

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

**JÉSSICA LUIZA DE OLIVEIRA FONSECA ZANARDO**

**A via Nrf2 participa da maior modulação endotelial  
induzida pela prenhez sobre reatividade de aortas à  
fenilefrina.**

**Araçatuba  
2020**

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

**A via Nrf2 participa da maior modulação endotelial  
induzida pela prenhez sobre reatividade de aortas à  
fenilefrina.**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Associada Dra. Cristina Antoniali Silva

**Araçatuba**  
**2020**

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

Z27v      Zanardo, Jéssica Luiza de Oliveira Fonseca.  
A via Nrf2 participa da maior modulação endotelial induzida pela prenhez sobre reatividade de aortas à fenilefrina / Jéssica Luiza de Oliveira Fonseca Zanardo. - Araçatuba, 2020  
86 f. : il. ; tab.

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

1. Prenhez 2. Aorta 3. Fator 2 relacionado a NF-E2  
4. Ratos endogâmicos SHR 5. Hipertensão I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

**DADOS CURRICULARES**  
**JÉSSICA LUIZA DE OLIVEIRA FONSECA ZANARDO**

**Nascimento:** 11.03.1993, Brasília-DF.

**Filiação:** Odília de Oliveira Fonseca  
João de Deus Fonseca.

**2011/2014:** Curso de Graduação em Biomedicina – Universidade Paulista/UNIP, Araçatuba, SP.

**2015-2016:** Curso de especialização em Diagnóstico por Imagem – Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE, Presidente Prudente, SP.

**2017-2018:** Curso de especialização em Hematologia e Banco de Sangue – Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP.

**2018-2020:** 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 esse trabalho aos meus pais Odília e João, pois são meus exemplos na vida, exemplo de caráter, de bondade e de ser humano. Obrigada por me apoiarem nessa jornada!

Também dedico ao meu esposo Ewerton, que com seu amor, carinho e atenção me incentivou a continuar nessa trajetória, para que o sucesso pudesse ser alcançado, essa vitória também é sua! Aos meus irmãos, por serem os melhores irmãos que alguém poderia ter.

Obrigada família, amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por estar sempre me dando forças e coragem para continuar nessa caminhada, sendo Ele minha base de tudo. E a Nossa Senhora por ser minha intercessora em todos os momentos.

Aos meus pais Odília e João, que me apoiaram desde o início, e me encorajaram para que eu realizasse meus sonhos e que me proporcionaram ter o conhecimento acadêmico que tenho hoje.

Ao meu marido Ewerton, que sempre esteve ao meu lado, que com seu amor e carinho me incentivou durante todos os momentos difíceis e teve muita paciência para lidar comigo nos dias mais irritantes. A presença dele foi fundamental para que eu conseguisse prosseguir nessa trajetória.

A minha orientadora professora Dra. Cristina Antoniali Silva, que confiou em meu trabalho e me acolheu com muito carinho em seu laboratório. Sou muito grata pela orientação, pelo carinho e compreensão dedicadas a mim durante esses anos. Cada conselho foi importante para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de farmacologia da professora Cristina: Heitor Araújo, Priscila Scarpim, Andrea Oliveira, Jéssica Troiano, Murilo Graton, Ana Carolina Lisboa, Simone Potje.

Meu agradecimento especial a Priscila e Heitor por estarem ao meu lado na grande maioria dos experimentos, por me animarem, me apoiarem, me consolarem e por serem meus amigos do coração, que quero levar para a vida! Nossa união e companheirismo foram essenciais para que este trabalho fosse finalizado e para que os dias se tornassem mais doces.

A Jéssica Troiano, por me ensinar as técnicas e rotina do laboratório, além de sempre estar disponível para me ajudar nas análises dos dados e correções da dissertação. A Simone, que mesmo longe fisicamente, sempre esteve disposta a me ajudar, sanando dúvidas e explicando protocolos.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP, Dra. Sandra Oliveira, Dra. Ana Cláudia Nakamune, Dra. Rita Dornelles, Dr. Antônio Hernandes, Dra. Dóris Sumida, Dr. Wilson Galego e Dr. João Callera pela colaboração e aprendizado.

Aos professores Dr. Antônio Hernandez, Dra. Sandra Oliveira, Dra. Ana Cláudia Nakamune, Dr. Cláudio Cassatti e seu aluno de doutorado Gestter Tessarin por permitirem o uso de equipamentos em seus laboratórios.

Aos funcionários da FOA-UNESP, Márcia Castellani, Eliseide Navega, Patrick da Silva, Maurício Tutumi, Arnaldo Santos e João Correa. Um agradecimento especial a Márcia por todo carinho, atenção, preocupação e cuidado que teve comigo nesta jornada.

As funcionárias da seção de pós-graduação, Cristiane Lui e Valéria Zagatto por todo suporte durante estes anos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão do auxílio financeiro à pesquisa (Processo nº. 2016/22180-9).  
A UNESP (Universidade Estadual Paulista) pela oportunidade de poder realizar e concluir o Mestrado.

Aos amigos do laboratório de farmacologia da profa. Sandra, Victor Balera, Beatriz Balassoni, Bianca Ribeiro, Milena Nunes, José Jordão, Mariana Sousa, Carolina Linjardi e Sabrina Tfaile, agradeço pela torcida e pela convivência maravilhosa que tivemos, deixando os dias de trabalho muito mais agradáveis e divertidos!

Aos amigos do departamento de Ciências Básicas: Damaris, Bruna, Debora, Maria Sara, Thais, Ângela, Fernanda, Mateus, Luís Fernando, Bianca, Rodrigo, Rafael, pelos ensinamentos e pelos momentos diários de diversão e descontração que tivemos juntos.

Um agradecimento especial a Bruna e Damaris, por serem mais que amigas, por se tornarem minhas irmãs, que estão comigo nos momentos bons e ruins.

Meu agradecimento especial aos professores das bancas avaliadoras que contribuíram de forma brilhante para meu trabalho,

Agradeço as demais pessoas que se fizeram importante e que contribuíram de alguma para que essa etapa pudesse ser concluída.

**“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria”**

Provérbios 9:10

ZANARDO, J. L. O. F. **A via Nrf2 participa da maior modulação endotelial induzida pela prenhez sobre reatividade de aortas à fenilefrina.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

## RESUMO

Alterações em diferentes vias de sinalização levam a disfunção vascular e endotelial e conseqüentemente a hipertensão. A hipertensão está relacionada diretamente com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) nos vasos sanguíneos. A via do Nrf2 (fator nuclear eritróide 2) está envolvida nos mecanismos que levam ao aumento da biodisponibilidade vascular de NO, pois controla a expressão de enzimas antioxidantes. A ativação do Nrf2 é modulada por sua ligação com a Keap-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) e sua atividade é modulada pelo fator de transcrição Bach-1, que compete pelo mesmo sítio ativo no DNA com o Nrf2. Em ratas normotensas e em ratas espontaneamente hipertensas (SHR) é observada uma redução da pressão arterial ao final da prenhez, que tem sido associada à redução do estresse oxidativo e maior biodisponibilidade de NO. Com o aumento da biodisponibilidade de NO, é aumentada a modulação do endotélio sobre a reatividade vascular à agonistas vasoconstritores, como à fenilefrina (PE). Levantamos a hipótese que a prenhez altera a expressão e ou a atividade do Nrf2 e de seus inibidores Keap-1 e Bach-1 e que estas possíveis alterações estariam associadas à maior modulação endotelial sobre contração de aortas à PE. Para testarmos esta hipótese, a expressão de Nrf2, Keap-1 e Bach-1 e também das enzimas antioxidantes transcritas pelo Nrf2, como a NADP(H) quinona oxirredutase-1 (NQO1), SOD-1 e SOD-2 foram avaliadas em aortas de ratas prenhes e comparadas as aortas de ratas não-prenhes. A fim de identificarmos outros possíveis mecanismos alterados pela prenhez em ratas Wistar e SHR, avaliamos a expressão de NOXO-1, subunidade regulatória da NOX1 e de p47phox, subunidade regulatória de NOX2. A participação do Nrf2 na produção de NO endotelial em aortas de ratas prenhes, foi avaliada pela utilização de Brusatol, uma droga inibidora do Nrf2. Avaliamos também a participação do Nrf2 na reatividade de aortas de ratas prenhes à fenilefrina e à

acetilcolina, utilizando o Brusatol. Todos os resultados foram comparados entre ratas não-prenhes normotensas (Wistar) e hipertensas (SHR) e entre ratas não-prenhes e prenhes nos grupos (análise de multivariância, post-test Tukey,  $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram que a expressão de Nrf2 está aumentada em aortas de ratas prenhes Wistar, apesar da expressão de Keap-1 e de Bach-1 não estar alterada. Associado a expressão aumentada de Nrf2 observamos maior expressão de SOD-2, mas não de SOD-1 ou NQO1, em aortas de ratas prenhes. Em aortas de ratas SHR não prenhes, observamos entre todas as proteínas avaliadas, menor expressão de Bach-1 e de NQO1 quando comparadas às aortas de ratas normotensas. A prenhez reduziu ainda mais a expressão apenas de NQO1 em aortas de SHR. A prenhez reduziu a expressão de NOXO-1 e de p47phox em aortas de SHR, enquanto que em aortas de ratas Wistar reduziu apenas a expressão de NOXO-1. Os resultados obtidos neste estudo mostraram também que a incubação de HUVEC com Brusatol aumentou as concentrações intracelulares de ERO, mas não alterou as concentrações de NO, no entanto, reduziu significativamente a concentração de NOx estimulada pela ACh em aortas de ratas prenhes, Wistar ou SHR. Além disto, o Brusatol aumentou a reatividade à PE em aortas de ratas normotensas não prenhes e prenhes, igualando a reatividade de aortas de ratas prenhes as aortas de ratas não prenhes. No entanto, o Brusatol não alterou a reatividade de aortas de SHR, prenhes ou não-prenhes. Nenhum efeito significativo do Brusatol foi observado na reatividade à Acetilcolina em aortas de ratas Wistar ou SHR, prenhes ou não prenhes. Em conclusão, nossos resultados sugerem que a atividade da via de sinalização do Nrf2 está aumentada, favorecendo a maior atividade de enzimas antioxidantes como a SOD-2, que contribuiria para maior biodisponibilidade de NO e maior modulação endotélio-dependente da contração vascular à PE em aortas de ratas normotensas prenhes. No entanto, em aortas de SHR prenhes, este mecanismo parecer não ser mais importante que a redução da atividade de isoformas NOX e de suas subunidades regulatórias que contribuiria para menor geração de  $O_2^{\cdot-}$  e conseqüentemente, maior biodisponibilidade de NO.

**Paravras-chave:** Prenhez; Aorta; Fator 2 relacionado a NF-E2; SHR; Hipertensão.

ZANARDO, J. L. O. F. **The Nrf2 pathway participates in the greater endothelial modulation induced by pregnancy on reactivity of aortas to phenylephrine.** Masters dissertation- São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba, 2020.

## ABSTRACT

Modifications in different signaling pathways lead to vascular and endothelial dysfunction and, consequently, hypertension. Hypertension is directly related to an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) and a decrease in the bioavailability of nitric oxide (NO) in blood vessels. The Nrf2 (erythroid nuclear factor 2) pathway is involved in the mechanisms that lead to the increased vascular bioavailability of NO, as it controls the expression of antioxidant enzymes. The activation of Nrf2 is modulated by Keap-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) and its activity is modulated by the transcription factor Bach-1, which competes for the same active site in DNA with Nrf2. In normotensive rats and spontaneously hypertensive rats (SHR), a reduction in blood pressure at the end of pregnancy is observed, which has been associated with a reduction in oxidative stress and greater bioavailability of NO. This increased NO bioavailability has been associated with the higher endothelium modulation over blood vessel reactivity to vasoconstrictor agonists, such as phenylephrine (PE), observed in pregnant rats. We hypothesized that pregnancy alters the expression and/or activity of Nrf2 and its inhibitors Keap-1 and Bach-1 and that these changes are associated with greater endothelial modulation on the contraction of aortas to PE. To test this hypothesis, the expression of Nrf2, Keap-1 and Bach-1 and the antioxidant enzymes transcribed by Nrf2, such as NADP (H) quinone oxidoreductase-1 (NQO1), SOD-1 and SOD-2 were evaluated in aortas of pregnant rats and compared to aortas of non-pregnant rats. In order to identify other possible mechanisms altered by pregnancy in Wistar rats and SHR, we evaluated the expression of NOXO-1, NOX1 regulatory subunit and p47phox, NOX2 regulatory subunit. The role of Nrf2 in the production of endothelial NO in aortas of pregnant rats was evaluated by use of Brusatol, an inhibitor of Nrf2. We also evaluated the role of Nrf2 in the reactivity of aortas of pregnant rats to phenylephrine and

acetylcholine, using Brusatol. All results were compared between normotensive (Wistar) and hypertensive (SHR) non-pregnant rats and between pregnant and non-pregnant rats in the groups (multivariate analysis, Tukey post-test,  $p < 0.05$ ). The results showed that the expression of Nrf2 is increased in aortas of pregnant Wistar rats, although the expression of Keap-1 and Bach-1 is not altered. The increased expression of Nrf2 was associated with the greater expression of SOD-2, but not of SOD-1 or NQO1, in aortas of pregnant rats. In aortas of non-pregnant SHR rats, we observed among all evaluated proteins, lower expression of Bach-1 and NQO1 when compared to the aortas of normotensive rats. Pregnancy reduced even more the expression of NQO1 in SHR aortas. Pregnancy reduced the expression of NOXO-1 and p47phox in SHR aortas, whereas in aorta of Wistar rats it reduced only the expression of NOXO-1. The results obtained in this study also showed that the incubation of HUVEC with Brusatol increased the intracellular concentrations of ROS, but did not alter the concentrations of NO, however, Brusatol significantly reduced the concentration of NO<sub>x</sub> stimulated by ACh in aortas of pregnant rats, Wistar or SHR. Moreover, Brusatol increased the reactivity to PE in aortas of pregnant normotensive rats and pregnant, matching the reactivity of aortas of pregnant rats to aortas of non-pregnant rats. However, Brusatol did not alter the reactivity of pregnant or non-pregnant SHR aortas. No significant effect of Brusatol was observed in the reactivity to Acetylcholine in aortas of Wistar rats or SHR, pregnant or non-pregnant rats. In conclusion, our results suggest that the activity of the Nrf2 signaling pathway is increased, favoring the greater activity of antioxidant enzymes such as SOD-2, which would contribute to greater bioavailability of NO and greater endothelium-dependent modulation of vascular contraction to PE in aortas of pregnant normotensive rats. However, in pregnant SHR aortas, this mechanism appears to be no more important than the lower the activity of NOX isoforms and their regulatory subunits that would contribute to lower O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation and, consequently, greater NO bioavailability.

**Keywords:** Pregnancy; Aorta; NF-E2 Related Factor 2; SHR; Hypertension

## ABREVIATURAS

% – Porcentagem

°C – Graus Celsius

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µmol/L – Micromol por litro

ACh – Acetilcolina

Akt – Proteína quinase B

Ang II – Angiotensina II

ARE – Elemento de resposta antioxidante (do termo em ingles, *antioxidant response elemento*)

BSA – Albumina de soro bovino (do inglês, bovine serum albumin)

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

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio

cm – Centímetro

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

DAF-2DA – Sonda de fluorescência diacetato diaminodifluorofluoresceína

DHE – Sonda de fluorescência dihidroetidina.

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DNPH – 2,4-dinitrofenil-hidrazina

E+ – Presença de endotélio

EC<sub>50</sub> – Concentração efetiva 50 % (do inglês, *Efetive Concentration 50%*)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

E<sub>max</sub> – Efeito máximo

eNOS – Oxido nítrico sintase endotelial

EPM – Erro padrão da média

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FBS – Soro bovino fetal (do inglês *Fetal Bovine Serum*)

g – Grama

GPx – Glutathiona peroxidase

GST-1 – Glutathione S-transferase-1

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – Ácido fosfórico

HO-1 – Heme-oxigenase-1

HUVEC – Células endoteliais de veia umbilical humana (do inglês, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)

KCl – Cloreto de potássio

Keap-1 – Kelch-like ECH-associated protein

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de potássio monohidratado

mg- Miligrama

mg/kg – Miligrama por quilograma

MgSO<sub>4</sub> – Sulfato de magnésio

mmol/L – Milimol por litro

mN – miliNewton

mol/L – Mol por litro

mRNA – RNA mensageiro

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – Fosfato dissódico

NaCl – Cloreto de sódio

NaHCO<sub>3</sub> – Bicarbonato de sódio

NaNO<sub>2</sub> – Nitrito de sódio

nm – Nanômetro

nmol/mg – Nanomol por miligrama

NO – Óxido nítrico

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – Nitrito

NOX – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase não fagocítica

NP – Não prenhes

NQO1 – Quinona oxidoredutase-1 NAD(P)H

Nrf2 – Fator de transcrição nuclear eritróide 2 NF-E2

O<sub>2</sub> – Oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>-•</sup> – Radical Ânion superóxido

P – Prenhes

pD2 – Logaritmo negativo da EC50

PE – Fenilefrina

pH – Potencial hidrogeniônico

PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase

PPAR- $\gamma$  - Receptor ativado proliferador de peroxisoma gama

RCF - *Relative centrifugal force*, Força centrífuga relativa

RIPA – Tampão para ensaio de imunoprecipitação

RUPP – Modelo de pressão de perfusão uterina reduzida (do inglês, *Reduced Uterine Perfusion Pressure*)

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos (do inglês, *Spontaneously Hypertensive Rats*)

SHR-SP – Ratos espontaneamente hipertensos propensos a acidente vascular cerebral (do inglês, *Spontaneously Hypertensive Rats - Stroke prone*)

SOD-1 – Superóxido dismutase de cobre/zinco

SOD-2 – Superóxido-dismutase de manganês

TBS-T – Tampão tris-salina acrescido de Tween 20

UA – Unidades arbitrárias

v/v – Volume/volume

vs – *Versus*

w/v – Peso por volume (do inglês, *weight by volume*)

WB – Western blotting

WKY – Ratos Wistar Kyoto

$\beta$  – Beta

$\delta$  – Delta

$\mu\text{g}/\text{mg}$  – Micrograma por miligrama

$\mu\text{g}/\text{mL}$  – Micrograma por mililitro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas NOXO-1/ $\beta$ -actina em homogenatos de aortas de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 8-9) dos diferentes grupos. \* $p < 0.05$  entre Wistar prenhe vs Wistar não-prenhe, \*\*\*\*  $p < 0.0001$  SHR prenhe vs SHR não prenhe, \*\*  $p < 0.01$  SHR prenhe vs Wistar prenhe, \*\*\*\*  $p < 0.0001$  SHR prenhe vs Wistar não prenhe. Aplicado teste Two-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

46

Figura 2: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas p47phox/ $\beta$ -actina em homogenatos de aortas, de ratas Wistar e SHR não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras cinza). As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos. \*\*  $p < 0.01$  entre SHR prenhes vs SHR não prenhes, SHR prenhes vs Wistar prenhes, e \*\*\*  $p < 0.001$  SHR prenhes vs Wistar não prenhes. Aplicado teste Two-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

47

Figura 3: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas Nrf2/ $\beta$ -actina em homogenatos de aortas, de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos. \*  $p < 0.05$  Wistar prenhes vs Wistar não prenhe, SHR prenhes vs Wistar prenhes. Aplicado teste Two-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

48

Figura 4: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas Keap-1/ $\beta$ -actina em homogenatos de aortas, de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos.

