

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

MARIANA SANTANA QUIRINO DA SILVA

**O TRATAMENTO COM APOCININA PREVINE A DISFUNÇÃO
ENDOTELIAL AO MELHORAR A FUNÇÃO DAS CAVEOLAS EM AORTAS
DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR).**

ARAÇATUBA

2023

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

MARIANA SANTANA QUIRINO DA SILVA

**O TRATAMENTO COM APOCININA PREVINE A DISFUNÇÃO
ENDOTELIAL AO MELHORAR A FUNÇÃO DAS CAVEOLAS EM AORTAS
DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de
Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Fisiológicas.
Orientadora: Prof.^a Associada Dr^a Cristina Antoniali Silva

ARAÇATUBA
2023

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Silva, Mariana Santana Quirino da.

S586t O tratamento com Apocinina previne a disfunção endotelial
ao melhorar a função das cavéolas em aortas de ratos esponta-
neamente hipertensos (SHR) / Mariana Santana Quirino da
Silva. - Araçatuba, 2023

63 f. ; graf.

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

Orientadora: Profa. Associada Cristina Antoniali Silva

1. Cavéolas 2. Ratos endogâmicos SHR 3. Endotélio
4. Óxido nítrico sintase 5. Dextrinas I. T.

CDD 612

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 27.05.1997, Araçatuba-SP

Filiação: Maurício de Oliveira Quirino da Silva

Cinara Santana

2015/2018: Curso de Graduação em Biomedicina, Centro Universitário Unioledo de Araçatuba.

2020/2023: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Modalidade Mestrado Acadêmico, pelo programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, pela Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

Dedico este trabalho aos meus pais, Maurício e Cinara, e aos meus irmãos Leonardo e Maria Clara, por todo apoio desde o início a minha jornada. Por sempre me permitirem acreditar nos meus sonhos, por estarem sempre ao meu lado nas dificuldades me incentivando a nunca desistir e por acreditarem em mim e no meu trabalho. Não teria sido possível sem vocês.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Cristina Antoniali, por me ter me recebido nos seu laboratório de braços abertos, e que me fez enxergar a fisiologia/farmacologia cardiovascular com outros olhos. Por toda paciência que teve comigo durante o período da pandemia, pelo carinho durante todo o processo e por todos os ensinamentos. Sua admiração pela pesquisa e docência me inspiram. Muito obrigada!!

Aos Professores do Departamento de Ciências Básicas da FOA, Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles, Dra Ana Cláudia Melo Stevanato Nakamune e Dra. Dóris Hissako Matsushita, e em especial aos professores Dr. Antônio Hernandez Chaves Neto e Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira, que estiveram sempre presentes ajudando tanto com reagentes e técnicas, como compartilhando experiência acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo auxílio financeiro durante o mestrado.

A todos os alunos que um dia foram orientandos da professora Cristina, Jéssica Luiza, Jéssica Troiano, Murilo Graton e Simone Potje por estarem sempre disponíveis para tirar dúvidas, mesmo estando longe do laboratório, e por todo apoio oferecido nestes anos, tanto em questão de experimentos quanto para vida. Muito obrigada, por tudo!

Aos amigos que dividem o laboratório, Bianca Ribeiro, Eduardo Bombardi, Sabrina Frasnelli, Victor Balera, Murilo Graton, Juliane Mendonça e Tayná Rodrigues, que sempre estiveram dando apoio diário, tanto nas partes difíceis como nos momentos de risadas. Muito obrigada por serem presença constante nesses últimos 2 anos.

Em especial, a Bianca e ao Eduardo, pela amizade criada no dia a dia, pelas ajudas prestadas quando solicitada, pelas risadas nos momentos felizes e nos momentos de desânimo. Sem vocês dois teria sido muito mais difícil aguentar a rotina por todo esse tempo.

Aos amigos do Departamento de Ciências Básicas, Bianca Ribeiro, Bianca Belardi, Victor Balera, Débora Cavalcante, Eduardo Bombardi, Thainá Esperança, Beatriz Stringhetta, Sabrina Frasnelli, Juliane Mendonça, Tayná Rodrigues e Luana Galante.

Aos funcionários da UNESP/FOA, Sra. Cristiane, Sra. Valéria e Sr. Eduardo pelo apoio necessário na secretaria de pós-graduação, ao Sr. João do Biotério Central, a Sra. Márcia e em especial a Sra. Célia do setor da limpeza, por estar sempre no dia a dia

A todos os meus amigos de fora da UNESP, dos que me acompanham desde a escola como a Gabriella e a Isabella, amigos da faculdade, como meu quarteto Keissy, Mirella e Nayara, e os amigos que surgiram durante todo esse período. Sem vocês, eu não teria conseguido chegar até aqui. Todo o incentivo e apoio quando eu precisei, por me motivarem e sempre continuar tentando e por todas as risadas e descontração que me permitiram distração em momentos essenciais.

A minha psicóloga Larissa Sena, que me mostrou que os momentos difíceis são apenas momentos, que me ajudou a entender e superar diversos momentos acadêmicos e pessoais e me fez acreditar em mim mesma. Sem esses anos de terapia, não teria conseguido finalizar essa dissertação.

Aos meus pais, novamente, que nunca duvidaram de mim, que ouviram minhas reclamações diárias e sempre me motivaram a seguir em frente. Obrigada por confiarem em mim, pelos ensinamentos para me tornar uma pessoa melhor. Sem vocês dois, teria sido impossível chegar a este momento. Aos meus irmãos, por sempre estarem ao meu lado, acreditando no que eu estava fazendo. A minha mãe por todo apoio, todos os momentos de descontração e por todas as caronas pro laboratório, incluindo sábado, domingos e feriados. Ao meu pai e minha irmã, por todas as vezes que me ajudaram a lidar com minhas ansiedades e me distraírem quando necessário. Meu pai que me fez admirar a docência e mostrar o caminho. Minha irmã que estava sempre me escutando e me aconselhando, teria sido muito difícil se você e sem nossos livros.

Aos meus avós, Ademar, Selma e Nelci, que muitas vezes, nem entendendo o que eu estava fazendo, sempre fizeram questão de demonstrar interesse, fazer perguntar e me incentivar a continuar. Devo muito do que sou hoje a vocês!

