

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

Lígia Arnedo Perassa

Efeito da apocinina na hipertensão, disfunção endotelial e hipertrofia ventricular esquerda em Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR)

ARAÇATUBA

2013

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

Lígia Arnedo Perassa

Efeito da apocinina na hipertensão, disfunção endotelial e hipertrofia ventricular esquerda em Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR)

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Antoniali Silva

ARAÇATUBA

2013

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P426e Perassa, Lígia Arnedo.
Efeito da apocinina na hipertensão, disfunção endotelial e hipertrofia ventricular esquerda em Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) / Lígia Arnedo Perassa - Araçatuba, 2013
101 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Dra. Cristina Antoniali Silva

1. Hipertensão 2. Vasodilatação 3. Endotélio 4. Hipertrofia ventricular esquerda 5. Ratos endogâmicos SHR 6. NADPH oxidase I. T.

CDD 612

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 17.08.1988, Andradina- SP.

Filiação: Sonia Maria Arnedo Perassa
Luiz Carlos Perassa

2006/2009: Curso de Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, Campus de Três Lagoas, MS.

2011/2013: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP.

Dedico esta dissertação aos meus pais, Sonia e Luiz, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhasse sem medo e cheios de esperanças, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Amo vocês, muito obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que nunca me abandonou, me deu forças e sabedoria para concluir esta caminhada.

A professora Cristina Antoniali Silva pela orientação, pelos importantes ensinamentos transmitidos durante a realização deste trabalho, pela paciência e auxílio nas dificuldades. Muito obrigada por tudo!

Ao grupo de pesquisa da professora Cristina, Simone Potje, Murilo Graton, Mariana Lima, Felipe Munhoz, Dalise Zancheta, Natália Manrique, Thais Costa, Gabrielle Almeida, Jéssica Troiano, Priscila Oliveira, pela parceria e contribuição na realização deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa da professora Lusiane Bendack, em especial a Laena Pernomian e a Marcella Granado pela ajuda na padronização dos experimentos *in vitro* de citometria de fluxo e Western Blotting.

Ao professor João Carlos Callera por ceder o laboratório para realização dos experimentos *in vivo*, a professora Dóris Hissako Sumida pela ajuda na realização dos experimentos de Western Blotting e aos demais professores do Departamento de Ciências Básicas, Sandra Helena Penha de Oliveira, João César Bedran de Castro, Ana Claudia Nakamune, Rita Cássia Menegatti Dornelles e Wilson Garcia por contribuírem em meu aprendizado.

A professora Tereza Cristina da Faculdade de Medicina Veterinário de Araçatuba (FMVA) por ceder o laboratório para realização dos experimentos de citometria de fluxo.

Ao professor Edilson Ervolino da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP) pela colaboração nas técnicas histológicas.

Aos professores da banca examinadora, Carlos Renato Tirapelli e Fernando Silva Carneiro, por terem aceitado o convite e pela contribuição na melhoria deste trabalho.

Aos funcionários da FOA-UNESP, Arnaldo, Camilo, João, Eliseide pela ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da FOA, Ana Claudia, Ana Paula, Maria Claudia, Denise e Luiz.

As funcionárias da seção de pós-graduação, Valéria Zagatto, Cristiane Lui e Lilian Mada.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de mestrado (proc. no. 2011/04619-0) e pelo auxílio financeiro à pesquisa (proc. no. 2011/20998-0) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro.

A UNESP (Universidade Estadual Paulista) pela oportunidade de poder realizar e concluir o Mestrado.

Ao meu irmão, Eder Arnedo Perassa, pela inspiração e incentivo nos estudos e a todos meus familiares que de alguma forma contribuíram por essa conquista.

Ao meu namorado, Rômulo Provazi, por ter aceitado se privar muitas vezes de minha companhia pelos estudos, pelo amor e paciência nos meus momentos de dúvidas, inquietações, desânimos. Pelo apoio, confiança e valorização do meu trabalho, dando-me, desta forma, coragem e ânimo para transpor os dias de cansaço. Amo-te!

Aos amigos e colegas do Departamento de Ciências Básicas, Rita, Camila, Samuel, Wagner, Ariana, Ângela, Caril, Thaís, Thamine, Dalise, Max Sander, Keny, Leandro, Monique, Jéssica, Simone pela convivência agradável durante o mestrado.

Aos amigos queridos Mariana Lima, Rita de Cássia, Ariane Araújo, Simone Potje, Murilo Graton, Angela Nicola, Aline Yamamoto, Cristiane Bashiyo pela amizade e a amiga que sempre me acompanhou desde a graduação, Ariana Ferreira, muito obrigada pelo companheirismo e por todos os momentos que compartilhamos juntas durante todos esses anos.

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução desse trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade. Muito Obrigada!

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas, e sim aquele que faz as verdadeiras perguntas.”

Claude Lévi-Strauss

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

RESUMO

As enzimas NAD(P)H oxidases ou família NOX tem sido considerada a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO) em vários tipos celulares. O aumento da biodisponibilidade de ERO e do sinal redox (estresse oxidativo) têm sido associados ao início e ou progressão de doenças crônicas como a hipertensão. Inibidores da NAD(P)H oxidase, como a apocinina, foram desenvolvidos e seus efeitos anti-hipertensivos têm sido estudados. O objetivo deste estudo foi verificar se o tratamento crônico com apocinina previne o desenvolvimento da hipertensão, da disfunção endotelial e da hipertrofia ventricular esquerda em Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) e avaliar os possíveis mecanismos envolvidos nestes efeitos. Para isto, ratos normotensos Wistar e SHR foram tratados com apocinina (30 mg/kg/dia, diluída na água de beber) da quarta até a décima semana de vida. Foram realizados experimentos *in vivo* para avaliação de valores basais de pressão arterial (média - PAM, sistólica - PS e diastólica - PD), frequência cardíaca (FC) e as respostas às drogas hipotensoras, acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS) e pressoras, fenilefrina (Phe) e angiotensina II (ANGII). Experimentos *in vitro* foram realizados para determinar se o tratamento com apocinina promove alterações na concentração citosólica de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]$), de óxido nítrico ([NO]) e de espécies reativas de oxigênio ([ERO]) nas células endoteliais (citometria de fluxo), estimuladas ou não com acetilcolina; na expressão proteica (Western Blotting) de enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e da guanilato ciclase solúvel em aorta destes animais; na hipertrofia ventricular esquerda, a partir da análise de cortes histológicos do ventrículo esquerdo com coloração Hematoxilina-Eosina (HE) e Picrossirius Red (*Sirius Red*) para analisar a presença de colágeno. Nossos resultados demonstraram que ao final do tratamento com apocinina, os SHR tratados apresentaram valores de PAS, PAD PAM e FC significativamente menores

do que os obtidos em SHR não tratados. As respostas à ACh foram maiores em SHR tratados do que em SHR não tratados, a resposta ao NPS não foi alterada e as respostas pressoras à Phe e ANG II estavam reduzidas em SHR tratados. A apocinina diminuiu a concentração de ERO e aumentou a concentração de Ca^{2+} e de NO em células endoteliais, aumentou a expressão da eNOS e não alterou a expressão das subunidades alfa e beta da GCs em aortas de SHR. Apesar da avaliação do peso cardíaco total (PCT) e do índice de massa ventricular esquerda (IMVE) não apresentarem diferenças entre SHR tratados com apocinina e não tratados, os valores de diâmetro dos cardiomiócitos e a porcentagem de colágeno foram menores em SHR tratados do que em SHR não tratados. Não observamos alterações dos parâmetros avaliados entre ratos Wistar não tratados e tratados com apocinina. Em conclusão, nosso estudo demonstrou que o tratamento crônico com apocinina previne o desenvolvimento hipertensão, da hipertrofia ventricular e da disfunção endotelial em SHR. Podemos sugerir que a atividade da NAD(P)H oxidase seria uma das principais causas de desenvolvimento de hipertensão arterial e disfunção endotelial em SHR.

Palavras-chave: NADPH oxidase. Hipertensão. Vasodilatação. Endotélio. Hipertrofia ventricular esquerda. Ratos endogâmicos SHR.

PERASSA, L. A. Effect of apocynin on hypertension, endothelial dysfunction and left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats (SHR).

2013. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

ABSTRACT

The enzymes NAD(P)H oxidases or family NOX has been considered the main source of reactive oxygen species (ROS) in various cell types. Increased ROS bioavailability and altered redox signaling (oxidative stress) have been implicated in the onset and/or progression of chronic diseases, including hypertension. NAD(P)H oxidase inhibitors, such as apocynin were developed and their antihypertensive effects have been studied. The aim of this study was to determine whether chronic treatment with apocynin prevents the development of hypertension, endothelial dysfunction and left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats (SHR) and to evaluate the mechanisms involved in these effects. Normotensive Wistar rats and SHR were treated with apocynin (30 mg/kg/day, diluted in the drinking water) from the fourth to the tenth week of life. The studies *in vivo* were performed to assess baseline blood pressure (mean arterial pressure - MAP, systolic - SBP, and diastolic blood pressure - DBP), heart rate (HR) before and after the administration of acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (SNP), phenylephrine (Phe) and angiotensin II (ANG II). We performed experiments *in vitro* to determine whether the treatment with apocynin causes changes in: cytosolic concentration of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]$), nitric oxide ($[NO]$), and reactive oxygen species ($[ROS]$) in endothelial cells (flow cytometry) stimulated or not with acetylcholine; protein expression (Western blotting) of enzyme endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and of soluble guanylate cyclase in the aorta of treated animals; left ventricular hypertrophy, from the analysis of histological sections of the left ventricle with hematoxylin-eosin staining (HE) and Picrosirius red. Our results demonstrated that SHR treated with apocynin showed SBP, DBP, MAP and HR significantly lower than those obtained in untreated SHR. Responses to ACh were greater in the treated SHR than in the untreated SHR; the response to SNP was not modified, and the pressor responses to ANG II and Phe were reduced in treated SHR. Apocynin

decreased [ROS], but increased [Ca²⁺] and [NO] in endothelial cells. Apocynin increased eNOS expression and did not alter the expression of the alpha and beta subunits of sGC in aortas SHR. Although the evaluation of total heart weight (THW) and left ventricular mass index (LVMI) did not differ between treated and untreated SHR, the values of the cardiomyocyte diameter and percentage of collagen were lower in treated SHR than in untreated SHR. We did not observe changes in the evaluated parameters between untreated Wistar and treated with apocynin. In conclusion, our study showed that chronic treatment with apocynin prevents the development of hypertension, left ventricular hypertrophy and endothelial dysfunction in SHR. We suggest that the activity of NAD(P)H oxidase would be a major cause of the development of hypertension and endothelial dysfunction in SHR.

Keywords: NADPH oxidase. Hypertension. Vasodilation. Endothelium. Left ventricular hypertrophy. SHR.

ABREVIATURAS

α – alfa

β - beta

% Δ PAM – porcentagem de variação da pressão arterial média

2R-1C – rato 2 rim 1 clipe (hipertenso renal)

$[Ca^{2+}]_c$ - concentração de cálcio citosólico

$[NO]_c$ - concentração de óxido nítrico citosólico

ACh – acetilcolina

ANG II – angiotensina II

APOCININA – 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona

Ca^{2+} – cálcio

$CaCl_2$ – cloreto de cálcio

CMLV – células do músculo liso vascular

cNOS - óxido nítrico sintase constitutiva

COX-2 – ciclooxigenase 2

DAF-2/DA - 4,5- diaminofluoresceína

DC – débito cardíaco

DHE – diidroetidina

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

EDRF – fatores relaxantes derivados do endotélio

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

eNOS ou isoforma III – óxido nítrico sintase endotelial

EO – estresse oxidativo

EPM - erro padrão da média

ERO – espécies reativas de oxigênio

FC – frequência cardíaca

GCs – guanilato ciclase solúvel

GMPc – guanosina monofosfato cíclico

GTP – guanosina trifosfato

HA – hipertensão arterial

HEPES - ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico

HVE - hipertrofia ventricular esquerda
IF – intensidade de fluorescência
IMVE - índice de massa ventricular esquerda
iNOS ou isoforma II – óxido nítrico sintase induzível
ISO - isoprenalina
 K^+ – potássio
 K_{ATP} - canais de potássio sensíveis à adenosina trifosfato
KCl – cloreto de potássio
 LD_{50} – dose letal
 $MgCl_2$ – cloreto de magnésio
MLV – músculo liso vascular
MPO - mieloperoxidase
NaCl – cloreto de sódio
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAD(P)H oxidase - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
 NaH_2PO_4 – fosfato monossódico
nNOS ou isoforma I – óxido nítrico sintase neuronal
NO – óxido nítrico
NP-40 – nonidet P-40
NOS – óxido nítrico sintase
NOX – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase não fagocítica
NPS – nitroprussiato de sódio
 O_2^- – ânion superóxido
 O_2 – oxigênio molecular
 $ONOO^-$ – peroxinitrito
PA – pressão arterial
PAD – pressão arterial diastólica
PAM – pressão arterial media
PAS – pressão arterial sistólica
PCT - peso cardíaco total
pH - potencial hidrogeniônico
Phe – fenilefrina

PVE - peso ventricular esquerdo

Rho Kinase – quinases associadas a Rho

RP - resistência periférica

RVPT - resistência vascular periférica total

SHR – rato espontaneamente hipertenso

SOD – superóxido dismutase

spSHR - rato espontaneamente hipertenso com predisposição ao acidente vascular encefálico

VE - ventrículo esquerdo

WKY - rato normotenso Wistar Kyoto

WST – rato normotenso Wistar

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Ativação da apocinina em células fagocíticas (neutrófilos) e não-fagocíticas (células vasculares) (Figura adaptada de TOUYZ, 2008). 31
- Figura 2: Variação do tamanho do miócito em função do ângulo de secção transversal da fibra cardíaca. 47
- Figura 3: Peso (A) ao final de cada semana de tratamento (1^a a 6^a semana) e comprimento naso-anal (B) no final do tratamento em Wistar (□), Wistar tratados (■), SHR (○) e SHR tratados (●) com apocinina, ANOVA. 51
- Figura 4: A) Pressão Arterial Sistólica (PAS), B) Pressão Arterial Diastólica (PAD), C) Pressão Arterial Média (PAM) e D) Frequência Cardíaca (FC) de ratos Wistar e SHR não tratados (barras brancas) e tratados (barras pretas) com apocinina (30 mg/kg), ANOVA. 53
- Figura 5: Porcentagem de variação da Pressão Arterial Média (% Δ PAM) em Wistar e SHR não tratados (barras brancas) e tratados (barras pretas) com apocinina após a administração *in bolus* de A) Acetilcolina (ACh) nas doses de 2 e 10 μ g/kg e B) Nitroprussiato de Sódio (NPS) nas doses de 10 e 35 μ g/kg, ANOVA. 55
- Figura 6: Porcentagem de variação da Pressão Arterial Média (% Δ PAM) em Wistar (barras brancas) e SHR não tratados (barras pontilhadas) e SHR tratados (barras pretas) com apocinina após a administração *in bolus* de A) Fenilefrina (Phe) nas doses de 2 e 8 μ g/kg e B) Angiotensina II (ANG II) nas doses de 2,5 e 10ng/kg, ANOVA. 57

Figura 7: Concentração citosólica de cálcio (Ca^{2+}) (Fluo 3-AM, 5 $\mu\text{mol/L}$) em células endoteliais de aorta de ratos Wistar, SHR e SHR tratados antes (barras brancas) e após (barras pretas) estimulação com acetilcolina (ACh, 1 μM , 5 minutos), ANOVA. 58

Figura 8: Concentração citosólica de óxido nítrico (NO) (DAF-2/DA, 10 $\mu\text{mol/L}$) em células endoteliais de aorta de ratos Wistar, SHR e SHR tratados antes (barras brancas) e após (barras pretas) estimulação com acetilcolina (ACh, 1 μM , 5 minutos), ANOVA. 59

Figura 9: Concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (DHE, 2,5 $\mu\text{mol/L}$) em células endoteliais de aorta de ratos Wistar, SHR e SHR tratados antes (barras brancas) e após (barras pretas) estimulação com acetilcolina (ACh, 1 μM , 5 minutos), ANOVA. 60

Figura 10: Autorradiografias típicas e expressão proteica da enzima Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS) em homogenatos de aorta de Wistar e SHR não tratados (barras brancas) e tratados (barras pretas) com apocinina (30mg/kg). Estes dados representam a \pm EPM dos resultados obtidos em aortas (n=5) dos diferentes grupos, ANOVA. 61

Figura 11: Autorradiografias típicas e expressão proteica das subunidades α da enzima Guanilato Ciclase solúvel (GCs) em homogenatos de aorta de Wistar e SHR não tratados (barras brancas) e tratados (barras pretas) com apocinina (30mg/kg). Estes dados representam a \pm EPM dos resultados obtidos em aortas (n=5) dos diferentes grupos, ANOVA. 62

Figura 12: Autorradiografias típicas e expressão proteica das subunidades β da enzima Guanilato Ciclase solúvel (GCs) em homogenatos de aorta de Wistar e SHR não tratados (barras brancas) e tratados (barras pretas) com apocinina (30mg/kg). Estes dados

representam a \pm EPM dos resultados obtidos em aortas (n=5) dos diferentes grupos, ANOVA. 63

Figura 13: Índice de Massa Ventricular Esquerda (massa do ventrículo esquerdo, g/comprimento da tíbia, cm) nos animais Wistar e SHR não tratados (barras brancas) e tratados (barras pretas) com apocinina (30mg/kg), ANOVA. 65

Figura 14: Fotomicrografias evidenciando o efeito do tratamento crônico com apocinina sobre o diâmetro dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratos Wistar (A), Wistar Tratados (B), SHR (C), SHR Tratados (D) e valores médios dos diâmetros dos cardiomiócitos de ratos Wistar e SHR, não tratados (barras brancas) e tratados (barras pretas) com apocinina (30mg/kg) (E). Coloração Hematoxilina e Eosina, ANOVA. 66

Figura 15: Fotomicrografias evidenciando o efeito do tratamento crônico com apocinina sobre a área de fibras colágenas no músculo cardíaco de ratos Wistar (A), Wistar Tratados (B), SHR (C), SHR Tratados (D) e valores médios dos diâmetros dos cardiomiócitos de ratos Wistar e SHR, não tratados (barras brancas) e tratados (barras pretas) com apocinina (30mg/kg) (E). Coloração Picrosirius red, ANOVA. 67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Sequências de desidratação, clareamento e impregnação e os tempos de cada fase utilizados para processamento histológico.	44
TABELA 2: Sequência de solução e tempo para a coloração com Hematoxilina-Eosina e Picrosirius Red.	45
TABELA 3: Peso cardíaco total (PCT), peso do ventrículo esquerdo (PVE) e comprimento da tíbia esquerda nos grupos de animais WST e SHR tratados e não tratados com apocinina (30mg/kg), ANOVA.	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 ANIMAIS	37
3.2 TRATAMENTO	37
3.3 DROGAS, REAGENTES E ANTICORPOS	38
3.4 MEDIDA DIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL	39
3.5 CITOMETRIA DE FLUXO	40
3.6 WESTERN BLOTTING	42
3.7 ANÁLISE DA HIPERTROFIA VENTRICULAR ESQUERDA	43
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
4 RESULTADOS	50
4.1 PESO E MEDIDA NASO-ANAL	51
4.2 ANÁLISE DA PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS WST E SHR NÃO TRATADOS E TRATADOS COM APOCININA	52
4.3 EFEITO HIPOTENSOR: ACETILCOLINA E NITROPRUSSIATO DE SÓDIO	53
4.4 EFEITO PRESSOR: FENILEFRINA E ANGIOTENSINA II	56
4.5 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CITÓSOLICA DE CÁLCIO, ÓXIDO NÍTRICO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE RATOS	58
4.6 EXPRESSÃO PROTEICA DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL E DE GUANILATO CICLASE SOLÚVEL EM HOMOGENATOS DE AORTAS	60
4.7 ANÁLISE DA HIPERTROFIA CARDÍACA	63
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÃO	76

REFERÊNCIAS

78

ANEXOS

100

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A pressão sanguínea resulta da interação da força com que o coração bombeia o sangue e a resistência periférica (RP) (CRIMI *et al.*, 2007). Com isso, a relação que define a pressão arterial (PA) é resultante do fluxo sanguíneo pela RP. Considerando a circulação como um todo, o fluxo total é débito cardíaco (DC), enquanto a resistência é denominada de resistência vascular periférica total (RVPT). Esse mecanismo gera uma perfusão tecidual adequada (BRODY, 1986; CRIMI *et al.*, 2007; GUYTON; HALL, 2006).