49

Figura 5: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas Bach-1/ $\beta$ -actina em homogenatos de aortas, de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5-6) dos diferentes grupos. \* $p < 0.05$  entre SHR prenhe e Wistar não prenhe e, SHR prenhe vs Wistar prenhe, \*\*  $p < 0.01$  entre SHR não prenhe e Wistar não prenhe. Aplicado teste Two-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

50

Figura 6: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas SOD-1/ $\beta$ -actina em homogenatos de aortas, de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos.

51

Figura 7: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas SOD-2/ $\beta$ -actina em homogenatos de aortas de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos. \* $p < 0.05$  entre os grupos Wistar não prenhe *versus* Wistar prenhe e Wistar prenhe *versus* SHR prenhe. Aplicado teste Two-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

52

Figura 8: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas NQO1/ $\beta$ -actina em homogenatos de aortas, de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes. As barras representam a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos. \*  $p < 0.05$  entre o grupo SHR não prenhe vs Wistar não prenhes, \*\*\*  $p < 0.001$  SHR prenhe vs SHR não prenhe, SHR prenhe vs Wistar prenhe, \*\*\*\*  $p < 0.0001$  SHR prenhe vs Wistar não prenhe. Aplicado teste Two-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

53

Figura 9: Intensidade de fluorescência emitida pelo DAF-2/DA (5  $\mu$ mol/L) que quantifica a concentração de óxido nítrico (NO) em HUVEC, em condições

basais ou não incubadas (Controle) e após 45 minutos de incubação com Brusatol 0,01  $\mu\text{mol/L}$ , 0,1  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$  e 10  $\mu\text{mol/L}$ . O gráfico mostra os valores obtidos nos experimentos realizados (pontos) e a média  $\pm$  EPM destes valores.

54

Figura 10: Intensidade de fluorescência emitida pelo DHE (2,5  $\mu\text{mol/L}$ ) em HUVEC, em condições basais, não incubadas (Controle) e após incubação por 45 minutos com Brusatol 0,01  $\mu\text{mol/L}$ , 0,1  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$  e 10  $\mu\text{mol/L}$ . O gráfico mostra os valores obtidos nos experimentos realizados (pontos) e a média  $\pm$  EPM destes valores.  $p^* < 0,05$  nas diferentes concentrações de Brusatol *versus* Controle. # Brusatol 10  $\mu\text{mol/L}$  *versus* Brusatol 0,01  $\mu\text{mol/L}$ . Aplicado teste One-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

55

Figura 11: Concentração de nitrito em anéis de aorta de Wistar, estimulados com ACh (1  $\mu\text{mol/L}$  por 5 minutos) na ausência e na presença de Brusatol (0,1  $\mu\text{mol/L}$  por 30 minutos), (n=3-4). As barras representam a média  $\pm$  SEM da diferença (delta) entre os valores obtidos. \*\*\*  $p < 0,001$  entre os grupos Wistar não prenhe ACh vs Wistar prenhe ACh e Wistar prenhe ACh vs Wistar prenhe Brusatol. Aplicado teste One-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey, a comparação entre prenhes e não prenhes no mesmo grupo foi realizada pelo teste t de *Student*.

56

Figura 12: Concentração de nitrito em anéis de aorta de SHR, estimulados com ACh (1  $\mu\text{mol/L}$  por 5 minutos) na ausência e na presença de Brusatol (0,1  $\mu\text{mol/L}$  por 30 minutos), (n=4-5). As barras representam a média  $\pm$  SEM da diferença (delta) entre os valores obtidos. \*\* $p = 0,0065$  entre aortas do grupo SHR prenhe ACh vs do grupo SHR prenhe incubado com Brusatol. Aplicado teste t de *Student*).

57

Figura 13: Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta com endotélio, controles (C) e incubados com Brusatol (0,1 $\mu$ mol/L) por 30 minutos. Os experimentos foram feitos com anéis de aortas de ratas Wistar não prenhes (WNP) e prenhes (WP). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n = 5-6). Os valores de Emax foram comparados entre aortas incubadas ou não com Brusatol nos grupos (Teste t de Student). \*p< 0,05 valores de Emax das curvas em anéis de ratas WNP B vs WNP C.  $\delta$  p<0,05 valores de Emax das curvas em anéis de ratas WP B vs WP C.

58

Figura 14: Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta sem endotélio, de Wistar não prenhes, não incubados (controle) ou incubados com Brusatol (0,1 $\mu$ mol/L) por 30 minutos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n = 6).

59

Figura 15: Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta com endotélio controles (C) e incubados com Brusatol (0,1 $\mu$ mol/L) por 30 minutos. Os experimentos foram feitos com anéis de aortas de ratas SHR não prenhes (SHR NP) e prenhes (SHR P). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n = 6-10). Os valores de Emax foram comparados entre aortas incubadas ou não com Brusatol nos grupos (Teste t de Student). \*p< 0,05 valores de Emax das curvas em anéis de ratas SHR NP C vs SHR P C.

60

Figura 16: Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta com endotélio não incubados (controle) e incubados com Brusatol (0,1 $\mu$ mol/L) por 30 minutos, Os experimentos foram feitos com anéis de aortas de ratas Wistar não prenhes (WNP) e prenhes (WP). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n = 4-6).

61

Figura 17: Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta com endotélio controles e incubados com e incubados com Brusatol (0,1 $\mu$ mol/L) por 30 minutos. Os experimentos foram feitos com anéis de aortas de ratas SHR não prenhes (SHR NP) e prenhes (SHR P). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n = 6-7).

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diluição dos anticorpos primários e secundários utilizados nos experimentos de Western Blotting.

Sumário	
1 Introdução .....	24
2 Hipótese.....	31
3 Objetivos .....	33
3. 1. Objetivo Geral .....	33
3.2. Objetivos Específicos.....	33
4 Metodologia .....	35
4.1 Animais .....	35
4.2 Western blotting (WB) .....	36
4.3 Análise do efeito do Brusatol sobre a produção de ânion superóxido e seu efeito sobre a medida de óxido nítrico em células endoteliais .....	38
4.4 Análise Bioquímica .....	39
4.4.1 Avaliação das concentrações de nitrito em amostras de aortas de ratas prenhes e não prenhes .....	39
4.5 Reatividade Vasculuar .....	40
4.6 Análise estatística .....	42
4.6.1 Western blotting .....	42
4.6.2 Análise dos experimentos fluorimétricos .....	43
4.6.3 Método de Griess.....	43
4.6.4 Reatividade Vasculuar .....	43
5 Resultados .....	46
5.1 Análise da expressão proteica da subunidade NOXO-1, p47phox e Nrf2 em anéis de aortas de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes .....	46
5.2 Análise da expressão proteica dos inibidores fisiológicos da Nrf2, Keap-1 e Bach-1 em anéis de aortas de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes .....	49
5.3 Análise da expressão proteica das isoformas das enzimas SOD, SOD-1 e SOD-2, e da NQO1 em anéis de aortas de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes.....	51
5.4 Análise do efeito do Brusatol em células endoteliais .....	54
5.5 Análise do efeito do Brusatol sobre a biodisponibilidade de NO em aortas de ratas prenhes e não prenhes, Wistar e SHR .....	56
5.7 Efeito do Brusatol na Reatividade vascular à fenilefrina (PE) em aortas de ratas prenhes e não prenhes, Wistar e SHR.....	58
5.8 Efeito do Brusatol na Reatividade vascular à Acetilcolina (ACh) em aortas de ratas prenhes e não prenhes, Wistar e SHR .....	61
6 Discussão .....	64
7 Conclusão .....	72
8 Referências .....	74

9 Apêndice .....	80
1. Valores numéricos dos resultados obtidos nos experimentos de Western Blot	80
2. Valores numéricos dos resultados obtidos nos experimentos fluorimétricos .....	82
3. Valores numéricos dos resultados obtidos nos experimentos para quantificação de Nitrito utilizando o Método de Griess em aortas dos diferentes grupos .....	83
4. Valores numéricos dos resultados obtidos nos experimentos de reatividade vascular .....	84

# ***INTRODUÇÃO***

## 1 Introdução

Em todo o mundo, as doenças hipertensivas são responsáveis por cerca de 10% das complicações existentes durante a gravidez, e podem terminar na morte materna, fetal e/ou morte neonatal (AMERICAN COLLEGE OF OBSTRETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, 2013; RUGOLO, BENTLIN, TRINDADE, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2016). Ainda não são conhecidas as principais causas que levam a esse processo patológico, porém a obtenção de informações sobre possíveis mecanismos fisiológicos alterados na gravidez e que levam a hipertensão, podem sugerir novos alvos para terapias mais precisas e mais eficazes. Nosso grupo tem estudado as alterações vasculares associadas a prenhez de ratas normotensas e hipertensas, com o objetivo de identificar os principais mecanismos fisiológicos associados a estas alterações. Conhecidos estes mecanismos, poderemos identificar possíveis alterações que estariam associadas a hipertensão na gravidez.

A pressão arterial média está reduzida ao final da prenhez em ratas normotensas (BALLEJO *et al.*, 2002) e em ratas espontaneamente hipertensas (SHR) (ZANCHETA *et al.*, 2015) por atividade de mecanismos associados ao aumento da atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e da produção de óxido nítrico (NO), além de redução de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (TROIANO *et al.*, 2016), contribuindo para o aumento da biodisponibilidade vascular de NO. Estes mecanismos estão envolvidos na modulação da reatividade vascular à agonistas vasoconstritores. Como observado em nossos estudos, a menor reatividade à fenilefrina (PE) em vasos de ratas Wistar prenhes e SHR prenhes depende da presença do endotélio e da atividade da eNOS (ZANCHETA *et al.*, 2015; TROIANO *et al.*, 2016). Estes resultados nos possibilitaram sugerir que prenhez reverteria a disfunção endotelial associada à hipertensão e observada em vasos de ratas SHR.

Nosso grupo também demonstrou que a expressão das proteínas PI3K e Akt nas suas formas fosforiladas e eNOS fosforilada em Serina<sup>1177</sup> está aumentada em homogenatos de aortas de ratas normotensas e hipertensas prenhes. Além disso, a incubação com Wortmannin (10 nmol/L), um inibidor da via PI3K/Akt, foi capaz de reverter a hiporreatividade de aortas de ratas prenhes à PE sugerindo que a via PI3K/Akt/eNOS estaria mais ativada em

aortas durante o período final da prenhez aumentando a modulação endotelial sobre a reatividade à PE (ZANCHETA *et al.*, 2015).

Por outro lado, na pré-eclâmpsia, há um aumento da pressão arterial por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (BAUMWELL e KARUMANCHI, 2007; GOULOPOULOU e DAVIDGE, 2015; DHARIWAL e LYNDE, 2017). Em modelos experimentais de pré-eclâmpsia, utilizando ratas ou camundongos fêmeas, a indução da hipertensão é feita pela redução da pressão de perfusão uterina ou RUPP (Reduced Uterine Perfusion Pressure), e os valores de pressão arterial ao final da prenhez (~128 mmHg) atingem valores muito acima dos encontrados em ratas prenhes Wistar ou SHR (AMARAL *et al.*, 2013).

Alteração fisiopatológica da função endotelial tem sido apontada, por estudos clínicos e experimentais, como a principal causa da hipertensão associada a gravidez/prenhez, uma vez que o nível local e circulante de múltiplos fatores, entre eles, as ERO podem causar disfunção endotelial generalizada e hipertensão, endoteliose glomerular renal e aumento da permeabilidade glomerular levando à proteinúria e endoteliose cerebral levando a edema e convulsões cerebrais (*apud* POSSOMATO-VIEIRA e KHALIL, 2016).

Diferentes vias bioquímicas correlacionadas ao aumento da geração de ERO e redução da biodisponibilidade de NO em células do músculo liso vascular e células endoteliais estão envolvidas no processo de hipertensão. O estresse oxidativo associado à hipertensão em SHR é resultante de um desequilíbrio entre a atividade de sistemas antioxidantes e aumento da produção de ERO. A atividade de diferentes NOX no sistema cardiovascular, isoformas da NAD(P)H oxidase que é a principal fonte de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), e a produção de  $O_2^{\bullet-}$  estão aumentadas em aortas de SHR machos quando comparadas a aortas de ratos normotensos (WIND *et al.*, 2010). Estudos prévios de nosso grupo demonstraram aumento da expressão da enzima NOX2 e de sua subunidade regulatória p47phox em aortas e da quantidade de ERO em células endoteliais de aortas de SHR machos quando comparadas as aortas/células de ratos normotensos Wistar, assim como a produção aumentada de ERO-dependente da atividade da lucigenina em aortas de SHR machos e fêmeas (PERASSA *et al.*, 2016; TROIANO *et al.*, 2016; GRATON *et al.*, 2019). Além disso, o tratamento crônico com Apocinina,

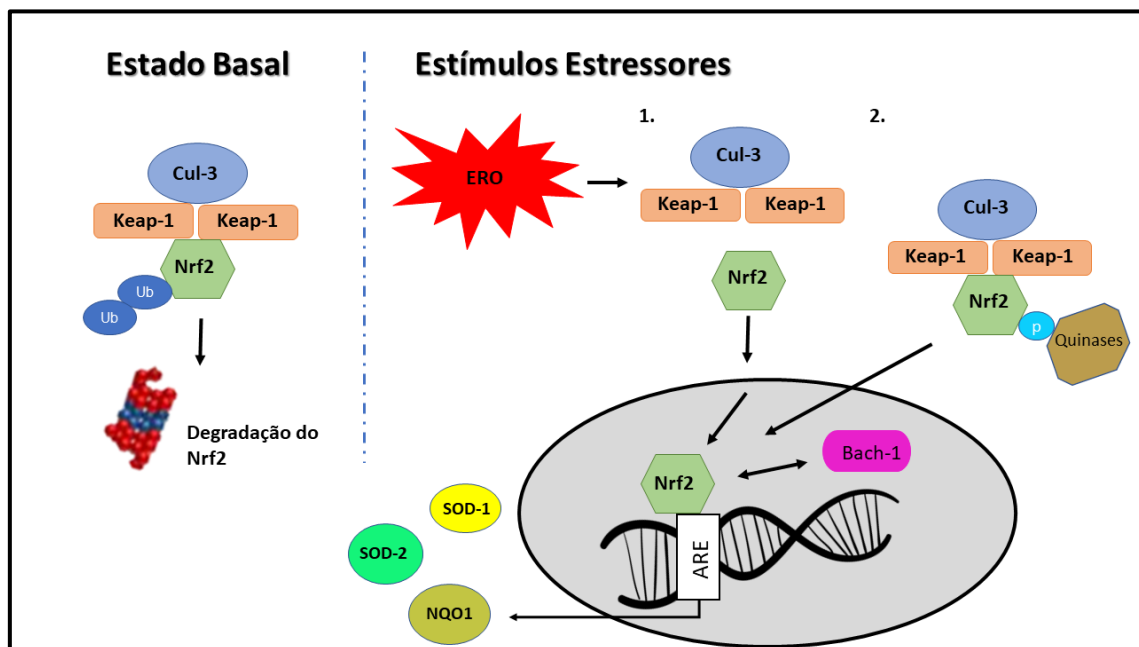
uma droga usada por sua ação inibitória da atividade da NAD(P)H oxidase, foi capaz de reduzir a pressão arterial e a expressão destas proteínas, reduzindo a produção de ERO e conseqüentemente, aumentando biodisponibilidade de NO (PERASSA *et al.*, 2016; GRATON *et al.*, 2019).

Interessantemente, em nossos estudos observamos que a prenhez aumenta os níveis de biomarcadores plasmáticos de estresse oxidativo em ratas normotensas e hipertensas devido ao aumento da atividade metabólica ocorrida durante a prenhez, porém há uma redução significativa destes biomarcadores em aortas de ratas prenhes de ambas as linhagens. Além disto, observamos que em aortas de SHR prenhes, a produção reduzida de ERO estaria associada a menor expressão das isoformas NOX1, NOX2 e NOX4 quando comparadas as aortas de SHR não prenhes (TROIANO *et al.*, 2016).

Alterações de vias bioquímicas relacionadas à produção e/ou biodisponibilidade de ERO e suas correlações com o desenvolvimento/manutenção da hipertensão são bastante estudadas. Entre estas vias, a via do fator nuclear eritróide-2 (Nrf2) tem despertado interesse devido ao seu papel na regulação direta de síntese de proteínas antioxidantes e conseqüentemente, modulação indireta da biodisponibilidade de ERO e NO. O papel do Nrf2 na modulação da atividade endotelial induzida pela prenhez ainda não é totalmente conhecido, por isso se torna relevante estudar possíveis alterações na função e ativação do Nrf2 em vasos de ratas prenhes.

O fator de transcrição nuclear eritróide 2 (Nrf2) é um fator redox-sensível que normalmente se encontra no citoplasma associado a proteína citoplasmática Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap-1) (KANG, LEE e KIM 2005). Em condições fisiológicas normais, a atividade do Nrf2 é negativamente regulada pela Keap-1 devido à sua rápida degradação proteosômica (ITOH *et al.*, 1999). Quantidades aumentadas de ERO modificam os resíduos específicos de cisteína da proteína Keap-1, e isso conseqüentemente leva a dissociação e ativação de Nrf2. O Nrf2 então transloca-se para o núcleo celular, onde se heterodimeriza a pequena proteína Maf (outro fator de transcrição) e se liga a sequências de elemento de resposta antioxidante (ARE, do termo em ingles, *antioxidant response element*) nas regiões promotoras de genes desintoxicantes e antioxidantes múltiplos (*apud* KWEIDER *et al.*, 2014).

Após dissociação do Keap-1 e ativação, Nrf2 inicia a transcrição de genes de enzimas citoprotetoras de defesa antioxidantes, incluindo quinona oxidorreductase-1 NAD(P)H (NQO1), heme-oxigenase-1 (HO-1), glutatona S-transferase-1 (GST-1), receptor ativado proliferador de peroxisoma gama (PPAR- $\gamma$ ), superóxido dismutase de cobre/zinco (SOD-1) e superóxido-dismutase de manganês (SOD-2) (JAISWAL, 2004; HUR; GRAY, 2011). A proteína Bach-1, que também é um fator de transcrição, é uma proteína que forma heterodímeros com pequenas proteínas Maf (SHAN *et al.*, 2004) e que compete com Nrf2 para regular a expressão gênica no sítio de ligação ARE (DHAKSHINAMOORTHY *et al.*, 2005). Conforme mostrado por Balan e Pal (2014), o aumento da expressão de Bach-1 e a diminuição do Nrf2 nuclear estariam associados com a regulação negativa de síntese de enzimas antioxidantes como a OH-1. Shan *et al.* (2004) relataram uma específica e seletiva habilidade do Bach-1 em reprimir a expressão da OH-1 hepática em humanos.



Via de sinalização do fator de transcrição Nrf2.

A atividade prejudicada do Nrf2 contribui para a disfunção vascular na hipertensão com aumento de biodisponibilidade de ERO, devido a redução da expressão de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase-1, catalase, peroxirredoxina-1 e glutatona peroxidase (LOPES *et al.*, 2015). Em

SHR, a expressão do mRNA do Nrf2 está diminuída (EREJUWA *et al.*, 2012) e contribui para reduzida capacidade antioxidante, aumentando desta forma o estresse oxidativo e a disfunção vascular. O tratamento com sulforafano, ativador de Nrf2, reverteu o desequilíbrio redox em vasos de SHR (LOPES *et al.*, 2015) e aumentou a vasodilatação dependente do endotélio (WU *et al.*, 2004). Além disso, o resveratrol, outro ativador de Nrf2, reduziu o estresse oxidativo e atenuou a severidade e progressão da hipertensão em SHR (JAVKHEDKAR *et al.*, 2015).