E a toda família Santana e Quirino, que estiveram presentes oferecendo suporte e apoio quando necessário mesmo alguns estando de longe fisicamente, sempre estiveram presentes.

“They say that a person’s personality is the sum of their experiences. But that isn’t true, at least not entirely, because if our past was all that defined us, we’d never be able to put up with ourselves. We need to be allowed to convince ourselves that we’re more than the mistakes we made yesterday. That we are all of our next choices, too, all of our tomorrows.”

“Not knowing is a good place to start.”

— Fredrik Backman, Anxious People

QUIRINO, M. S., **O tratamento com Apocinina previne a disfunção endotelial ao melhorar a função das cavéolas em aortas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).** 2023. 62f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2023

RESUMO

O menor número e a função prejudicada das cavéolas em células endoteliais de artérias de SHR tem sido associado à disfunção endotelial e hipertensão. O tratamento com Apocinina previne o aumento da pressão arterial e a disfunção endotelial em SHR. A hipótese deste estudo é que a Apocinina melhora o papel das cavéolas em aortas de SHR. Aortas de ratos Wistar e SHR, não tratados e tratados com Apocinina (30mg/Kg, v.o, da 4ª a 10ª semana de vida) foram incubadas por 30 minutos com metil-beta-ciclodextrina (dextrina, 10 mmol/L). Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh) e para o ionóforo de cálcio A23187 foram analisadas na ausência e presença de dextrina e comparada entre os grupos. Nossos resultados mostraram que o tratamento com Apocinina reduziu a pressão arterial em SHR, aumentou a resposta vasodilatadora à ACh e a concentração de NOx em aortas de SHR. A dextrina prejudicou a função endotelial em ambos os grupos não tratados, mas seu efeito foi mais prejudicial em aortas de SHR do que em aortas de Wistar. Interessantemente, a Apocinina preveniu o efeito da dextrina em aortas de SHR, mas não em aortas de ratos Wistar. Em aortas de SHR tratados com Apocinina, a dextrina não alterou a resposta vasodilatadora à ACh ou a concentração de NOx. Em conclusão, nossos resultados sugerem que o tratamento com Apocinina previne a disfunção endotelial ao melhorar a função das cavéolas em aortas de SHR.

Palavras-chaves: Apocinina, SHR, aorta, NO, cavéola, Dextrina.

QUIRINO DA SILVA, M. S., **Apocynin treatment prevents endothelial dysfunction by improving caveolae function in aorta of spontaneously hypertensive rats (SHR).** 2023. 62f. Dissertation (master's degree). School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), 2023

ABSTRACT

Lower number and impaired function of caveolae in endothelial cells of SHR arteries have been associated with endothelial dysfunction and hypertension. Apocynin treatment prevents increased blood pressure and endothelial dysfunction in SHR. The hypothesis of this study is that Apocynin improves the role of caveolae in SHR aortas. Aortas from Wistar rats and SHR, untreated and treated with Apocynin (30mg/Kg, v.o, from the 4th to the 10th week of life) were incubated for 30 minutes with methyl-beta-cyclodextrin (dextrin, 10 mmol/L). Concentration-effect curves for acetylcholine and A23187, a calcium ionophore, were analyzed in the presence and absence of dextrin and compared between groups. Our results showed that chronic treatment with Apocynin reduced blood pressure in SHR, increased vasodilator response to ACh and NOx concentration in aortas of SHR. Dextrin impaired endothelial function in both groups, but its effect was more detrimental in SHR aortas than in Wistar aortas. Interestingly, Apocynin prevented the effect of dextrin in SHR aortas, but not in Wistar rat aortas. In aortas from Apocynin-treated SHR, dextrin did not alter the vasodilator response to ACh or NOx concentration. In conclusion, our results suggest that Apocynin treatment prevents endothelial dysfunction by improving caveolae function in SHR aortas.

Keywords: Apocynin, SHR, aorta, NO, caveolae, Dextrin.

LISTA DE ABREVIATURAS

% – porcentagem

μ – micro

μL – microlitro

μm – micrômetro

μmol/L – micromol por litro

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

A23187- ionóforo de cálcio

ACh- acetilcolina

β- beta

Ca²⁺- cálcio

CaM- calmodulina

CaM-Ca²⁺-composto cálcio-calmodulina

Cav-1-caveolina 1

Cav-2-caveolina 2

Cav-3-caveolina 3

eNOS- enzima óxido nítrico sintase endotelial

EROs- espécies reativas de oxigênio

EMax- efeito máximo

g-gramas

HUVEC- células endoteliais da veia umbilical humana

L-NAME- n-nitro-l-arginina metil éster

mmHg- milímetros de mercúrio

mg- miligrama

mmol- milimol

NO- óxido nítrico

NOX- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NOx- nitrito/nitrato

SHR- rato espontaneamente hipertenso

v.o- via oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Pressão arterial sistólica (em mmHg) de ratos Wistar e SHR não tratados (n=5) e Wistar e SHR tratados (n=5) com Apocinina (30mg/Kg, v.o). Valores representados em média $\pm$ EPM. ***p<0.001 SHR não tratados versus outros grupos; #p<0.001 SHR tratados versus outros grupos (ANOVA).....31

Figura 02. Comparação das curvas concentração-resposta a acetilcolina (ACh, 0.1nmol/L - 100 μ mol/L) e ao ionóforo de cálcio A23187 (0.1 nmol/L - 10 μ mol/L) entre anéis de aorta de ratos normotensos Wistar (n=8-4) e SHR (n=7-5) **p<0.01, diferença no efeito máximo entre as curvas para A23187 e ***p<0.001, diferença entre o efeito máximo para ACh.....33