A RVPT depende, além de outros fatores, do tônus vascular, que é realizado por diferentes substâncias (AALKJAER *et al.*, 2011; BAGHER; SEGAL, 2011; REMBOLD, 1992; SEGAL, 2005; SHIMOKAWA; TAKESHITA, 1995; WEBB, 2003). Uma das principais substâncias vasodilatadoras que participa do controle contínuo do tônus vascular é o óxido nítrico (NO) (GEWALTIG; KOJDA, 2002; MONCADA *et al.*, 1988, 1991). Em 1980, Furchgott e Zawadzki descobriram que os mensageiros químicos responsáveis pela dilatação dos vasos sanguíneos são derivados do endotélio, camada que reveste o interior do vaso sanguíneo. Eles nomearam essa molécula como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF, do inglês endothelium-derived relaxing factor) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Anos mais tarde, Furchgott, Ignarro e Palmer (FURCHGOTT, 1988; IGNARRO *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1987) sugeriram, simultaneamente, que o EDRF e o NO eram a mesma molécula. Logo depois, foi comprovado que o EDRF era o NO (MONCADA *et al.*, 1988).

O NO participa da regulação do sistema cardiovascular (ANDREW; MAYER, 1999) e além da manutenção do tônus vascular, inibe a agregação plaquetária, a adesão de leucócitos ao endotélio, a migração e proliferação de células lisas musculares (ALBRECHT *et al.*, 2003; MARLETTA, 1993). O NO é sintetizado pela enzima NO sintase (NOS) que pode ser do tipo constitutiva (cNOS), dividida em NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS), ou induzível (iNOS) (FÖRSTERMANN *et al.*, 1998; MONCADA *et al.*, 1991). A atividade enzimática da nNOS e eNOS (isoformas I e III, respectivamente), dependente, ou não, da ligação do cálcio (Ca^{2+}) com a calmodulina (proteína de baixo peso molecular, que funciona

como co-fator para ativar a NOS). A ativação da eNOS pode ocorrer também pela fosforilação por meio da atividade da proteína quinase Akt, ou proteína quinase B, a qual é responsável por fosforilar resíduos de serina (Ser 1179 ou 1177) da eNOS. O processo de fosforilação da eNOS reduz a dependência do aumento cálcio intracelular para sua ativação e produção de NO (AYAJIKI *et al.*, 1996; CORSON *et al.*, 1996; FLEMING *et al.*, 1998). Entretanto, a atividade da iNOS (isoforma II) é independente de Ca^{2+} (MONCADA *et al.*, 1991; TENNYSON; LIPPARD, 2011).

A eNOS, presente no endotélio vascular (MICHEL; VANHOUTTE, 2010; REES *et al.*, 1989), pode ser ativada pela acetilcolina (ACh), bradicinina, estresse de cisalhamento (*shear stress*), agregação plaquetária, entre outros fatores (MÁRIN; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1997; MONCADA *et al.*, 1991). A partir do aumento da concentração de cálcio no interior da célula endotelial, haverá a formação do complexo cálcio-calmodulina que irá ligar-se a eNOS, ativando-a. Depois de ativada, há a oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino do substrato, o aminoácido L-arginina, levando à geração de NO e citrulina (DUDZINSKI; MICHEL, 2007; FLEMING; BUSSE, 1999). O NO formado pode agir como primeiro mensageiro que atuará na diminuição da concentração citoplasmática de cálcio no músculo liso vascular (MLV) e promover relaxamento muscular levando a vasodilatação (GEWALTIG; KOJDA; 2002; IGNARRO *et al.*, 1987; UMANS; LEVI, 1995). A eNOS, além de ser expressa nas células endoteliais de vasos, é também expressa nos cardiomiócitos (BALLIGAND *et al.*, 1995).

Depois de ter sido produzido pelas células endoteliais, devido a sua capacidade lipofílica, o NO difunde-se até a célula do músculo liso vascular (CMVL) e promove uma série de eventos, que resultam na diminuição da concentração de cálcio citosólico ($[Ca^{2+}]_c$) (BLATTER; WIER 1994). Um desses eventos se deve a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). Quando o NO interage com ferro do grupo heme da enzima GCs, presente no citoplasma, altera a forma desta enzima tornando-a ativa. Depois de ativada, esta enzima catalisa a guanosina trifosfato (GTP) à guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (GEWALTIG; KOJDA, 2002; MURAD, 1999; NAPOLI; IGNARRO, 2003). A GMPc promove o relaxamento da musculatura lisa vascular por meio da redução na liberação e aumento no sequestro de cálcio pelo retículo endoplasmático (BREDT, 1999; KHAZAEI *et al.*, 2008),

consequentemente levando ao aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos e do fluxo sanguíneo com redução da PA (MONCADA; HIGGS, 1993).

A hipertensão arterial essencial tem sido considerada um importante fator de risco para doenças cardiovasculares, apesar de importantes avanços na compreensão de sua fisiopatologia e da disponibilidade de estratégias de tratamento eficazes (CARRETERO; OPARIL, 2000). A hipertensão arterial (HA) é a causa mais relevante da hipertrofia ventricular esquerda (HVE) a qual pode ser associada também a várias outras doenças, como obesidade, diabetes, infarto do miocárdio prévio, estenose aórtica e doença cardíaca valvar regurgitante (LORELL; CARABELLO, 2000). Em curto prazo, a HVE é considerada uma resposta compensatória do miocárdio à sobrecarga pressórica ou volumétrica, sendo inicialmente benéfica ao permitir uma função cardíaca normal. Entretanto, em longo prazo torna-se prejudicial (GARDIN; LAUER, 2004; KANNEL, 1983; KANNEL *et al.*, 1972; MANN *et al.*, 1988; WEBER *et al.*, 1991), pois o coração hipertrofiado é muitas vezes incapaz de sustentar a sobrecarga aumentada por um período indefinido, o que pode levar a insuficiência cardíaca, arritmias ventriculares, isquemia miocárdica e disfunção ventricular sistólica e diastólica (FRIMM, 1998; PFEFFER *et al.*, 1982; WAKATSUKI *et al.*, 2004). Consequentemente, o coração hipertrofiado tem crescimento de miócitos e/ou de tecido conjuntivo intersticial (SHIRANI *et al.*, 2000; WEBER *et al.*, 1990).

Vários trabalhos demonstram aumento da mortalidade e morbidade cardiovascular quando HA é associada à HVE (LEVY *et al.*, 1987; SCHILLACI *et al.*, 2000). A HVE que ocorre nestes casos é caracterizada por um crescimento celular que é conhecido como hipertrofia concêntrica e se caracteriza pela adição de novos sarcômeros em paralelo nos cardiomiócitos. Resulta num aumento na largura do miócito e conseqüente aumento da espessura da parede, o que reduz o espaço da câmara cardíaca (GERDES; CAPASSO, 1995).

Além da HVE, muitos estudos têm sido realizados para se investigar a relação direta da disfunção endotelial com a hipertensão arterial. A disfunção endotelial pode ser definida como o desequilíbrio entre a ação de substâncias vasoconstrictoras e vasodilatadoras produzidas pelo endotélio. Pode ser a causa de várias alterações fisiológicas e contribuir para a progressão de outras. Quando estabelecida, ocorre a

diminuição na biodisponibilidade do NO, que pode ser decorrente da produção diminuída de NO pelo endotélio ou por sua inativação por ERO (espécies reativas de oxigênio). Desta forma, os vasos sanguíneos deixam de dilatar como antes, e assim, a pressão arterial é mantida em níveis mais elevados (VANHOUTTE, 2002). Para que possa ser determinada com precisão a participação das alterações endoteliais nos mecanismos envolvidos na progressão da hipertensão, é necessário saber quais são as alterações funcionais e estruturais do endotélio de vasos nos diferentes modelos de hipertensão e em diferentes leitos vasculares. Muitos fatores podem contribuir para mudanças nas respostas vasculares observadas, como o estado hipertensivo, o desenvolvimento e duração da pressão sanguínea elevada, as espécies, idade e gênero dos animais, a técnica utilizada para analisar a alteração vascular e a localização regional do leito vascular (LÜSCHER, 1992).

A fisiopatologia da disfunção endotelial é complexa e envolve múltiplos mecanismos. A disfunção endotelial parece estar relacionada a uma redução da atividade da eNOS ou a redução da disponibilidade do seu substrato, L-arginina (VANHOUTTE, 2002). Além disto, uma das causas da disfunção endotelial é o aumento do estresse oxidativo, que é caracterizado pela produção excessiva de ERO (CAI; HARRISON, 2000; DRÖGE, 2002; DUSTING, *et al.*, 2005; GUTIERREZ *et al.*, 2006; TANIYAMA; GRIENGLING, 2003). As ERO possuem efeitos deletérios sobre a função endotelial e vascular, pois levam a uma diminuição da biodisponibilidade de NO e ao comprometimento do relaxamento do MLV (CAI; HARRISON, 2000; ELLIS; TRIGGLE, 2003; FORTUÑO *et al.*, 2005; HAMILTON *et al.*, 2001; TAWFIK *et al.*, 2008; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004; WOLIN, 2000).

O estresse oxidativo está envolvido no desenvolvimento de disfunção endotelial, redução no relaxamento vascular, espessamento da túnica média e estreitamento do lúmen vascular. É resultado do aumento da produção de ERO e/ou de uma diminuição da remoção destas espécies pelo sistema antioxidante (GEISZT, 2006; RABELINK; LÜSCHER, 2006). Além de ser um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de disfunção endotelial por seus efeitos diretos sobre a membrana das células, o ânion superóxido (O_2^-) pode interferir em vários passos da cascata de eventos que leva ao relaxamento do MLV mediado pelo NO (HAMILTON *et al.*, 2001). Quando o O_2^- reage com o NO, forma-se o peroxinitrito ($ONOO^-$) que é um

potente oxidante altamente tóxico (SALVEMINI *et al.*, 1998). O aumento na concentração de O_2^- leva ao sequestro de NO e ao dano celular associado com a disfunção endotelial (McINTYRE *et al.*, 1999). Além disso, o $ONOO^-$ é responsável pelo desacoplamento da eNOS, que também leva ao aumento na produção de O_2^- (RABELINK; LUSCHER, 2006).

A NAD(P)H oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase) é um complexo enzimático (BABIOR, 2004) que tem sido considerado a principal fonte de ERO em células vasculares (GEISZT, 2006). Está presente em células de origem mesodérmica, incluindo os fagócitos, sendo capaz de catalisar a transferência de elétrons através da membrana celular (BABIOR, 1999; BEDARD; KRAUSE, 2007). Contêm uma proteína G regulatória (Rac2) e as subunidades: p47phox, p67phox, p40phox (*phox* de "*phagocyte oxidase*"), que se situam no citoplasma, e p22phox e gp91phox (também denominada Nox2) estão associados à membrana formando o flavocitocromo b558 que constituem o sítio catalítico da enzima (BABIOR, 2004; EL-BENNA *et al.*, 2005; GROEMPING; RITTINGER, 2005; JOHNSON *et al.*, 2002). A ativação celular das diversas isoformas da NAD(P)H oxidase ocorre por meio de estímulos que podem ser fisiológicos, moléculas que induzem a quimiotaxia (anticorpos e lipídeos bioativos) ou agentes não fisiológicos como ésteres de forbol, ácidos graxos e retinóides que promovem a fosforilação da proteína citoplasmática p47phox, levando a translocação e agregação das subunidades citosólicas a membrana (BABIOR, 1999). Esta agregação promove o início da transferência de elétrons, a partir do substrato NADPH, para o oxigênio molecular (O_2), gerando O_2^- (CAI *et al.*, 2003; DUSTING *et al.*, 2005; FORTUÑO *et al.*, 2005) e em seguida, outras ERO (BABIOR, 1999).

Recentemente, subunidades homólogas ao gp91phox foram identificadas em células não-fagocíticas, incluindo células vasculares, e foram denominadas como família NOX (NAD(P)H oxidase não fagocítica), contendo sete membros definidos pelos seus componentes de ancoragem, ou seja, Nox1, Nox 2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2 (CAVE *et al.*, 2006; GEISZT, 2006; LI; SHAH, 2002). As DUOX 1 e 2 foram os segundos homólogos a serem identificados e possuem uma extremidade C-terminal semelhante a Nox2 e uma extremidade N-terminal com um domínio homólogo à peroxidase. Então, devido à presença de dois tipos de domínios, essas

proteínas ficaram conhecidas como Duox 1 e Duox 2 (“dual oxidase” 1 e 2) (LAMBETH, 2004). Cada componente da família nox está presente em diferentes tecidos/tipos celulares. As subunidades Nox1, 2 e 4 são expressas no endotélio e as subunidades Nox1 e 4 são expressas nas CMLV (BEDARD; KRAUSE, 2007; QUINN *et al.*, 2006; SELEMIDIS *et al.*, 2008).

As subunidades Nox1, Nox2 e Nox4 são altamente expressas e tem sua atividade aumentada, em células endoteliais e do MLV, na hipertensão (LASSÈGUE; CLEMPUS, 2003; LASSÈGUE *et al.*, 2012; PARAVICINI *et al.*, 2004). Na hipertensão renovascular, a Nox1 contribui para o desenvolvimento da hipertensão e posterior remodelamento cardíaco (CIFUENTES *et al.*, 2000). Ainda, em modelos animais com o aumento da expressão de Nox1, ocorre potencialização da hipertensão induzida por ANG II e hipertrofia de células do músculo liso (DIKALOVA *et al.*, 2005). A produção de O_2^- está aumentada nos vasos sanguíneos de diferentes modelos de hipertensão e inclusive no rato espontaneamente hipertenso (SHR) (BOULOUMIE *et al.*, 1997; SUZUKI *et al.*, 1995).

O SHR é um bom modelo experimental para estudo da hipertensão primária ou essencial (PINTO *et al.*, 1998). Assim como nos seres humanos, em SHR a hipertensão surge com a idade e o desenvolvimento do aumento da pressão arterial ocorre a partir da terceira semana de nascimento (CLUBB *et al.*, 1987), chegando a valores superiores que 160 mmHg com doze semanas de idade (OKAMOTO; AOKI, 1963). A linhagem de SHR foi desenvolvida na década de 1960 por Okamoto e Aoki (1963) através do cruzamento de ratos Wistar Kyoto (WKY) irmãos.

A sobrecarga de pressão sobre o coração leva ao desenvolvimento de HVE em SHR (PFEFFER *et al.*, 1976, 1979). Evidências suportam a hipótese de que alterações na via do NO podem estar envolvidas na hipertensão e na HVE de SHR. Kuo *et al.* (1976) sugeriram que a hipertrofia cardíaca de SHR poderia ser resultante de anormalidades da via NO-GMPc, uma vez que este modelo de hipertensão contém níveis menores de GMPc cardíaca. O papel anti-hipertrófico do NO foi demonstrado no trabalho de Matsuoka *et al.* (1996), onde o tratamento crônico com L-arginina reduziu a HVE de SHR. Ainda, ratos que foram submetidos à sobrecarga pressora por coarctação da aorta desenvolveram hipertrofia cardíaca e maior

expressão miocárdica das subunidades p22phox e p67phox da NAD(P)H oxidase (NADRUZ JÚNIOR *et al.*, 2004).

Lüscher e Vanhoutte (1986) estudaram o relaxamento dependente de endotélio em anéis de aorta SHR e observaram uma redução no relaxamento por acetilcolina (ACh). Bauersachs *et al.* (1998) demonstram que em SHR há uma diminuição na expressão da eNOS na vasculatura de coronárias que parece explicar a disfunção vasodilatadora. Estes resultados poderiam ser associados com a diminuição da biodisponibilidade do NO, uma vez que o SHR produz O_2^- de forma exagerada na parede vascular (SUZUKI *et al.*, 1995). Recentemente foi proposto por Zhao *et al.* (2013) que a existência de um mecanismo endógeno de produção de NO pelo citocromo P450, que é independente da atividade da eNOS, compensaria a disfunção endotelial em SHR.

Várias observações sugerem que o sistema NAD(P)H oxidase é responsável pela maior parte da produção de ânion superóxido na parede vascular da aorta (PAGANO *et al.*, 1995). Em SHR há um aumento da atividade da NAD(P)H oxidase, juntamente com o aumento da produção de O_2^- em aortas, quando comparado com ratos normotensos WKY da mesma idade (ZALBA *et al.*, 2000). Estes dados foram correlacionados com o comprometimento do vaso-relaxamento dependente do endotélio (DOBARRO *et al.*, 2009; LÜSCHER; VANHOUTTE, 1986; MIYAGAWA *et al.*, 2007), caracterizando a disfunção endotelial presente neste modelo experimental (BAUERSACHS *et al.*, 1998). Sugerem então, que a hipertensão pode ser associada ao aumento da atividade enzimática da subunidade p22phox da NAD(P)H oxidase.

Baseados nas evidências do envolvimento da atividade da NAD(P)H oxidase em doenças cardiovasculares, o efeito de diferentes inibidores destas enzimas tem sido estudado (WILLIAMS *et al.*, 2007).

A apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) foi isolada das raízes da planta *Apocynum cannabinum* (maconha canadense) e descrita inicialmente por Schmiedeberg em 1883. Posteriormente, em 1971, foi identificada através do isolamento dos componentes imunomoduladores da raiz da planta *Picrorhiza kurroa* (Scrophulariaceae), nativa das montanhas da Índia, Nepal, Tibete e do Paquistão, conhecida na medicina tradicional indiana (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008). A apocinina é uma acetofenona, pertencente à classe dos metóxi-catecóis, possui

peso molecular de 166,17, um ponto de fusão de 115 °C. Apresenta leve odor de baunilha (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008) e baixa toxicidade (LD₅₀: 9 g/kg) após a administração oral em ratos (LUCHTEFELD *et al.*, 2008).

A apocinina é metabolizada pela mieloperoxidase (MPO), presente em células fagocíticas, produzindo o metabólito ativo diapocinina (JOHNSON *et al.*, 2002). Sugere-se que este metabólito inibe a fosforilação (p47phox) e translocação dos componentes citosólicos (p47phox, p67phox) do complexo NAD(P)H oxidase para a membrana, inibindo sua atividade (JOHNSON *et al.*, 2002; STOLK *et al.*, 1994; XIMENES *et al.*, 2007) (Figura 1). No trabalho de Stolk *et al.* (1994), foi demonstrado que macrófagos alveolares, que apresentam deficiência de MPO, não sofrem ação da apocinina. Em outro estudo, foi demonstrado que células que “*superexpressam*” Nox1, 2 ou 4 (HEK293) estimuladas com MPO tiveram a formação do metabólito ativo da apocinina e houve redução da produção de O₂⁻. No mesmo estudo, células endoteliais e do MLV tratadas com apocinina não tiveram inibição da atividade NOX, mas houve diminuição da produção de O₂⁻, sugerindo que a apocinina atua como antioxidante em células vasculares (HEUMÜLLER *et al.*, 2008). Como outras peroxidases, além da MPO, podem influenciar a atividade da apocinina, é possível que células vasculares possuam enzimas peroxidativas capazes de ativar este inibidor (TOUYZ, 2008; VEJRAZKA *et al.*, 2005). Isto se deve a observação de que em células endoteliais, nas quais dímeros de apocinina foram identificados, a apocinina inibiu de forma concentração dependente a atividade da NAD(P)H oxidase, a formação de ERO e a proliferação celular (JOHNSON *et al.*, 2002).

Estudos *in vivo* demonstraram que a MPO pode ser absorvida pelas células endoteliais por meio da proteína citoqueratina 1 e assim a apocinina poderia ser então metabolizada a dímeros ativos para inibir a NAD(P)H oxidase em células vasculares (Figura 1). Esta proteína parece ser a responsável pela internalização da MPO nas células endoteliais (ASTERN *et al.*, 2007).

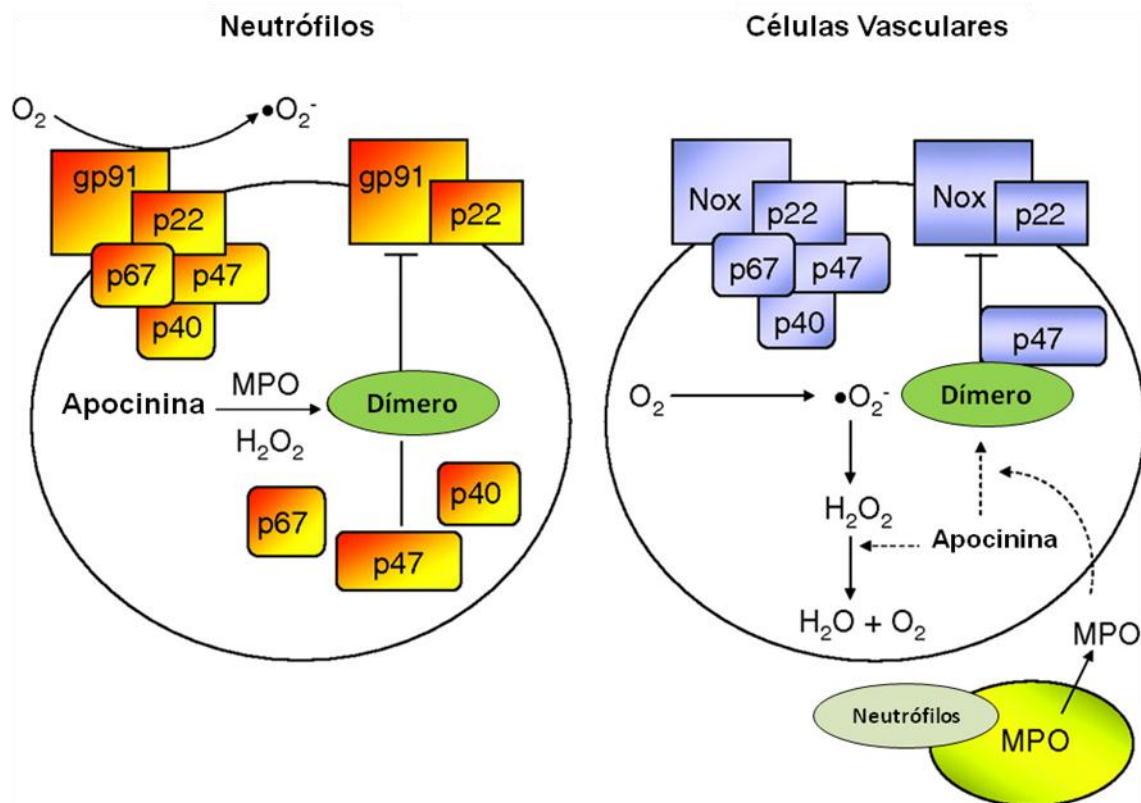


Figura 1 - Ativação da apocinina em células fagocíticas (neutrófilos) e não-fagocíticas (células vasculares) (Figura adaptada de TOUYZ, 2008).