O efeito do Brusatol como um único inibidor da via Nrf2 foi identificado inicialmente em muitos tipos de células cancerígenas devido à alta expressão constitutiva de Nrf2 encontrada nestas células. Nestas células, o Brusatol reduziu seletivamente o nível de proteína Nrf2 através da ubiquitinação e degradação do Nrf2 e conseqüentemente, a expressão dos *downstream-genes* do Nrf2 e a resposta antioxidante dependente de Nrf2 foram suprimidas (REN *et al.*, 2011). O Brusatol induz potentemente a depleção rápida e transitória de Nrf2 por meio de um mecanismo pós-transcricional, independente de alterações em mRNA, e sem efeitos citotóxicos, podendo ser usado como ferramenta farmacológica experimental para a inibição da sinalização Nrf2 (OLAYANJU *et al.*, 2015). Recentemente, Bai *et al.* (2020) mostraram que o Brusatol usado como inibidor de Nrf2, inibiu o efeito do ácido betulinico que ativa vias antioxidantes reguladas por Nrf2. Neste estudo foi demonstrado que a hiporreatividade à acetilcolina (ACh) observada em aortas de ratos em choque séptico estava associada, entre outros fatores, ao excesso de ERO, e era revertida pelo ácido betulinico por um mecanismo associado ao aumento da expressão de mRNA de SOD, GPx e HO-1, no entanto, este efeito não foi mais observado quando os ratos foram tratados com Brusatol (0.4 mg/kg/2 days, i.p).

Como escrito acima, nosso grupo demonstrou que a prenhez reduz a quantidade e a produção de ERO em células vasculares, a peroxidação lipídica, utilizada como marcador de estresse oxidativo, e a expressão de isoformas NOX em aortas de fêmeas SHR (TROIANO *et al.*, 2016). Possíveis alterações nas subunidades regulatórias NOXO-1 e p47phox das enzimas NOX1 e NOX2 respectivamente, poderiam estar associadas a menor expressão destas enzimas e menor atividade da NAD(P)H oxidase em aortas

de SHR prenhes. Não sabemos até o momento se a prenhez modularia a expressão de subunidades regulatórias NOXO-1 e p47phox em aortas de ratas normotensas e SHR. Apesar de não observarmos alterações significativas na expressão de SOD-1 em aortas de SHR prenhes (TROIANO *et al.*, 2016), não investigamos até o momento se a prenhez altera a expressão de SOD-2 ou de outras enzimas antioxidantes em aortas de ratas Wistar e SHR. Outros estudos demonstraram que a atividade da SOD-1 está diminuída, mas a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) está aumentada em artéria mesentérica de SHR prenhes (OGNIBENE *et al.*, 2012). Juntos, os resultados encontrados na literatura até o momento sugerem que os mecanismos de modulação da atividade das enzimas antioxidantes na prenhez ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, considerando que a prenhez aumenta a biodisponibilidade de óxido nítrico e reduz a produção de ERO em vasos de SHR (ZANCHETA *et al.*, 2016; TROIANO *et al.*, 2016), ela então poderia reverter o desequilíbrio redox em aortas de SHR e modular a ativação do Nrf2 e de sistemas antioxidantes dependentes da atividade de Nrf2.

***HIPÓTESE***

## **2 Hipótese**

Levando em consideração estas observações, levantamos a hipótese que a prenhez aumenta a atividade da via do Nrf2 e de sistemas enzimáticos antioxidantes em aortas de ratas Wistar e SHR. Mais ainda, o aumento da expressão do fator de transcrição Nrf2, associado à redução da expressão de Keap-1 e de Bach-1, determinaria maior atividade de sistemas enzimáticos antioxidantes aumentando assim a modulação endotelial sobre a reatividade à fenilefrina em aortas de ratas Wistar e SHR prenhes.

# ***OBJETIVOS***

### **3 Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar possíveis alterações na via de ativação do fator de transcrição Nrf2 que levariam a redução da biodisponibilidade de ERO em vasos de ratas normotensas e espontaneamente hipertensas (SHR) prenhes, as quais contribuiriam indiretamente para maior biodisponibilidade vascular de NO observada ao final da prenhez.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Os experimentos foram conduzidos a fim de:

- A- Avaliar se a expressão das subunidades regulatórias NOXO-1 e p47phox das enzimas NOX1 e NOX2 respectivamente, estariam alteradas em aortas de ratas normotensas e SHR prenhes
- B- Verificar se a expressão de Nrf2 estaria alterada em aortas de ratas SHR não prenhes e se a prenhez é uma condição capaz de modular a expressão deste fator de transcrição neste vaso.
- C- Verificar se a prenhez modula a expressão das proteínas regulatórias Keap-1 e Bach-1 em vasos de ratas normotensas e SHR.
- D- Avaliar se a expressão de enzimas citoprotetoras de defesa antioxidantes, como quinona oxidoredutase-1 NAD(P)H (NQO1), superóxido dismutase de cobre/zinco (SOD-1) e superóxido-dismutase de manganês (SOD-2) estariam alteradas em aortas de ratas prenhes.
- E- Avaliar se o Brusatol, inibidor do Nrf2, reverteria a hiporeatividade à PE em aortas de ratas Wistar e SHR prenhes.

# ***METODOLOGIA***

## 4 Metodologia

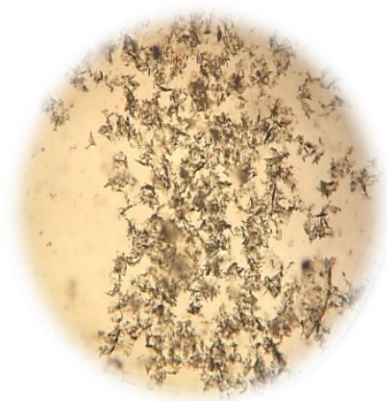
Todos os experimentos realizados neste estudo foram conduzidos após a análise e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, CEUA-FOA/UNESP (protocolo nº. 00538-2018).

### 4.1 Animais

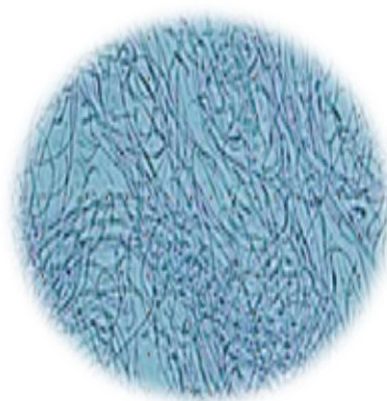
Nos experimentos foram utilizadas ratas Wistar (aproximadamente 220 g), como controle normotenso e ratas espontaneamente hipertensas - SHR (aproximadamente 180 g) com 12 semanas de vida. Ambas as linhagens foram divididas em dois grupos: ratas não prenhes (NP) e ratas prenhes (P). As ratas não prenhes foram utilizadas nos experimentos na fase estro do ciclo estral e as ratas prenhes, no período final da prenhez, entre o 18º ao 20º dia. O esfregaço vaginal foi feito em todas as ratas pela manhã para a determinação da fase do ciclo estral ou para a determinação do dia zero de prenhez (Figura 1). O dia zero de prenhez foi determinado pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal das ratas em acasalamento.

Foram utilizadas ratas espontaneamente hipertensas (SHR) de uma linhagem mantida pelo nosso grupo de pesquisa no biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, UNESP e ratas Wistar, provenientes de uma linhagem mantida no biotério central da mesma faculdade.

Todos os animais usados em nosso estudo foram alimentados com ração padrão e água *ad libitum* e foram mantidos em condições controladas de limpeza, temperatura (22 – 24°C) e umidade (45 – 65 %) com ciclo de luz (12 h claro/escuro).



Fase estro



Dia Zero de prenhez - presença de Espermatozoides

Figura 1- Imagens representativas do esfregaço vaginal (a fresco) de ratas na fase estro do ciclo estral e no dia zero de prenhez. Microscópio óptico (aumento 10 vezes).

#### 4.2 Western blotting (WB)

Realizamos a técnica de WB para as análises de expressão de proteínas em segmentos de aorta torácica. Inicialmente as ratas não prenhes e prenhes, Wistar ou SHR, foram previamente anestesiadas em câmara saturada com halotano e em seguida decapitadas. Foi realizada a toractomia, visualização e remoção do segmento torácico da aorta. A aorta torácica foi cuidadosamente dissecada e o tecido adiposo perivascular todo removido. As aortas foram seccionadas na metade do seu tamanho total (1,0 - 1,5 cm) e em seguida, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C até o dia de realização do experimento.

No dia do experimento, os tecidos foram triturados em nitrogênio líquido e homogeneizados separadamente em tampão RIPA (Tris-base 65,2 mmol/L, NaCl 154 mmol/L, NP-40 1 % (v/v), deoxicolato de sódio 0,25 % (w/v) e EDTA 0,8 mmol/L) suplementado com um coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Protease Inhibitor Mix, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) utilizando um sonicador (Sonics Vibra Cell, Newtown, CT, EUA). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (4 °C, 9300 RCF por 20 minutos) para a separação do sobrenadante.

A quantificação da concentração de proteína no sobrenadante foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando diferentes concentrações de albumina de soro bovino (BSA - Santa Cruz; sc 2323) como curva de concentração padrão. Cinquenta microgramas (50 µg) de proteína foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% e, posteriormente, transferidas para a membrana de nitrocelulose. Depois da transferência, as membranas foram incubadas com leite desnatado (Glória) a 5 % em tampão tris-salina com Tween 20 (TBS-T), por 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (Tabela 1), à 4 °C, *overnight*.

Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas por 10 minutos, 3 vezes, com tampão TBS-T e incubadas com anticorpos secundários correspondentes (Tabela 1) por 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o substrato para peroxidase quimioluminescente (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Little Chalfont, BKM, Reino Unido) e visualizadas pelo ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK).

A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica pelo programa ImageJ (versão 1.46r, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). A normalização dos resultados foi feita pelos valores de expressão de  $\beta$ -actina. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA)/  $\beta$ -actina e foram comparados entre os grupos.

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários utilizados nos experimentos (diluições e fabricantes)

<b>Anticorpo Primário</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Anticorpo Secundário</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>
<b>Bach-1</b>	1:1000	sc-271211, Santa Cruz Biotechnology	Anti- camundongo IgG	1:500	sc-2005, Santa Cruz Biotechnology

<b>Keap-1</b>	1:500	sc-515432, Santa Cruz Biotechnology	Anti- camundongo IgG	1:500	sc-2005, Santa Cruz Biotechnology
<b>NOXO-1</b>	1:500	sc-390927, Santa Cruz Biotechnology	Anti- camundongo IgG	1:1000	sc-2005, Santa Cruz Biotechnology
<b>p47phox</b>	1:500	sc-17845, Santa Cruz Biotechnology	Anti- camundongo IgG	1:1000	sc-2005, Santa Cruz Biotechnology
<b>NQO1</b>	1:1000	sc-271116, Santa Cruz Biotechnology	Anti- camundongo IgG	1:1000	sc-2005, Santa Cruz Biotechnology
<b>SOD-1</b>	1:500	sc-11407, Santa Cruz Biotechnology	Anti-Coelho IgG	1:1000	sc-2004, Santa Cruz Biotechnology
<b>SOD-2</b>	1:1000	30080, Santa Cruz Biotechnology	Anti-Coelho IgG	1:500	sc-2004, Santa Cruz Biotechnology
<b>Nrf2</b>	1:1000	Ab121035, Abcam	Anti-Cabra IgG	1:4000	sc-2768, Santa Cruz Biotechnology
<b><math>\beta</math>-actina</b>	1:10000	sc-69879, Santa Cruz Biotechnology	Anti- camundongo IgG	1:12000	sc-2005, Santa Cruz Biotechnology

#### **4.3 Análise do efeito do Brusatol sobre a produção de ânion superóxido e seu efeito sobre a medida de óxido nítrico em células endoteliais**

Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC, conforme abreviação em inglês) foram adquiridas de linhagens celulares ATCC (EUA) e cultivadas no meio Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) suplementado com soro bovino fetal (FBS) 10% e usadas nas passagens 4-6.

Após privação sérica no meio de cultura por 12 h, as células confluentes ( $10^4$  células / poço) foram incubadas com Brusatol a 0,01  $\mu\text{mol/L}$ , 0,1  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  ou não (controle) por 45 minutos. Em seguida, as células foram incubadas com as sondas de fluorescência DHE (seletiva de ERO, 2,5  $\mu\text{mol/L}$ ) ou DAF-2DA (seletiva para óxido nítrico, 5  $\mu\text{mol/L}$ ), por 30 minutos. As análises fluorométricas foram realizadas em um espectrofluorômetro (BioTeK®) equipado com uma lâmpada de xenônio de 150 watts (Excitação / Emissão, em nm: DHE 405/570 e DAF-2DA 488/530).

#### **4.4 Análise Bioquímica**

Utilizamos as aortas das ratas para realização do método de Griess descrito a seguir.

Inicialmente, as ratas foram anestesiadas, as aortas foram removidas, dissecadas e seccionadas em segmentos de 6 mm. Os segmentos foram colocados em tubos *ependorf* com 500  $\mu\text{L}$  de solução de Krebs Henseleit (composição em mmol/L: NaCl 130,0; KCl 4,7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2;  $\text{MgSO}_4$  1,2;  $\text{NaHCO}_3$  14,9; glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) 5,5;  $\text{CaCl}_2$  1,6, pH 7,4), por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  e com aeração constante (95 % de  $\text{O}_2$  e 5 % de  $\text{CO}_2$ ). Essas amostras foram divididas em quatro grupos: 1- controle (não estimulado), 2- estimulado com Acetilcolina (ACh, 1  $\mu\text{mol/L}$ ) por 5 minutos, 3- incubado com Brusatol (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ) por 30 minutos e 4- incubado com Brusatol (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ) por 30 minutos e estimulado com ACh (1  $\mu\text{mol/L}$ ) por 5 minutos.

##### **4.4.1 Avaliação das concentrações de nitrito em amostras de aortas de ratas prenhes e não prenhes**

A realização do experimento para avaliação das concentrações de nitrito consistia das seguintes etapas:

Os *ependorfs* que continham os segmentos de aortas e 500  $\mu\text{L}$  de Krebs Henseleit foram mantidos em banho-maria, incubados ou não com Brusatol (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ). Todos permaneceram sob as mesmas condições (aeração constante, pH 7,4 e  $37^\circ\text{C}$ ) por um período de 30 minutos. Após este

período alguns, segmentos foram estimulados com ACh (1  $\mu\text{mol/L}$ ) por 5 minutos. Seguidamente, a solução dos diferentes *eppendorfs* foram coletadas.

Em uma placa de 96 poços foram adicionados em cada poço 50 $\mu\text{L}$  da solução dos diferentes *eppendorfs* e 50 $\mu\text{L}$  do reagente de Griess (sulfanilamida a 1% (w/v) e 0,1% (w/v) de dicloridrato de N- (1-naftil) etilenodiamina em 2,5% (v/v) de ácido fosfórico), e incubados por 10 minutos. A concentração de nitrito foi determinada baseada em uma curva padrão de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) em diferentes concentrações (12,5 - 0,39  $\mu\text{g/mL}$ ). Os valores de absorbância foram determinados a 570 nm e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol/mL}$  de  $\text{NaNO}_2$ / peso (mg) das aortas frescas (os diferentes segmentos de aortas foram pesados antes do início dos experimentos).

Estas metodologias foram conduzidas conforme as descritas previamente (Diaz *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2019; Wong *et al.*, 2017).

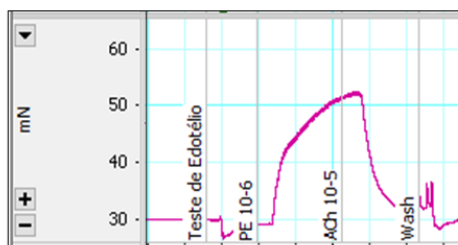
#### 4.5 Reatividade Vascular

Os experimentos de reatividade vascular foram realizados para avaliarmos a funcionalidade do músculo liso vascular e o endotélio vascular de ratas prenhes. Aortas torácicas isoladas de ratas não-prenhes e prenhes, Wistar ou SHR foram estimuladas com fenilefrina, agonista alfa-1-adrenérgico, que promove vasoconstrição e com acetilcolina, um agonista muscarínico, que promove vasodilatação dependente do endotélio vascular.

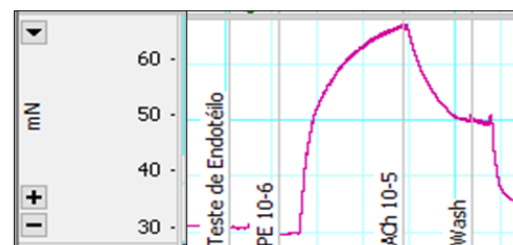
As ratas foram decapitadas após serem anestesiadas em câmara saturada de halotano. A aorta torácica foi removida, dissecada e cortada em anéis de 2 mm em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (composição em mmol/L: NaCl 130,0; KCl 4,7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2;  $\text{MgSO}_4$  1,2;  $\text{NaHCO}_3$  14,9; glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) 5,5;  $\text{CaCl}_2$  1,6), pH 7,4 a 4  $^\circ\text{C}$ .

Alguns anéis foram usados intactos e outros foram usados após a remoção mecânica do endotélio vascular. Os anéis com e sem endotélio foram posicionados entre dois ganchos de aço inoxidável conectados a um transdutor de força isométrica (DMT, ADInstruments, Melbourne, VIC, Austrália) em cubas (5mL) contendo solução de Krebs-Henseleit, 37 $^\circ\text{C}$ , pH 7,4 e suprimento gasoso de 95 % de  $\text{O}_2$  e 5 % de  $\text{CO}_2$ . Os anéis foram mantidos por um período de 30 minutos sob tensão basal de 30 mN para estabilização. Em seguida, os anéis

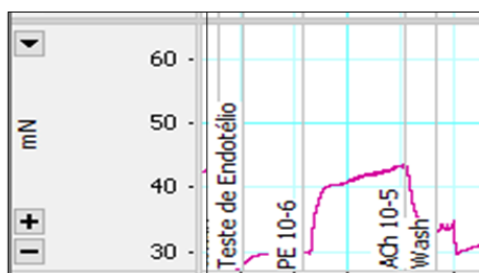
foram estimulados com solução de Krebs KCl (120 mmol/L) para testar a integridade funcional (contração do músculo liso vascular), e então foram lavados com solução de Krebs até o retorno para tensão basal. Foram considerados viáveis os anéis que atingiram contração  $\geq 10$  mN. A integridade e funcionalidade do endotélio vascular foi verificada pelo grau de relaxamento induzido por acetilcolina (ACh, 1  $\mu$ mol/L) após contração prévia com fenilefrina (PE, 100 nmol/L). Os anéis de ratas Wistar que apresentaram relaxamento à ACh  $\geq 80$  % foram considerados com endotélio. Para os anéis de aortas de SHR, a integridade e a funcionalidade do endotélio foram consideradas quando ACh (1  $\mu$ mol/L) induziu relaxamento  $\geq 70$  %. Para os anéis que tiveram o endotélio removido mecanicamente, a ausência de endotélio funcional foi considerada quando o relaxamento à ACh foi  $\leq 10$  % da contração induzida pela PE.