Figura 03. Curva concentração-resposta para acetilcolina (ACh, 0.1 nmol/L - 100 μ mol/L) e ionóforo de cálcio (0.1 nmol/L - 10 μ mol/L) em aortas de ratos Wistar (A,B; n=5-3) e SHR (C-D; n=7-3, na ausência e na presença de L-NAME (100 μ mol/L)).**p<0.01, diferença no efeito máximo da resposta ao A23187 em aorta de SHR na presença de L-NAME; ***p<0.001, diferença de efeito máximo a ACh em aorta de SHR na presença de L-NAME e ****p<0.0001, diferença de efeito máximo em aortas de ratos Wistar tanto para ACh quanto para A23187 na presença de L-NAME.....34

Figura 04. Comparação das curvas de concentração- resposta para acetilcolina (ACh, 0,1 nmol/L - 100 μ mol/L) entre anéis de aorta de ratos Wistar (n=8-6) e SHR (n=6) na ausência e presença de metil- β -ciclodextrina (dextrina, 10 mmol/L). Em A, *p<0,05 entre valores de pD2 das curvas obtidas na presença e ausência de dextrina; em B, **p<0.01 nos valores de pD2 entre as curvas na presença e ausência de dextrina em SHR e em C ****p<0.0001 entre os valores de Emax, obtidos na presença de dextrina, em anéis de Wistar e SHR.....35

Figura 05. Comparação das curvas concentração-resposta para A23187 (0.1 nmol/L - 10 μ mol/L) entre anéis de aorta de Wistar (n=5-3) e SHR (n=8-3), na ausência e na presença de metil- β -ciclodextrina (dextrina, 10 mmol/L).*p<0.05

entre valores de pD2 e [#]p<0.05 entre os valores de Emax das curvas para A23187 na presença de dextrina em aortas de Wistar e SHR.....36

Figura 06. Curvas concentração-resposta (em A-C) para acetilcolina (ACh, 0.1 nmol/L - 100 µmol/L) em anéis de aorta de ratos Wistar normotenso (n=8-5) e SHR (n=10-7) não tratados e tratados com Apocinina (30 mg/Kg). *p<0.05 entre valores de pD2 em aortas de SHR tratado quando comparado as aortas de Wistar tratado e ***p<0.001 entre valores de Emax em aortas de SHR tratado e em aortas de SHR não tratado.....37

Figura 07. Comparação das curvas de concentração-resposta para A23187 (0.1 nmol/L - 10 µmol/L) entre anéis de aorta de Wistar tratado e não tratado (A, n=5-3) com Apocinina e SHR tratado e não tratado (B, n=8-3) com Apocinina (30mg/kg).....38

Figura 08. Curvas de concentração-resposta para A23187 (0.1nmol/L - 10µmol/L) na presença de Indometacina (10 nmol/L), em anéis de ratos Wistar tratados e não tratados com Apocinina (n=5-4) e SHR não tratado e tratado com Apocinina (n=8-3) *p<0.05, para os valores de pD2 entre aortas de Wistar e Wistar tratados.....38

Figura 09. Efeito da metil-β-ciclodextrina (10 mmol/L, após 60 min de incubação) na curva concentração-resposta para acetilcolina (ACh, 0.1nmol/L - 100 µmol/L) em aortas ratos Wistar e SHR. (A) Curva de ACh entre os grupos Wistar tratados e não tratados com Apocinina na presença e ausência de dextrina, (B) Curvas para ACh na presença e ausência de dextrina em SHR tratados e não tratados com Apocinina e (C) Curvas para ACh na presença de dextrina em aortas dos diferentes grupos. *p<0.05 de diferença estatística nos valores de efeito máximo entre Wistar não tratado com dextrina e Wistar tratados na ausência de dextrina, pD2 entre Wistar não tratado na ausência de dextrina e grupos com dextrina, e pD2 de SHR não tratado e tratado na presença de dextrina. ***p<0.001 em efeito máximo entre os grupos SHR não tratado sem dextrina e SHR tratado com e sem dextrina, valor de pD2 entre SHR não tratado com dextrina e SHR tratado e efeito máximo de SHR não tratado com dextrina e todos os outros grupos com dextrina.....40

Figura 10. O efeito da metil- β -ciclo dextrina (10 mmol/L, após 60 min de incubação) na curva concentração-resposta para A23187 (0.1 nmol/L - 10 μ mol/L) em aortas ratos Wistar e SHR. (A) Curva de A23187 entre os grupos de Wistar tratados e não tratados com Apocinina na presença e ausência de dextrina, * $p < 0.05$, entre pD_2 das curvas de Wistar e Wistar tratado com incubação de dextrina (B) Curvas para A23187 na presença e ausência de dextrina em SHR tratados e não tratados com Apocinina, * $p < 0.05$, entre os valores de efeito máximo em aortas de SHR tratado na presença de dextrina e em aortas de SHR controle e tratado na ausência de dextrina e SHR controle na presença de dextrina.....41

Figura 11. Concentração de nitrito (NOx) em homogenatos de aortas de ratos Wistar e SHR (n=6), não tratados e tratados com Apocinina (n=6), na ausência e na presença de metil- β -ciclodextrina (10 mmol/L, após 60 minutos incubação). * $p < 0,05$; # $p < 0,05$ entre os grupos tratados e não tratados com Apocinina, na presença e ausência de dextrina.....43

Figura 12. Representação da expressão proteica da Caveolina-1 e eNOS, avaliada por western blot, em HUVEC na ausência (Controle) e presença, após incubação por 30 minutos, com Apocinina (100 μ mol/L). * $p < 0,05$ entre os grupos.....44