Além disso, foi sugerido que a apocinina atua por uma via independente de MPO. Schlüter *et al.* (2008) observaram que a apocinina possui seus efeitos vasodilatadores inibindo a atividade da proteína Rho Kinase em células do músculo liso vascular (CMLV) de ratos normotensos. Conseqüentemente, no animal hipertenso, este efeito levaria a redução da contração das CMLV, disfunção endotelial e remodelamento vascular (SURMA *et al.*, 2011). Também foi relatado por Han *et al.* (2010) que a apocinina induz vasodilatação por aumentar a concentração de Ca²⁺ em células endoteliais e pela ativação de canais de K⁺ dependentes de voltagem em CMLV de ratos Sprague-Dawley. Senejoux *et al.* (2013) demonstraram que apocinina aumenta dilatação dependente do endotélio, mediada pela atividade da NOS e também por uma via independente do endotélio, envolvendo a inibição da mobilização de Ca²⁺ e ativação de canais K_{ATP} (canais de potássio sensíveis à adenosina trifosfato) em CMLV de ratos Wistar.

Estudos demonstraram que a apocinina tem grande potencial farmacológico como anti-hipertensivo (WILLIANS *et al.*, 2007). Hamilton *et al.* (2002) mostraram que a apocinina (3 mmol/L) aumentou a biodisponibilidade do NO e a vasodilatação de artérias mamárias e veias safenas de humanos. Ciarcia *et al.* (2010) verificaram que o tratamento agudo com apocinina (16mg/kg, v.o) melhora a atividade renal em SHR por aumentar o fluxo no túbulo proximal. Bäumer *et al.* (2007) trataram SHR com apocinina (33 mg/kg/dia, v.o) por quatro semanas e observaram que houve redução da pressão arterial e da concentração de O_2^- . Entretanto, Pechánová *et al.* (2009) demonstraram que o tratamento crônico com apocinina (seis semanas) iniciado na sexta semana de vida de SHR (30mg/kg/dia,v.o) preveniu apenas parcialmente o aumento da pressão arterial sistólica (PAS) em SHR, não alterou a atividade da eNOS no ventrículo esquerdo e na aorta, apesar de diminuir a produção de ERO e favorecer a formação de GMPc nestes tecidos.

Tomados em conjunto, estes dados sugerem o envolvimento da atividade NAD(P)H oxidase na hipertensão, porém ainda não está totalmente elucidada a eficácia e os mecanismos de ação envolvidos no efeito anti-hipertensivo da apocinina.

Neste estudo testamos a hipótese que a apocinina por inibir a atividade da NAD(P)H oxidase e consequente produção de ERO, previne o desenvolvimento da hipertensão, da disfunção endotelial e da hipertrofia ventricular esquerda em SHR.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o tratamento crônico com apocinina, iniciado no período pós-natal anterior à alteração da pressão arterial, previne o desenvolvimento da hipertensão, da disfunção endotelial e da hipertrofia ventricular esquerda em SHR e avaliar os possíveis mecanismos envolvidos nestes efeitos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Verificar se o tratamento com apocinina previne o desenvolvimento da hipertensão em SHR;

2) Verificar se o tratamento com apocinina altera a resposta hipotensora causada pela liberação endógena e exógena de NO;

3) Verificar se o tratamento com apocinina altera as respostas pressoras a Fenilefrina e Angiotensina II.

Para isto, foram avaliados os resultados obtidos com a realização de experimentos *in vivo* onde a Pressão Arterial Média (PAM) e a Frequência Cardíaca (FC), basal ou após a administração de drogas hipotensoras Acetilcolina (ACh) e Nitroprussiato de Sódio (NPS) e de drogas pressoras Fenilefrina (Phe) e Angiotensina II (ANG II) foram registradas em animais normotensos e hipertensos, não anestesiados, tratados ou não com apocinina.

4) Verificar se o tratamento com apocinina altera as concentrações basais de Ca^{+2} , NO e ERO em células endoteliais de aortas de ratos hipertensos;

5) Verificar se o tratamento com apocinina promove variações nas concentrações Ca^{+2} , NO e ERO estimuladas por acetilcolina em células endoteliais;

Para isto, foram realizados experimentos de citometria de fluxo em células endoteliais de aorta, de animais hipertensos e normotensos tratados ou não com apocinina, antes e após a estimulação com acetilcolina. As concentrações de Ca^{+2} , NO e ERO foram medidas com sondas específicas (descritas em material e métodos).

6) Verificar se o tratamento com apocinina altera a expressão de eNOS nas células endoteliais e de GCs nas células do músculo liso vascular de ratos Wistar e SHR.

Para isto, realizamos estudos biomoleculares (Western Blotting) onde a expressão da eNOS e GCs foram avaliadas em aortas dos grupos estudados.

7) Verificar se o tratamento com apocinina previne o desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda e da fibrose em SHR.

Para isto, foram realizados cortes histológicos com coloração Hematoxilina-Eosina (HE) para analisar a hipertrofia ventricular esquerda e com Picrossirius Red (*Sirius Red*) para analisar a área de fibras colágenas.

MATERIAS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos realizados neste estudo foram previamente aprovados pela CEEA-FOA/UNESP (protocolo no. 01561-2011).

3.1 Animais

A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) é mantida pelo nosso grupo de pesquisa no biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba (FOA) da UNESP. Os ratos Wistar foram fornecidos pelo Biotério Central da FOA. 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 Wistar e SHR e o desenvolvimento dos filhotes até a 4ª semana foi acompanhado no biotério do DCB-FOA/UNESP. O acasalamento de SHR foi feito entre ratos machos e fêmeas que apresentaram PAS maior ou igual a 150 mmHg, verificada por pletismografia de cauda utilizando um pletismógrafo de cauda (PowerLab, ADInstruments, Melbourne, Austrália).

3.2 Tratamento

Os animais foram tratados a partir da 4ª semana de vida até a 10ª semana com apocinina na dose de 30mg/kg/dia. Esta dose de apocinina foi escolhida com base em estudos (BAUMER *et al.*, 2007; HAYASHI *et al.*, 2005; OELZE *et al.*, 2011; PECHANOVÁ *et al.*, 2009) que observaram os efeitos da apocinina sem toxicidade para os animais. Para o tratamento, a apocinina foi diluída em água de beber. O volume de água utilizado foi determinado a partir do volume de água consumido por dia pelos animais.

A cada semana de desenvolvimento, os ratos eram pesados a fim de ser corrigida a dose administrada. Ao final da 10ª semana de tratamento, os ratos foram utilizados nos experimentos descritos abaixo.

3.3 Drogas, Sondas e Anticorpos

Utilizamos diferentes drogas nos experimentos, as quais foram descritas abaixo:

- 4-hidróxi-3-metóxiacetofenona 98% - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): Apocinina;
- Nitroferricianeto (III) de Sódio - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): Nitroprussiato de Sódio (NPS);
- Cloridrato de L- Fenilefrina - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): Fenilefrina (Phe);
- Clorato de Acetilcolina - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): Acetilcolina (ACh);
- [Asn¹, Val⁵] Angiotensina II - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): Angiotensina II (ANG II).

Nos experimentos de citometria, utilizamos as seguintes sondas:

- Fluo 3-AM - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA);
- 4,5- diaminofluoresceína - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): DAF-2/DA;
- Dihidroetidina - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): DHE.

Avaliamos a expressão proteica de algumas proteínas utilizando os seguintes anticorpos:

- anticorpo para eNOS (SAB4502013) - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA);
- anticorpo para subunidades alfa (α) (SAB1300812) e beta (β) (SAB4501344) da Guanilato Ciclase solúvel (GCs) - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA);
- anticorpo para β -actina (SAB A5441 – Sigma Aldrich).

Para os experimentos *in vivo*, medida direta da PA, as drogas ACh, NPS, Phe e ANG II foram diluídas em solução fisiológica (0,9% ou 0,15M NaCl) e para o estudo *in vitro*, citometria de fluxo, as drogas foram diluídas em solução de HANKS . Todas as soluções de drogas foram acondicionadas em frascos e protegidas da luz. Após a diluição, as soluções das drogas foram divididas em alíquotas e congeladas a -20°C até a utilização.

3.4 MEDIDA DIRETA DE PRESSÃO ARTERIAL

A) Cirurgia para implantação das cânulas

Os ratos foram anestesiados com quetamina (45 mg/kg) associada a xilazina (5mg/kg) por via intraperitoneal. Durante a anestesia, uma cânula de polietileno (PE₁₀ conectado a PE₅₀) preenchida com salina heparinizada foi implantada no interior da aorta abdominal, através da artéria femoral, para o registro da pressão arterial e outra na veia femoral, para administração de drogas ou veículo. Estas cânulas foram passadas por baixo da pele e exteriorizadas na região do dorso do animal. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais recebendo ração padrão e água *ad libitum* por um período de até 24 horas, no máximo, antes de realizarmos os experimentos.

B) Registro da Pressão Arterial Sistólica (PAS), Diastólica (PAD), Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC)

Ao final da 10^a semana de tratamento, a PAM, PAS, PAD e a FC foram continuamente registradas nos ratos não anestesiados utilizando um transdutor de pressão (ADInstruments, Austrália) ligado à cânula intra-arterial e um amplificador (ADInstruments, Austrália). A PAM, antes e após a administração das drogas, foi calculada utilizando-se o software PowerLab, Chart5 (ADInstruments, Austrália), no qual a variação da pressão arterial foi obtida.

C) Protocolo Experimental

Após um período de 30 minutos para estabilização da pressão arterial, injeções *in bolus* de 2 e 10 µg/kg de acetilcolina (ACh) e 10 e 35 µg/kg de nitroprussiato de sódio (NPS) foram realizadas e seus efeitos registrados até a obtenção da estabilização da resposta. Em outro grupo de animais, injeções *in bolus* de 2 e 8 µg/kg de fenilefrina (Phe) e 2,5 e 10 ng/kg de angiotensina II (ANG II) foram realizadas e seus efeitos registrados até a obtenção da estabilização da resposta. Os resultados foram expressos como média ± EPM dos valores de PAM e FC obtidos. A partir dos resultados obtidos, a porcentagem de variação da PAM (% Δ

PAM) foi calculada pela diferença dos valores de PAM antes e após a administração das drogas.

3.5 CITOMETRIA DE FLUXO

A) Isolamento de células endoteliais de aorta de ratos

Na 10^a semana, os animais foram anestesiados em câmara saturada com halotano (Tanohalo[®]- Cristália) e mortos por decapitação. As aortas torácicas dos ratos (segmentos de 15 mm) foram isoladas, dissecadas de tecidos adjacentes, cortadas longitudinalmente e mantidas em solução de Hanks completa modificada (CaCl₂ 1,6 mmol/L; MgCl₂ 1,0 mmol/L; NaCl 120,0 mmol/L; KCl 5,0 mmol/L; NaH₂PO₄ 0,5 mmol/L; dextrose 10,0 mmol/L; HEPES 10,0 mmol/L; pH 7,4). A remoção das células endoteliais foi feita mecanicamente com o auxílio de uma haste plástica plana. A suspensão de células obtida foi centrifugada (1000 rpm por 5 minutos) em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado, o *pellet* suspenso em 250 µL de solução de Hanks e posteriormente, volumes determinados desta suspensão foram colocados em tubos de poliestireno. Após esta etapa, as células permaneceram acondicionadas em temperatura de 37°C até o momento do experimento.

Na citometria de fluxo, foi feita a leitura de 2.500 eventos (células) de cada aorta utilizada. O número de experimentos realizados “n” se refere ao número de aortas utilizadas para cada grupo estudado. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo (ATTUNE Acoustic Focusing Cytometer[®], APPLIED BIOSYSTEM, USA) utilizando sondas específicas para Ca⁺² (Fluo 3-AM), NO (DAF-2/DA) e ERO (DHE) conforme os seguintes protocolos experimentais.

B) Quantificação da concentração citosólica de cálcio ([Ca₂⁺]_c)

Para quantificação da concentração citosólica de cálcio nas células endoteliais ([Ca₂⁺]_c), a suspensão de células endoteliais de aorta de ratos, sem qualquer estímulo, foi submetida à leitura para verificar a emissão de fluorescência basal (branco). A suspensão de células foi então incubada por 20 minutos com a sonda fluorescente Fluo 3-AM (5µmol/L), excitada com laser azul em 488 nm com

emissão de 530/30 e a intensidade de fluorescência emitida foi verificada antes (basal) e após a estimulação com acetilcolina (1 μ M). Os valores foram expressos pelo aumento da intensidade de fluorescência comparado com o basal. Foi realizada a aquisição de 2500 eventos para cada protocolo realizado.

C) Quantificação da concentração citosólica de Óxido Nítrico ([NO]_c)

Para quantificação de [NO]_c, a suspensão de células endoteliais de aorta de ratos, sem qualquer estímulo, foi submetida à leitura para verificar a emissão de fluorescência basal (branco). A suspensão de células foi então incubada por 20 minutos com a sonda fluorescente 4,5- diaminofluoreceína (DAF-2/DA - 10 μ mol/L) e excitadas com laser azul, em 488 nm com emissão de 530/30 e a intensidade de fluorescência emitida foi verificada na ausência (basal) ou na presença de acetilcolina (1 μ M). Os valores obtidos foram expressos pelo aumento da intensidade de fluorescência comparado com o basal. Foi realizada a aquisição de 2500 eventos para cada protocolo realizado.

D) Quantificação da concentração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Para quantificação de ERO, a suspensão de células endoteliais de aorta de ratos, sem qualquer estímulo, foi submetida à leitura para verificar a emissão de fluorescência basal (branco). A suspensão de células foi então incubada por 20 minutos com a sonda fluorescente Dihidroetidina (DHE – 2,5 μ mol/L), excitada com laser azul em 488 nm, com emissão de 585/42 e a intensidade de fluorescência emitida foi verificada em ausência (basal) ou presença de estimulação com acetilcolina (1 μ M). Os valores foram expressos pelo aumento da intensidade de fluorescência comparado com o basal. Foi realizada a aquisição de 2500 eventos para cada protocolo realizado.

A mediana da intensidade de fluorescência foi calculada em todas as amostras usando o software Attune Cytometric Software (APPLIED BIOSYSTEM, USA) e posteriormente comparada entre os grupos.

3.6 WESTERN BLOTTING

A) Avaliação da expressão proteica de Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS) e de Guanilato Ciclase solúvel (GCs) em aortas de SHR e Wistar

Segmentos torácicos de aorta foram removidos dos animais, dissecados, imediatamente pulverizados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80° C. Os tecidos foram triturados em nitrogênio líquido e homogeneizados separadamente em tampão RIPA (Tris-base 65,2 mM, NaCl 154 mM, NP-40 a 1%, deoxicolato de sódio a 0,25% e EDTA 0,8 mM,, suplementado com um coquetel de inibidores de protease - Protease Inhibitor Mix - GE Healthcare) utilizando-se para isso um sonicador (Sonics Vibra Cell). Em seguida os homogenatos foram centrifugados (4°C, 4.000 rpm por 15 minutos) para a separação do sobrenadante. A dosagem de proteína do sobrenadante foi feita pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*,1951), utilizando a soroalbumina bovina como padrão. Cem microgramas (100 ug) de proteína total foram misturadas com tampão de Laemmli contendo mercaptoetanol e foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (para anticorpo eNOS) ou 10% (para anticorpo GCs) e depois transferidas para a membrana de nitrocelulose. Depois da transferência, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em tampão tris-salina com Tween 20 (TBS-T), por 30 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: eNOS (1:2500, SAB4502013) e subunidades alfa (1:500, SAB1300812) e beta (1:500, SAB4501344) da enzima guanilato ciclase (GCs). A incubação foi feita durante a noite, à 4°C. Após a incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas por quinze minutos, 3 vezes, com tampão TBS-T e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho (para eNOS - 1:2000; para GCs - 1:1000), por uma hora, a temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o substrato para peroxidase quimioluminescente (Kit ECL - Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) e expostas a um filme radiográfico para a detecção das bandas. A β -actina (1:8000, SAB A5441) foi utilizada para normalização dos resultados. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica com o programa Scion. Os resultados foram comparados entre os grupos.

3.7 AVALIAÇÃO DA HIPERTROFIA VENTRICULAR ESQUERDA

A) Avaliação dos pesos cardíacos

Ao final do tratamento com apocinina, os animais foram mortos por decapitação, os corações foram removidos e lavados em solução de cloreto de potássio (KCl) a 1,15% para remoção dos coágulos. Em seguida os corações foram pesados para determinação do Peso Cardíaco Total (PCT, em gramas). Depois de retirado e dissecado, o ventrículo esquerdo (VE) foi pesado obtendo-se assim o peso ventricular esquerdo (PVE, em gramas). Esses valores foram corrigidos em função do comprimento (em centímetros) da tíbia esquerda do animal, sendo expresso o Índice de Massa Ventricular Esquerda ($IMVE = PVE, g / \text{comprimento da tíbia esquerda, cm}$).

B) Preparo das lâminas histológicas

Para a realização dos cortes histológicos, foram retirados os corações e posteriormente o ventrículo esquerdo com auxílio de um bisturi. Após a fixação dos tecidos em formalina tamponada 10%, as peças foram submetidas às seguintes metodologias: Para a preparação das peças e realização dos cortes histológicos do VE, processamos a desidratação, clareamento, impregnação, inclusão e a coloração com auxílio de materiais como cassete (Lupe), pinças, béqueres, cronômetro, proveta, estufa, geladeira, micrótomo (Lupetec), lâminas silanizadas (Starfrost), lamínulas (EasyPath), resina Permount (Fisher Scientific) e o microscópio (Leitz Aristoplan) para visualização dos cortes preparados. Inicialmente, os procedimentos de Desidratação, Clareamento e Impregnação foram realizados. Para isto, colocamos os VE, dentro dos cassetes (Lupe) nas seguintes soluções e nos tempos indicados:

Tabela 1 - Sequência de desidratação, clareamento e impregnação e os tempos de cada fase utilizados para processamento histológico.

DESIDRATAÇÃO	TEMPO
Álcool 70%	60 minutos
Álcool 80%	60 minutos
Álcool 95%	60 minutos
Álcool absoluto I	60 minutos
Álcool absoluto II	60 minutos
Álcool absoluto III	60 minutos
Álcool absoluto / xilol	60 minutos

CLAREAMENTO	TEMPO
Xilol I	30 minutos
Xilol II	30 minutos
Xilol III	60 minutos

IMPREGNAÇÃO	TEMPO
Parafina I	60 minutos
Parafina II	60 minutos
Parafina III	120 minutos

Após estes procedimentos, realizamos a inclusão da peça no molde de parafina (Erviplast), onde ela é incluída no centro do molde até completa solidificação. A peça foi moldada de acordo com o tamanho do micrótomo. Fizemos cortes de 5 μm que foram levados a estufa em temperatura aproximada de 60°C. Os cortes foram colocados na lâmina e corados com a Hematoxilina (10%) e Eosina (10%) (Synth) e Picrosirius Red (0,1%) (Sirius Red F 3B 200, Mobay Chemical CO, Union, NJ, USA).

O corante básico, a hematoxilina, cora as estruturas de característica ácida em azul (núcleo, ribossomos e retículo endoplasmático rugoso) enquanto a eosina, um corante ácido, cora as estruturas de características alcalina em rosa -

avermelhado. Como a maioria das proteínas citoplasmáticas é básica, em uma coloração com HE, o citoplasma usualmente se cora em rosa - avermelhado e os núcleos em azul. Esta técnica pode ser usada para detecção de hipertrofia cardíaca.

Com o intuito de verificar a presença de colágeno no miocárdio, utilizamos a solução de Picrosirius Red. As colorações foram feitas seguindo as etapas abaixo descritas sequencialmente para HE e Picrosirius Red, respectivamente:

Tabela 2 - Sequência de solução e tempo para a coloração com Hematoxilina-Eosina e Picrosirius Red.