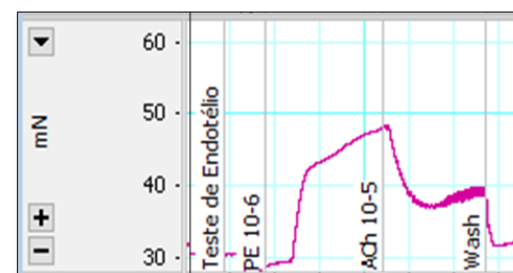
Wistar



Wistar



SHR



SHR

Registros representativos de respostas vasoconstritoras à PE e vasodilatadoras à ACh em anéis de aorta com endotélio preservado (relaxamento maior ou igual a 80% para Wistar e 70% para SHR), e anéis com endotélio danificado (relaxamento menor que 80% para Wistar e 70% para SHR) esquerda e direita respectivamente.

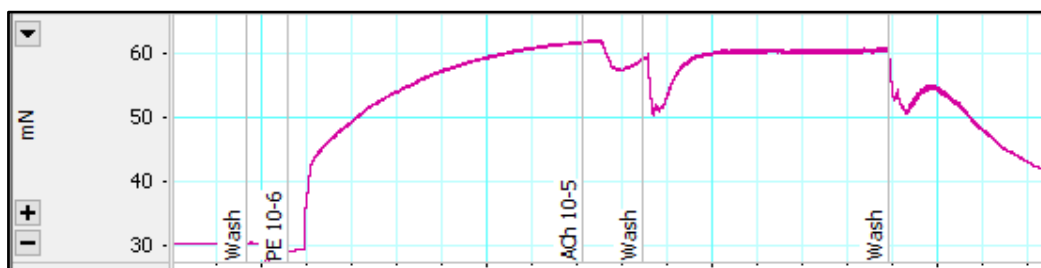


Imagem representativa da resposta à PE e à ACh em anel de aorta de rato Wistar após remoção mecânica de endotélio (relaxamento menor que 10%).

### **Efeito do Brusatol na reatividade vascular à fenilefrina (PE) e à acetilcolina (ACh) em anéis de aortas de ratas Wistar e SHR, não prenhes e prenhes:**

Alguns anéis de aorta com endotélio (E+) foram estimulados com concentrações crescentes e cumulativas de PE ou de ACh (0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L). Outros anéis de aorta com endotélio (E+) foram estimulados com PE ou ACh na presença de Brusatol (0,1  $\mu$ mol/L), uma droga inibidora do fator de transcrição Nrf2, após 30 minutos de incubação.

As curvas para PE e ACh obtidas na ausência e na presença de Brusatol foram comparadas entre os anéis de aorta de ratas prenhes e não prenhes, normotensas e hipertensas.

## **4.6 Análise estatística**

Os resultados obtidos nos diferentes experimentos realizados foram analisados conforme o método estatístico mais adequado para cada tipo de experimento conforme descrito abaixo. Para as análises estatísticas, o programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, La Jolla, CA, EUA) versão 6.0 foi utilizado.

### **4.6.1 Western blotting**

Os valores de densitometria óptica das bandas foram obtidos pelo programa ImageJ (versão 1.46r, National Institutes of Health, Bethesda, MD,

EUA). As proteínas alvo tiveram seus valores de densitometria óptica normalizados pelos valores das bandas de  $\beta$ -actina e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os resultados foram comparados pelo teste estatístico Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey e as diferenças entre os valores obtidos nos grupos experimentais foram consideradas significantes quando  $p < 0.05$ .

#### **4.6.2 Análise dos experimentos fluorimétricos**

Os dados obtidos relatam fenômenos de dispersão do laser que reflete sobre as células, de absorção da luz e de emissão de fluorescência. Os resultados foram apresentados de acordo com a intensidade de fluorescência (IF) das células com marcação positiva para as sondas fluorescentes DAF-2/DA e DHE. Os resultados foram comparados pelo teste One-way, ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$ .

#### **4.6.3 Método de Griess**

Cálcamos a diferença (delta) entre os valores obtidos em aortas estimuladas e não estimuladas com ACh, e entre os valores obtidos em aortas incubadas com Brusatol e estimuladas ACh e em aortas incubadas com Brusatol. Comparamos então estes valores entre aortas de ratas não-prenhes e prenhes Wistar ou SHR. Os valores de concentração de nitrito nas diferentes amostras foram comparados entre os grupos pelo teste de ANOVA (One-way) e pós teste de Tukey, e a comparação entre prenhes e não prenhes no mesmo grupo foi realizada pelo Test t de *Student*. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$ .

#### **4.6.4 Reatividade Vascular**

Analizamos os parâmetros farmacológicos de eficácia (Efeito Máximo – Emax) e a potência (pD2:  $-\log EC_{50}$ ). Os resultados foram expressos com a média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). Os gráficos e os cálculos para

determinação do Emax (efeito máximo) e da EC50 (concentração que produz 50 % da resposta máxima, calculada pelo método de regressão não linear dos mínimos quadrados).

A comparação dos valores de Emax e EC50 entre os grupos prenhes e não-prenhes foi feita aplicando o Test t de *Student*, e as comparações entre os diferentes grupos foi feita pelo teste ANOVA (One-way), seguido do pós-teste de Tukey sendo adotado nível de significância de 5 % ( $p < 0.05$ ) para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

# ***RESULTADOS***

## 5 Resultados

### 5.1 Análise da expressão proteica da subunidade NOXO-1, p47phox e Nrf2 em anéis de aortas de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes

Não observamos diferenças na expressão da NOXO-1 (Figura 1) entre aortas de ratas hipertensas e normotensas não prenhes. Entretanto, foi possível observar que a prenhez reduziu a expressão de NOXO-1 em aortas de ratas Wistar e de SHR. O efeito da prenhez na redução de NOXO-1 foi mais significativo em aortas de SHR.

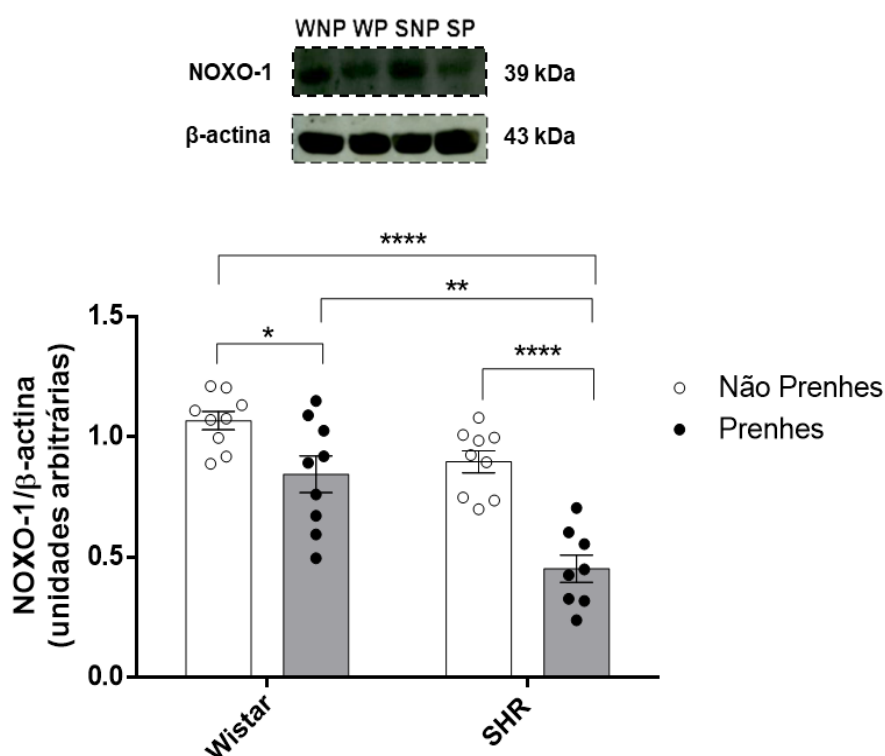


Figura 1: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas NOXO-1/β-actina em homogenatos de aortas de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes. As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 8-9) dos diferentes grupos. \*p<0.05 entre Wistar prenhe vs Wistar não-prenhe, \*\*\*\* p<0.0001 SHR prenhe vs SHR não prenhe, \*\* p<0.01 SHR prenhe vs Wistar prenhe, \*\*\*\* p<0.0001 SHR prenhe vs Wistar não prenhe. Aplicado teste Two-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

Também não foi observado diferença na expressão da subunidade regulatória p47phox entre aortas de ratas normotensas e hipertensas não prenhes, apesar de uma tendência a um menor valor numérico. A prenhez não alterou a expressão de p47phox em aortas de ratas Wistar, mas reduziu a expressão de p47phox em aortas de SHR, mostrando que a expressão desta subunidade é menor nestes vasos se comparada aos outros grupos (Figura 2).

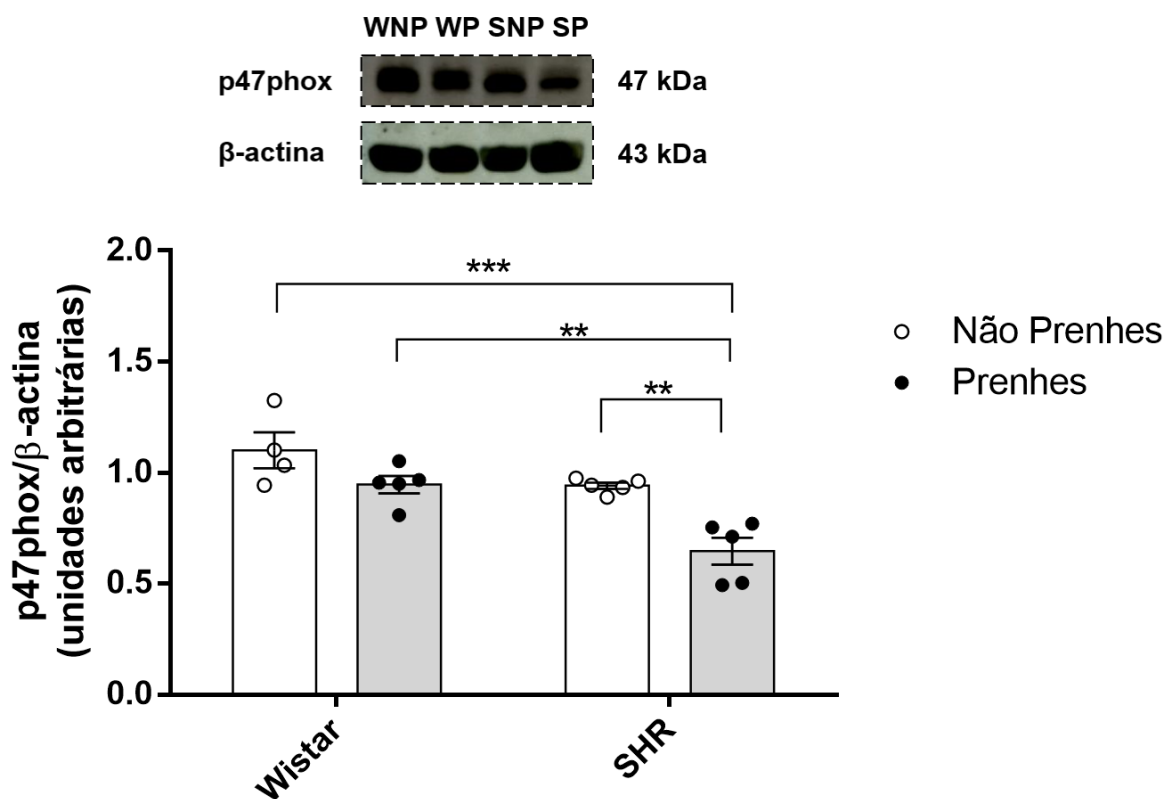


Figura 2: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas p47phox/β-actina em homogenatos de aortas, de ratas Wistar e SHR não prenhes (barras brancas) e prenhes (barras cinza). As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos. \*\* p<0.01 entre SHR prenhes vs SHR não prenhes, SHR prenhes vs Wistar prenhes, e \*\*\* p<0.001 SHR prenhes vs Wistar não prenhes. Aplicado teste Two-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

A expressão proteica de Nrf2 em aortas não foi diferente entre SHR e Wistar não prenhes. Observamos que a prenhez aumentou a expressão de Nrf2 em aortas de Wistar, mas não promoveu alteração importante na expressão de Nrf2 em aortas de SHR prenhes (Figura 3).

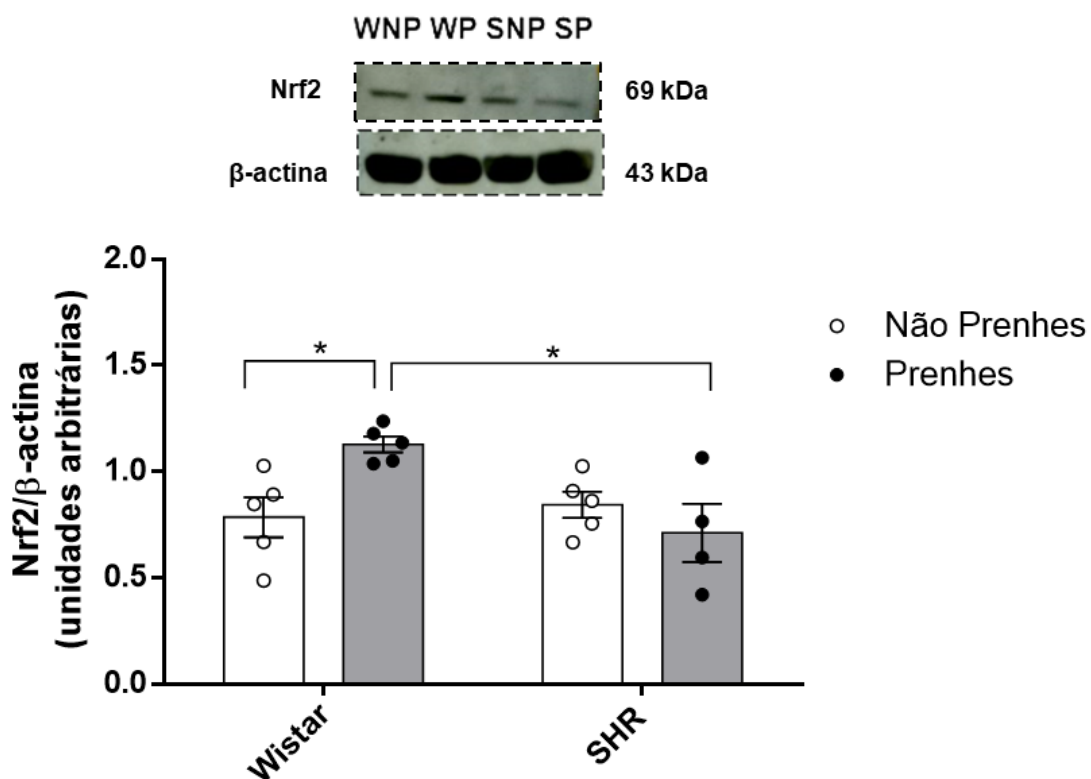


Figura 3: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas Nrf2/β-actina em homogenatos de aortas, de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes. As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos. \* p<0.05 Wistar prenhes vs Wistar não prenhe, SHR prenhes vs Wistar prenhes. Aplicado teste Two-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

## 5.2 Análise da expressão proteica dos inibidores fisiológicos da Nrf2, Keap-1 e Bach-1 em anéis de aortas de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes

Não encontramos diferença na expressão de Keap-1 entre aortas de ratas Wistar e SHR não prenhes. Também observamos que a prenhez não foi capaz de alterar a expressão dessa proteína entre aortas de ratas Wistar e SHR () (Figura 4).

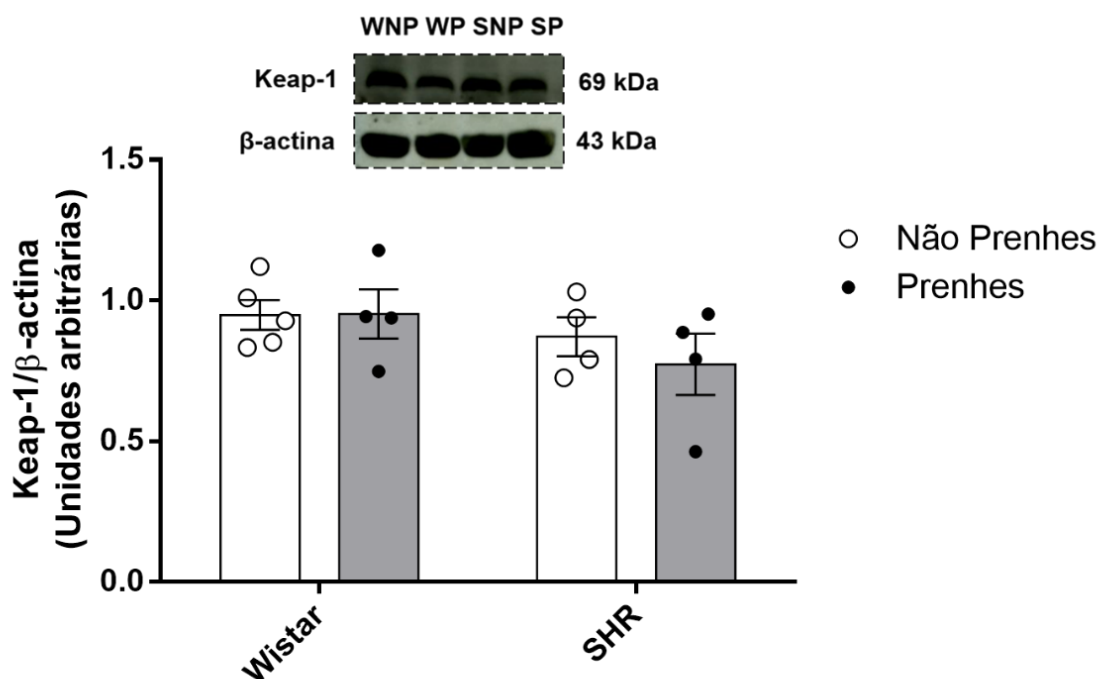


Figura 4: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas Keap-1/β-actina em homogenatos de aortas, de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes. As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos.

Nossos resultados mostraram que há redução do conteúdo proteico de Bach-1 em aortas de ratas hipertensas quando comparadas as aortas de ratas normotensas não prenhes, e que a prenhez não altera a expressão desta proteína em aortas de ratas normotensas, e em aortas de SHR. Ao compararmos a expressão desta proteína entre aortas de ratas prenhes, observamos menor expressão em aortas de SHR (Figura 5).