Sumário

1.INTRODUÇÃO.....	16
2.HIPÓTESE	20
3.OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo Geral	22
3.2. Objetivos Específicos.....	22
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1. Animais.....	25
4.2.Tratamento	25
4.3. Reatividade Vascular em Aorta	26
4.3.1- Teste da integridade e funcionalidade do endotélio:.....	26
4.3.2 - Análise das respostas vasodilatadoras dependentes da atividade da NOS:.....	27
4.3.3 - Análise do efeito da Dextrina nas respostas vasodilatadoras à ACh e A23187:27	
4.4. Análise do efeito da Dextrina na produção de nitrito em aortas de ratos tratados com apocinina:.....	28
4.5. Avaliação da Expressão de Caveolina-1 e eNOS por Western Blot em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).....	28
4.6. Sais, Drogas e Reagentes.....	29
4.7. Análise Estatística	29
5. RESULTADOS.....	31
5.1. O tratamento com Apocinina reduz a pressão arterial sistólica (PAS) em SHR, mas não altera em ratos normotensos Wistar.	31
5.2. As respostas vasodilatadoras e dependente da atividade de NOS, estimuladas pela Acetilcolina e pelo A23187, estão bastante prejudicadas em aortas de ratos hipertensos	32
5.3. A dextrina promove redução do efeito vasodilatador à ACh e A23187 em ambos os grupos, prejudicando ainda mais o efeito vasodilatador destas drogas em aortas de SHR.....	33
5.4. O tratamento com Apocinina melhorou a resposta vasodilatadora para ACh em aortas de SHR, mas não alterou o efeito vasodilatador do A23187 em ambos os grupos:	35
5.5. O tratamento com Apocinina preveniu o efeito da dextrina em aortas de ratos SHR.	39
5.6. O tratamento com Apocinina aumentou a concentração de NOx em aortas de Wistar e SHR. A dextrina não alterou a concentração de NOx aumentada em aorta de SHR tratados com Apocinina:	42
5.7. A expressão das proteínas eNOS e Cav-1 em células de veias umbilicais humanas foi aumentada pela incubação com Apocinina.....	42

6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO	54
8.REFERÊNCIAS	56

INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

As cavéolas são estruturas presentes na membrana plasmática de diversos tipos celulares. Inicialmente, foram descritas como invaginações da membrana plasmática, muito comumente visualizadas por meio de microscopia eletrônica no formato da letra “Ω”, e diâmetro em torno de 60-80 nm (PETERS et al., 1985; PARTON; SIMONS, 2007; YAMADA, 1955) Sua composição é rica em colesterol, esfingolipídios e proteínas, o que torna sua estrutura rígida. As proteínas presentes nas cavéolas são conhecidas como caveolinas, e podem ser de três isoformas, caveolina-1 (Cav-1), caveolina-2 (Cav-2) e caveolina-3 (Cav-3). As caveolinas presentes na estrutura da cavéola são as principais responsáveis pela formação das cavéolas e pela manutenção da sua integridade, sendo a Cav-1 e Cav-2 as mais abundantes em células endoteliais, do músculo liso, adipócitos e fibroblastos, enquanto a Cav-3 é expressa principalmente em músculo esquelético e cardíaco (FRANK et al., 2003; OKAMOTO et al., 1998; SHAUL; ANDERSON, 1998; YAO et al., 2009).

As células endoteliais são um dos tipos celulares com maior abundância de cavéolas em sua membrana celular, além de também ser o tipo celular com maior expressão de Cav-1 (GRATTON; BERNATCHEZ; SESSA, 2004; SHAUL et al., 1996). Uma das principais funções da Cav-1 nas células endoteliais é a regulação da atividade da enzima óxido nítrico endotelial (eNOS) e da produção de óxido nítrico (NO). Esta regulação é considerada inibitória pois, ao manter-se ligada a eNOS, a Cav-1 mantém esta enzima em seu estado inativo, e dessa forma, não ocorre a produção de NO. Para que ocorra a produção de NO, os estímulos de ativação, tanto por meio de receptores (acetilcolina em receptores muscarínicos endoteliais) quanto por mecanismos independentes de receptores (estresse de cisalhamento) levam ao aumento de cálcio intracelular e formação do complexo calmodulina-cálcio (CaM-Ca²⁺). Este complexo faz com que a eNOS se desligue da Cav-1 e produza NO (GARCIA-CARDENA et al., 1996; JU et al., 1997; SOWA; PYPAERT; SESSA, 2001). Chen et al. (2012) mostraram que a liberação de NO, após a dissociação de Cav-1 também é um estímulo importante para que a eNOS volte a se ligar com a Cav-1 na cavéola e se mantenha na forma inativa. Este seria um mecanismo importante para evitar o desacoplamento da eNOS.

Estudos com camundongos knockout para Cav-1 (Cav-1^{-/-}) mostraram que as respostas vasodilatadoras à ACh e vasoconstritora a angiotensina II e endotelina-1 são

diferentes se comparadas aquelas observadas em animais controle, mostrando que a ausência de Cav-1 faz com que as aortas desses animais se dilatam mais do que as aortas de animais controle e que uma menor vasoconstrição ocorra, sugerindo que em ambos os estímulos as alterações aconteceriam devido a maior liberação de NO, além de alteração no tônus miogênico (DRAB et al., 2001; RAZANI; LISANTI, 2001). Potje et al (2019) recentemente mostraram que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentavam uma menor quantidade de cavéolas na célula endotelial, assim como menor expressão de Cav-1 em aortas quanto em artérias mesentéricas. Estas alterações foram associadas as respostas vasodilatadoras prejudicadas para ACh, as quais foram ainda mais prejudicadas pelo uso de metil- β -ciclodextrina (dextrina), um agente farmacológico que desestrutura o colesterol presente nas cavéolas, afetando seu formato e função. As mesmas alterações morfológicas e funcionais foram encontradas em vasos sanguíneos de fêmeas SHR (TROIANO et al., 2021). Outros estudos também mostraram que a resposta prejudicada à ACh em animais hipertensos dois rins - um clip (2K-1C) estaria associada ao menor número de cavéolas em células endoteliais (RODRIGUES et al., 2010a).

Os SHR são considerados modelo experimental de hipertensão essencial -ou primária- que foram geneticamente selecionados por Okamoto & Aoki (1963) na década de 60. Os SHR são animais muito utilizados para estudos que avaliam alterações vasculares e endoteliais associadas a hipertensão, e o efeito anti-hipertensivo de novas drogas (KLINGE et al., 2008; PENG et al., 2014; VERA et al., 2007). Assim como em humanos com distúrbios hipertensivos, a pressão arterial em SHR aumenta gradualmente com desenvolvimento do animal, além disso, os vasos sanguíneos de SHR apresentam disfunção endotelial (JAMA et al., 2022). Em SHR, as respostas vasodilatadoras à acetilcolina (ACh) são prejudicadas e podem estar associadas a menor atividade e/ou ao desacoplamento da eNOS, mecanismos que promovem produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela eNOS, aumento do estresse oxidativo e consequentemente, uma menor disponibilidade de NO (GRATON et al., 2019; PERASSA et al., 2016; VERA et al., 2007a). Além destas alterações, SHRs também apresentam uma menor expressão de Cav-1 e um número reduzido de cavéolas em aortas e artérias mesentéricas quando comparados aos vasos sanguíneos de animais Wistar normotensos (POTJE et al., 2019).