SOLUÇÃO	TEMPO	SOLUÇÃO	TEMPO
Xilol I	10 minutos	Xilol I	10 minutos
Xilol II	10 minutos	Xilol II	10 minutos
Álcool absoluto	2 minutos	Álcool absoluto	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos	Álcool 95%	2 minutos
Álcool 90%	2 minutos	Álcool 90%	2 minutos
Álcool 70%	2 minutos	Álcool 70%	2 minutos
Água	2 minutos	Água	2 minutos
Hematoxilina	6 minutos	Picrosirius Red	8 minutos
Eosina	3 minutos	Água	2 minutos
Água	2 minutos	Álcool 70%	Passagem
Álcool 70%	30 segundos	Álcool 95%	Passagem
Álcool 95%	30 segundos	Álcool absoluto	Passagem
Álcool absoluto	30 segundos	Álcool absoluto/ xilol	1 minuto
Álcool absoluto/ xilol	1 minuto	Xilol I	5 minutos
Xilol I	10 minutos	Xilol II	10 minutos
Xilol II	10 minutos	Xilol III	10 minutos
Xilol III	10 minutos		

Após a coloração, as lamínulas foram fixadas nas lâminas com permount, estando pronta para a visualização no microscópio.

C) Análise Morfométrica Quantitativa

A análise morfométrica quantitativa das células foi realizada segundo a avaliação quantitativa realizada por meio de análise das imagens digitais com utilização de sistema composto por microscópio óptico (Leitz Aristoplan) conectado a um computador por uma câmera de vídeo. A lente, a intensidade da luz do microscópio e a altura do condensador foram padronizadas. Os cortes histológicos, n=5 por grupo, dos ventrículos esquerdos foram fotografados em sete campos escolhidos por lâmina em aumento de 400 vezes utilizando o software AxioVision Documentation (Carl Zeiss Video Image, MD, USA).

Na literatura são encontrados diferentes maneiras que avaliam a hipertrofia ventricular, que pode ser por análise do número de células (TATÍC *et al.*, 2012), tamanho das células (GUPTA *et al.*, 2012), espessura e disposição da miofibrila (HE *et al.*, 2012) ou através da área de secção transversal dos cardiomiócitos (LU *et al.*, 2012). Em nosso estudo, para realizarmos a análise da hipertrofia ventricular, avaliamos o menor diâmetro dos cardiomiócitos, seguindo a técnica padronizada no laboratório do Dr Rubens Fazan Junior, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Fisiologia da Universidade de São Paulo/USP. Optamos por fazer esta análise, pois, assim como eles, nos baseamos na seguinte explicação: a figura abaixo mostra que a área da secção transversal reflete o tamanho do miócito quando é tomada apenas com um ângulo de 90° em relação ao eixo da fibra cardíaca. Esta figura mostra ainda que a área da secção transversal do miócito aumenta com a variação do ângulo formado, enquanto que o menor diâmetro do miócito não. Portanto, a área da secção transversal do miócito não seria o melhor indicador do tamanho do miócito, uma vez que não é possível ter sempre uma área da secção transversal perpendicular em relação ao eixo do miócito, passamos a analisar o menor diâmetro em vez da área de secção transversal.

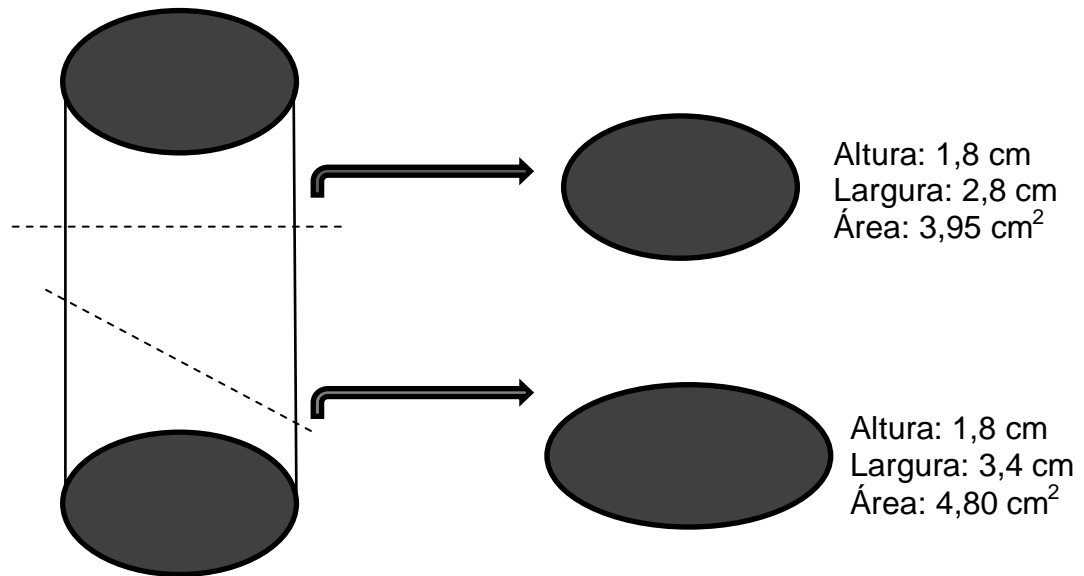


Figura 2 - Variação do tamanho do miócito em função do ângulo de secção transversal da fibra cardíaca. Figura cedida gentilmente pelo Laboratório do Prof Dr Rubens Fazan Junior (FMRP-USP).

As imagens capturadas foram analisadas com a utilização do software Image J. O menor diâmetro dos cardiomiócitos foi determinado a partir de 25 medições em cada ventrículo distribuídas aleatoriamente nos sete campos fotografados, que foram feitas com uma ampliação de 400x, em miofibrilas orientadas longitudinalmente, onde o menor diâmetro foi obtido na região do núcleo que foi claramente delimitado pela membrana nuclear. A quantidade de colágeno foi expressa em porcentagem da área total de tecido (ventrículo esquerdo) obtida nas imagens capturadas de cada corte de ventrículo. Na imagem fotografada foram quantificadas as áreas ocupadas por fibras colágenas e a área total do tecido. Para cada ventrículo foram avaliados 3 diferentes cortes. Em cada corte foram avaliadas 3-4 áreas totais e a partir destas foi calculada a média das porcentagens de fibras colágenas.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A) Medida direta da PA

Os resultados foram expressos como a média \pm EPM (erro padrão da média) dos valores obtidos. A porcentagem de variação da PAM (% Δ MAP) foi calculada aplicando a seguinte fórmula:

$$\% \Delta PAM = \frac{\text{valor PAM basal} - \text{valor PAM após a droga} \times 100}{\text{valor PAM antes da droga}}$$

Os resultados foram comparados entre os grupos pelo teste estatístico de multivariância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

B) Citometria de Fluxo

Foram analisados os traçados citofluorográficos (histograma) gerados pelo software Attune Cytometric após a leitura pelo citômetro. Os histogramas obtidos descrevem fenômenos de dispersão do laser que incide sobre as células, de absorção da luz e de emissão de fluorescência. Os resultados foram apresentados como a média das medianas da intensidade de fluorescência (IF) das células com marcação positiva para as sondas fluorescentes DAF-2/DA , Fluo 3-AM e DHE. Os resultados foram comparados entre os grupos, e foi utilizado o teste estatístico de multivariância (ANOVA) e pós-teste Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

C) Western Blotting

Os valores de densitometria óptica das bandas foram obtidos pelo programa Scion. Os valores referentes as bandas de GCs e eNOS foram normalizados pelos valores das bandas de β -actina. Os valores obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Foram realizados 5 experimentos diferentes para cada grupo. Os resultados obtidos foram comparados entre os grupos (ANOVA, pós-teste Tukey). Diferenças entre os valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

D) Análise da Hipertrofia Cardíaca

Os resultados foram expressos como média \pm EPM dos valores de diâmetro das células e área das fibras colágenas. Os resultados foram comparados entre os grupos pelo teste estatístico de multivariância ANOVA (pós-teste Tukey). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Peso e comprimento naso-anal

O peso dos animais aumentou significativamente durante as seis semanas de tratamento. Tanto o peso (Figura 3A) quanto o comprimento naso-anal (Figura 3B) de SHR foram menores que os de ratos normotensos Wistar. A apocinina não alterou o peso (Figura 3A) ou o comprimento naso-anal dos ratos Wistar (não tratados: $23,9 \pm 0,3$ cm, $n=13$; tratados: $23,8 \pm 0,5$ cm, $n=7$) e SHR (não tratados: $20,6 \pm 0,3$ cm, $n=11$; tratados: $20,5 \pm 0,2$ cm, $n=9$) (Figura 3B).

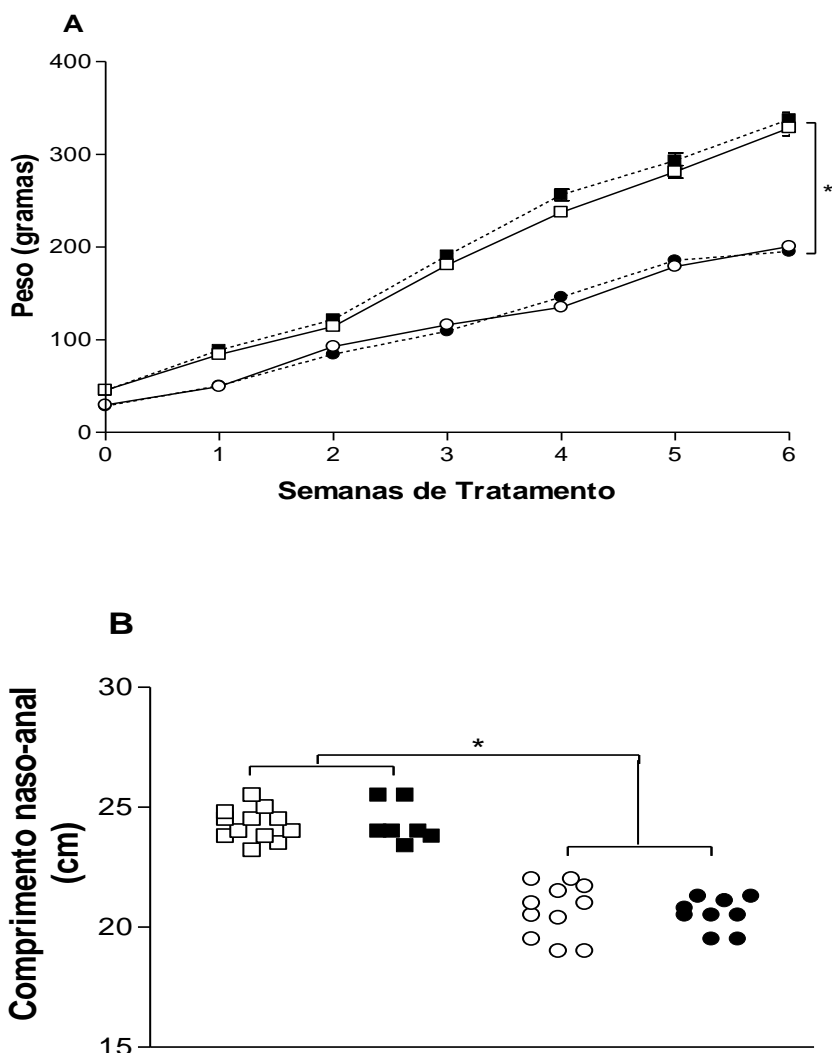


Figura 3 - Peso (A) ao final de cada semana de tratamento (1^a a 6^a semana) e comprimento naso-anal (B) no final do tratamento em Wistar (□), Wistar tratados com apocinina (■), SHR (○) e SHR tratados com apocinina (●). * $p < 0,05$ entre grupos, ANOVA.

4.2 Análises da PAS, PAD, PAM e da FC de ratos WST e SHR, não tratados e tratados com apocinina

SHR apresentaram PAS, PAD, FC e PAM aumentados quando comparados a ratos normotensos Wistar (Figura 4).

Os valores de PAS e PAD (Figura 4A-B) de SHR tratados com apocinina (PAS: $148,2 \pm 1,0$; PAD: $100,1 \pm 0,8$ mmHg/min) foram menores que os observados em SHR não tratados (PAS: $180,6 \pm 2,4$; PAD: $132,9 \pm 0,9$ mmHg/min, n=7). Não houve diferença entre os valores de PAS e PAD de ratos Wistar tratados (PAS: $121,4 \pm 1,4$; PAD: $87,7 \pm 1,0$ mmHg/min) e não tratados (PAS: $123,7 \pm 1,2$; PAD: $85,9 \pm 1,3$ mmHg/min, n=7).

Os dados mostram que o tratamento crônico, da 4^a a 10^a semana de vida, com apocinina (30mg/kg) preveniu o desenvolvimento da hipertensão em SHR. Ao final da 10^a semana, os valores de PAM de SHR tratados ($129,5 \pm 2,2$ mmHg, n=9) foram bastante reduzidos se comparados aos valores do grupo não tratado ($160,3 \pm 2,7$ mmHg, n=9) (Figura 4C). Além disso, a FC de SHR tratados com apocinina também foi menor ($318,8 \pm 5,8$ bpm, n=9) do que de SHR não tratados ($362,7 \pm 8,3$ bpm, n=9) (Figura 4D). Entretanto, o tratamento com apocinina não alterou a PAM (Não Tratados: $108,3 \pm 1,3$; Tratados: $108,0 \pm 1,3$ mmHg, n=9, Figura 4C) ou a FC (Não tratados: $312,0 \pm 3,4$; Tratados: $314,2 \pm 4,3$ bpm, n=9, Figura 4D) de ratos normotensos Wistar.

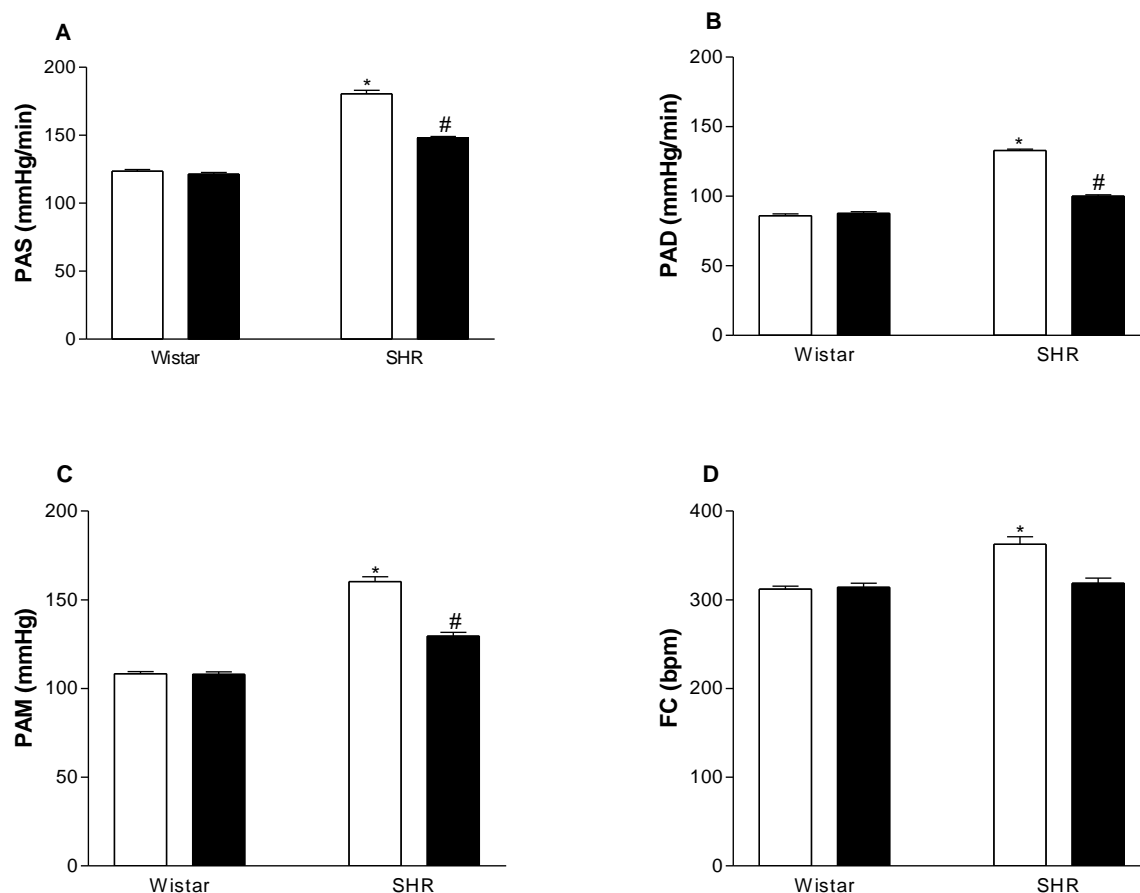


Figure 4 - A) Pressão Arterial Sistólica (PAS), B) Pressão Arterial Diastólica (PAD), C) Pressão Arterial Média (PAM) e D) Frequência Cardíaca (FC) de ratos Wistar e SHR não tratados (barras brancas) e tratados (barras pretas) com apocinina (30 mg/kg). * $p < 0,05$ entre SHR não tratados e outros grupos, # $p < 0,05$ entre SHR tratados e outros grupos, ANOVA.

4.3 Efeito hipotensor a ACh e NPS

Após o registro por 30 minutos da PAM e da FC, foi feita a administração intravenosa das drogas.

As respostas à ACh *in vivo* nas doses testadas foram menos eficazes em SHR (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$: $-13,8 \pm 1,3$ %; 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$: $-22,6 \pm 1,8$ % ΔPAM , $n=7$) quando comparadas às observadas em ratos Wistar (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$: $-28,7 \pm 1,3$; 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$: $-39,4 \pm 2,0$ % ΔPAM , $n=7$) (Figura 5A).

O efeito hipotensor da ACh não foi alterado em ratos Wistar pela apocinina (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - Tratados: $-29,4 \pm 2,3$; Não Tratados: $-28,7 \pm 1,3$; 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - Tratados: $-40,1 \pm 2,2$; Não Tratados: $-39,4 \pm 2,0$ % ΔPAM , $n=7$) (Figura 5A). No entanto, a resposta

hipotensora, dose dependente, da ACh foi maior em SHR tratado (2 µg/kg: $-31,3 \pm 2,6$; 10 µg/kg: $-41,5 \pm 1,9$ % Δ PAM, n=7) quando comparada às de SHR não tratados (2 µg/kg: $-13,8 \pm 1,3$; 10 µg/kg: $-22,6 \pm 1,8$ % Δ PAM; n=7) (Figura 5A).

Ao compararmos a hipotensão causada pela ACh entre os ratos tratados, observamos que a resposta hipotensora da ACh foi similar entre SHR tratados (2 µg/kg: $-31,3 \pm 2,6$; 10 µg/kg: $-41,5 \pm 1,9$ % Δ PAM, n=7) e Wistar Tratados (2 µg/kg - Tratados: $-29,4 \pm 2,3$ %; 10 µg/kg Tratados: $-40,1 \pm 2,2$ % Δ PAM, n=7) (Figura 5A).

Observamos o efeito hipotensor dose-dependente ao NPS em todos os grupos. As respostas do NPS não foram diferentes entre SHR (10 µg/kg: $-19,1 \pm 1,1$; 35 µg/kg: $-30,4 \pm 1,4$ % Δ PAM; n = 7) e ratos Wistar (10 µg/kg: $-20,2 \pm 1,7$; 35µg/kg: $-31,1 \pm 1,1$ % Δ PAM; n = 7) (Figura 5B).

Nos ratos Wistar (Figura 5B), o efeito hipotensor do NPS não foi alterado pelo tratamento com apocinina (10 µg/kg - Tratados: $-21,0 \pm 1,5$; Não tratados: $-20,2 \pm 1,7$; 35 µg/kg – Tratados: $-32,5 \pm 2,0$; Não tratados: $-31,1 \pm 1,1$ % Δ PAM; n = 7).

As respostas do NPS nas doses testadas também não foram alteradas pelo tratamento em SHR (Figura 5B) (10 µg/kg – Tratados: $-22,5 \pm 1,3$; Não tratados: $-19,1 \pm 1,1$; 35 µg/kg – Tratados: $33,6 \pm 1,3$; Não tratados: $-30,4 \pm 1,4$ % Δ PAM; n = 7). Ao compararmos a hipotensão causada pelo NPS entre Wistar tratados e SHR tratados, observamos que a resposta hipotensora foi similar entre eles.