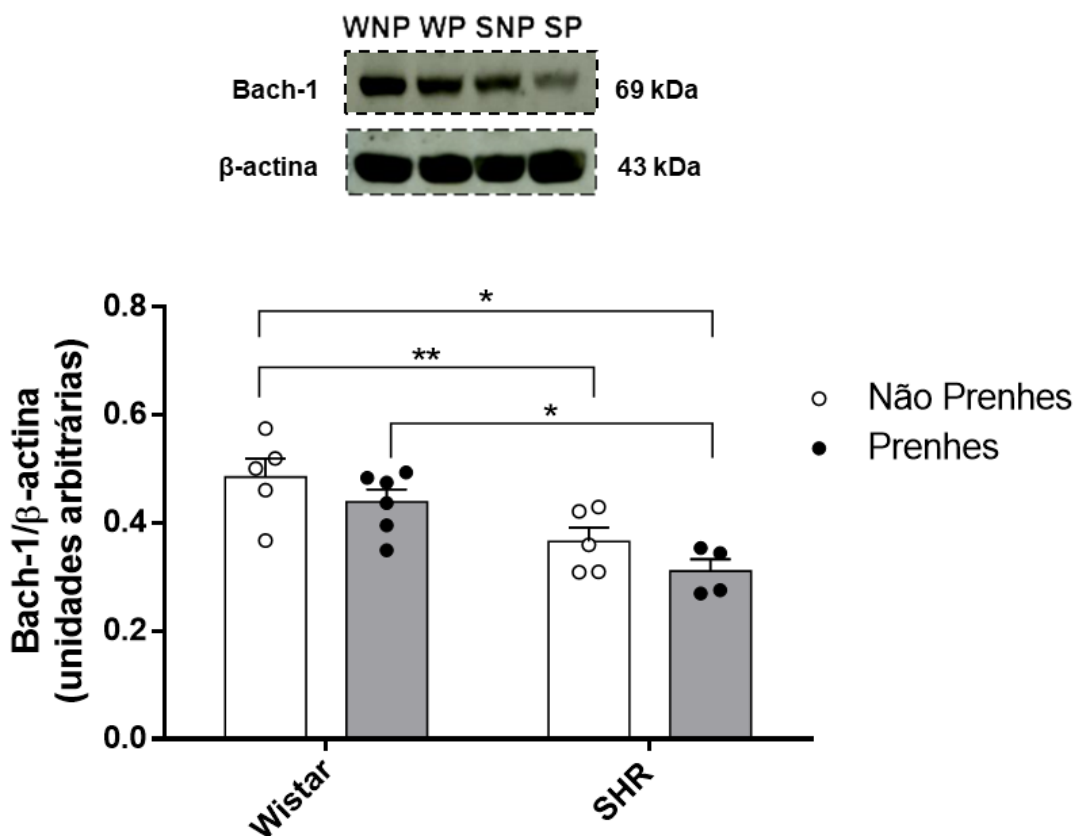


Figura 5: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas Bach-1/β-actina em homogenatos de aortas, de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes. As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5-6) dos diferentes grupos. \*p<0.05 entre SHR prenhe e Wistar não prenhe e, SHR prenhe vs Wistar prenhe, \*\* p<0.01 entre SHR não prenhe e Wistar não prenhe. Aplicado teste Two-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

### 5.3 Análise da expressão proteica das isoformas das enzimas SOD, SOD-1 e SOD-2, e da NQO1 em anéis de aortas de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes

Nossos resultados demonstram que não há diferença na expressão da enzima antioxidante SOD-1 entre aortas de ratas normotensas e hipertensas não prenhes, e que também não há alteração da expressão desta enzima entre aortas dos grupos Wistar e SHR prenhes (Figura 6).

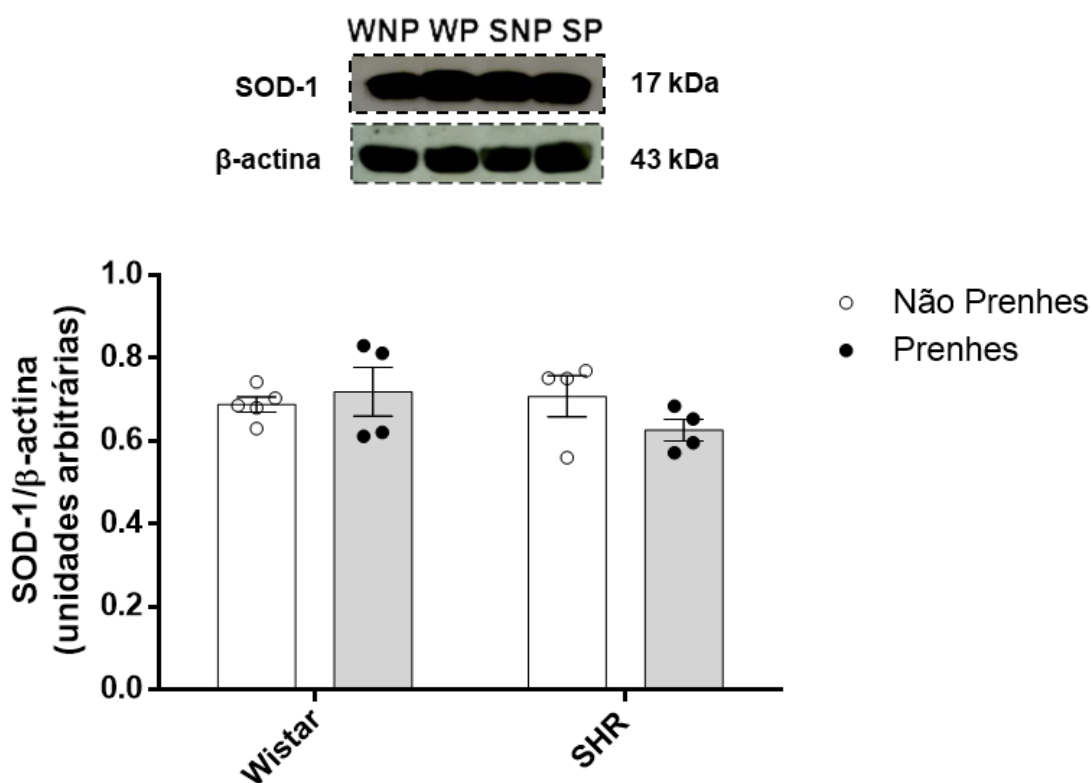


Figura 6: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas SOD-1/β-actina em homogenatos de aortas, de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes. As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos.

A expressão da enzima antioxidante SOD-2 foi maior em aortas de Wistar prenhes quando comparada a Wistar não prenhes. Não observamos diferenças na expressão de SOD-2 entre aortas de SHR prenhes (Figura 7) e de SHR não prenhe.

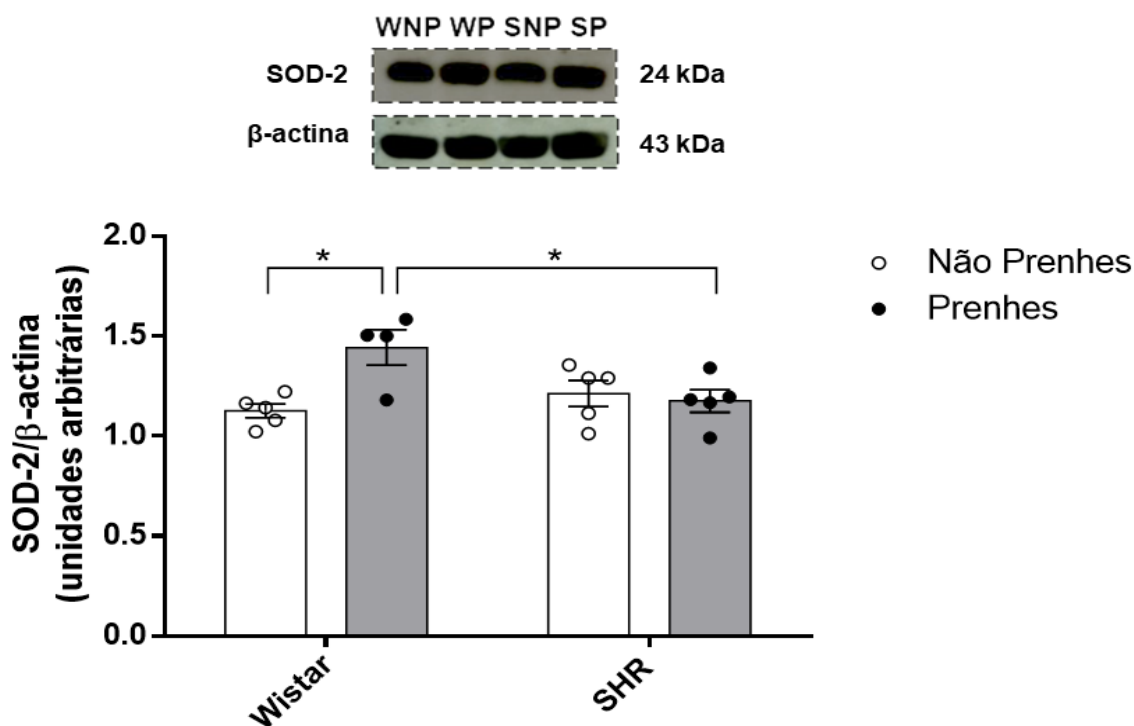


Figura 7: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas SOD-2/β-actina em homogenatos de aortas de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes. As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos. \*p<0.05 entre os grupos Wistar não prenhe *versus* Wistar prenhe e Wistar prenhe *versus* SHR prenhe. Aplicado teste Two-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

Observamos redução da expressão de NQO1 no grupo de ratas espontaneamente hipertensas quando comparadas ao grupo de ratas normotensas não prenhes. A prenhez não alterou a expressão desta enzima antioxidante em aortas de ratas normotensas. Entretanto, a expressão desta enzima foi diminuída no grupo SHR prenhe quando comparada ao grupo SHR não prenhe (Figura 8).

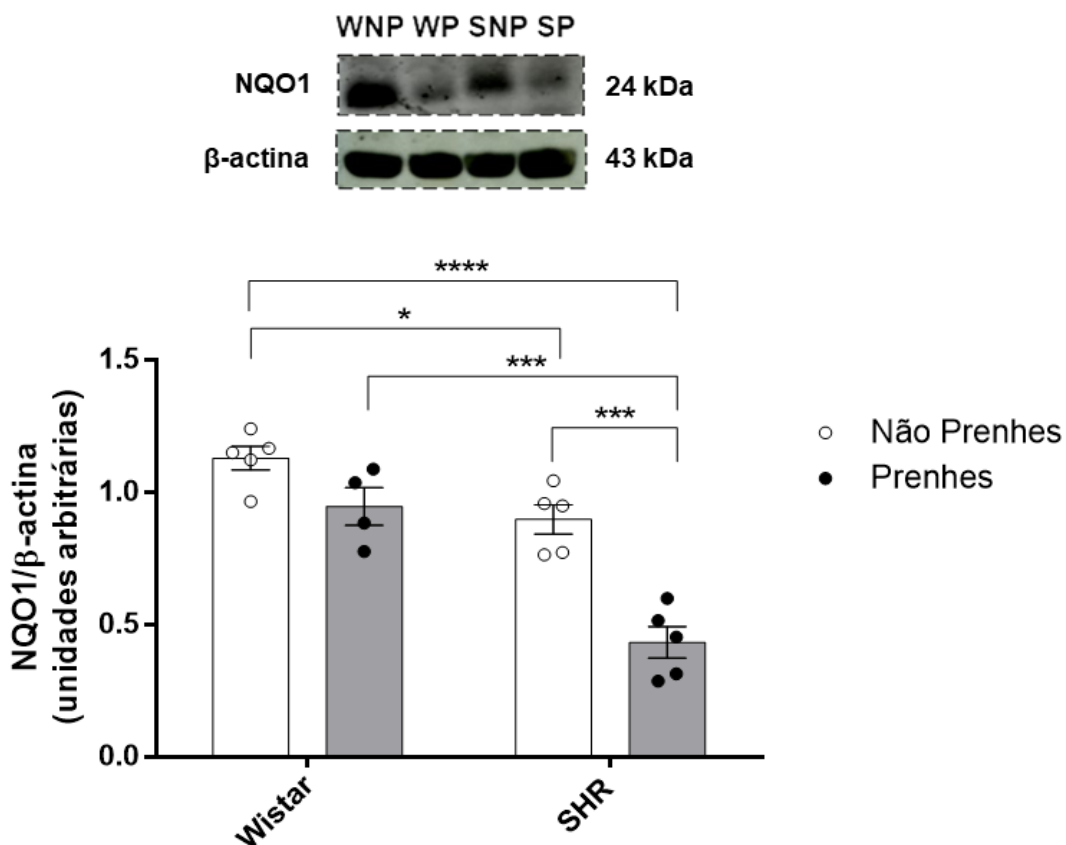


Figura 8: Imagens representativas das bandas e quantificação da expressão de proteínas NQO1/β-actina em homogenatos de aortas, de ratas Wistar e SHR não prenhes e prenhes. As barras representam a média ± EPM dos resultados obtidos em aortas (n = 4-5) dos diferentes grupos. \* p<0.05 entre o grupo SHR não prenhe vs Wistar não prenhes, \*\*\* p<0.001 SHR prenhe vs SHR não prenhe, SHR prenhe vs Wistar prenhe, \*\*\*\* p<0.0001 SHR prenhe vs Wistar não prenhe. Aplicado teste Two-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

#### 5.4 Análise do efeito do Brusatol em células endoteliais

A fim de quantificarmos um possível efeito do Brusatol, inibidor do Nrf2, nas células vasculares de aortas de ratas prenhes e não prenhes, Wistar ou SHR, inicialmente avaliamos o efeito do Brusatol em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Realizamos experimentos para avaliar se o Brusatol promoveria alteração na concentração intracelular de NO nestas células. Para isso quantificamos a intensidade de fluorescência, expressa por unidades arbitrárias, emitidas pela sonda DAF-2DA, seletiva para NO. Células incubadas por 30 minutos com Brusatol 10  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$ , 0,1  $\mu\text{mol/L}$  e 0,01  $\mu\text{mol/L}$  não apresentaram diferença na variação de fluorescência do DAF-2DA, quando comparadas as células não incubadas, controles (Figura 9).

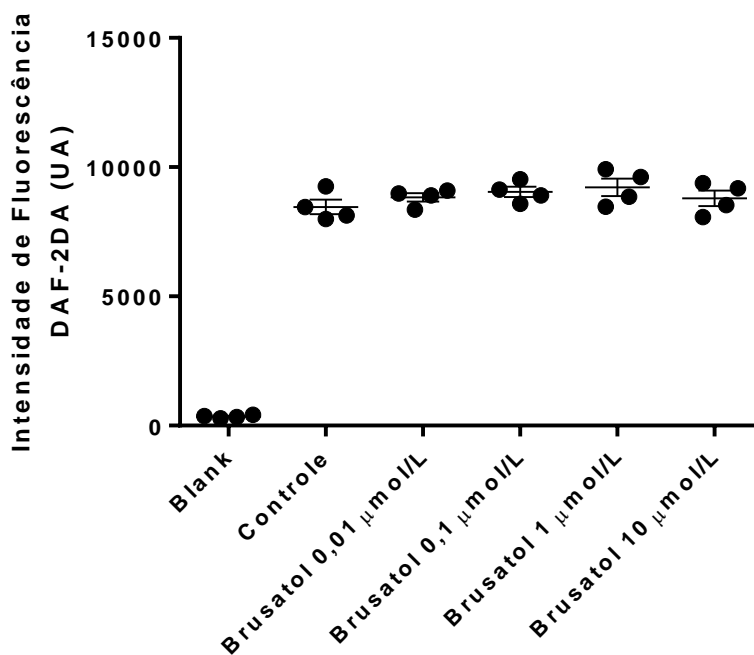


Figura 9: Intensidade de fluorescência emitida pelo DAF-2/DA (5  $\mu\text{mol/L}$ ) que quantifica a concentração de óxido nítrico (NO) em HUVEC, em condições basais ou não incubadas (Controle) e após 45 minutos de incubação com Brusatol 0,01  $\mu\text{mol/L}$ , 0,1  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$  e 10  $\mu\text{mol/L}$ . O gráfico mostra os valores obtidos nos experimentos realizados (pontos) e a média  $\pm$  EPM destes valores.

Também avaliamos um possível efeito do Brusatol sobre a concentração intracelular de ERO. Para tanto analisamos a intensidade de fluorescência, emitida pela sonda DHE, seletiva para ERO, em HUVEC. Todas as concentrações de Brusatol, ou seja, 10  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$ , 0,1  $\mu\text{mol/L}$  e 0,01  $\mu\text{mol/L}$  foram capazes de aumentar a intensidade de fluorescência ao DHE, mostrando que o Brusatol nas diferentes concentrações, aumenta as concentrações intracelulares de ERO quando comparadas aos valores observados nas células controle, não incubadas. Na concentração 10  $\mu\text{mol/L}$ , observamos o maior efeito do Brusatol sobre a concentração de ERO em HUVEC (Figura 10).

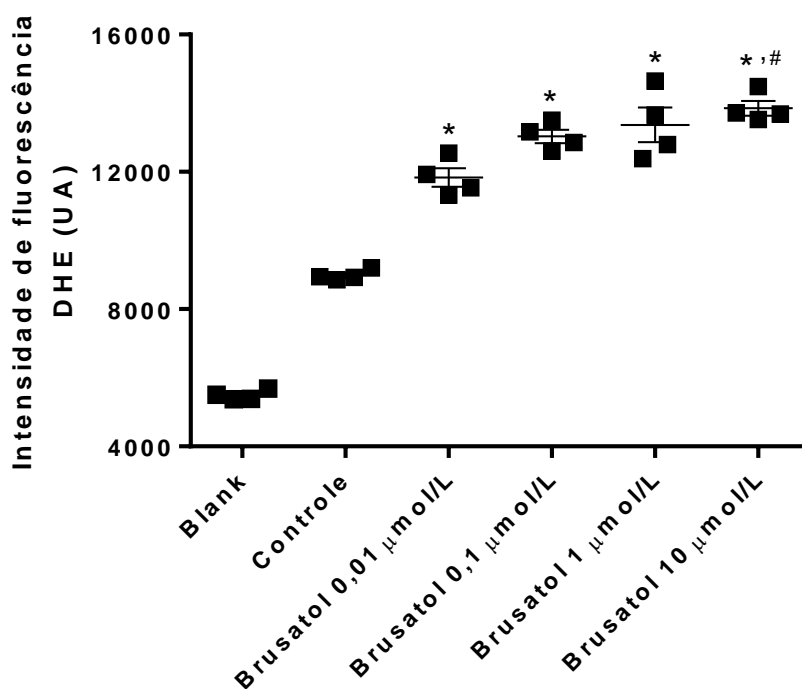


Figura 10: Intensidade de fluorescência emitida pelo DHE (2,5  $\mu\text{mol/L}$ ) em HUVEC, em condições basais, não incubadas (Controle) e após incubação por 45 minutos com Brusatol 0,01  $\mu\text{mol/L}$ , 0,1  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$  e 10  $\mu\text{mol/L}$ . O gráfico mostra os valores obtidos nos experimentos realizados (pontos) e a média  $\pm$  EPM destes valores.  $p^* < 0,05$  nas diferentes concentrações de Brusatol *versus* Controle. # Brusatol 10  $\mu\text{mol/L}$  *versus* Brusatol 0,01  $\mu\text{mol/L}$ . Aplicado teste One-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey.

## 5.5 Análise do efeito do Brusatol sobre a biodisponibilidade de NO em aortas de ratas prenhes e não prenhes, Wistar e SHR

Verificamos se o Brusatol seria capaz de alterar o a biodisponibilidade de NO estimulada pela acetilcolina em aortas de ratas normotensas e hipertensas. Observamos que aortas de ratas normotensas Wistar prenhes estimuladas com ACh apresentaram maior concentração de Nitrito quando comparadas as aortas de ratas Wistar não prenhes ( $17.72 \pm 3.47 \mu\text{mol/mg}$  de tecido úmido,  $n = 4$ ). Além disso, podemos verificar que a incubação com Brusatol foi capaz de reduzir a concentração de nitrito em aortas de ratas Wistar prenhes, mas não alterou em Wistar não prenhes (Figura 11).

