic Research in Cardiology**, [S. l.], v. 106, n. 5, p. 735, 2011. b. DOI: 10.1007/S00395-011-0190-Z. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3149671/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21598086/). Acesso em: 3 set. 2021.

TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SUDANO, I.; SALVETTI, A. Endothelial dysfunction in hypertension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, [S. l.], v. 38, n. SUPPL. 2, 2002. DOI: 10.1097/00005344-200111002-00004.

TAIN, You-Lin; HSU, Chien-Ning; HUANG, Li-Tung; LAU, Ying-Tung. Apocynin



attenuates oxidative stress and hypertension in young spontaneously hypertensive rats independent of ADMA/NO pathway. **Free Radical Research**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 68–76, 2012. DOI: 10.3109/10715762.2011.639069. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10715762.2011.639069>. Acesso em: 28 ago. 2020.

TANASE, H. Genetic control of blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Jikken dobutsu. Experimental animals**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 519–530, 1979. DOI: 10.1538/EXPANIM1978.28.4\_519. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/527674/>. Acesso em: 26 jul. 2021.

TANITO, Masaki et al. Enhanced Oxidative Stress and Impaired Thioredoxin Expression in Spontaneously Hypertensive Rats. **Antioxidants and Redox Signaling**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 89–97, 2004. DOI: 10.1089/152308604771978381. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14713339/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

THOMAS, Candice M.; SMART, Eric J. Caveolae structure and function: Caveolae Review Series. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 796–809, 2008. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00295.x. Disponível em: </pmc/articles/PMC4401128/>. Acesso em: 20 jun. 2021.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. **Reactive oxygen species in vascular biology: Implications in hypertension***Histochemistry and Cell Biology*Histochem Cell Biol, , 2004. DOI: 10.1007/s00418-004-0696-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15338229/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

TOUYZ, Rhian M.; BRIONES, Ana M. **Reactive oxygen species and vascular biology: Implications in human hypertension***Hypertension Research*Hypertens Res, , 2011. DOI: 10.1038/hr.2010.201. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20981034/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

TRANE, Andy E.; PAVLOV, Dmitri; SHARMA, Arpeeta; SAQIB, Uzma; LAU, Kelvin; VAN PETEGEM, Filip; MINSHALL, Richard D.; ROMAN, Linda J.; BERNATCHEZ, Pascal N. Deciphering the binding of Caveolin-1 to client protein endothelial nitric-oxide synthase (eNOS): Scaffolding subdomain identification, interaction modeling, and biological significance. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 289, n. 19, p. 13273–13283, 2014. DOI: 10.1074/jbc.M113.528695. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24648521/>. Acesso em: 20 jun. 2021.

TRIPPODO, NC; FROHLICH, ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circulation research**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 309–319, 1981. DOI: 10.1161/01.RES.48.3.309. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7460205/>. Acesso em: 26 jul. 2021.

WIND, S.; BEUERLEIN, K.; EUCKER, T.; MÜLLER, H.; SCHEURER, P.; ARMITAGE, M. E.; HO, H.; SCHMIDT, H. H. H. W.; WINGLER, K. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 161, n. 4, p. 885–898, 2010. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00920.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20860666/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

WU, Lingyun; ASHRAF, M. Hossein Noyan; FACCI, Marina; WANG, Rui; PATERSON, Phyllis G.; FERRIE, Alison; JUURLINK, Bernhard H. J. Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 101, n. 18, p. 7094, 2004. DOI: 10.1073/PNAS.0402004101. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14644441/>. Acesso em: 3 set. 2021.

XIAO, Lei; LIU, Yahan; WANG, Nanping. **New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells** *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* Am J Physiol Heart Circ Physiol, , 2014. DOI: 10.1152/ajpheart.00182.2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24285111/>. Acesso em: 27 jul. 2021.

XU, Y.; HENNING, R. H.; VAN DER WANT, J. J. L.; VAN BUITEN, A.; VAN GILST, W. H.; BUIKEMA, H. Disruption of endothelial caveolae is associated with impairment of both NO- as well as EDHF in acetylcholine-induced relaxation depending on their relative contribution in different vascular beds. **Life Sciences**, [S. l.], v. 80, n. 18, p. 1678–1685, 2007. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.01.041. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17335855/>. Acesso em: 20 jun. 2021.

YAGI, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [S. l.], v. 108, p. 101–106, 1998. DOI: 10.1385/0-89603-472-0:101. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1385/0-89603-472-0:101>. Acesso em: 28 ago. 2020.

YAMADA, E. The fine structure of the renal glomerulus of the mouse. **The Journal of**

**biophysical and biochemical cytology**, [S. l.], v. 1, n. 6, p. 551–566, 1955. DOI: 10.1083/JCB.1.6.551.

ZHOU, Xueping; HE, Pingnian. Improved measurements of intracellular nitric oxide in intact microvessels using 4,5-diaminofluorescein diacetate. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [S. l.], v. 301, n. 1, 2011. DOI: 10.1152/ajpheart.00195.2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21536843/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

ZHU, Hong; ZHANG, Li; AMIN, Ashok R.; LI, Yunbo. Coordinated upregulation of a series of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes as a novel strategy for protecting renal tubular cells from oxidative and electrophilic stress. **Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 233, n. 6, p. 753–765, 2008. DOI: 10.3181/0801-RM-5.



## ANEXO 1. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – Capítulo 1.



**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 "**Estudo dos mecanismos pós-translacionais envolvidos no aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico em ratos espontaneamente hipertensos tratados com apocinina**", Processo FOA nº 00855-2017, 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 19 de Setembro de 2017.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 18 de Setembro de 2021.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 18 de Outubro de 2021.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Study of the post-translational mechanisms involved in increased nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats treated with apocynin**", Protocol FOA nº 00855-2017, 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 September 19, 2017.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** September 18, 2021.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** October 18, 2021.

**Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

## ANEXO 2. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – Capítulo 2.



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 "**Apocinina: um antioxidante ou inibidor de NAD(P)H oxidase em células vasculares?**", Processo FOA nº 00130-2016, 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 24 de março de 2016.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 28 de Fevereiro de 2017.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 28 de Março de 2017.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Apocynin: an antioxidant or a NAD(P)H oxidase inhibitor in vascular cells?**", Protocol FOA nº 00130-2016, 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 March 24, 2016.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** February 28, 2017.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** March 28, 2017.

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

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP  
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br