A Apocinina é uma acetofenona isolada de uma planta chamada *Picrorhiza kurroa* e foi inicialmente reportada como uma droga inibidora de NAD(P)H oxidase, ou de isoformas de enzimas NOX. A Apocinina tem sido estudada por sua atividade

antioxidante e anti-hipertensiva (SAVLA; LADDHA; KULKARNI, 2021; VIRDIS; GESI; TADDEI, 2016a). Nós demosramos previamente que o tratamento crônico de SHR durante a 4^a e 10^a semana de vida com Apocinina, numa dose de 30mg/Kg, administrada por via oral (adicionada na água de beber), reduz a pressão arterial desses animais, assim como reduz a expressão de NOX, a atividade de NAD(P)H oxidase e a produção de EROs. Foi observado também um aumento na concentração intracelular de cálcio e de óxido nítrico (NO), e aumento da expressão de eNOS em células vasculares de SHR tratados com Apocinina (GRATON et al., 2019; PERASSA et al., 2016). Em conjunto, os resultados obtidos até o momento na literatura sugerem que o tratamento com Apocinina promoveria a prevenção da disfunção endotelial nos vasos sanguíneos de SHR por diferentes mecanismos. No entanto, o efeito da Apocinina na função das cavéolas em células endoteliais vasculares de SHR ainda não foi estudado.

HIPÓTESE

2.HIPÓTESE

Nossa hipótese é que o tratamento com Apocinina previne a disfunção endotelial por melhorar a função das cavéolas nas células endoteliais de aortas de SHR.

OBJETIVOS

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar se o efeito da Apocinina na função endotelial em aortas de ratos espontaneamente hipertensos estaria relacionado a possíveis alterações na função das cavéolas sobre a atividade da eNOS em aortas de SHR.

3.2. Objetivos Específicos

Os experimentos foram conduzidos neste estudo com a finalidade de responder às seguintes questões:

1) O tratamento com Apocinina reverte a prejudicada resposta vasodilatadora estimulada pela Acetilcolina em aortas de SHR?

Para respondermos esta pergunta, a reatividade vascular de anéis de aorta estimulados pela Acetilcolina (ACh) foi comparada entre ratos normotensos e hipertensos, não tratados e tratados com Apocinina.

2) O efeito do tratamento com Apocinina sobre a função endotelial está associado as alterações no receptor muscarínico?

Para respondermos esta pergunta, as curvas concentração-resposta para o ionóforo de cálcio A23187 em aortas foram comparadas entre os grupos. Avaliamos com estes experimentos se possíveis alterações do efeito vasodilatador dependente de NO, mas independente da interação e estimulação de receptores muscarínicos em aortas, poderia ser prevenida pelo tratamento com Apocinina.

3) O tratamento com Apocinina melhora a atividade da eNOS em aortas de SHR?

Para respondermos esta pergunta, comparamos as curvas concentração-resposta para a ACh e para o ionóforo de cálcio A23187, obtidas na ausência e presença de inibidor da atividade de NOS (L-NAME), entre aortas de todos os grupos.

4) O tratamento com Apocinina altera a função das cavéolas na resposta vasodilatadora estimulada pela acetilcolina e pelo A23187?

Para respondermos esta pergunta, inicialmente avaliamos o efeito da metil- β -Dextrina (uma droga desestabilizadora de cavéolas) nas respostas vasodilatadoras à ACh e ao A23187, comparando as curvas concentração-resposta para ambas as drogas, na ausência e presença de dextrina. Posteriormente, comparamos o efeito vasodilatador modificado pela dextrina entre aortas de ratos normotensos e hipertensos. E finalmente, avaliamos o efeito da dextrina no efeito vasodilatador entre aortas de ratos normotensos e hipertensos tratados com Apocinina.

5) A dextrina altera a produção de óxido nítrico em aortas de ratos normotensos e hipertensos? O tratamento com Apocinina previne possíveis alterações na produção de óxido nítrico consequentes do efeito da dextrina?

Para respondermos estas questões, inicialmente avaliamos se a produção de NOx, quantificada pelo método de Griess, estaria alterada em aortas de animais hipertensos e se a dextrina alteraria a produção de NOx em aortas de ratos normotensos e hipertensos. Posteriormente comparamos o efeito da dextrina na produção de NOx, entre aortas de ratos normotensos e hipertensos tratados com Apocinina.

6) O tratamento com Apocinina altera a expressão de Caveolina-1 e NOS em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC)?

Para respondermos esta pergunta, as HUVEC foram incubadas com Apocinina (100 μ mol/L) por 60 minutos. A expressão proteica de Cav-1 e de NOS foi comparada entre HUVEC não incubadas e incubadas com Apocinina.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos e experimentos que foram realizados neste estudo, foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia, Campus Araçatuba, UNESP (Processo CEUA FOA 0097-2021).

4.1. Animais

Neste estudo foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) de uma linhagem mantida pelo Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA UNESP), no biotério do Departamento de Ciências Básicas (DCB), sob responsabilidade do grupo de pesquisa da Profa. Cristina Antoniali Silva, e ratos normotensos, da linhagem Wistar, que foram fornecidos pelo Biotério Central da mesma instituição.

Para a obtenção dos filhotes de ambas as linhagens, o acasalamento, a prenhez de ratas Wistar e SHR, e o desenvolvimento dos filhotes até a 4ª semana foram acompanhados no biotério do DCB/FOA UNESP. A pressão arterial sistólica de ratos machos e fêmeas, normotensos (PAS= 110-112mmHg) e espontaneamente hipertensos (PAS $\geq$ 150 mmHg), foi verificada previamente ao período de acasalamento por pletismografia de cauda (PowerLab, ADInstruments, Melbourne, Austrália). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22-24°C) com ciclo de luz (12h/luz e 12h/escuro) e receberam ração padrão e água *ad libitum*.