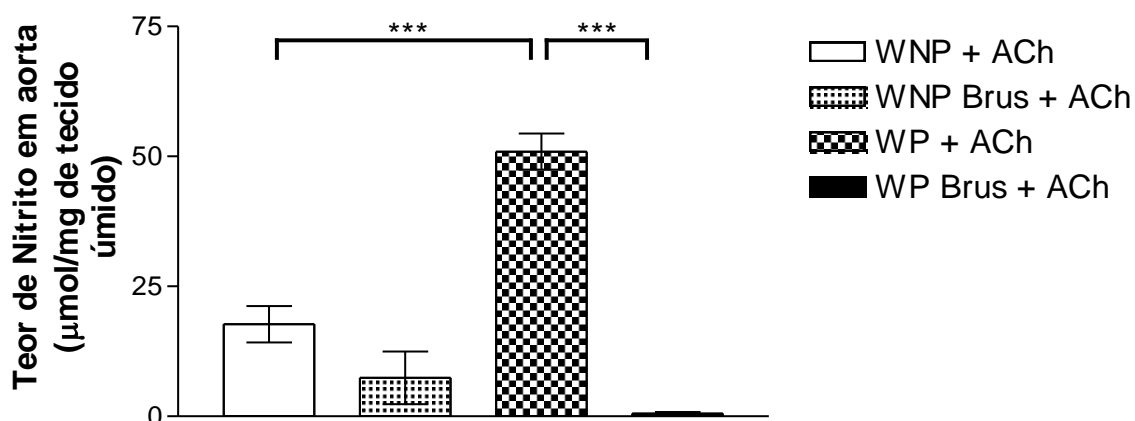


Figura 11: Concentração de nitrito em anéis de aorta de Wistar, estimulados com ACh ( $1 \mu\text{mol/L}$  por 5 minutos) na ausência e na presença de Brusatol ( $0,1 \mu\text{mol/L}$  por 30 minutos), ( $n=3-4$ ). As barras representam a média  $\pm$  SEM da diferença (delta) entre os valores obtidos. \*\*\*  $p < 0.001$  entre os grupos Wistar não prenhe ACh vs Wistar prenhe ACh e Wistar prenhe ACh vs Wistar prenhe Brusatol. Aplicado teste One-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey, a comparação entre prenhes e não prenhes no mesmo grupo foi realizada pelo teste t de *Student*.

Verificamos que não há diferença na concentração de nitrito entre aortas de ratas SHR prenhes e SHR não prenhes. O Brusatol não alterou a concentração de nitrito estimulada pela ACh em aortas de SHR não prenhes, mas reduziu em aortas de SHR prenhes (Figura 12).

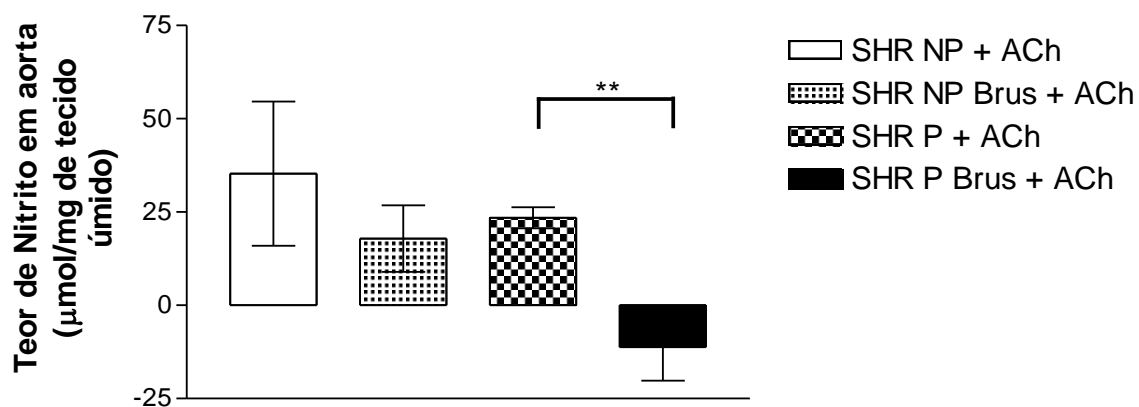


Figura 12: Concentração de nitrito em anéis de aorta de SHR, estimulados com ACh (1 µmol/L por 5 minutos) na ausência e na presença de Brusatol (0,1µmol/L por 30 minutos), (n=4-5). As barras representam a média ± SEM da diferença (delta) entre os valores obtidos. \*\*p=0,0065 entre aortas do grupo SHR prenhe ACh vs do grupo SHR prenhe incubado com Brusatol. Aplicado teste t de *Student*).

## 5.7 Efeito do Brusatol na Reatividade vascular à fenilefrina (PE) em aortas de ratas prenhes e não prenhes, Wistar e SHR

A incubação com Brusatol ( $0,1\mu\text{mol/L}$ ), um inibidor de Nrf2, foi capaz de aumentar a reatividade à PE em anéis de aorta de ratas Wistar não prenhes, quando comparadas aos anéis não incubados, controles. Aortas intactas de ratas Wistar prenhes incubadas com Brusatol apresentaram maior reatividade à fenilefrina quando comparadas as aortas não incubadas, controle (Figura 13).

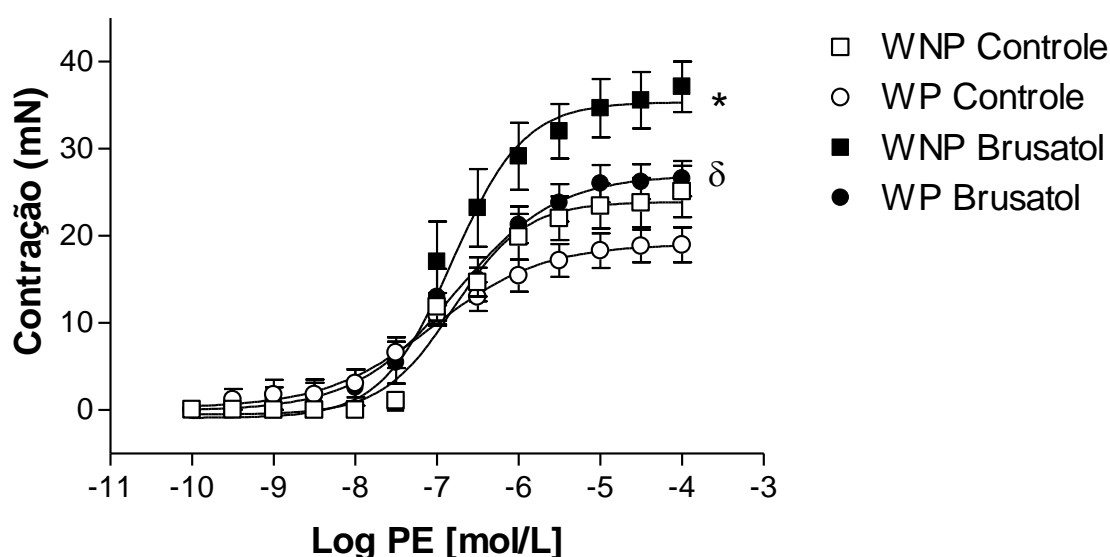


Figura 13: Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE,  $0,1\text{ nmol/L}$  a  $0,1\text{ mmol/L}$ ) em anéis de aorta com endotélio, controles (C) e incubados com Brusatol ( $0,1\mu\text{mol/L}$ ) por 30 minutos. Os experimentos foram feitos com anéis de aortas de ratas Wistar não prenhes (WNP) e prenhes (WP). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados ( $n = 5-6$ ). Os valores de  $E_{\text{max}}$  foram comparados entre aortas incubadas ou não com Brusatol nos grupos (Teste t de Student). \* $p < 0,05$  valores de  $E_{\text{max}}$  das curvas em anéis de ratas WNP B vs WNP C.  $\delta$   $p < 0,05$  valores de  $E_{\text{max}}$  das curvas em anéis de ratas WP B vs WP C.

Não observamos efeito do Brusatol sobre a reatividade vascular de anéis de aorta de ratas Wistar não prenhes sem endotélio quando comparado aos anéis não incubados, indicando que o efeito do Brusatol seria depende do endotélio (Figura 14).

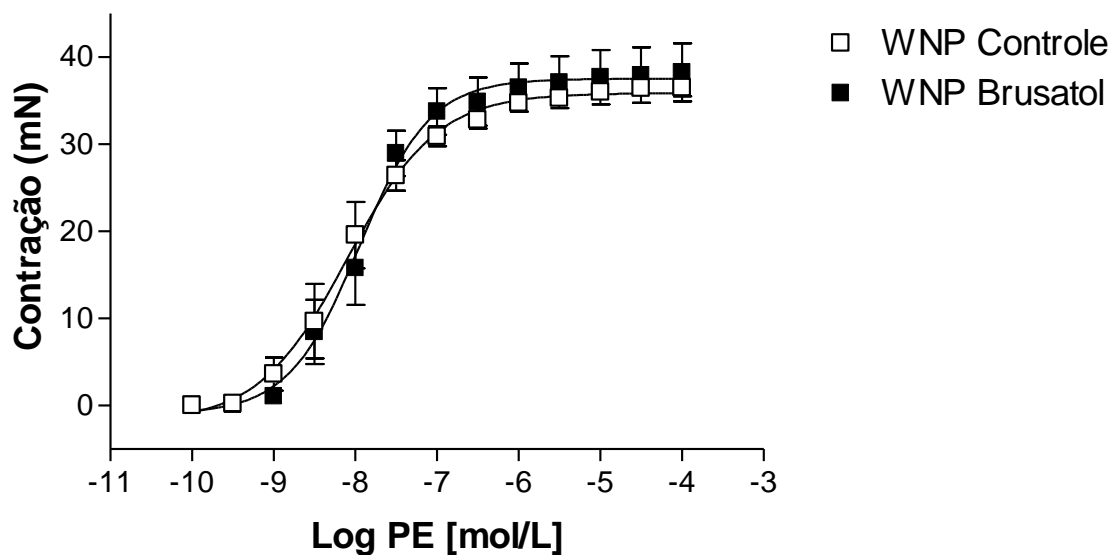


Figura 14: Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta sem endotélio, de Wistar não prenhes, não incubados (controle) ou incubados com Brusatol (0,1 $\mu$ mol/L) por 30 minutos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n = 6).

O Brusatol não alterou a reatividade à PE em anéis de aortas com endotélio de SHR não prenhes. O inibidor também não alterou a reatividade à PE em anéis de aorta com endotélio de SHR prenhes (Figura 15).

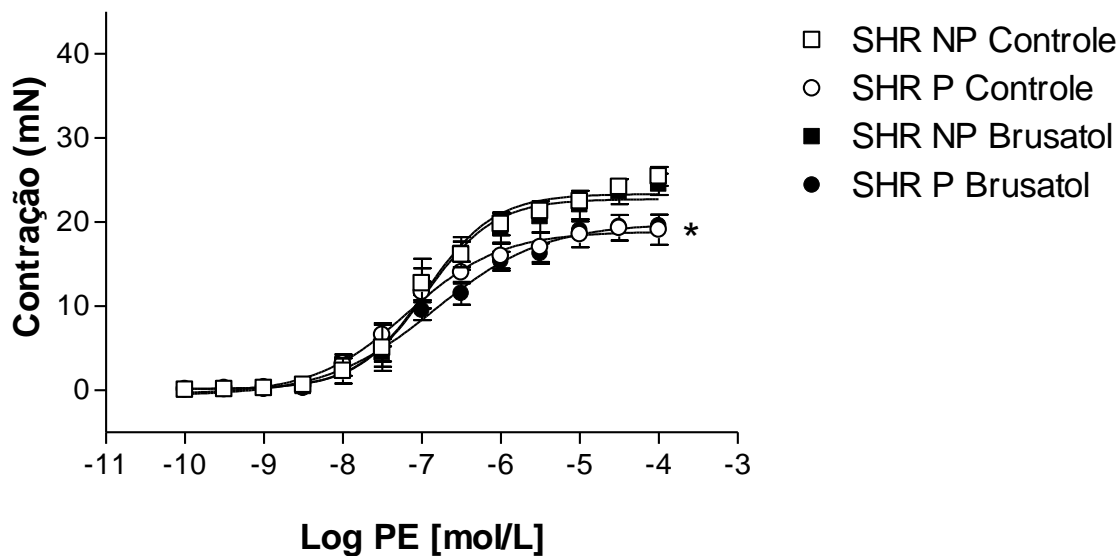


Figura 15: Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta com endotélio controles (C) e incubados com Brusatol (0,1 $\mu$ mol/L) por 30 minutos. Os experimentos foram feitos com anéis de aortas de ratos SHR não prenhes (SHR NP) e prenhes (SHR P). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n = 6-10). Os valores de Emax foram comparados entre aortas incubadas ou não com Brusatol nos grupos (Teste t de *Student*). \*p < 0,05 valores de Emax das curvas em anéis de ratos SHR NP C vs SHR P C.

## 5.8 Efeito do Brusatol na Reatividade vascular à Acetilcolina (ACh) em aortas de ratas prenhes e não prenhes, Wistar e SHR

Não observamos diferenças na reatividade à ACh entre aortas de ratas não prenhes e ratas prenhes. O efeito do Brusatol no relaxamento de aortas estimuladas por Acetilcolina (ACh) foi avaliado e observamos que a incubação com Brusatol não foi capaz de alterar o relaxamento induzido pela ACh em aortas de ratas Wistar, prenhes ou não prenhes (Figura 16).

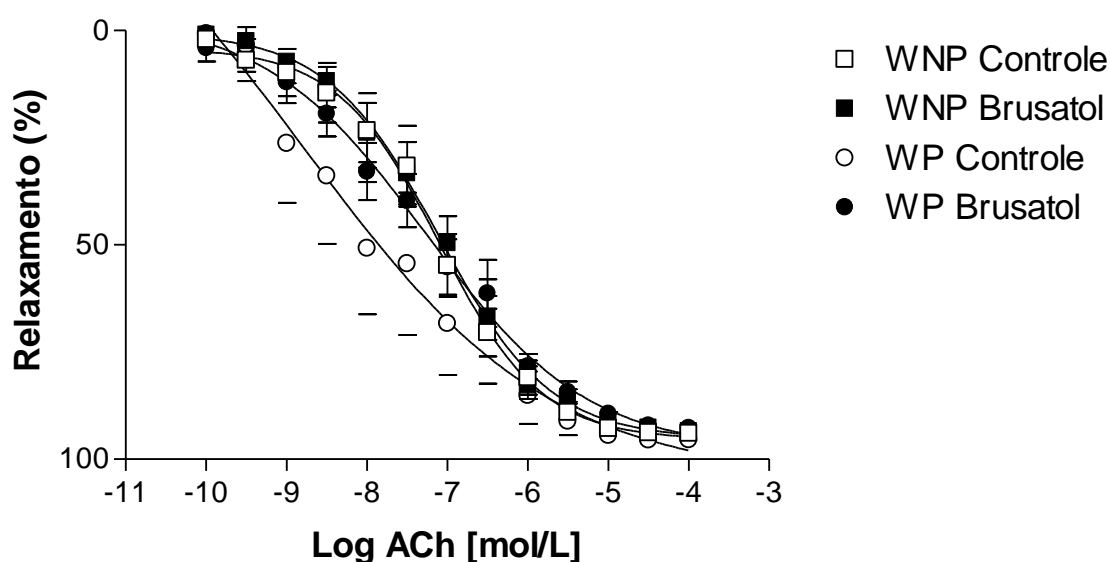


Figura 16: Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta com endotélio não incubados (controle) e incubados com Brusatol (0,1 $\mu$ mol/L) por 30 minutos. Os experimentos foram feitos com anéis de aortas de ratas Wistar não prenhes (WNP) e prenhes (WP). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n = 4-6).

A reatividade à ACh em aortas de SHR não é alterada pela prenhez. O efeito do Brusatol na reatividade à acetilcolina em aortas com endotélio de SHR não prenhes não foi observado, assim como em aortas com endotélio de ratas SHR prenhes. Observamos que a incubação com Brusatol também não promoveu diferença na reatividade à ACh entre aortas de SHR não prenhes e prenhes (Figura 17).

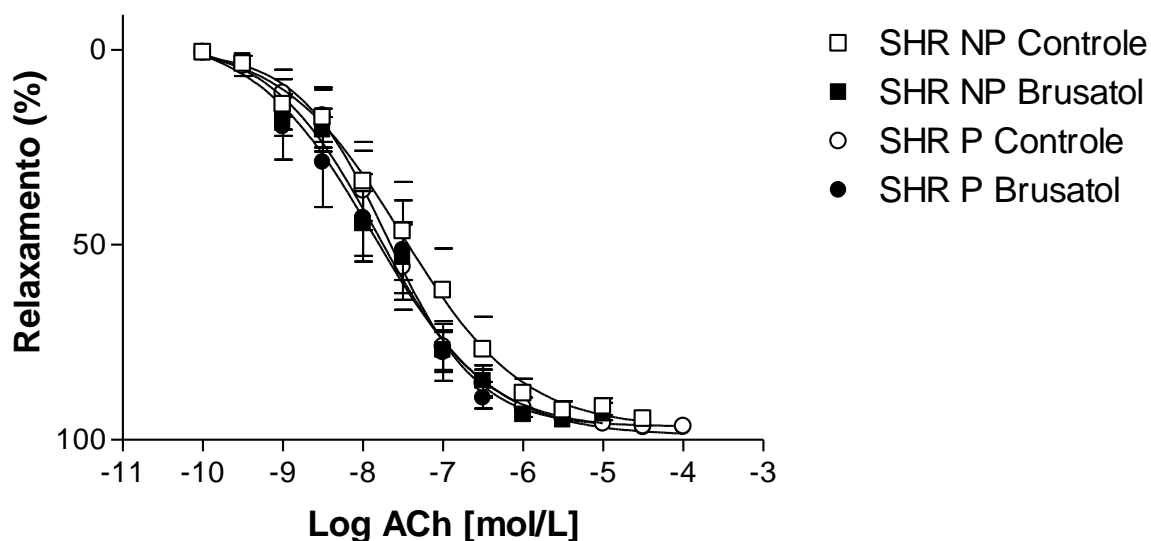


Figura 17: Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh, 0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta com endotélio controles e incubados com e incubados com Brusatol (0,1 $\mu$ mol/L) por 30 minutos. Os experimentos foram feitos com anéis de aortas de ratas SHR não prenhes (SHR NP) e prenhes (SHR P). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados (n = 6-7).

***DISCUSSÃO***

## 6 Discussão

Neste estudo mostramos que em aortas de ratas SHR prenhes há redução da expressão das subunidades regulatórias NOXO-1 e p47phox, porém em Wistar prenhes há redução somente da subunidade NOXO-1. A prenhez é uma condição capaz de aumentar a expressão do fator de transcrição Nrf2 e da enzima antioxidante SOD-2 em aortas de ratas Wistar. Em aortas de SHR observamos redução na expressão do inibidor Bach-1 e da enzima antioxidante NQO1 quando comparadas as ratas Wistar. Além disso, a prenhez foi capaz reduzir ainda mais a expressão de NQO1 em SHR. Não encontramos diferenças na expressão de Keap-1 e SOD-1 entre ratas normotensas e hipertensas, prenhes e não prenhes. Em células HUVEC observamos que a incubação com Brusatol foi capaz de aumentar a biodisponibilidade de ERO, sem alterar a biodisponibilidade de NO. Nossos experimentos bioquímicos mostraram que aortas de ratas Wistar prenhes apresentam maiores níveis de  $\text{NO}_2^-$  quando comparadas as aortas de ratas não prenhes e que a incubação com Brusatol reduziu os níveis de  $\text{NO}_2^-$  em aortas de ratas Wistar e SHR prenhes. Nossos resultados de experimentos funcionais mostraram que o Brusatol foi capaz de aumentar a reatividade à PE em aortas de ratas Wistar prenhes, porém não alterou a reatividade à PE em aortas de SHR, além de não alterar o relaxamento induzido pela ACh em aortas de ambas as linhagens.