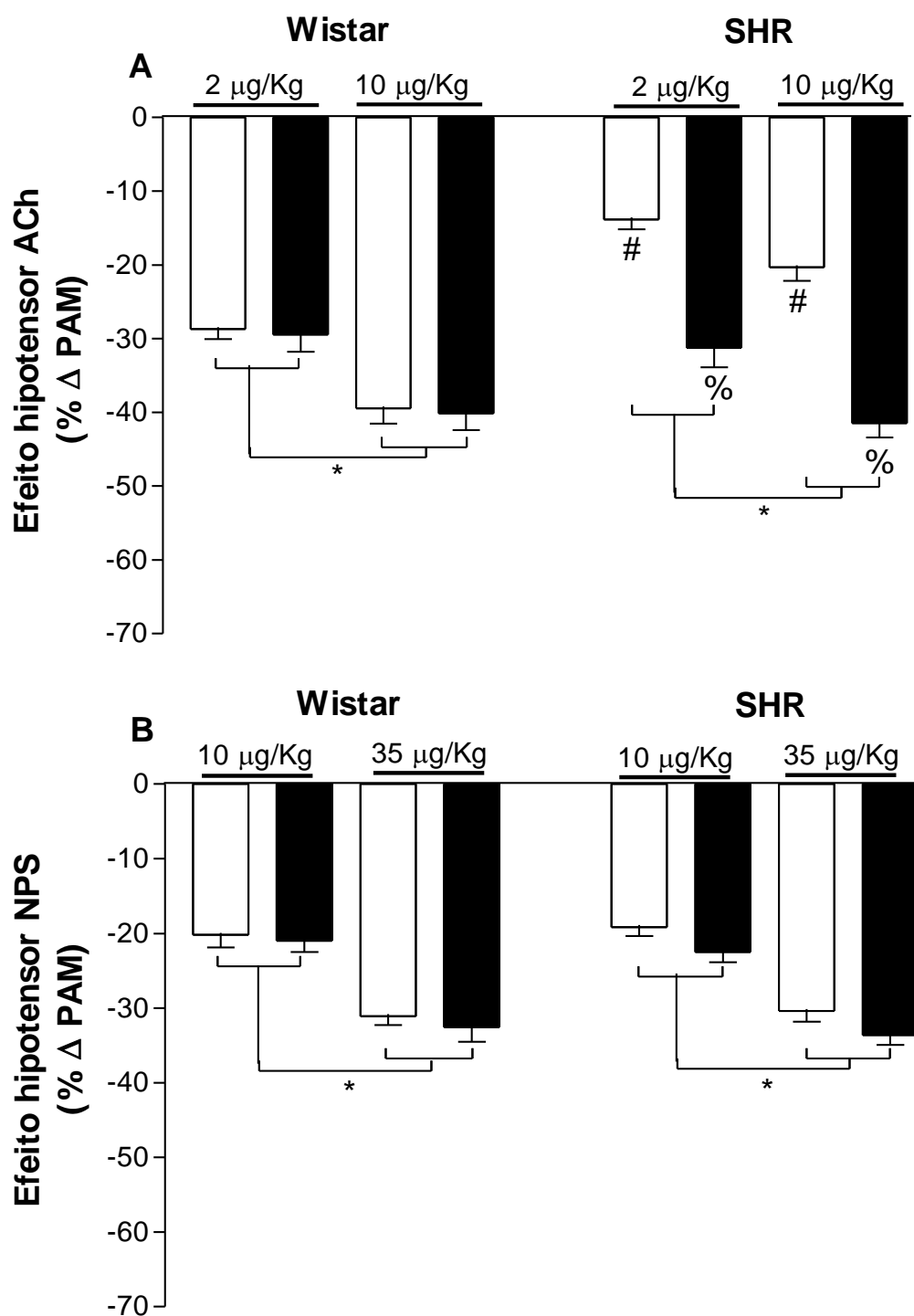


Figura 5 - Variação da Pressão Arterial Média (% ΔPAM) em Wistar (barras brancas) e SHR não tratados (barras brancas) e tratados (barras pretas) com apocinina após a administração *in bolus* de A) Acetilcolina (ACh) nas doses de 2 e 10 µg/kg e B) Nitroprussiato de Sódio (NPS) nas doses de 10 e 35µg/kg. *p<0,05 entre as 2 doses testadas de ACh e NPS; [#]p<0,05 Wistar e SHR não tratado; [%]p<0,05 SHR não tratado e SHR Tratado, ANOVA.

4.4 Efeito pressor a Phe e ANG II

Maiores efeitos pressores dose-dependentes à Phe foram observados em SHR (2 µg/kg: $10,5 \pm 0,5$; 8 µg/kg: $26,7 \pm 0,5$ % Δ PAM; n = 5) do que em ratos Wistar (2 µg/kg: $6,1 \pm 0,3$; 8 µg/kg: $21,7 \pm 0,7$ % Δ PAM; n = 5) (Figura 6A). Da mesma forma, as respostas à ANG II estavam aumentadas em ratos hipertensos (2,5 ng/kg: $17,5 \pm 0,6$; 10 ng/kg: $29,2 \pm 0,8$ % Δ PAM; n = 5) em relação a observada em ratos normotensos Wistar (2,5 ng/kg: $11,7 \pm 0,5$; 10 ng/kg: $22,1 \pm 0,6$ % Δ PAM; n = 5) (Figura 6B).

Em SHR tratados, observamos uma importante redução da resposta pressora à Phe (2 µg/kg: $6,4 \pm 1,1$; 8 µg/kg: $20,6 \pm 0,8$ % Δ PAM; n = 5; Figura 6A) e a ANG II (2,5 ng/kg: $12,8 \pm 0,4$; 10 ng/kg: $21,3 \pm 0,3$ % Δ PAM; n = 5) em relação as observadas em SHR controle (Figura 6B).

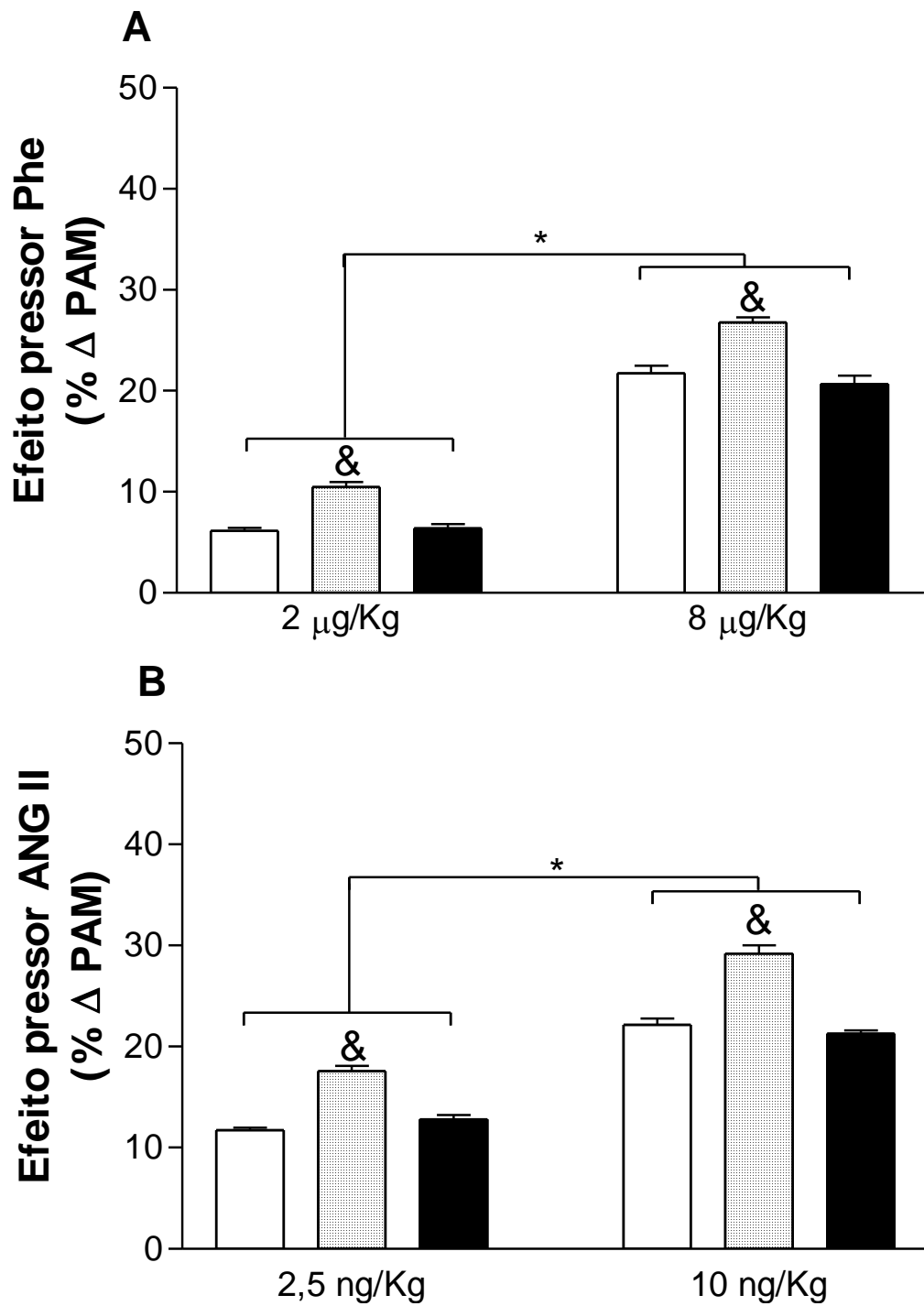


Figura 6 - Variação da Pressão Arterial Média (% ΔPAM) em Wistar (barras brancas) e SHR não tratados (barras pontilhadas) e SHR tratados (barras pretas) com apocinina após a administração *in bolus* de A) Fenilefrina (Phe) nas doses de 2 e 8 µg/kg e B) Angiotensina II (ANG II) nas doses de 2,5 e 10ng/kg. *p<0,05 entre as 2 doses testadas de Phe e ANG II; &p<0,05 entre SHR não tratados e outros grupos, ANOVA.

4.5.1 Quantificação da concentração citoplasmática de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) em células endoteliais de aorta (CEA) de ratos

A $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal (Figura 7) em CEA de SHR é menor do que em CEA de ratos Wistar. A $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal em CEA de SHR tratados ($2916,0 \pm 0,068$ U) foi maior do que em SHR não tratados ($1743,0 \pm 0,031$ U), mas similar à observada em Wistar ($3148,0 \pm 0,387$ U). A acetilcolina aumentou a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ em todos os grupos, mas este efeito estava potencializado em SHR tratados ($6005,0 \pm 0,189$ U) se comparado aos ratos Wistar ($4918,0 \pm 0,284$ U) e SHR não tratados ($3787,0 \pm 0,380$ U).

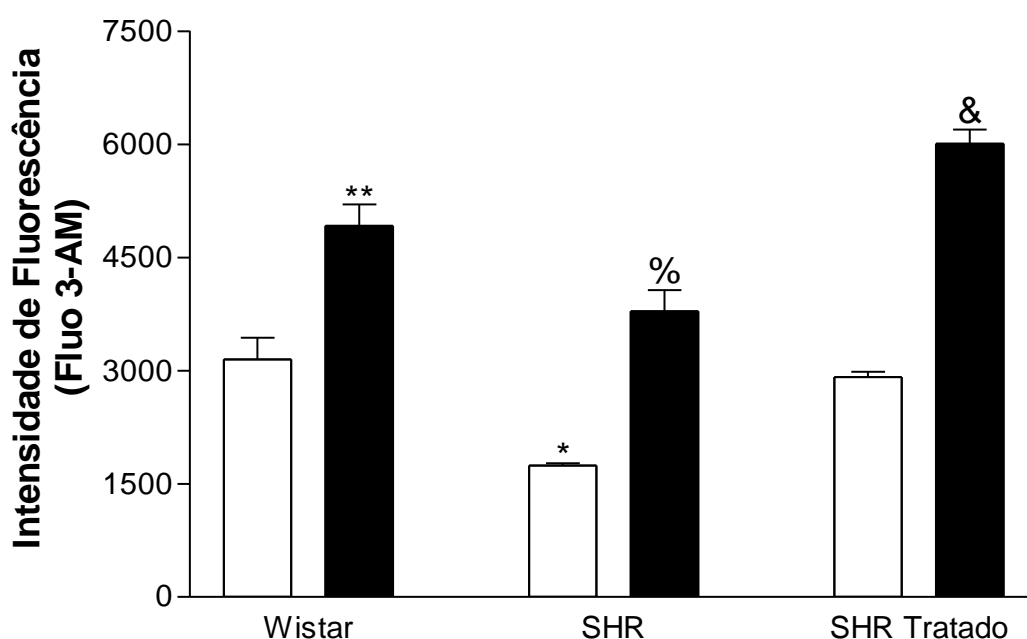


Figura 7 - Intensidade de fluorescência emitida pelo Fluo 3-AM ($5 \mu\text{mol/L}$) que quantifica a concentração citosólica de Ca^{2+} em células endoteliais de aorta ($n=5$) de ratos Wistar, SHR e SHR tratados antes (barras brancas) e após (barras pretas) estimulação com acetilcolina (ACh, $1 \mu\text{M}$, 5 minutos). * $p < 0,05$ entre SHR e outros grupos; ** $p < 0,05$ antes e após a ACh em ratos Wistar, % $p < 0,05$ antes e após a ACh em SHR; & $p < 0,05$ entre SHR tratados e outros grupos, ANOVA.

4.5.2 Quantificação da concentração citoplasmática de NO ($[\text{NO}]_c$) em células endoteliais de aorta (CEA) de ratos

A $[\text{NO}]_c$ basal (Figura 8) em CEA de SHR não tratados ($2057,0 \pm 0,081$ U) foi menor que de Wistar ($3180,0 \pm 0,220$ U) e SHR tratados ($3368,0 \pm 0,276$ U). Não houve diferença na $[\text{NO}]_c$ basal entre CEA de ratos Wistar e SHR tratados. A ACh

(1 μ M) aumentou a [NO]_c em CEA de ratos Wistar (4526,0 \pm 0,263 U), mas não em SHR não tratados (2259,0 \pm 0,108 U). Entretanto, em SHR tratados a ACh promoveu aumento da [NO]_c (6320,0 \pm 0,345 U) em torno de 2 vezes maior que a [NO]_c de SHR não tratados.

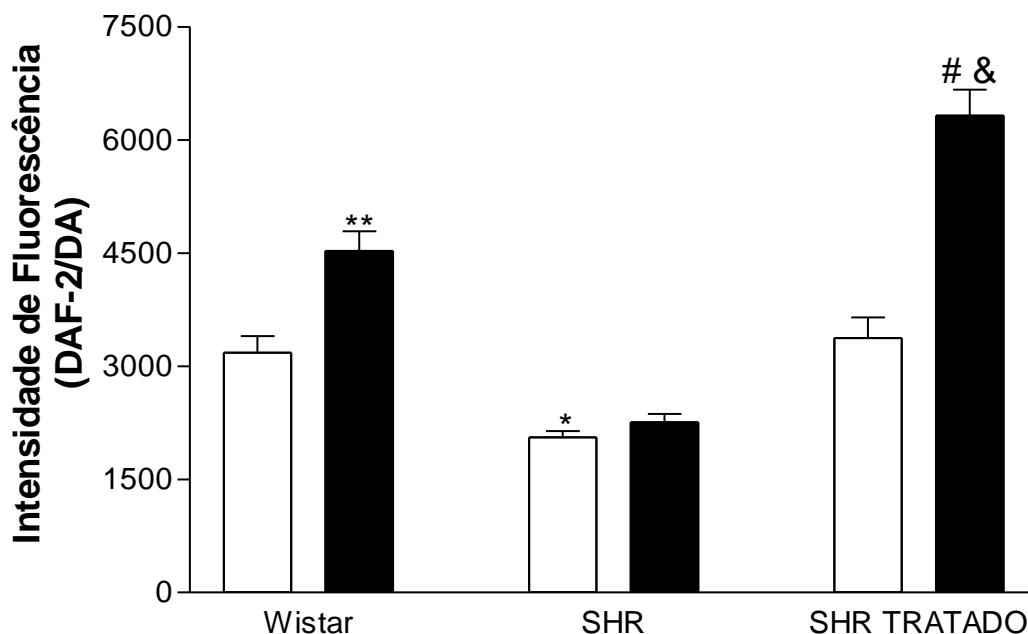


Figura 8 - Intensidade de fluorescência emitida pelo DAF-2/DA (10 μ mol/L) que quantifica a concentração citosólica de óxido nítrico (NO) em células endoteliais de aorta (n=5) de ratos Wistar, SHR e SHR tratados antes (barras brancas) e após (barras pretas) estimulação com acetilcolina (ACh, 1 μ M, 5 minutos). *p<0,05 entre SHR e outros grupos; **p<0,05 antes e após a ACh em ratos Wistar, #p<0,05 antes e após a ACh em SHR; &p<0,05 entre SHR tratados e outros grupos, ANOVA.

4.5.3 Quantificação da concentração de ERO em células endoteliais de aorta (CEA) de ratos

Em células endoteliais de SHR não tratados, a [ERO] basal (2880,0 \pm 0,155 U) estava aumentada em relação a células endoteliais de ratos Wistar (1902,0 \pm 0,127 U). Entretanto, em células de SHR tratados a [ERO] basal (2090,0 \pm 0,174 U) estava reduzida em comparação a observada em SHR não tratados e similar a observada em Wistar. A ACh não alterou a [ERO] em CEA de SHR tratados (1896,0 \pm 0,077 U), SHR não tratados (2858,0 U \pm 0,256) e Wistar (1822,0 \pm 0,095 U) (Figura 9).

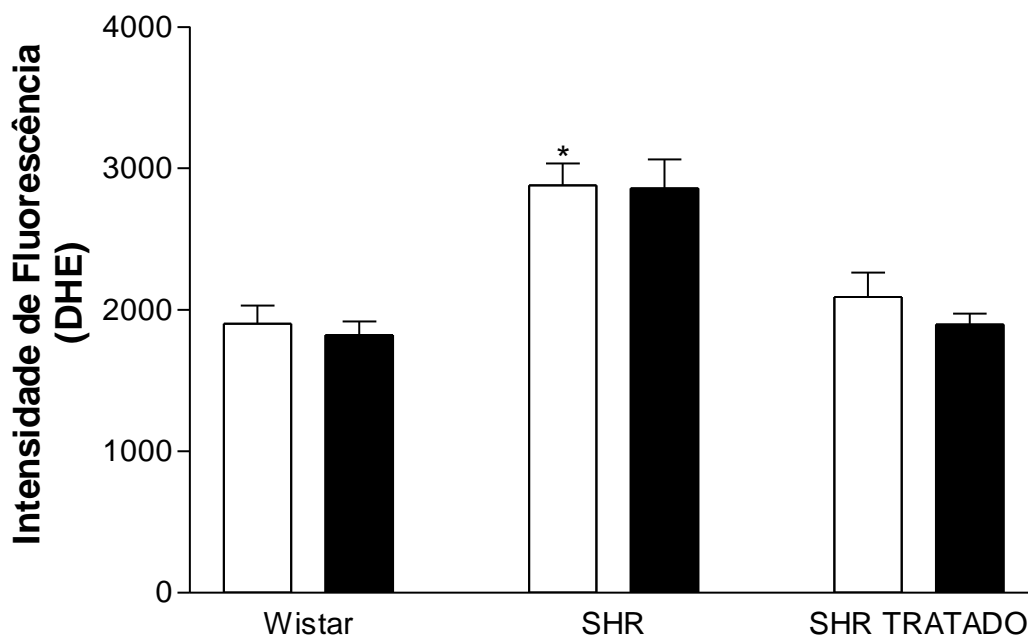


Figura 9 - Intensidade de fluorescência emitida pelo DHE (2,5 µmol/L) que quantifica a concentração citosólica de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células endoteliais de aorta (n=5) de ratos Wistar, SHR e SHR tratados antes (barras brancas) e após (barras pretas) estimulação com acetilcolina (ACh, 1µM, 5 minutos). *p<0,05 entre SHR e outros grupos, ANOVA.

4.6.1 Expressão proteica da eNOS (Óxido Nítrico Sintase endotelial) em homogenatos de aortas

A expressão basal de eNOS foi muito menor em SHR ($0,22 \pm 0,02$; n=5) do que em Wistar ($0,58 \pm 0,01$; n=5). Não houve alteração na expressão da eNOS entre ratos Wistar tratados ($0,57 \pm 0,01$; n=5) e não tratados. Porém, em aortas SHR tratados com apocinina, foi observado aumento da expressão proteica da eNOS ($0,41 \pm 0,01$; n=5) quando comparado as aortas de SHR não tratados (Figura 10).