4.2.Tratamento

Os filhotes machos Wistar e SHR, com 4 semanas de idade, foram divididos em quatro grupos: Wistar (n=20), Wistar Tratado (n=20), SHR (n=20) e SHR Tratado (n=20). Os grupos tratados receberam Apocinina (30mg/Kg, v.o.) diluída na água de beber, em volume previamente definido, e os grupos não tratados receberam o mesmo volume de água sem a Apocinina. Todos os animais foram pesados a cada 4 dias entre a 4ª e 10ª semana de vida, para ajuste de dose da Apocinina. A dose de Apocinina utilizada neste estudo (30mg/Kg) foi determinada a partir de estudos realizados previamente, os quais mostraram os efeitos da Apocinina na pressão arterial sem toxicidade sistêmica (BÄUMER et al., 2007; GRATON et al., 2019; HAYASHI et al., 2005; OELZE et al.,

2011; PECHÁNOVÁ; JENDEKOVÁ; VRANKOVÁ, 2009; PERASSA et al., 2016). Ao final da 10ª semana de vida, todos os animais foram então utilizados nos experimentos descritos a seguir.

Em ratos Wistar tratados com Apocinina não foram observadas alterações nos valores de pressão arterial sistólica (PALIEGE et al., 2006; PERASSA et al., 2016). No entanto, este grupo foi incluído no estudo para avaliarmos se os efeitos da Apocinina sobre os mecanismos estudados seriam associados, ou não, ao seu efeito anti-hipertensivo.

4.3. Reatividade Vascular em Aorta

Os animais foram anestesiados em câmara saturada com isoflurano e mortos por decapitação. Os segmentos torácicos da aorta foram removidos, dissecados da gordura perivascular (PVAT) em placa de Petri contendo solução Krebs-Henseleit (pH 7,4, 4°C). A aorta foi cortada em anéis de 2,0mm de comprimento com auxílio de material cirúrgico específico. Os anéis foram posicionados entre dois ganchos de aço inoxidável conectados a um transdutor de força isométrica (DMT, ADInstruments, Melbourne, Austrália) em cubas (5mL) contendo a solução Krebs-Henseleit, a 37°C, com pH 7,4 e com suprimento gasoso de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os anéis foram mantidos por 30 minutos sob tensão basal de 30mN para estabilização e em seguida, foram estimulados com Krebs KCl (120 mmol/L) para testar a integridade funcional dos tecidos. Depois, foram lavados com solução de Krebs até retorno a tensão basal inicial.

4.3.1- Teste da integridade e funcionalidade do endotélio:

A integridade e funcionalidade do endotélio vascular foram verificadas pelo grau de relaxamento induzido por acetilcolina (ACh, 1 µmol/L) após a contração prévia com fenilefrina (PE, 100 nmol/L). Os anéis que apresentaram relaxamento à ACh > 90% da resposta contrátil a PE, foram considerados intactos ou com endotélio funcional. Para os anéis de aorta de SHR não tratados, que naturalmente apresentam disfunção endotelial associada a hipertensão, a funcionalidade do endotélio foi considerada quando a ACh promoveu relaxamento de 50-70% da contração estimulada pela PE.

4.3.2 - Análise das respostas vasodilatadoras dependentes da atividade da NOS:

Anéis de aorta com endotélio funcional foram contraídos com PE (100nmol/L). Atingindo fase mantida da resposta vasoconstritora (platô de contração), os anéis foram estimulados com concentração crescentes e cumulativas de ACh (0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L). Em outra série de experimentos, os anéis de aorta após terem sido estimulados com PE (100 nmol/L) e atingirem o platô de contração, foram estimulados com concentrações crescentes e cumulativas de ionóforo de cálcio, A23187 (10 nmol/L a 0,1µmol/L) que tem como mecanismo de ação, o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular. Em alguns anéis de aorta, a resposta vasodilatadora do A23187 foi avaliada após a pré-incubação (30 minutos) com Indometacina (10 nmol/L).

Para avaliarmos se as respostas vasodilatadoras a ACh e A23187 eram dependentes da atividade de óxido nítrico sintase (NOS), os anéis de aorta foram incubados por 30 minutos com N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 µmol/L), e posteriormente estimulados com PE (100 nmol/L) e com concentrações crescentes e cumulativas de ACh ou A23187. As curvas concentração-efeito para ACh e A23187 obtidas na ausência e presença de L-NAME foram comparadas entre as aortas dos diferentes grupos.

4.3.3 - Análise do efeito da Dextrina nas respostas vasodilatadoras à ACh e A23187:

Os anéis de aorta com endotélio intacto foram incubados por 60 minutos com metil-β-ciclodextrina (dextrina, 10 mmol/L), uma droga desestabilizadora de cavéolas. Após o período de incubação, os anéis foram estimulados com PE (100 nmol/L) e sobre o platô de contração, foi feito o estímulo dos anéis com concentrações crescentes e cumulativas de ACh (0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) e A23187 (0.1 nmol/L a 10 µmol/L).

As curvas para ACh e A23187 obtidas nestas condições experimentais foram comparadas com as curvas obtidas na ausência da dextrina entre aortas do mesmo grupo de experimentos, e entre aortas dos diferentes grupos.

4.4. Análise do efeito da Dextrina na produção de nitrito em aortas de ratos tratados com Apocinina:

Todo o seguimento torácico da aorta foi removido dos animais dos diferentes grupos. As aortas foram dissecadas em solução de Krebs-Henseleit a 4°C, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C até a realização dos experimentos. As aortas foram homogeneizadas em solução salina tamponada (200µl, pH 7,4) e centrifugadas (10000 rpm, 30 minutos, 24°C). O sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente (14000 rpm, 20 minutos, 24°C).