Estudos prévios de nosso grupo mostraram que a prenhez é uma condição fisiológica que reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em aortas de SHR (TROIANO *et al.*, 2016), revertendo o desequilíbrio redox observado em aortas de SHR não prenhes. Como o Nrf2 é um fator redox-sensível, esta alteração associada à prenhez poderia modular a ativação do Nrf2 e de sistemas antioxidantes em vasos de SHR, contribuindo para maior biodisponibilidade de NO nestes vasos.

Avaliamos inicialmente, possíveis diferenças na expressão destas proteínas associadas a hipertensão. Os resultados obtidos na primeira parte deste estudo mostraram que não há diferença na expressão de NOXO-1 (Figura 1) entre aortas de ratas hipertensas (SHR) não prenhes e de ratas Wistar, assim como na expressão de NOX1 (TROIANO *et al.*, 2016).

Resultados prévios de nosso grupo mostraram que a expressão da NOX1 e de sua subunidade regulatória NOXO-1, não estão alteradas em aortas e leito mesentéricos de machos SHR (PERASSA *et al.*, 2016, GRATON *et al.*, 2019) quando comparada aos vasos de ratos normotensos. No entanto, a expressão de NOX2 e de sua subunidade regulatória p47phox estão aumentadas em aorta e leito mesentérico de machos SHR (PERASSA *et al.*, 2016, GRATON *et al.*, 2019) e apesar da expressão de NOX2 ser maior em aortas de fêmeas SHR do que em aortas de ratas normotensas (TROIANO *et al.*, 2016), nenhuma alteração da expressão de p47phox foi observada nestes vasos (Figura 2). Já a expressão de NOX4 não está alterada em vasos de machos SHR, mas está aumentada em aorta de fêmeas SHR não prenhes. A maior expressão de isoformas de NAD(P)H oxidase e de suas subunidades regulatórias associada a maior atividade enzimática medida em aorta e leito mesentérico, maior quantidade de ERO em células endoteliais de aorta e maior peroxidação lipídica em aortas de SHR (PERASSA *et al.*, 2016, TROIANO *et al.*, 2016, GRATON *et al.*, 2019), corroboram dados da literatura que mostram maior produção de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) ou de ERO em células de vasos sanguíneos periféricos e centrais de ratos hipertensos SHR (CAI e HARRISON, 2000, PARAVICINI *et al.*, 2004, LODI *et al.*, 2006, RAHALI, LI e ANAND-SRIVASTAVA, 2018).

Em condições fisiológicas, Nrf2 está constitutivamente expresso no citoplasma das células e associado ao Keap-1, uma proteína repressora de sua atividade. Radicais livres favorecem a translocação do Nrf2 para o núcleo e a ligação aos genes do elemento de resposta antioxidante (ARE) que codificam proteínas antioxidantes. Apesar do papel do Nrf2 no sistema cardiovascular não ser totalmente conhecido, evidências indicam que a menor atividade do Nrf2 contribui para o estresse oxidativo (*apud* da COSTA *et al.*, 2019). Resultados apresentados previamente por outros grupos mostraram redução da expressão proteica, ou de RNAm, de Nrf2 e Keap-1 em células vasculares (aortas ou artérias mesentéricas) de machos SHR e SHR-SP se comparadas as mesmas células de ratos normotensos (EREJUWA *et al.*, 2012, LI *et al.*, 2019, LOPES *et al.*, 2015, YAN e WANG, 2019). Interessantemente e diferente do esperado, não observamos alteração da expressão basal de Nrf2 (Figura 3) ou de sua proteína regulatória Keap-1 (Figura 4) em aortas de SHR se

comparadas às aortas de ratas Wistar não prenhes. Como não encontramos alterações na expressão destas proteínas, avaliamos possíveis alterações na expressão de Bach-1, outra proteína repressora da atividade de Nrf2 e observamos que em condição basal, não estimulada, a expressão de Bach-1 é menor em aortas de SHR não prenhes (Figura 5) do que em aortas de Wistar não prenhes. Nos estudos de Lopes *et al.*, (2015) foi observado que o estímulo de célula do músculo liso vascular com angiotensina II (Ang II) leva o aumento a expressão de Bach-1 apenas em SHR-SP se comparado ao rato normotenso WKY, indicando que esta proteína teria um papel importante na ativação deficiente do Nrf2 que ocorreria com o aumento do estresse oxidativo pela Ang II. Aumento da expressão de Bach-1 dependente do estímulo com Ang II também foi observado em tecido renal de camundongos (LOPES *et al.*, 2015, WEBER *et al.*, 2018).

Avaliamos também possíveis alterações na expressão de enzimas antioxidantes em aortas de ratas hipertensas. Nossos resultados mostraram redução da expressão de NQO1 (Figura 8), mas nenhuma alteração na expressão de SOD-1 (Figura 6) e de SOD-2 (Figura 7) em aortas de SHR não prenhes quando comparadas a aortas de Wistar não prenhes. Em vasos sanguíneos de ratos machos hipertensos (SHR-SP e SHR) há redução da expressão proteica, de RNAm ou da atividade de SOD-1, SOD-2 e NQO1 (LOPES *et al.*, 2015, MAJZUNOVA *et al.*, 2019).

Os resultados desta primeira parte de nosso estudo mostraram que, diferente do encontrado em vasos de ratos machos hipertensos, a hipertensão associada ao desequilíbrio redox em fêmeas não altera de forma significativa a expressão de muitas proteínas envolvidas nos mecanismos de modificações pós-traducionais associados ao Nrf2 em aortas. Não encontramos na literatura resultados prévios que comparassem diferenças entre vasos sanguíneos de machos e fêmeas hipertensos. Assim, como nossa contribuição, nesta primeira parte do estudo, mostramos que nenhuma alteração na expressão de Nrf2, Keap-1, SOD-1 e de SOD-2 é observada em aortas de fêmeas SHR, mas há redução da expressão de Bach-1 e de NQO1 nestes vasos.

Considerando que a prenhez é uma condição fisiológica que reduz a quantidade de ERO em células endoteliais, a produção de ERO e a expressão de NOX1, NOX2 e NOX4 em aortas de fêmeas SHR (TROIANO *et al.*, 2016),

contribuindo desta forma para reverter o desequilíbrio redox observado em vasos de SHR, levantamos a hipótese que a prenhez modularia a expressão de todas as proteínas acima citadas.

Observamos que a prenhez reduz a expressão de NOXO-1, mas não altera a expressão de p47phox em aortas de ratas Wistar, porém, interessantemente, em aortas de SHR, a prenhez reduz a expressão de NOXO-1 e de p47phox (Figuras 1 e 2 respectivamente). A redução da expressão de NOXO-1 em aortas de ratas prenhes foi mais significativa em SHR do que em ratas Wistar (Figura 1). A redução das subunidades regulatórias NOXO-1 e p47phox em aortas de SHR prenhes poderia ser associada a menor expressão das isoformas NOX1 e NOX2 e a menor produção de ERO (TROIANO *et al.*, 2016) encontrada nestes vasos, reforçando a sugestão que a prenhez, como processo fisiológico, é capaz de reduzir a geração ERO em células de vasos sanguíneos periféricos, principalmente de SHR.

Em aortas de ratas normotensas prenhes observamos aumento da expressão de Nrf2 (Figuras 3) e da expressão de SOD-2 (Figura 7), mas sem alteração da expressão de Keap-1, Bach-1 (Figuras 4 e 5), SOD-1 (Figura 6) ou de NQO1 (Figura 8), sugerindo que a prenhez em ratas normotensas, poderia aumentar a expressão/atividade de alguns sistemas antioxidantes, como SOD-2, associados a maior expressão/atividade de Nrf2 em aorta. Também foi observado aumento da atividade de catalase em leito mesentérico de ratas normotensas prenhes (OGNIBENE *et al.*, 2012), e de SOD-2, mas não de SOD-1, em endométrio de ovelhas ao final da prenhez (AL-GUBORY, FAURE e GARREL, 2017). Ao contrário do esperado, não observamos aumento, mas redução apenas da expressão da enzima antioxidante de NQO1 (Figura 8), sem alteração de expressão de SOD-1 e SOD-2 em aortas de SHR prenhes. Menor atividade de SOD, mas aumento na atividade de glutathione redutase (GPx), foi também observada em leito mesentérico de SHR prenhes (OGNIBENE *et al.*, 2012). O mecanismo envolvido no efeito da prenhez sobre as enzimas antioxidantes é para nós até o momento desconhecido, mas os resultados apresentados sugerem claramente que em ratas hipertensas, a prenhez não seria capaz de induzir o aumento da atividade de enzimas antioxidantes.

Juntos os resultados obtidos nas primeiras partes de nosso estudo mostram que a prenhez modula a biodisponibilidade de ERO em vasos sanguíneos, mas de forma distinta entre ratas normotensas e hipertensas. Nossos dados sugerem que enquanto em aortas de ratas normotensas prenhes a maior expressão/atividade de enzimas antioxidantes parece ser mais relevante, em aortas de SHR prenhes, a menor expressão e atividade de enzimas produtoras de ERO, isoformas de NAD(P)H, NOX1 e NOX2, e subunidades regulatórias, NOXO-1e p47phox, seriam mais importantes para manutenção da menor biodisponibilidade vascular de ERO.

Para confirmarmos esta hipótese, realizamos estudo bioquímico e funcionais utilizando o Brusatol, um inibidor de Nrf2 (CAI *et al.*, 2018, BAI *et al.*, 2020). Inicialmente, verificamos que a pré-incubação de HUVEC com diferentes concentrações de Brusatol não alterou a quantidade de NO, mas promoveu um aumento da quantidade de ERO nestas células (Figuras 9 e 10, respectivamente). O efeito do Brusatol sobre a biodisponibilidade de NO também foi avaliado em aorta. Verificamos que os níveis de  $\text{NO}_2^-$  estão aumentados em aortas de ratas Wistar prenhes, corroborando a sugestão de que a atividade da eNOS estaria aumentada em vasos sanguíneos de ratas prenhes (BALLEJO *et al.*, 2002, ZANCHETA *et al.*, 2016, TROIANO *et al.*, 2016). A pré-incubação de aortas com Brusatol (0,1 $\mu\text{mol/L}$ ) reduziu a quantidade de  $\text{NO}_2^-$  estimulada por ACh apenas em aortas de ratas Wistar prenhes (Figura 11), sugerindo que nestes vasos, a atividade do Nrf2 estaria associada a maior biodisponibilidade de NO. Esta sugestão é reforçada pelos nossos resultados que mostraram que a expressão de Nrf2, assim como de SOD-2, está aumentada em aortas de ratas Wistar prenhes.

Em aortas de SHR prenhes, a quantidade de  $\text{NO}_2^-$  estimulada por ACh não foi diferente da encontrada em aortas de SHR não prenhes (Figura 12), apesar das concentrações de NO basal, ser maior em células endoteliais isoladas de aortas de SHR prenhes (TROIANO *et al.*, 2016). Em aortas de SHR não prenhes, o Brusatol não alterou a quantidade de  $\text{NO}_2^-$  estimulada por ACh, mas reduziu em aortas de SHR prenhes sugerindo participação da via do Nrf2 na prenhez (Figura 12).

Nos experimentos funcionais, para avaliação da reatividade de aortas, o Brusatol aumentou o efeito contrátil à PE em aortas de ratas não prenhes e

prenhes normotensas (Figura 13), efeito este que não foi observado em aortas sem endotélio (Figura 14), sugerindo que a atividade de Nrf2 participa do efeito modulador do endotélio sobre a reatividade à PE, o qual depende da biodisponibilidade de NO. Na presença de Brusatol, inibidor da atividade de Nrf2, a quantidade de ERO (Figura 10) foi aumentada em HUVEC. Considerando que este mesmo efeito ocorreria em células endoteliais de aortas de ratas, conseqüentemente, menor modulação endotélio-dependente sobre a resposta contrátil seria esperada, ou seja, na presença do Brusatol, a maior quantidade de  $O_2^{\cdot-}$  reduziria a biodisponibilidade de NO e seu efeito anti-contrátil, reduzindo assim o efeito modulador do endotélio e/ou aumentando a contração das aortas ao agonista  $\alpha 1$ -adrenérgico.

A presença de Brusatol, no entanto, não aboliu a diferença de reatividade entre aortas de ratas prenhes e não prenhes (Figura 13), sugerindo que este mecanismo não seria responsável pela maior modulação endotelial e menor reatividade de aortas à PE observada em ratas prenhes. Por outro lado, considerando que a maior expressão Nrf2 seria associada a maior atividade de Nrf2 em aortas de ratas Wistar prenhes, possivelmente uma maior concentração de Brusatol seria necessária para inibir totalmente sua atividade e abolir a diferença de reatividade entre aortas de prenhes e não prenhes. Até o momento não realizamos um experimento funcional utilizando uma maior concentração de Brusatol para testarmos esta hipótese, mas avaliando as curvas concentração-efeito (Figura 13) pode ser observado que a concentração de Brusatol usada foi suficiente para igualar a contração entre aortas de ratas prenhes e de aortas de ratas não prenhes não incubadas com Brusatol, sugerindo a participação do Nrf2 na hiporeatividade de aortas de ratas prenhes à PE. Até o momento nossos resultados sugerem que a atividade de Nrf2, que é inibida pelo Brusatol, participa do efeito modulador do endotélio sobre a reatividade à PE, e que esta participação seria maior em aortas de ratas prenhes, uma vez que a mesma concentração de Brusatol reverteu apenas parcialmente a maior modulação endotelial sobre contração vascular à PE observada na prenhez (BALLEJO *et al.*, 2002, ZANCHETA *et al.*, 2015, TROIANO *et al.*, 2016). Interessantemente, ausência de efeito do Brusatol sobre a reatividade à PE foi observada em aortas de SHR não prenhes e prenhes (Figura 15), reforçando nossos achados prévios que sugerem que o

Nrf2, assim como a expressão/atividade de enzimas antioxidantes, não teria, em aortas de SHR prenhes, participação tão importante nos mecanismos envolvidos na hiporeatividade à PE como observado em aortas de Wistar prenhes.

Estudos prévios mostraram que a reatividade de aortas de ratas Wistar ou SHR, à ACh, assim como a outros vasodilatadores, não está alterada na prenhez (BALLEJO *et al.*, 2002, ZANCHETA *et al.*, 2015). O Brusatol não alterou significativamente o efeito vasodilatador da ACh em aortas dos grupos avaliados (Figuras 16 e 17). Este resultado corrobora a sugestão que a hiporeatividade de aortas de ratas prenhes à PE seria consequente de um maior efeito modulador do NO sobre as contrações vasculares dependentes de maior atividade da via PI3K-Akt e fosforilação da eNOS (ZANCHETA *et al.*, 2015), mecanismo distinto do ativado pela ACh.

***CONCLUSÃO***

## 7 Conclusão

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a atividade da via de sinalização do Nrf2 pode estar aumentada, favorecendo a maior atividade de enzimas antioxidantes como a SOD-2, que contribuiria para maior biodisponibilidade de NO e maior modulação endotélio-dependente da contração vascular à PE em aortas de ratas normotensas prenhes. No entanto, em aortas de SHR prenhes, este mecanismo parecer não ser mais importante que a redução da atividade de isoformas NOX e de suas subunidades regulatórias que contribuiriam para menor geração de  $O_2^{\cdot-}$  e consequentemente, maior biodisponibilidade de NO e maior modulação endotélio-dependente da contração vascular à PE associada à prenhez.

# ***REFERÊNCIAS***

## 8 Referências

- A. A. Javkhedkar, Y. Quiroz, B. Rodriguez-Iturbe, N. D. Vaziri, M. F. Lokhandwala, A. A. Banday, Resveratrol restored Nrf2 function, reduced renal inflammation, and mitigated hypertension in spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 308 (2015), R840-6. <http://doi:10.1152/ajpregu.00308.2014>
- A. K. Jaiswal, Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression, *Free Radical Biology and Medicine.* 36 (2004), 1199–1207 <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.074>
- A. Olayanju, I. M. Copple, H. K. Bryan, et al., Brusatol provokes a rapid and transient inhibition of Nrf2 signaling and sensitizes mammalian cells to chemical toxicity-implications for therapeutic targeting of Nrf2, *Free Radic Biol Med.* 78 (2015), 202-12. <http://doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.003>
- A. V. Souza, J. S. Giolo, R. R. Teixeira, D. D. Vilela, L. G. Peixoto, A. B. Justino, D. C. Caixeta, G. M. Puga, F. S. Espindola, Salivary and Plasmatic Antioxidant Profile following Continuous, Resistance, and High-Intensity Interval Exercise: Preliminary Study, *Oxid Med Cell Longev.* 2019 (2019), 5425021. <http://doi.org/10.1155/2019/5425021>
- American college of obstetricians and gynecologists; task force on hypertension in pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy, *Obstet Gynecol.* 122 (2013), 1122-1131. <http://doi:10.1097/01.AOG.0000437382.03963.88>
- B. Yan, J. Wang, UBIAD1 expression is associated with cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats, *Molecular Medicine Reports.* 19 (2019), 651-659. <http://doi:10.3892/mmr.2018.9693>
- C. M. Wong, C. L. Au, S. Y. Tsang, C. W. Lau, X. Yao, A. C-k. Chung, Role of inducible nitric oxide synthase in endothelium-independent relaxation to raloxifene in rat aorta, *British Journal Of Pharmacology.* 174 (2017), 718-733. <http://doi.org/10.1111/bph.13733>
- D. Ren, N. F. Villeneuve, T. Jiang, T. Wu, A. Lau, H.A. Toppin, D. D. Zhang, Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108 (2011), 1433-8. <http://doi:10.1073/pnas.1014275108>
- D. Zancheta, J.A. Troiano, S.R. Potje, P. Cavalari, D.H. Sumida, C. Antoniali, The PI3K–Akt–eNOS pathway is involved in aortic yproactivity to Phenylephrine

associated with late pregnancy in spontaneously hypertensive rats, *Life Sciences*. 122 (2015), 78–86. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.014>

D.T. Ognibene, L.C. Carvalho, C.A. Costa, A.P. Rocha, R.S. de Moura, A. Resende, Role of renin-angiotensin system and oxidative status on the maternal cardiovascular regulation in spontaneously hypertensive rats, *American journal of hypertension*. 25 (2012), 498-504. <http://doi:10.1038/ajh.2011.253>

F. Lodi, A. Cogolludo, J. Duarte, L. Moreno, A. Coviello, M. P de Bruno, R. Vera, M. Galisteo, R. Jiménez, J. Tamargo, Increased NADPH oxidase activity mediates spontaneous aortic tone in genetically hypertensive rats, *European Journal Of Pharmacology*. 544 (2006), 97-103. <http://doi:10.1016/j.ejphar.2006.06.028>

G. Ballejo, T.A. Barbosa, E.B. Coelho, C. Antoniali, M.C.O. Salgado, Pregnancy-associated increase in rat systemic arteries endothelial nitric oxide production diminishes vasoconstrictor but does not enhance vasodilator responses, *Life Sciences*. 70 (2002), 3131–3142. [http://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)01576-x](http://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)01576-x)