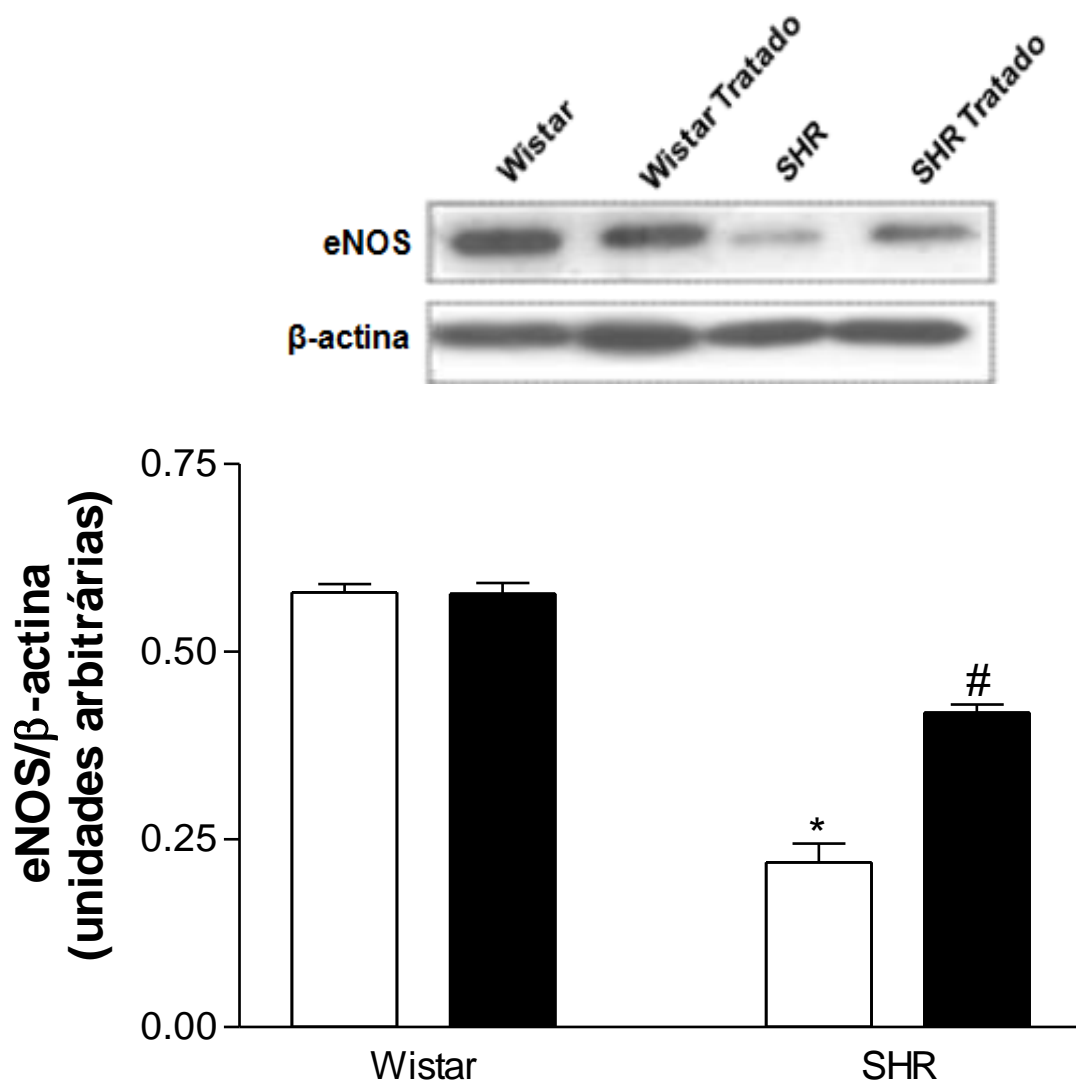


Figura 10 - Autorradiografias típicas e quantificação da expressão proteica da enzima Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS) em homogenatos de aorta de Wistar e SHR não tratados (barras brancas) ou tratados (barras pretas) com apocinina (30mg/kg). Estes dados representam a \pm EPM dos resultados obtidos em aortas (n=5) dos diferentes grupos. *p<0,05 entre SHR e outros grupos; #p<0,05 entre SHR tratados e outros grupos, ANOVA.

4.6.2 Expressão proteica da GCs (Guanilato Ciclase solúvel) em homogenatos de aortas

Não observamos diferenças na expressão basal das subunidades α e β da GCs entre ratos não tratados Wistar (α : $0,60 \pm 0,05$; β : $0,61 \pm 0,04$; n=5) e SHR (α : $0,61 \pm 0,03$; β : $0,67 \pm 0,05$; n=5) ou Wistar tratados (α : $0,57 \pm 0,05$; β : $0,65 \pm 0,06$; n=5) e SHR tratados (α : $0,56 \pm 0,04$; β : $0,68 \pm 0,04$; n=5) (Figuras 11 e 12).

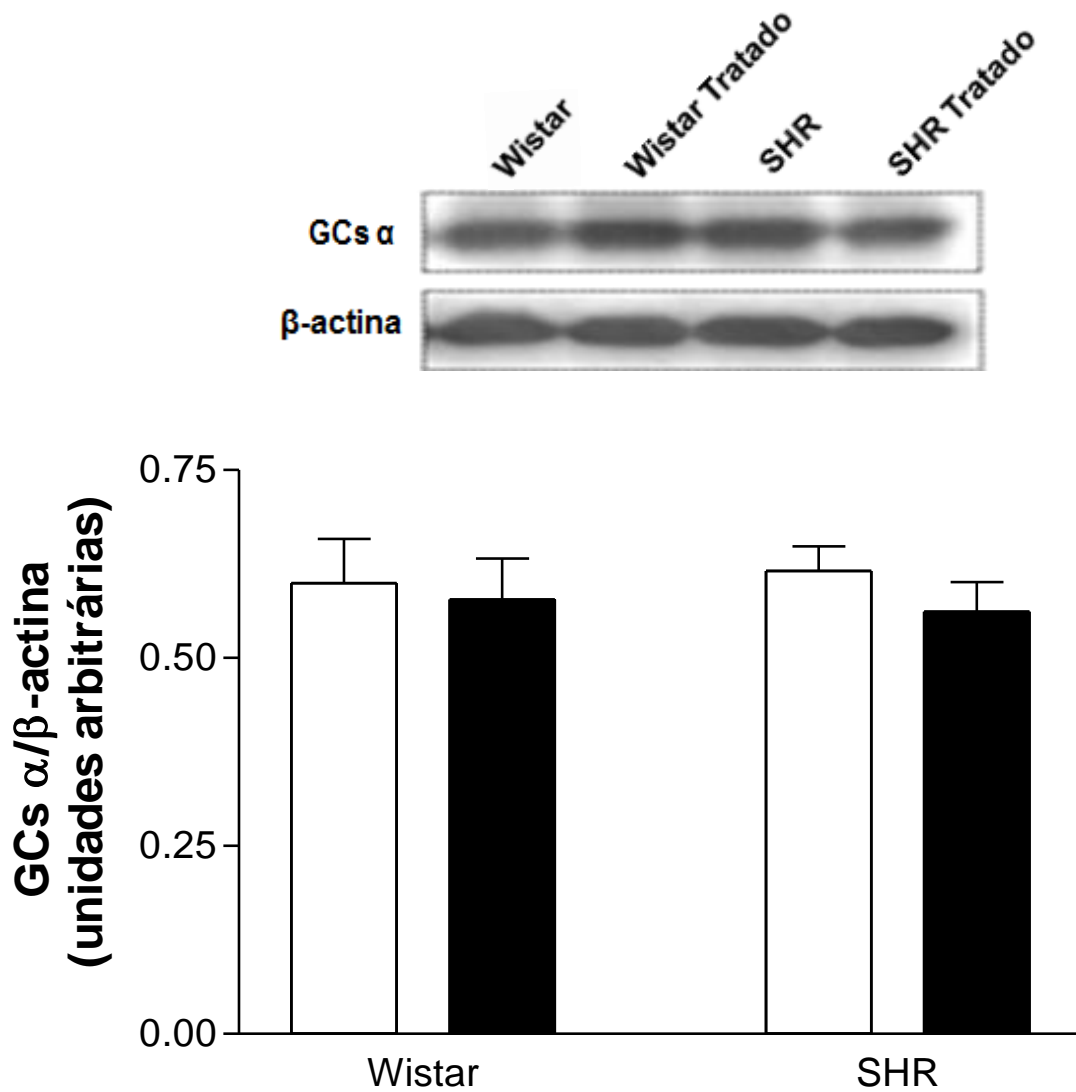


Figura 11 - Autorradiografias típicas e quantificação da expressão proteica das subunidades α da enzima Guanilato Ciclase solúvel (GCs) em homogenatos de aorta de Wistar e SHR não tratados (barras brancas) ou tratados (barras pretas) com apocinina (30mg/kg). Os dados representam a \pm EPM dos resultados obtidos em aortas (n=5) dos diferentes grupos, ANOVA.

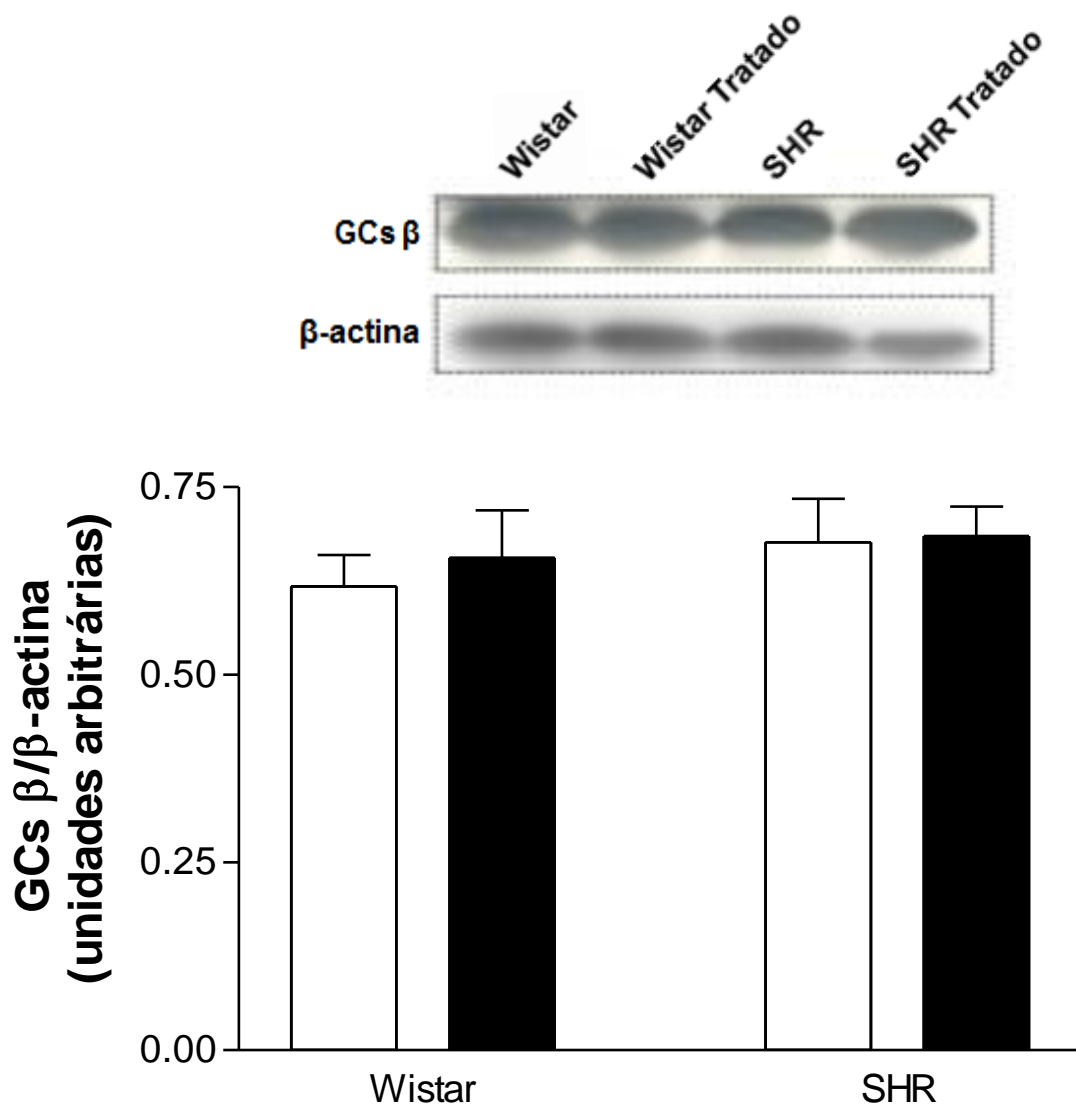


Figura 12 - Autorradiografias típicas e quantificação da expressão proteica da subunidade β da enzima Guanilato Ciclase solúvel (GCs) em homogenatos de aorta de Wistar e SHR não tratados (barras brancas) ou tratados (barras pretas) com apocinina (30mg/kg). Os dados representam a \pm EPM dos resultados obtidos em aortas (n=5) dos diferentes grupos, ANOVA.

4.7 Análise da Hipertrofia Cardíaca

O peso cardíaco total (PCT) foi maior em Wistar ($1,41 \pm 0,05$ g, n=7) do que em SHR ($1,10 \pm 0,02$ g, n=7). Quando comparamos o PCT após o tratamento, não observamos diferença dentro do grupo de SHR (Não tratados: $1,10 \pm 0,02$; Tratados: $1,11 \pm 0,03$ g, n=7) ou de Wistar (Não tratados: $1,41 \pm 0,05$; Tratados: $1,49 \pm 0,04$ g, n=7) (Tabela 3).

O peso do ventrículo esquerdo (PVE) não foi alterado nos animais SHR tratados ($0,46 \pm 0,02$ g; n=9) quando comparado ao grupo não tratado ($0,47 \pm 0,01$ g; n=7). Nos ratos Wistar também não houve alteração de PVE (Não tratados: $0,52 \pm 0,01$; Tratados: $0,51 \pm 0,02$ g, n=7). Quando comparamos ratos Wistar e SHR sem tratamento, não observamos diferença de PVE (Tabela 3).

O comprimento da tíbia esquerda foi maior em Wistar ($3,96 \pm 0,02$ cm, n=7) do que em SHR ($3,50 \pm 0,04$ cm, n=7). Quando comparamos o comprimento da tíbia esquerda após o tratamento, não houve diferença dentro do grupo SHR (Não tratados: $3,50 \pm 0,04$; Tratados: $3,54 \pm 0,03$ cm, n=7) e Wistar (Não tratados: $3,96 \pm 0,02$; Tratados: $3,94 \pm 0,08$ cm, n=7) (Tabela 3).

Tabela 3 - Peso cardíaco total (PCT), peso do ventrículo esquerdo (PVE) e comprimento da tíbia esquerda nos grupos de animais Wistar e SHR não tratados ou tratados com apocinina (30mg/kg) *p<0,05 SHR x Wistar e Wistar Tratados; #p<0,05 SHR Tratados x Wistar e Wistar Tratados, ANOVA.

	WISTAR	WISTAR TRATADO	SHR	SHR TRATADO
Peso Cardíaco Total (gramas)	$1,41 \pm 0,05$ n=7	$1,49 \pm 0,04$ n=7	$1,10 \pm 0,02^*$ n=7	$1,11 \pm 0,03^{\#}$ n=7
Peso do Ventrículo Esquerdo (gramas)	$0,52 \pm 0,02$ n=7	$0,51 \pm 0,02$ n=7	$0,47 \pm 0,02$ n=7	$0,46 \pm 0,01$ n=7
Comprimento da Tíbia Esquerda (centímetros)	$3,96 \pm 0,02$ n=7	$3,94 \pm 0,08$ n=7	$3,50 \pm 0,04^*$ n=11	$3,54 \pm 0,03^{\#}$ n=7

O índice da massa ventricular esquerda (IMVE) foi semelhante entre Wistar ($0,12 \pm 0,004$ g/cm, n=12) e SHR ($0,13 \pm 0,004$ g/cm, n=11). Entre SHR tratados ($0,13 \pm 0,007$ g/cm, n=9) e SHR não tratados ($0,13 \pm 0,004$ g/cm, n=11) não houve diferença. No grupo de ratos normotensos, o tratamento com apocinina também não alterou o IMVE (Não tratados: $0,12 \pm 0,004$ g/cm, n=12; Tratados: $0,13 \pm 0,006$ g/cm, n=7) (Figura 13).

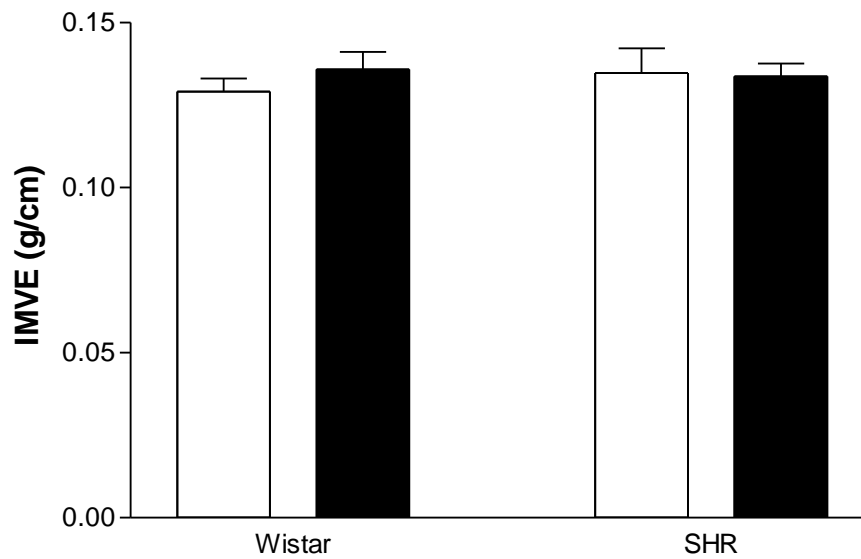


Figura 13 - Índice de Massa Ventricular Esquerda (massa do ventrículo esquerdo(g)/comprimento da tíbia (cm)) de ratos Wistar e SHR não tratados (barras brancas) e tratados (barras pretas) com apocinina (30mg/kg).

A medida dos diâmetros dos miócitos do ventrículo esquerdo foi maior em SHR do que em Wistar (Figura 14). A apocinina não alterou essa medida em ratos Wistar (Wistar: $68,82 \pm 0,70 \mu\text{m}$, $n=5$; Wistar tratados: $66,83 \pm 0,85 \mu\text{m}$, $n=5$). No entanto, em SHR o diâmetro foi reduzido nos animais tratados com apocinina ($75,35 \pm 0,90 \mu\text{m}$, $n=5$) em comparação aos não tratados ($84,64 \pm 1,05 \mu\text{m}$, $n=5$).

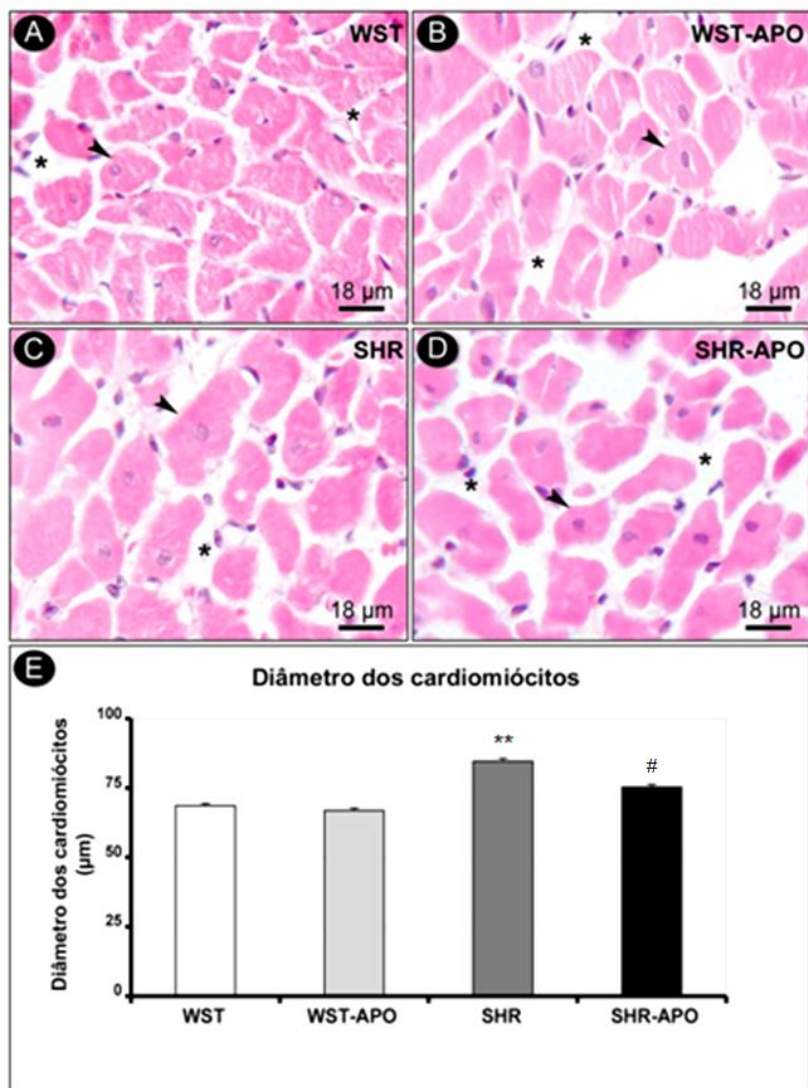


Figura 14 - Fotomicrografias evidenciando o efeito do tratamento crônico com apocinina sobre o diâmetro dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo (ampliação de 400 x) de ratos Wistar (A), Wistar Tratados (B), SHR (C), SHR Tratados (D) e valores médios dos diâmetros dos cardiomiócitos de ratos Wistar e SHR, não tratados (barras brancas) e tratados (barras pretas) com apocinina (30mg/kg) (E). Coloração Hematoxilina e Eosina. Setas representam cardiomiócitos; *tecido conjuntivo; ** $p < 0,05$ SHR e demais grupos; # $p < 0,05$ SHR tratados e demais grupos, ANOVA. Barras de escala: 18 μm.