Para reação colorimétrica de Griess, 50 µl do homogenato foi adicionado a 50 µl de reagente Griess (uma diluição de 1:1 de dicloreto de N-(1-Naftil) etilenodiamina 1% diluído em água destilada e sulfanilamida 1% diluída em ácido fosfórico 5%) em placa de 96 poços. Nitrito de sódio foi usado para curva como padrão, de concentração de 3 µM até 200µM. A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados obtidos foram normalizados pela concentração de proteína na amostra, quantificada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando como curva padrão (0,10µg/µl a 1µg/µl) de albumina de soro bovino.

4.5. Avaliação da Expressão de Caveolina-1 e eNOS por Western Blot em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).

Células endoteliais de veias umbilicais humanas foram adquiridas da ATCC cell lines (American Type Culture Collection -Manassa, VA – United States), cultivadas em meio celular DMEM (Dulbecco's modified eagles' medium -DMEM, Vitrocell, 00025) e suplementadas com soro fetal bovino (SFB) 10% da Gibco (12657029, South America) e usadas nas passagens 4-6. Após privação de soro no meio de cultivo, o tratamento com Apocinina (100 µmol) foi usado por 60 minutos. Após o tratamento, a cultura de células foram lisadas com tampão RIPA suplementado com inibidor de protease. As amostras foram preparadas em tampão Laemmli 4x e beta mercaptoetanol 10% e pipetados em gel de poliacrilamida 8%. Após transferência, as membranas de nitrocelulose forem incubadas com anticorpo anti-eNOS (1:1000, BD Bioscience, 610269) e anti-Cav-1 (1:2000, BD Bioscience, 610406) e anticorpo secundário anti-mouse (1:2000). As bandas foram detectadas por quimiluminescência e quantificadas pelo ImageJ Software.

4.6. Sais, Drogas e Reagentes

Os sais cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de potássio monohidratado (KH_2PO_4), sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) e cloreto de cálcio de diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram adquiridos da Dinâmica (Diadema, Brasil). Carbonato de sódio (Na_2CO_3), hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de cobre (CuSO_4) e citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) foram adquiridos da Synth (Diadema, Brasil). Tris-base ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) e o deoxicolato de sódio são da marca Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). A albumina bovina foi adquirida da Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA).

Apocinina (4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon), acetilcolina (acetylcholine chloride), fenilefrina (L-phenylephrine hydrochloride), L-NAME (N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride), Dextrina (Methyl-beta-cyclodextrin), ionóforo de cálcio A23187 e Indometacina ($\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{ClNO}_4$) foram obtidas da Sigma-Aldrich.

O meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium) e penicilina/estreptomicina e fungicida foram comprados da Gibco, Thermo Fischer Scientific, EUA e o coquetel de inibidores de proteases (Protease Inhibitor Mix) foi adquirido da GE Healthcare (Little Chalfont, BKM, Reino Unido).

4.7. Análise Estatística

Em todas as curvas concentração-resposta foram analisados dois parâmetros farmacológicos. A eficácia, ou efeito máximo de cada droga (E_{max}), além da potência, ou pD_2 (logaritmo negativo da concentração efetiva 50% (EC_{50})).

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e comparados entre os grupos. Foram utilizados os testes estatísticos mais adequado ao tipo de comparação feita, teste t de Student ou ANOVA (seguido de pós-teste Tukey), utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, La Jolla, EUA). As diferenças entre os resultados foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. O tratamento com Apocinina reduz a pressão arterial sistólica (PAS) em SHR, mas não altera em ratos normotensos Wistar.

Ratos SHR apresentaram valores de PAS bastante aumentados (173 ± 6 mmHg, $n=5$) quando comparados a ratos normotensos Wistar (106 ± 3 mmHg, $n=5$). O tratamento com Apocinina não alterou os valores de PAS em ratos normotensos (103 ± 2 mmHg, $n=5$), mas reduziu significativamente os valores de PAS (137 ± 5 mmHg, $n=5$) em SHR.

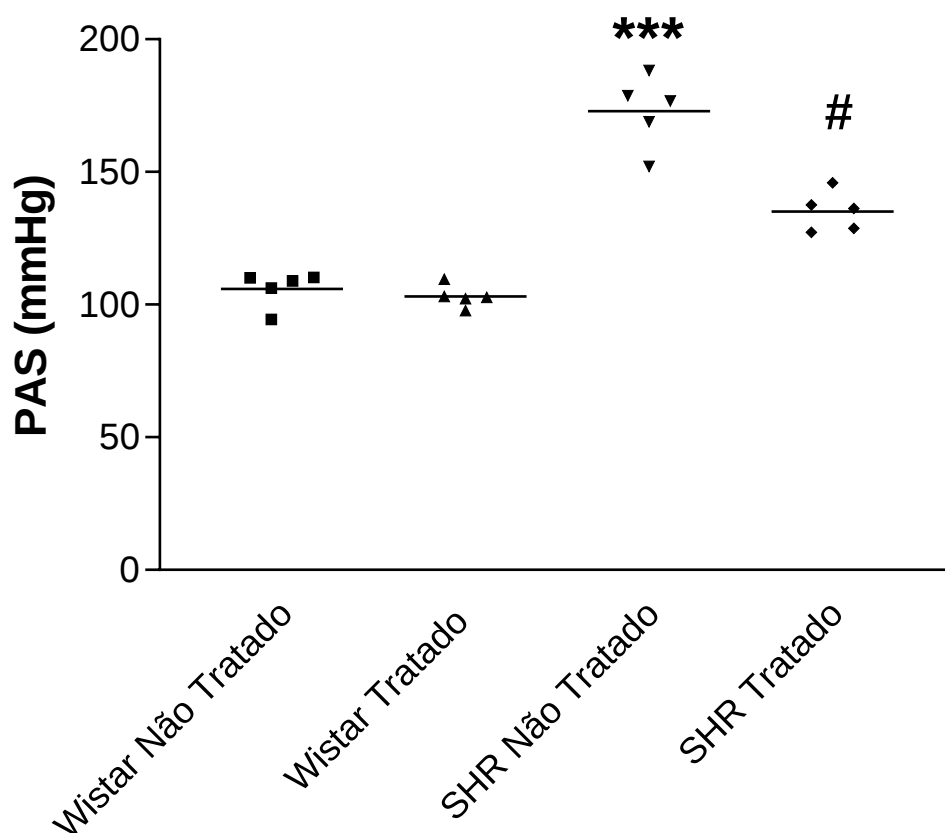


Figura 1. Pressão arterial sistólica (em mmHg) de ratos Wistar e SHR não tratados ($n=5$) e Wistar e SHR tratados ($n=5$) com Apocinina (30mg/Kg, v.o). Valores representados em média $\pm$ EPM. *** $p<0.001$ SHR não tratados versus outros grupos; # $p<0.001$ SHR tratados versus outros grupos.