G. J. Weber, B. Purkayastha, L. Ren, S. Pushpakumar, U. Sem, Hypertension exaggerates renovascular resistance via miR-122-associated stress response in aging, *Journal Of Hypertension*. 36 (2018), 2226-2236. <http://doi:10.1097/HJH.0000000000001770>

H. Cai, D. G. Harrison, Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress, *Circulation Research*. 87 (2000), 840-844. <http://doi:10.1161/01.res.87.10.840>

J. Li, X. Teng, S. Jin, J. Dong, Q. Guo, D. Tian, Y. Wu, Hydrogen sulfide improves endothelial dysfunction by inhibiting the vicious cycle of NLRP3 inflammasome and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats, *Journal Of Hypertension*. 37 (2019), 1633-1643. <http://doi:10.1097/HJH.0000000000002101>

J.A. Troiano, S.R. Potje, M.E. Graton, P. Cavalari, A.A.F. Pereira, G.T. Vale, A.C.M.S. Nakamune, D.H. Sumida, C.R. Tirapelli, C. Antoniali, Decreased reactive oxygen species production and NOX1, NOX2, NOX4 expressions contribute to hyporeactivity to phenylephrine in aortas of pregnant SHR, *Life Sci*. 144 (2016), 178–184. <http://doi:10.1016/j.lfs.2015.12.011>

J.S. Possomato-Vieira, R.A. Khalil, Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia, *Advances in Pharmacology*. 77(2016), 361-431. <http://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.04.008>

K. H. Al-gubory, P. Faure, C. Garrel, Different enzymatic antioxidative pathways operate within the sheep caruncular and intercaruncular endometrium throughout the estrous cycle and early pregnancy, *Theriogenology*. 99 (2017), 111-118. <http://doi10.1016/j.theriogenology.2017.05.017>

K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel, M. Yamamoto, Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain, *Genes Dev.* 13 (1999), 76-86. <http://doi.org/10.1101/gad.13.1.76>

K.W. Kang, S. J. Lee, S. G. Kim, Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress, *Antioxid. Redox Signal.* 7 (2005), 1664-1673. <http://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1664>

L. M. Amaral, L.C. Pinheiro, D.A. Guimaraes, A.C.t. Palei, J. T. Sertório, R. L. Portella, J. E. Tanus-Santos, Antihypertensive effects of inducible nitric oxide synthase inhibition in experimental pre-eclampsia, *Journal Of Cellular And Molecular Medicine.* 17 (2013), 1300-1307. <http://doi:10.1111/jcmm.12106>

L. M. S. d S. Rugolo, M. R. Bentlin, C. E. P. Trindade, Preeclampsia: Effect on the fetus and newborn. 12 (2011), 198–206. [http:// DOI: https://doi.org/10.1542/neo.12-4-e198](http://DOI:https://doi.org/10.1542/neo.12-4-e198)

L. WU, M. H. NOYAN ASHRAF, M. FACCI, R. Wang, P. G. Paterson, A. Ferrie, B. H. J. Juurlink, Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004), 7094-9. <http://doi:10.1073/pnas.0402004101>

L.A. Perassa, M.E. Graton, S.R. Potje, J.A. Troiano, M.S. Lima, G.T. Vale, A.A. Pereira, A.C. Nakamune, D.H. Sumida, C.R. Tirapelli, L.M. Bendhack, C. Antoniali, Apocynin reduces blood pressure and restores the proper function of vascular endothelium in SHR, *Vascul Pharmacol.* 87 (2016), 38-48. <http://doi:10.1016/j.vph.2016.06.005>

M. Balan, S. Pal, Novel CXCR3-B Chemokine Receptor-induced Growth-inhibitory 20 Signal in Cancer Cells Is Mediated through the Regulation of Bach-1 Protein and Nrf2 21 Protein Nuclear Translocation, *The Journal of Biological Chemistry.* 289 (2014), 3126-37. <http://doi:10.1074/jbc.M113.508044>

M. M. Diaz, O. L. Bocanegra, R. R. Teixeira, S. S. Soares, F. S. Espindola, Salivary nitric oxide and alpha-amylase as indexes of training intensity and load, *Int J Sports Med.* 34 (2013), 8–13. <http://doi:10.1055/s-0032-1316318>

M. Majzunova, M. Kvandova, A. Berenyiova, P. Balis, I. Dovinova, S. Cacanyiova, Chronic NOS Inhibition Affects Oxidative State and Antioxidant Response Differently in the Kidneys of Young Normotensive and Hypertensive Rats, *Oxidative Medicine And Cellular Longevity.* 2019 (2019), 5349398. <http://doi:10.1155/2019/5349398>

M.E. Graton, S.R. Potje, J.A. Troiano, G.T. Vale, L.A. Perassa, A.C. M. S. Nakamune, C.R. Tirapelli, L.M. Bendhack, C. Antoniali, Apocynin alters redox

signaling in conductance and resistance vessels of spontaneously hypertensive rats. *Free Radic Biol.* 134 (2019), 53-63. <http://doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.026>

N. K. Dhariwal, G. C. Lynde, Update in the Management of Patients with Preeclampsia. *Anesthesiology Clinics.* 35 (2017), 95–106. <http://doi:10.1016/j.anclin.2016.09.009>

N. Kweider, B. Huppertz, M. Kadyrov, W. Rath, T. Thomas Pufe, C.J. Wruck, A possible protective role of Nrf2 in preeclampsia, *Annals of Anatomy.* 196 (2014), 268–277. <http://doi.org/10.1016/j.aanat.2014.04.002>

O. O. Erejuwa, S. A. Sulaiman, M. S. Ab. Wahab, K. N. S. Sirajudeen, S. Salleh, S. Gurtu, Honey Supplementation in Spontaneously Hypertensive Rats Elicits Antihypertensive Effect via Amelioration of Renal Oxidative Stress, *Oxidative Medicine And Cellular Longevity.* 2012 (2012), 374037. <http://doi:10.1155/2012/374037>

O.H. Lowry, N.J. Roserbrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.

R. A. Lopes, K. B. Neves, R. C. Tostes, A.C. Montezano, R. M. Touyz, Downregulation of Nuclear Factor Erythroid 2–Related Factor and Associated Antioxidant Genes Contributes to Redox-Sensitive Vascular Dysfunction in Hypertension, *Hypertension.* 66 (2015), 1240-1250. <http://doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06163>

R. M. da Costa, D. Rodrigues, C. A. Pereira, J. F. Silva, J. V. Alves, N. S. Lobato, R. C. Tostes, Nrf2 as a Potential Mediator of Cardiovascular Risk in Metabolic Diseases, *Front Pharmacol.* 10 (2019), 382. <http://doi:10.3389/fphar.2019.00382>

S. A. Cai, N. Hou, G. J. Zhao, X. W. Liu, Y. Y. He, H. L. Liu, Y. Q. Huan, L. R. Li, Y. Huang, C. W. Ou, C. F. Luo, M. S. Chen, Nrf2 Is a Key Regulator on Puerarin Preventing Cardiac Fibrosis and Upregulating Metabolic Enzymes UGT1A1 in Rats, *Front Pharmacol.* 9 (2018), 540. <http://doi:10.3389/fphar.2018.00540>

S. Baumwell, S. A. Karumanchi, Pre-Eclampsia: Clinical Manifestations and Molecular Mechanisms, *Nephron Clinical Practice.* 106 (2007), c72-81. <http://doi:10.1159/000101801>

S. Dhakshinamoorthy, A.K. Jain, D.A. Bloom, A.K. Jaiswal, Bach1 Competes with Nrf2 Leading to Negative Regulation of the Antioxidant Response Element (ARE)-mediated NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 Gene Expression and Induction in Response to Antioxidants, *The Journal of Biological Chemistry.* 280 (2005), 16891–16900. <http://doi.org/10.1074/jbc.m500166200>

S. Goulopoulou, S. T. Davidge, Molecular mechanisms of maternal vascular dysfunction in preeclampsia, *Trends in Molecular Medicine*. 21 (2015), 88-97. <http://doi:10.1016/j.molmed.2014.11.009>

S. Rahali, Y. Li, M. B. Anand-Srivastava, Contribution of oxidative stress and growth factor receptor transactivation in natriuretic peptide receptor C-mediated attenuation of hyperproliferation of vascular smooth muscle cells from SHR, *Plos One*. 13 (2018), e0191743. <http://doi:10.1371/journal.pone.0191743>

S. Wind, K. Beuerlein, M. E. Armitage, A. Taye, A. H.s. Kumar, D. Janowitz, C. Neff, A. M. Shah, K. Wingler, H. Schmidt, Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged 5 spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition, *Hypertension*. 56 (2010), 490–497. <http://doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.149187>

T. M. Paravicini, S. Chrissobolis, G. R. Drummond, C. G. Sobey, Increased NADPH-Oxidase Activity and Nox4 Expression During Chronic Hypertension Is Associated With Enhanced Cerebral Vasodilatation to NADPH In Vivo, *Stroke*. 35 (2004), 584-589. <http://doi:10.1161/01.STR.0000112974.37028.58>

T. V. Pinheiro, S. Brunetto, J. G. Ramos, J. R. Bernardi, M. Z. Goldani, Hypertensive disorders during pregnancy and health outcomes in the offspring: a systematic review, *J. Dev. Orig. Health Dis*. 7 (2016), 391-407. <http://doi.org/10.1017/s2040174416000209>

W. Hur, N. S. Gray, Small molecule modulators of antioxidant response pathway. *Curr. Opin. Chem*. 15 (2011), 162–173. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.12.009>

Y. Bai, D. Yan, H. Zhou, W. Li, Y. Lou, X. Zhou, L. Qian, C. Xiao, Betulinic acid attenuates lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity in the rat aorta by modulating Nrf2 antioxidative function, *Inflammopharmacology*. 28 (2020), 165-174. <http://doi.org/10.1007/s10787-019-00622-4>

Y. Shan, R. W. Lambrecht, T. Ghaziani, S. E. Donohue, L. Herbert, H. L. Bonkovsky, Role of Bach-1 in Regulation of Heme Oxygenase-1 in Human Liver Cells. Insights From Studies With Small Interfering RNAs, *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (2004), 51769-74. <http://doi:10.1074/jbc.M409463200>

***APÊNDICE***

## 9 Apêndice

### 1. Valores numéricos dos resultados obtidos nos experimentos de Western Blot

**Tabela 1- Valores dos resultados apresentados na Figura 1, referentes à expressão de NOXO-1 em aortas dos diferentes grupos**

<b>Grupos</b>	<b>Valores em Unidade Arbitrárias (UA)</b>	<b>Número amostral</b>
Wistar Não Prenhe	1,068 ± 0,038	9
Wistar Prenhe	0,846 ± 0,076	9
SHR Não Prenhe	0,898 ± 0,046	9
SHR Prenhe	0,454 ± 0,056	8

**Tabela 2- Valores dos resultados apresentados na Figura 2, referentes a expressão de p47phox em aortas dos diferentes grupos**

<b>Grupos</b>	<b>Valores em Unidade Arbitrárias (UA)</b>	<b>Número amostral</b>
Wistar Não Prenhe	1,102 ± 0,081	4
Wistar Prenhe	0,947 ± 0,039	5
SHR Não Prenhe	0,942 ± 0,015	5
SHR Prenhe	0,647 ± 0,061	5

**Tabela 3- Valores dos resultados apresentados na Figura 3, referentes à expressão de Nrf2 em aortas dos diferentes grupos**

<b>Grupos</b>	<b>Valores em Unidade Arbitrárias (UA)</b>	<b>Número amostral</b>
Wistar Não Prenhe	0,785 ± 0,094	5
Wistar Prenhe	1,128 ± 0,038	5
SHR Não Prenhe	0,844 ± 0,062	5
SHR Prenhe	0,712 ± 0,137	4

**Tabela 4- Valores dos resultados apresentados na Figura 4, referentes à expressão de Keap-1 em aortas dos diferentes grupos**

<b>Grupos</b>	<b>Valores em Unidade Arbitrárias (UA)</b>	<b>Número amostral</b>
Wistar Não Prenhe	0,948 ± 0,053	5
Wistar Prenhe	0,952 ± 0,088	4
SHR Não Prenhe	0,872 ± 0,069	4
SHR Prenhe	0,773 ± 0,109	4

**Tabela 5- Valores dos resultados apresentados na Figura 5, referentes à expressão de Bach-1 em aortas dos diferentes grupos**

<b>Grupos</b>	<b>Valores em Unidade Arbitrárias (UA)</b>	<b>Número amostral</b>
Wistar Não Prenhe	0,485 ± 0,035	5
Wistar Prenhe	0,439 ± 0,023	6
SHR Não Prenhe	0,366 ± 0,026	5
SHR Prenhe	0,311 ± 0,022	4

**Tabela 6- Valores dos resultados apresentados na Figura 6, referentes à expressão de SOD-1 em aortas dos diferentes grupos**

<b>Grupos</b>	<b>Valores em Unidade Arbitrárias (UA)</b>	<b>Número amostral</b>
Wistar Não Prenhe	0,688 ± 0,018	5
Wistar Prenhe	0,718 ± 0,059	4
SHR Não Prenhe	0,707 ± 0,049	4
SHR Prenhe	0,626 ± 0,026	4

**Tabela 7- Valores dos resultados apresentados na Figura 7, referentes à expressão de SOD-2 em aortas dos diferentes grupos**

<b>Grupos</b>	<b>Valores em Unidade Arbitrárias (UA)</b>	<b>Número amostral</b>
Wistar Não Prenhe	1,127 ± 0,035	5
Wistar Prenhe	1,443 ± 0,089	4

SHR Não Prenhe	1,213 ± 0,064	5
SHR Prenhe	1,176 ± 0,056	5

**Tabela 8- Valores dos resultados apresentados na Figura 8, referentes à expressão de NQO1 em aortas dos diferentes grupos**

<b>Grupos</b>	<b>Valores em Unidade Arbitrárias (UA)</b>	<b>Número amostral</b>
Wistar Não Prenhe	1,131 ± 0,045	5
Wistar Prenhe	0,948 ± 0,071	4
SHR Não Prenhe	0,899 ± 0,055	5
SHR Prenhe	0,435 ± 0,059	5

## 2. Valores numéricos dos resultados obtidos nos experimentos fluorimétricos

**Tabela 9- Valores dos resultados apresentados na Figura 9, referentes à intensidade de fluorescência do DAF-2/DA em HUVEC após a incubação com diferentes concentrações de Brusatol**

<b>Concentração de Brusatol (µmol/L)</b>	<b>Intensidade de fluorescência (UA)</b>	<b>Número amostral</b>
Controle	8460 ± 281,3	4
0,01 µmol/L	8833 ± 162,0	4
0,1 µmol/L	9040 ± 199,2	4
1 µmol/L	9215 ± 335,2	4
10 µmol/L	8793 ± 302,2	4

**Tabela 10- Valores dos resultados apresentados na Figura 10, referentes à intensidade de fluorescência do DHE em HUVEC após a incubação com diferentes concentrações de Brusatol**

<b>Concentração de Brusatol (µmol/L)</b>	<b>Intensidade de fluorescência (UA)</b>	<b>Número amostral</b>
Controle	8983 ± 75,50	4

0,01 µmol/L	11834 ± 268,2	4
0,1 µmol/L	13030 ± 195,6	4
1 µmol/L	13370 ± 501,6	4
10 µmol/L	13852 ± 216,3	4

**3. Valores numéricos dos resultados obtidos nos experimentos para quantificação de Nitrito utilizando o Método de Griess em aortas dos diferentes grupos**

**Tabela 11- Valores dos resultados apresentados na Figura 11, referentes a concentração de nitrito quantificada em aortas dos diferentes grupos**

<b>Grupos</b>	<b>Concentração de Nitrito em aortas (µmol/mg de tecido úmido)</b>	<b>Número amostral</b>
Wistar Não Prenhe + ACh	17,72 ± 3,47	4
Wistar Prenhe + ACh	50,93 ± 3,48	3
Wistar Não Prenhe + ACh + Brusatol	7,434 ± 5,06	4
Wistar Prenhe + ACh + Brusatol	0,522 ± 0,29	3

**Tabela 12- Valores dos resultados apresentados na Figura 12, referentes a concentração de nitrito quantificada em aortas dos diferentes grupos**

<b>Grupos</b>	<b>Concentração de Nitrito em aortas (µmol/mg de tecido úmido)</b>	<b>Número amostral</b>
SHR Não Prenhe + ACh	35,29 ± 19,37	5
SHR Prenhe + ACh	23,44 ± 2,85	4
SHR Não Prenhe + ACh + Brusatol	17,88 ± 8,94	5
SHR Prenhe + ACh + Brusatol	0	5

**4. Valores numéricos dos resultados obtidos nos experimentos de reatividade vascular.**

**Tabela 13- Valores dos resultados apresentados na Figura 13, referentes ao Emax das curvas concentração-efeito para fenilefrina em aortas dos diferentes grupos**

<b>Grupos</b>	<b>Valores de Emax (mN)</b>	<b>Número amostral</b>
Wistar Não Prenhe Controle	25,10 ± 2,97	6
Wistar Prenhe Controle	18,98 ± 2,01	5
Wistar Não Prenhe Brusatol	37,13 ± 2,89	6
Wistar Prenhe Brusatol	26,60 ± 2,01	5

**Tabela 14- Valores dos resultados apresentados na Figura 14, referentes ao Emax das curvas concentração-efeito para fenilefrina em aortas sem endotélio não-incubadas (controle) e incubadas com Brusatol**

<b>Grupos</b>	<b>Valores da contração (mN)</b>	<b>Número amostral</b>
Wistar Não Prenhe Controle (Sem endotélio)	36,50 ± 0,96	6
Wistar Não Prenhe Brusatol (Sem endotélio)	38,27 ± 3,32	6

**Tabela 15- Valores dos resultados apresentados na Figura 15, referentes ao Emax das curvas concentração-efeito para fenilefrina em aortas não-incubadas (controle) e incubadas com Brusatol, nos diferentes grupos**

<b>Grupos</b>	<b>Valores de Emax (mN)</b>	<b>Número amostral</b>
SHR Não Prenhe Controle	25,43 ± 1,13	6
SHR Prenhe Controle	19,12 ± 1,79	10
SHR Não Prenhe Brusatol	24,50 ± 1,28	9

SHR Prenhe Brusatol	19,56 ± 0,82	10
---------------------	--------------	----

**Tabela 16- Valores dos resultados apresentados na Figura 16, referentes ao Emax das curvas concentração-efeito para acetilcolina em aortas não-incubadas (controle) e incubadas com Brusatol, nos diferentes grupos**

<b>Grupos</b>	<b>Valores de Emax (% de relaxamento)</b>	<b>Número amostral</b>
Wistar Não Prenhe Controle	94,07 ± 0,98	6
Wistar Prenhe Controle	95,56 ± 1,30	4
Wistar Não Prenhe Brusatol	93,57 ± 1,56	6
Wistar Prenhe Brusatol	92,81 ± 0,61	5

**Tabela 17- Valores dos resultados apresentados na Figura 17, referentes ao Emax das curvas concentração-efeito para acetilcolina em aortas não-incubadas (controle) e incubadas com Brusatol, dos diferentes grupos**

<b>Grupos</b>	<b>Valores de Emax (% de relaxamento)</b>	<b>Número amostral</b>
SHR Não Prenhe Controle	94,65 ± 1,28	6
SHR Prenhe Controle	96,56 ± 1,05	7
SHR Não Prenhe Brusatol	92,83 ± 2,23	7
SHR Prenhe Brusatol	96,84 ± 0,67	7