A área de fibras colágenas presente no ventrículo esquerdo de SHR estava aumentada em relação à observada em ratos Wistar (Figura 15). Esta medida não foi alterada após o tratamento com apocinina em ratos Wistar (Não tratados: $2,90 \pm 0,14$; Tratados: $3,06 \pm 0,14$ % área, $n=5$). Em SHR tratados ($3,08 \pm 0,17$ % área,

n=5), a área de fibras colágenas foi reduzida em comparação com SHR sem tratamento ($4,09 \pm 0,20$ % área, n=5) e similar à observada em Wistar.

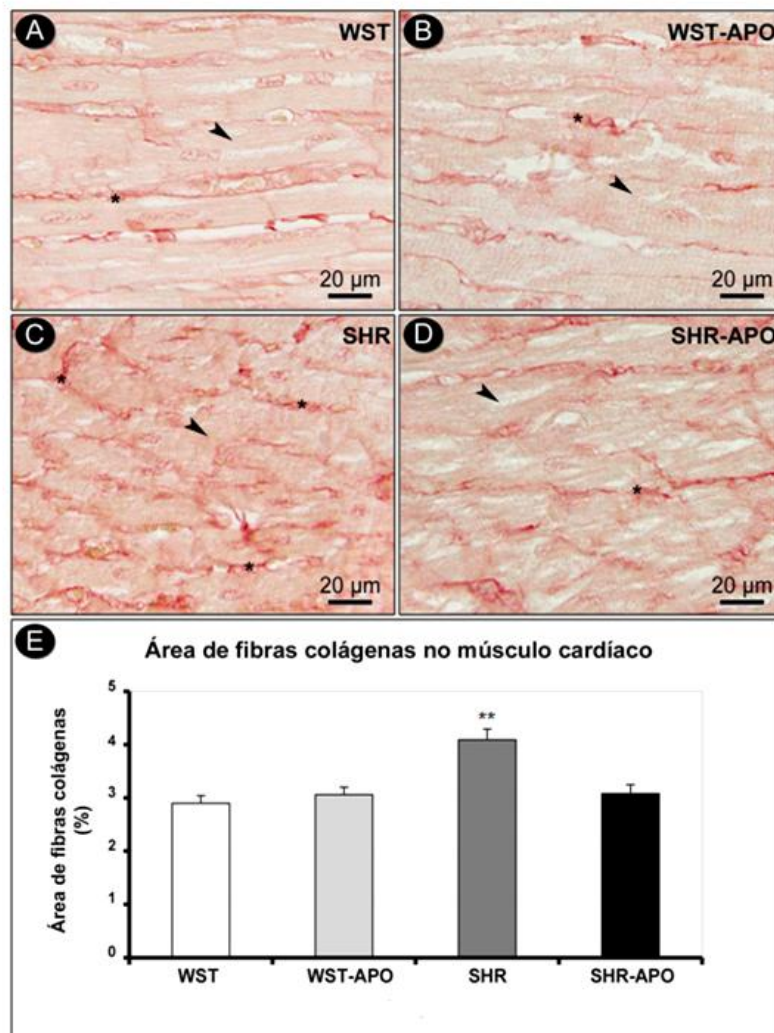


Figura 15 - Fotomicrografias evidenciando o efeito do tratamento crônico com apocinina sobre a área de fibras colágenas no músculo cardíaco (ampliação de 400 x) de ratos Wistar (A), Wistar Tratados (B), SHR (C), SHR Tratados (D) e valores médios dos diâmetros dos cardiomiócitos de ratos Wistar e SHR, não tratados (barras brancas) e tratados (barras pretas) com apocinina (30mg/kg) (E). Coloração Picrosirius red. Setas representam cardiomiócitos; *tecido conjuntivo; **p<0,05 SHR e demais grupos, ANOVA. Barras de escala: 20 μ m.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Neste estudo observamos que o tratamento de ratos normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR) com apocinina não alterou o peso corporal (Figura 3A) e o comprimento naso-anal (Figura 3B) demonstrando que a apocinina não possui ação tóxica e não interfere no desenvolvimento dos animais.

Pequenas variações na pressão arterial (PA) ocorrem em ratos normotensos entre a terceira e quarta semanas após nascimento (GRAY, 1984). Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), o aumento da PA pode ocorrer entre a terceira e décima semana de vida, e aumenta em 30% acima da PA de ratos normotensos WKY (CLUBB *et al.*, 1987). Segundo Dickhout e Lee (1998), a frequência cardíaca de SHR já está aumentada nas primeiras semanas de vida quando comparada a de ratos WKY. Sabe-se que o aumento da expressão de NAD(P)H oxidase precede o desenvolvimento de hipertensão (CHABRASHVILI *et al.*, 2002), dessa forma o tratamento com inibidores deste complexo enzimático deve ser mais eficiente em SHR jovens antes do desenvolvimento de alterações provenientes da hipertensão. Por isso em nosso estudo, iniciamos o tratamento de SHR com apocinina (30mg/kg/dia, via oral) na 4ª semana (21 dias) de vida dos animais e mantivemos até a 10ª semana, a fim de prevenirmos o desenvolvimento da hipertensão, da disfunção endotelial e da hipertrofia ventricular esquerda em SHR.

Desta forma, demonstramos que o tratamento crônico de SHR da 4ª a 10ª semana de vida com apocinina (30 mg/kg/dia), foi eficaz em prevenir o desenvolvimento da hipertensão arterial, uma vez que os valores de PAS, PAD e PAM (Figura 4A-C) de SHR tratados foram menores do que os obtidos em SHR não tratados. Estes resultados sugerem que em SHR não tratados a redução da biodisponibilidade de NO, associada ao aumento de ERO, teria papel crítico no desenvolvimento da hipertensão em SHR (TOUYZ, 2004). Como a NAD(P)H oxidase tem sido considerada a maior fonte de ERO em células vasculares (PAGANO *et al.*, 1995) e como tem sido sugerido, seria responsável pela disfunção endotelial observada em diferentes patologias cardiovasculares (BAUERSACHS *et al.*, 1998; LÜSCHER, 1993; LÜSCHER; NOLL, 1995; SITIA *et al.*, 2010), nossos resultados sugerem que em SHR tratados, a apocinina ao inibir a atividade NAD(P)H oxidase,

reduziria a produção de ERO (O_2^-) e aumentaria consequentemente a biodisponibilidade de NO.

O efeito da apocinina na prevenção do desenvolvimento da hipertensão também foi observado em ratos 2-rins-1-clip (2R-1C) (COSTA *et al.*, 2009), ratos tratados com frutose (UNGER; PATIL, 2009), ratos DOCA-salt (BESWICK *et al.*, 2001), ratos Sprague-Dawley com hipertensão induzida por dexametasona (HU *et al.*, 2006) e em camundongos com hipertensão induzida por ANG II (MÁRTINEZ-REVELLES *et al.*, 2013). No entanto, Pechanová *et al.* (2009) observaram que tratamento crônico com apocinina durante 6 semanas, na mesma dose utilizada por nós (30 mg/kg/dia), administrada também por via oral, não foi capaz de prevenir o desenvolvimento da hipertensão em SHR, mas reduziu os valores de PAM. A diferença entre os resultados obtidos nos estudos provavelmente está associada ao período de início do tratamento. Enquanto iniciamos o tratamento no período anterior (4ª semana) à alteração da pressão sanguínea, Pechanová *et al.* (2009) iniciaram o tratamento na 6ª semana após o nascimento, período em que já pode ser observado aumento da PA em SHR. Recentemente, Tain *et al.* (2012) demonstraram que o tratamento com apocinina (2,5 mM, na água de beber) iniciado na 4ª semana e mantido por 8 semanas atenuou o aumento da pressão arterial média em SHR. Eles sugeriram que este efeito estaria relacionado a capacidade da apocinina em bloquear a translocação da subunidade p47phox nos rins de SHR.

Como foi descrito, o tratamento foi eficaz em reduzir a PAS e PAD de SHR. A PAS aumenta diretamente na proporção do aumento do débito cardíaco, este por sua vez, é resultante da interação entre volume sistólico e frequência cardíaca. O tratamento crônico com apocinina reduziu a FC (Figura 4D) apenas nos SHR e consequentemente, como também observado em nossos resultados, ocorreu redução da PAS. A PAD reflete a distensão das paredes dos vasos quando o músculo cardíaco está relaxado, ou seja, quanto menor a PAD, menor será a densidade capilar local (SILVERTHORN, 2010). A PAD reflete parte da resistência periférica, desta maneira, o tratamento com apocinina foi capaz em modular a resistência vascular periférica apenas nos hipertensos que apresentam valores maiores de PAD.

Em nossos resultados observamos que as respostas hipotensoras, dose-dependente, à ACh estão diminuídas em SHR se comparadas as respostas obtidas em ratos Wistar (Figura 5A). Também observamos que apesar da estimulação com ACh aumentar a concentração citosólica de Ca^{+2} em células endoteliais de ratos Wistar e SHR (Figura 7), o aumento da concentração de NO foi observado apenas em ratos Wistar (Figura 8), caracterizando desta forma uma deficiência na síntese/produção de NO pelo endotélio de SHR (SUZUKI *et al.*, 1995). Esta alteração poderia ser associada à reduzida expressão da eNOS (Figura 10) observada em homogenatos de aortas de SHR. Estes resultados reforçam a sugestão de que a diminuição da expressão da eNOS (BAUERSACHS *et al.*, 1998; CHOU *et al.*, 1998), possivelmente devido a deficiência do cofator tetrahydrobiopterina da enzima ou do seu substrato L-arginina (VASQUEZ-VIVAR *et al.*, 2002) e a oxidação de tetrahydrobiopterina pelo peroxinitrito, que levam ao desacoplamento da eNOS (LAURSEN *et al.*, 2001) e promovem alterações na produção de NO endógeno e aumento de ERO (SAHA *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 1995), poderiam estar associados a disfunção endotelial descrita em SHR (LUSCHER; VANHOUTTE, 1986).

Em SHR tratados com apocinina, foram observadas maiores respostas hipotensoras a ACh (Figura 5A), aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} (Figura 7) e de NO (Figura 8) em células endoteliais e da expressão proteica de eNOS (Figura 10) em homogenatos de aorta. Não observamos diferença nesses parâmetros avaliados em Wistar tratados (Figura 7, 8 e 10). Estes resultados sugerem que o tratamento com apocinina em SHR previne o desenvolvimento da disfunção endotelial observada previamente em SHR não tratados. Possivelmente, devido a diminuição na concentração de O_2^- e aumento da biodisponibilidade de NO, associados a maior síntese ou aumento na expressão de eNOS.

Nossos dados estão de acordo com os apresentados por Costa *et al.* (2009) que também observaram que o tratamento com apocinina ou tempol (1mmol/L) aumenta a resposta hipotensora a ACh (1-100 pmol) em 2R-1C. Unger e Patil (2009) verificaram um aumento da resposta a ACh (1 nmol/L a 100 μ mol/L) em ratos com hipertensão induzida por frutose e tratados com apocinina (1,5 mmol/L). Wind *et al.* (2010) verificaram que a apocinina também aumenta a resposta vasodilatadora a

ACh em SHR. Ainda, Virdis *et al.* (2004) demonstraram que em camundongos com hipertensão induzida pela infusão de ANG II a vasodilatação em resposta à ACh é diminuída em artérias de resistência, o que foi totalmente prevenido pela apocinina (2,5 mg/dia, na comida, durante 14 dias). Foi demonstrado que a apocinina impede a redução de NO em animais e humanos sujeitos a estresse oxidativo (HAMILTON *et al.*, 2002).

A fim de confirmarmos que o efeito da apocinina se daria pela reversão da disfunção endotelial, avaliamos se a apocinina poderia alterar o efeito hipotensor de uma droga vasodilatadora independente do endotélio (NPS). Caso o efeito da apocinina fosse observado, a sugestão da reversão da disfunção endotelial poderia ser questionada.

Em nosso estudo, o tratamento com apocinina não alterou a resposta hipotensora do NPS em SHR (Figura 5B) assim como não modificou a expressão da GCs (Figura 10) em homogenatos de aorta. Como foi demonstrado por Munhoz *et al.* (2012), o NPS promove um efeito hipotensor em apenas 30 segundos, promovendo seu efeito diretamente sobre o músculo liso vascular. No trabalho de Rizzetti *et al.* (2013), utilizando ratos expostos ao mercúrio que foram tratados com apocinina (1,5 mmol/L) e no trabalho Unger e Patil (2009) que utilizaram ratos com hipertensão induzida por frutose também tratados com apocinina, não foram observadas alterações nas respostas vasodilatadoras ao NPS.

Como a expressão da eNOS e a resposta hipotensora para ACh foram aumentadas somente em ratos SHR após o tratamento, podemos sugerir que a modulação da apocinina ocorre principalmente sobre as células endoteliais, revertendo a disfunção endotelial, como explicado anteriormente. Esta sugestão é reforçada pelos resultados obtidos neste estudo, que demonstraram que a apocinina parece não modular a atividade das CMLV, uma vez que não houve alteração na expressão das subunidades alfa e beta da GCs em homogenatos de aortas de ratos tratados Wistar e SHR (Figuras 11 e 12).

Verificamos também que a infusão de Phe (agonista α 1-adrenérgico) e ANG II promoveu uma maior resposta pressora *in vivo* em ratos SHR (Figura 6), como relatado anteriormente (BRODY *et al.*, 1984; MORI, 1973). Esta alteração seria consequente de uma maior modulação da atividade simpática (BRODY *et al.*, 1984;

MORI, 1973) e da hiperatividade do sistema renina angiotensina, da qual resulta em produção aumentada de angiotensina II em vários leitos vasculares, o que seguramente também contribui para a elevada resistência periférica total observada neste modelo (MULLINS *et al.*, 2006). Após o tratamento, observamos que as respostas pressoras à Phe e ANG II em SHR foram diminuídas (Figura 6). Foi demonstrado por Tsai e Jiang (2010) que o tratamento de anéis de aorta de ratos Sprague-Dawley com apocinina, diminui a resposta a fenilefrina, sugerindo que as ERO modulam a atividade de receptores α 1-adrenérgicos. Ainda, foi descrito que a ANG II ativa a NAD(P)H oxidase no músculo liso vascular (GRIENDLING *et al.*, 1994; RAJAGOPALAN *et al.*, 1996). Ao tratarmos o rato com apocinina, haveria, como esperávamos, inibição da atividade da NAD(P)H oxidase e consequente diminuição da resposta a ANG II.

Estudos anteriores demonstraram que ratos hipertensos SHR apresentam disfunção endotelial coronariana e hipertrofia ventricular esquerda (LORELL; CARABELLO, 2000; ZHANG *et al.*, 2009). Em nosso estudo, verificamos que o tratamento crônico com apocinina, além de atenuar a PAM, também diminuiu a FC (Figura 4D) em SHR. Na hipertensão, o coração sofre sobrecarga de pressão, e conseqüentemente, algumas alterações são observadas (ENGELMANN *et al.*, 1987). O aumento da expressão de NAD(P)H oxidase nos cardiomiócitos (LI *et al.*, 2002) e aumento da quantidade de O_2^- , estaria contribuindo para maior função contrátil do coração (DOROSHENKO *et al.*, 2005). Desta forma, levantamos a hipótese de que ao bloquearmos a atividade da NAD(P)H oxidase com o tratamento crônico de apocinina, haveria uma diminuição das ERO com consequente aumento da biodisponibilidade de NO, o que reduziria a FC. Nossos resultados sugerem que seria este o mecanismo envolvido, uma vez que observamos efeito da apocinina sobre a FC apenas em ratos hipertensos SHR e não em ratos normotensos Wistar.

Diversos autores (CHANG *et al.*, 2005; MATSUOKA *et al.*, 1996; OZAKI *et al.*, 2002; WOLLERT; DREXLER, 2002) relataram o papel anti-hipertrofico do NO, ao reduzir a hipertrofia ventricular esquerda. Primeiramente, foi demonstrado que o tratamento crônico de SHR com L-arginina resultou na redução da hipertrofia (CHANG *et al.*, 2005; MATSUOKA *et al.*, 1996). Posteriormente, foi observado que em camundongos que “*hiperexpressam*” óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), o

NO atenuou a hipertrofia cardíaca induzida pela infusão crônica de isoprenalina (ISO) (OZAKI *et al.*, 2002). Em camundongos *knockout* para Nox2, a hipertrofia cardíaca induzida por infusão de ANG II foi marcadamente inibida e acompanhada pela inibição da fibrose cardíaca intersticial (BENDALL *et al.*, 2002). Além disto, em modelos experimentais de hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão aórtica, mostraram que o progressivo aumento da geração de ERO no ventrículo esquerdo seria consequente do aumento na expressão de Nox2 (LI *et al.*, 2002). Ainda, Park *et al.* (2004) demonstraram que a inibição da NAD(P)H oxidase com apocinina (1,5 mmol/L) preveniu a hipertensão, hipertrofia cardíaca e a fibrose em ratos com hipertensão induzida por infusão de aldosterona. Nos nossos resultados, apesar do tratamento não ter reduzido o PCT e IMVE (Tabela 3, Figura 13), em SHR tratados com apocinina o diâmetro dos cardiomiócitos é menor do que em SHR não tratados, demonstrando que o tratamento foi eficaz em reduzir a hipertrofia ventricular esquerda de SHR (Figura 14).

Nossos dados mostraram também que o tratamento com apocinina reduziu a porcentagem de colágeno no ventrículo esquerdo dos SHR tratados (Figura 15). Outros estudos também observaram o efeito da apocinina na fibrose. Em cultura de fibroblastos cardíacos de ratos Wistar, onde a ANG II estimula a atividade da NAD(P)H oxidase e aumento da produção de colágeno, o uso de apocinina aboliu essas respostas (LIJNEN *et al.*, 2006). O tratamento com apocinina (0,15 mmol/kg) durante 4 semanas reduziu a fibrose observada em ratos stroke-prone SHR (spSHR) (YAMAMOTO *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos em nosso estudo sugerem que o efeito da apocinina sobre a PAM, hipertrofia cardíaca e disfunção endotelial em SHR estaria associado a redução do estresse oxidativo. Esta hipótese foi testada pela avaliação da produção basal de ERO em células endoteliais. Nossos resultados demonstraram que houve uma diminuição dos níveis de ERO liberadas pelas células endoteliais de SHR tratados com apocinina (Figura 9). Estes resultados corroboram os apresentados por Wind *et al.*, (2010) que demonstraram que o tratamento com apocinina (1 mmol/L) reduz a fluorescência ao DHE em aortas com endotélio de SHR. Além disto, também foi observado por Beswick *et al.* (2001) que o tratamento de ratos DOCA-salt com apocinina (1,5 mmol/L) foi capaz de reduzir a produção de

O_2^- , medida *in vitro* por lucigenina, nos anéis de aorta isolados destes animais. Observamos também que a estimulação com ACh não alterou a geração de ERO em células endoteliais de ratos Wistar ou de SHR, demonstrando assim a eficácia do tratamento com apocinina na redução do estresse oxidativo em SHR. Foi relatado o efeito protetor do tratamento *in vivo* com apocinina em modelos experimentais de lesão vascular associada à superprodução de ERO (CHAN *et al.*, 2007), evidenciando que este composto parece ser eficaz no impedimento do dano vascular associado ao estresse oxidativo.

A ação antioxidante da apocinina e sua dependência ou não por peroxidases (HEUMULLER *et al.*, 2008; SIMONYI *et al.*, 2012; WILLIAMS; GRIENGLING, 2007) fez com que esta droga fosse a escolha por grande parte dos estudos que tiveram como objetivo avaliar o envolvimento do complexo NAD(P)H oxidase em modelos experimentais *in vivo*, uma vez que administrada oralmente pode inibir a NAD(P)H oxidase sem apresentar efeitos tóxicos (BEDARD; KRAUSE, 2007; HOLLAND; JOHNSON, 1999; STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008; WILLIAMS; GRIENGLING, 2007; YU *et al.*, 2008).

Este estudo traz informações importantes sobre os efeitos do tratamento crônico com apocinina na hipertensão, hipertrofia ventricular esquerda e disfunção endotelial. Estas informações podem ajudar a aumentar a compreensão dos mecanismos de ação da apocinina sobre as células endoteliais de animais hipertensos, bem como propor novas terapias anti-hipertensivas.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Em conjunto, estes dados demonstraram que o tratamento crônico com apocinina, inibidor da NAD(P)H oxidase, foi eficaz em:

- Prevenir o desenvolvimento da hipertensão arterial, da hipertrofia ventricular esquerda e reduzir a fibrose ventricular em SHR;
- Diminuir a concentração de ERO e aumentar a concentração de Ca^{2+} e NO em células endoteliais,
- Aumentar a expressão de eNOS em homogenatos de aortas de SHR.

A partir destes resultados, concluímos que a apocinina previne o desenvolvimento hipertensão, da hipertrofia ventricular e da disfunção endotelial em SHR.

Com a investigação continuada dos mecanismos envolvidos, é possível prever a aplicação clínica de drogas semelhantes à apocinina na prevenção da hipertensão essencial humana.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AALKJAER, C.; BOEDTKJER D.; MATCHKOV V. Vasomotion - what is currently thought? **Acta Physiol.**, v. 202, n. 3, p. 253-269, Jul. 2011.

ALBRECHT, E. W. et al. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. **J. Pathol.**, v. 199, n. 1, p. 8-17, Jan. 2003.

ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc. Res.**, v. 43, n. 3, p.521-531, Aug. 1999.

ASTERN, J. M. et al. Myeloperoxidase interacts with endothelial cell surface cytoke-
ratin 1 and modulates bradykinin production by the plasma kallikrein-kinin system. **Am. J. Pathol.**, v. 171, n. 1, p. 349-360, Jul. 2007.

AYAJIKI, K. et al. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. **Cir. Res.**, v. 78, n. 5, p. 750-758, May 1996.

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

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-1676, Mar. 1999.

BAGHER, P.; SEGAL, S. S. Regulation of blood flow in the microcirculation: role of conducted vasodilation. **Acta Physiol.**, v. 202, n. 3, p. 271-284, Jul. 2011.

BALLIGAND, J. L. et al. Nitric oxide dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 24, p. 14582-14586, Jun. 1995.

BAUERSACHS, J. et al. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. **Cardiovasc. Res.**, v. 37, n. 3, p. 772–779, Mar. 1998.

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

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

BENDALL, J. K. et al. Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. **Circulation**, v. 105, n. 3, p. 293-296, Jan. 2002.

BESWICK, R. A. et al. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. **Hypertension**, v. 38, n. 5, p. 1107-1111, Nov. 2001.

BLATTER, L. A.; WIER, W. G. Nitric oxide decreases $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. **Cell Calcium**, v. 15, n. 2, p. 122–131, Feb. 1994.

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

BREDDT, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radic. Res.**, v. 31, n. 6, p. 577-596, Dec. 1999.

BRODY, M. J. Central nervous system mechanisms of arterial pressure regulation. **Fed. Proc.**, v. 45, n. 12, p. 2700-2706, Nov. 1986.

BRODY, M. J.; O'NEILL, T. P.; PORTER, J. P. Role of central catecholaminergic systems in pathogenesis and treatment of hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 6, sup. 5, p. 5727-5741, 1984.

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

CAI, H.; GRIENDLING, K. K.; HARRISON, D. G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, n. 9, p. 471-478, Sep. 2003.

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

CAVE, A. C. et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 8, n. 5-6, p. 691-728, May/Jun. 2006.

CHABRASHVILI, T. et al. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. **Hypertension**, v. 39, n. 2, p. 269-274, Feb. 2002.

CHAN, E. C. et al. Adventitial application of the NADPH oxidase inhibitor apocynin in vivo reduces neointima formation and endothelial dysfunction in rabbits. **Cardiovasc. Res.**, v. 75, n. 4, p. 710-718, Sep. 2007.

CHANG, H. R. et al. Reduction of ventricular hypertrophy and fibrosis in spontaneously hypertensive rats by l-arginine. **Chin. J. of Physiol.**, v. 48, n. 1, p. 15-22, Mar. 2005.

CHOU, T. C. et al. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. **Hypertension**, v. 31, n. 2, p. 643-648, Feb. 1998.

CIARCIA, R. et al. Apocynin activity in spontaneously hypertensive rats (SHR): preliminary studies in vivo. **Vet. Res. Commun.**, v. 34, sup. 1, p. 583-586, Jun. 2010.

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

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

CORSON, M. A. et al. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. **Cir. Res.**, v. 79, n. 5, p. 984-991, Nov. 1996.

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

CRIMI, E.; IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C. Microcirculation and oxidative stress. **Free Radic. Res.**, v. 41, n. 12, p. 1364-1375, Dec. 2007.

DICKHOUT, J. G.; LEE, R. M. K. W. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v. 274, n. 3, p. H794-800, Mar. 1998.

DIKALOVA, A. et al. Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. **Circulation**, v. 112, n. 17, p. 2668 -2676, Oct. 2005.

DOBARRO, D. et al. Current pharmacological approach to restore endothelial dysfunction. **Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.**, v. 7, n. 3, p. 212-222, Jul. 2009.

DOROSHENKO, A. S.; SOLODKOV, A. P.; SHEBEKO, V. I. The role of superoxide anions in regulation of coronary vessel tone and myocardial contractile function in changed redox-state of the myocardium. **Russ. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova**, v. 91, n. 12, p. 1428-1440, Dec. 2005.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, n. 1, p. 47–95, Jan. 2002.

DUDZINSKI, D. M.; MICHEL, T. Life history of eNOS: partners and pathways. **Cardiovasc. Res.**, v. 75, n. 2, p. 247-260, Jul. 2007.

DUSTING, G. J.; SELEMIDIS, S.; JIANG, F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, sup. 1, p. 97-103, Mar. 2005.

EL-BENNA, J. et al. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 53, n. 3, p. 199-206, May/Jun. 2005.

ELLIS, A.; TRIGGLE, C. R. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 81, n. 11, p. 1013-1028, Nov. 2003.

ENGELMANN, G. L.; VITULLO, J. C.; GERRITY, R. G. Morphometric analysis of cardiac hypertrophy during development, maturation, and senescence in spontaneously hypertensive rats. **Circ. Res.**, v. 60, n. 4, p. 487-494, Apr. 1987.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovasc. Res.**, v. 43, n. 3, p. 532-541, Aug. 1999.

FLEMING, I. et al. Ca^{2+} independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. **Circ. Res.**, v. 82, n. 6, p. 686-695, Apr. 1998.

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

FORTUÑO, A. et al. Oxidative stress and vascular remodelling. **Exp. Physiol.**, v. 90, n. 4, p. 457-462, Jul. 2005.

FRIMM, C. C. Disfunção sistólica e diastólica na hipertensão arterial sistêmica com hipertrofia ventricular esquerda. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 5, n. 3, p. 189-194, Jul./Set. 1998.

FURCHGOTT, R. F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrate: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory' factor from bovine retractor penis is inorganic nitrate and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: VANHOUTE, P. M. Mechanism of vasodilatation. New York: Raven Press, 1988. p. 401-414.

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

GARDIN, J. M.; LAUER, M. S. Left ventricular hypertrophy: the next treatable, silent killer ? **JAMA**, n. 292, v. 19, p. 2396-2398, Nov. 2004.

GEISZT, M. NADPH oxidases: new kids on the block. **Cardiovasc. Res.**, v. 71, n. 2, p. 289-299, Jul. 2006.

GERDES, A. M.; CAPASSO, J. M. Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 27, n. 3, p. 849–856, Mar. 1995.

GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovasc. Res.**, v. 55, n. 2, p. 250-260, Aug. 2002.

GRAY, S. D. Pressure profiles in neonatal spontaneously hypertensive rats. **Biol. Neonate**, v. 45, n. 1, p. 25-32, 1984.

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

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochem. J.**, v. 386, Pt. 3, p. 401-416, Mar. 2005.

GUPTA, G. K. et al. Vitamin D deficiency induces cardiac hypertrophy and inflammation in epicardial adipose tissue in hypercholesterolemic swine. **Exp. Mol. Path.**, v. 93, n. 1, p. 82-90, Aug. 2012.

GUTIERREZ, J. et al. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. **Circ. Res.**, v. 99, n. 9, p. 924-932, Oct. 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. 11 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1116 p, 2006.

HAMILTON, C. A. et al. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. **Hypertension**, v. 40, n. 5, p. 755-762, Nov. 2002.

HAMILTON, C. A. et al. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. **Hypertension**, v. 37, n. 2, Pt 2, p. 529–534, Feb. 2001.

HAN W. Q. et al. Contributory role of endothelium and voltage-gated potassium channels in apocynin-induced vasorelaxation. **J. Hypertens.**, v. 28, n. 10, p. 2102-2110, Oct. 2010.

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

HE, T. et al. In vivo and in vitro protective effects of pentamethylquercetin on cardiac hypertrophy. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, v. 26, n. 2, p. 109-120, Apr. 2012.

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

HOLLAND, J. A; JOHNSON, D. K. **Prevention of atherosclerosis using NADPH oxidase inhibitors.** US Patent 5.902.831, 1999.

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

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, Dec. 1987.

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

KANNEL, W. B. Prevalence and natural history of eletrocardiographic left ventricular hypertrophy. **Am. J. Med.**, v. 75, n. 3 A, p. 4-11, Sep. 1983.

KANNEL, W. B. et al. Role of blood pressure in the development of congestive heart failure: the Framingham Study. **N. Engl. J. Med.**, v. 287, n. 16, p. 781-787, Oct. 1972.

KHAZAEI, M.; MOEIN-AFSHARI, F.; LAHER, I. Vascular endothelial function in health and diseases. **Pathophysiology**, v. 15, n. 1, p.49-67, Jun. 2008.

KUO, J. F.; DAVIS, C.W.; TSE, J. Depressed cardiac cyclic GMP dependent protein kinase in spontaneously hypertensive rats and its further depression by guanethidine. **Nature**, v. 261, n. 5558, p. 335-336, May. 1976.

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 3, p. 181-189, Mar. 2004.

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

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

LAURSEN, J. B. et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoEdeficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. **Circulation**, v. 103, n. 9, p. 1282-1288, Mar. 2001.

LEVY, D. et al. Echocardiography criteria for left ventricular hypertrophy: the Framingham heart study. **Am. J. Cardiol.**, v. 59, n. 9, p. 956-960, Apr. 1987.

LI, J. M.; SHAH, A. M. Intracellular localization and preassembly of the NAD(P)H oxidase complex in cultured endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 22, p. 19952-19960, May 2002.

LI, J. M. et al. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. **Hypertension**, v. 40, n. 4, p. 477-484, Oct. 2002.

LIJNEN, P. et al. Angiotensin II-stimulated collagen production in cardiac fibroblasts is mediated by reactive oxygen species. **J. Hypertens.**, v. 24, n. 4, p. 757-766, Apr. 2006.

LOCKETTE, W.; OTSUKA, Y.; CARRETERO, O. The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. **Hypertension**, v. 8, n. 6 Pt 2, p. 61-66, Jun. 1986.

LORELL, B. H.; CARABELLO, B. A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. **Circulation**, v. 102, n. 4, p. 470-479, Jul. 2000.

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

LU, J. et al. Erythropoietin attenuates cardiac dysfunction by increasing myocardial angiogenesis and inhibiting interstitial fibrosis in diabetic rats. **Cardiovasc. Diabetol.**, v. 11, p. 105, Sep. 2012.

LUCHTEFELD, R. et al. Dose formulation and analysis of diapocynin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, n. 2, p. 301-306, Jan. 2008.

LÜSCHER, T. F. The endothelium as a target and mediator of cardiovascular disease. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 23, n. 11, p. 670–685, Nov. 1993.

LÜSCHER, T. F. Heterogeneity of endothelial dysfunction in hypertension. **Eur. Heart J.**, v. 13, Suppl. D, p. 50-55, Sep. 1992.

LÜSCHER, T. F.; NOLL, G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. **Atherosclerosis**, v. 118, Suppl, p. 581-590, Dec. 1995.

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

MANN, D. L.; SPANN, J.F.; COOPER, I. V. G. Basic mechanisms and models in cardiac hypertrophy: Part 1. Pathophysiological models. **Mod. Concepts Cardiovasc. Dis.**, v. 57, p. 7-11, 1988.

MARÍN, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, M.A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacol. Ther.**, v. 75, n. 2, p. 111-134, Aug. 1997.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 17, p. 12231-12234, Jun. 1993.

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

MATSUOKA, H. et al. Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 27, n. 1, p. 14-18, Jan. 1996.

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

MICHEL, T.; VANHOUTTE, P. M. Cellular signaling and NO production. **Pflugers Arch.**, v. 459, n. 6, p. 807-816, May. 2010.

MIYAGAWA, K. et al. Increased oxidative stress impairs endothelial modulation of contractions in arteries from spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 25, n. 2, p. 415-421, Feb. 2007.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, Dec. 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, v. 12, n. 4, p. 365-372, Oct. 1988.

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

MORI, K. Participation of the sympathetic nervous system in spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Circ. J.**, v. 37, n. 6, p. 609-618, Jun. 1973.

MULLINS, L. J.; BAILEY, M.A.; MULLINS, J.J. Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective. **Physiol. Rev.**, v. 86, n. 2, p. 709-746, Apr. 2006.

MUNHOZ, F. C. et al. Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO donor [Ru(terpy)(bdq)NO(+)](3+) in spontaneously hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 2, p. 111-117, Feb. 2012.

MURAD, F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 11, p. 1317-1327, Nov. 1999.

NADRUZ JUNIOR, W. et al. c-Jun is regulated by combination of enhanced expression and phosphorylation in acute-overloaded rat heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 286, n. 2, p. H760-767, Feb. 2004.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide-releasing drugs. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 43, p. 97-123, Jan. 2003.

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

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

OZAKI, M. et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiac hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion. **Circ. J.**, v. 66, n. 9, p. 851-856, Sep. 2002.

PAGANO, P. et al. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. **Am. J. Physiol.**, v. 268, n. 6, Pt 2, p. H2274-2280, Jun. 1995.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, n. 327, v. 6122, p. 524-526, Jun. 1987.

PARAVICINI, T. M. et al. Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. **Stroke**, v. 35, n. 2, p. 584-589, Feb. 2004.

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

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

PERNOMIAN, L. **Efeitos vasculares induzidos pelo peptídeo natriurético tipo C (CNP) em aortas de ratos normotensos e hipertensos renais.** 2011. 149 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, 2011.

PFEFFER, M. A.; PFEFFER, J. M.; FROHLICH, E. D. Pumping ability of the hypertrophying left ventricle of the spontaneously hypertensive rat. **Circ. Res.**, v. 38, n. 5, p. 423-429, May 1976.

PFEFFER, R. I. et al. Measurement of functional activities in older adults in the community. **J. Gerontol.**, v. 37, n. 3, p. 323-329, May. 1982.

PFEFFER, M. A. et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. **Circ. Res.**, v. 44, n. 4, p. 503-512, Apr. 1979.

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

POTJE, S. R. **Participação do endotélio e das espécies reativas de oxigênio no efeito hipotensor e na resposta vasodilatadora do novo doador de Óxido Nítrico [Ru(terpy)(bdq)NO+]₃₊ (TERPY) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).** 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Faculdade de

Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araçatuba, 2012.

QUINN, M. T.; AMMONS, M. C.; DELEO, F. R. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. **Clin. Sci.**, v. 111, n. 1, p. 1-20, Jul. 2006.

RABELINK, T. J.; LÜSCHER, T. F. Endothelial nitric oxide synthase: host defense enzyme of the endothelium? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 26, n. 2, p. 267-271, Nov. 2006.

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

REES, D. D.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 86, n. 9, p. 3375-3378, May 1989.

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, n. 2, p.129-137, Aug.1992.

RIZZETTI, D. A. et al. Apocynin prevents vascular effects caused by chronic exposure to low concentrations of mercury. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55806, Feb. 2013.

SAHA, S. et al. Superoxide anion and NADPH oxidase activity determination in vascular smooth muscle cells and tissues from rats. In: DAP, D. K. (Ed.) **Handbook of the methods for studying redox signaling**. New York: Mary Ann Liebert, 2009. p. 234-236.

SALVEMINI, D. et al. Peroxynitrite decomposition catalysts: therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 95, n.5, p. 2659-2663, Mar. 1998.

SCHILLACI, G. et al. Clinical relevance of office underestimation of usual blood pressure in treated hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v. 13, n. 5, Pt 1, p. 523-528, May 2000.

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

SEGAL, S. S. Regulation of blood flow in the microcirculation. **Microcirculation**, v. 12, n. 1, p. 33-45, Jan./Feb. 2005.

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

SENEJOUX, F. et al. New insights into the mechanisms of the vasorelaxant effects of Apocynin in rat thoracic aorta. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 27, n. 3, p. 262-270, Jun. 2013.

SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A. Endothelium-dependent regulation of the cardiovascular system. **Intern. Med.**, v. 34, n. 10, p. 939-946, Oct. 1995.

SHIRANI, J. et al. Morphology and significance of the left ventricular collagen network in young patients with hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 35, n. 1, p. 36-44, Jan. 2000.

SILVERTHORN, D. U. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

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

SITIA, S. et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. **Autoimmun. Rev.**, v. 9, n. 12, p. 830-834, Oct. 2010.

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

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

SURMA, M.; WEI, L.; SHI, J. Rho kinase as a therapeutic target in cardiovascular disease. **Future Cardiol.**, v. 7, n. 5, p. 657-671, Sep. 2011.

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

TAIN, Y. L. et al. Apocynin attenuates oxidative stress and hypertension in young spontaneously hypertensive rats independent of ADMA/NO pathway. **Free Radic. Res.**, v. 46, n. 1, p. 68-76, Jan. 2012.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075-1081, Dec. 2003.

TATIC, V. et al. Histochemical and immunohistochemical analysis of the myocardial scar following acute myocardial infarction. **Vojnosanit. Pregl.**, v. 69, n. 7, p. 581-588, Jul. 2012.

TAWFIK, H. E. et al. Role of oxidative stress in multiparity-induced endothelial dysfunction. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 295, n. 4, p. H1736–H1742, Oct. 2008.

TENNYSON, A. G.; LIPPARD, S. J. Generation, Translocation, and Action of Nitric Oxide in Living Systems. **Chem. Biol.**, v. 18, n. 10, p. 1211-1220, Oct. 2011.

TOUYZ, R. M. Apocynin, NADPH oxidase and vascular cells: a complex matter. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 172-174, Feb. 2008.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? **Hypertension**, v. 44, N. 3, p. 248-252, Jul. 2004.

TOUYZ R. M.; SCHIFFRIN E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 122, n. 4, p. 339-352, Oct. 2004.

TSAI, M-H.; JIANG, M. J. Reactive oxygen species are involved in regulating α 1-adrenoceptor-activated vascular smooth muscle contraction. **J. Biomed. Sci.**, v.17, p. 67, Aug. 2010.

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

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

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

VASQUEZ-VIVAR, J. et al. Altered tetrahydrobiopterin metabolism in atherosclerosis: implications for use of oxidized tetrahydrobiopterin analogues and thiol antioxidants. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, n. 10, p. 1655-1661, Oct. 2002.

VEJRAZKA, M.; MÍCEK, R.; STÍPEK, S. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1722, n. 2, p. 143-147, Mar. 2005.

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

WAKATSUKI, T.; SCHLESSINGER, J.; ELSOM, E. L. The biochemical response of heart to hypertension and exercise. **Trends. Biochem. Sci.**, v. 29, n. 11, p. 609-617, Nov. 2004.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 27, n.1-4, p. 201-206, Dec. 2003.

WEBER, K. T.; BRILLA, C. G.; JANICKI, J. S. Myocardial remodeling and pathological hypertrophy. **Hosp. Pract.**, v. 26, n. 4, p. 73-80, Apr. 1991.

WEBER, K. T. et al. Fibrillar collagen and remodeling of dilated left ventricle. **Circulation**, v. 82, n. 4, p. 1387-1401, Oct. 1990.

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

WIND, S. et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. **Hypertension**, v. 56, n. 3, p. 490-497, Jul. 2010.

WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, n. 6, p. 1430-1442, Jun. 2000.

WOLLERT, K. C.; DREXLER, H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. **Heart Fail Rev.**, v. 7, n. 4, p. 317-325, Oct. 2002.

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

YAMAMOTO, E. et al. Enhancement of cardiac oxidative stress by tachycardia and its critical role in cardiac hypertrophy and fibrosis. **J. Hypertens.**, v. 24, n.10, p. 2057-2069, Oct. 2006.

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

ZALBA, G. et al. Vascular NADH/NAD(P)H oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 35, n. 5, p. 1055-1061, May. 2000.

ZHANG, P. et al. NADPH oxidase contributes to coronary endothelial dysfunction in the failing heart. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 296, n. 3, p. 840-846, Mar. 2009.

ZHANG, C. et al. Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. **Hypertension**, v. 44, n. 6, p. 935-943, Dec. 2004.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P.; LEUNG, W. S. Endothelial nitric oxide synthase-independent release of nitric oxide in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 344, n. 1, p. 15-22, Jan. 2013.

ANEXOS

ANEXOS

Aprovação do Comitê de Ética Local (CEEA-FOA/UNESP).



Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Análise in vivo e in vitro do efeito da apocinina sobre a disfunção endotelial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR)" sob responsabilidade da Pesquisadora CRISTINA ANTONIALI SILVA e colaboração de Ligia Arnedo Perassa está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 01561-2011.

CERTIFICATE

We certify that the research "Analysis in vivo and in vitro effect of apocynin on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats (SHR)", process number 01561-2011, under responsibility of CRISTINA ANTONIALI SILVA and with collaboration of Ligia Arnedo Perassa agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Fabiano A. Gadioli
Coordenador CEUA
CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária – Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal – Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636-1440 Fax (18) 3636-1403 E-mail: fabianocadioli@fmva.unesp.br