5.2. As respostas vasodilatadoras e dependentes da atividade de NOS, estimuladas pela Acetilcolina e pelo A23187, estão bastante prejudicadas em aortas de ratos hipertensos.

Na primeira parte de nosso estudo, avaliamos possíveis alterações nas respostas vasodilatadoras estimuladas por ACh e pelo ionóforo de cálcio A23187, em aortas de ratos SHR.

Como pode ser observado na figura 2A, em anéis de ratos normotensos Wistar, a ACh induziu relaxamento máximo ($95.6 \pm 2.2 \%$). No entanto, em aortas de SHR (Figura 2B), a ACh promoveu resposta máxima ($60.1 \pm 7.7 \%$) significativamente menor a observada em aortas de ratos Wistar. Não observamos alteração na potência da ACh ao compararmos as curvas concentração-efeito para ACh entre aortas de Wistar e SHR (Wistar $pD_2 = 7.10 \pm 0.16$; SHR $pD_2 = 7.17 \pm 0.15$).

O ionóforo de cálcio, A23187, também promoveu relaxamento vascular em aortas com endotélio de ratos Wistar e SHR (Figura 2B). O A23187 induziu em aortas de ratos Wistar uma resposta vasodilatadora máxima em torno de 78% ($EMax = 78.1 \pm 6.6\%$) da contração de PE. Porém, em aortas de SHR, observamos que o efeito vasodilatador máximo do A23187 foi significativamente menor, em torno de 25% ($EMax = 25.4 \pm 10.2\%$). As curvas concentração-efeito ao A23187 estavam bem deslocadas à direita em aortas de SHR, sugerindo uma alteração de potência do A23187 em aortas de SHR ($pD_2 = 6.67 \pm 0.4$) quando comparadas as aortas de ratos Wistar ($pD_2 = 7.73 \pm 0.3$), no entanto, esta alteração não foi estatisticamente diferente.

As respostas vasodilatadoras à ACh foram inibidas quando as aortas de ratos Wistar ($EMax = 14.2 \pm 7\%$) e SHR ($EMax = 9.3 \pm 6\%$) foram previamente incubadas com L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) (Figura 3, A e B). O L-NAME também aboliu as respostas vasodilatadoras do A23187 (Wistar $EMax = 6.5 \pm 1\%$ e SHR $EMax = 16.8 \pm 4\%$; Figura 3, B e D). Na presença de L-NAME, as concentrações mais altas de A23187 promoveram um pequeno aumento do tônus vascular em aortas de ratos Wistar ($EMax = 14.2 \pm 7\%$) e em aortas de SHR ($EMax = 9.3 \pm 6\%$).

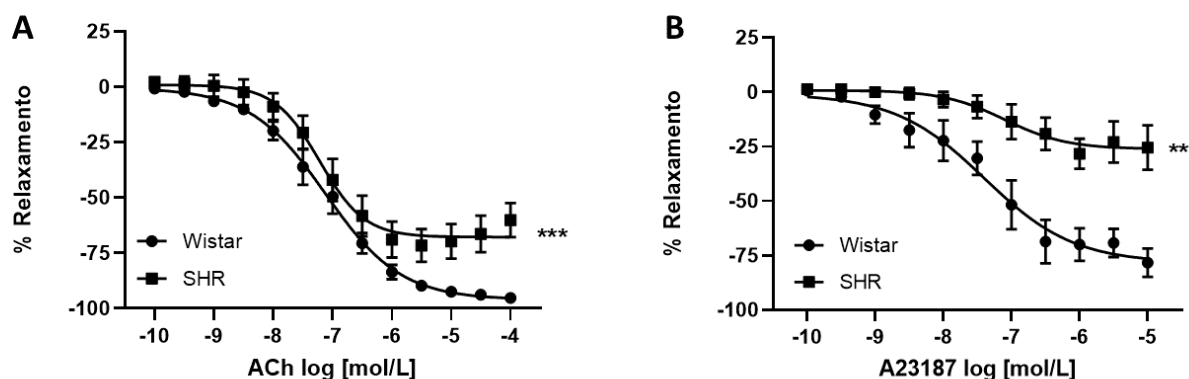


Figure 2. Comparação das curvas concentração-resposta a acetilcolina (ACh, 0.1 nmol/L - 100 μ mol/L) e ao ionóforo de cálcio A23187 (0.1 nmol/L - 10 μ mol/L) entre anéis de aorta de ratos normotensos Wistar (n=8-4) e SHR (n=7-5) **p<0.01, diferença no efeito máximo entre as curvas para A23187 e ***p<0.001, diferença entre o efeito máximo para ACh.

5.3. A dextrina promove redução do efeito vasodilatador à ACh e A23187 em ambos os grupos, prejudicando ainda mais o efeito vasodilatador destas drogas em aortas de SHR.

O efeito da dextrina nas respostas vasodilatadoras à ACh e ao A23187 foi avaliado em aortas de ratos Wistar e SHR (Figura 4 e Figura 5). As aortas foram previamente incubadas com dextrina (10 mmol/L, 60 min) e as curvas concentração-efeito para ACh e para A23187, obtidas na ausência e presença de dextrina foram comparadas. A dextrina deslocou as curvas concentração-efeito à ACh para a direita em aortas de Wistar (pD₂= 6.2 $\pm$ 0.1), assim como em aortas de SHR (pD₂= 6.3 $\pm$ 0.1). Na presença de dextrina, o efeito vasodilatador a estimulação com ACh foi significativamente menor em aortas de SHR (Figura 4C).

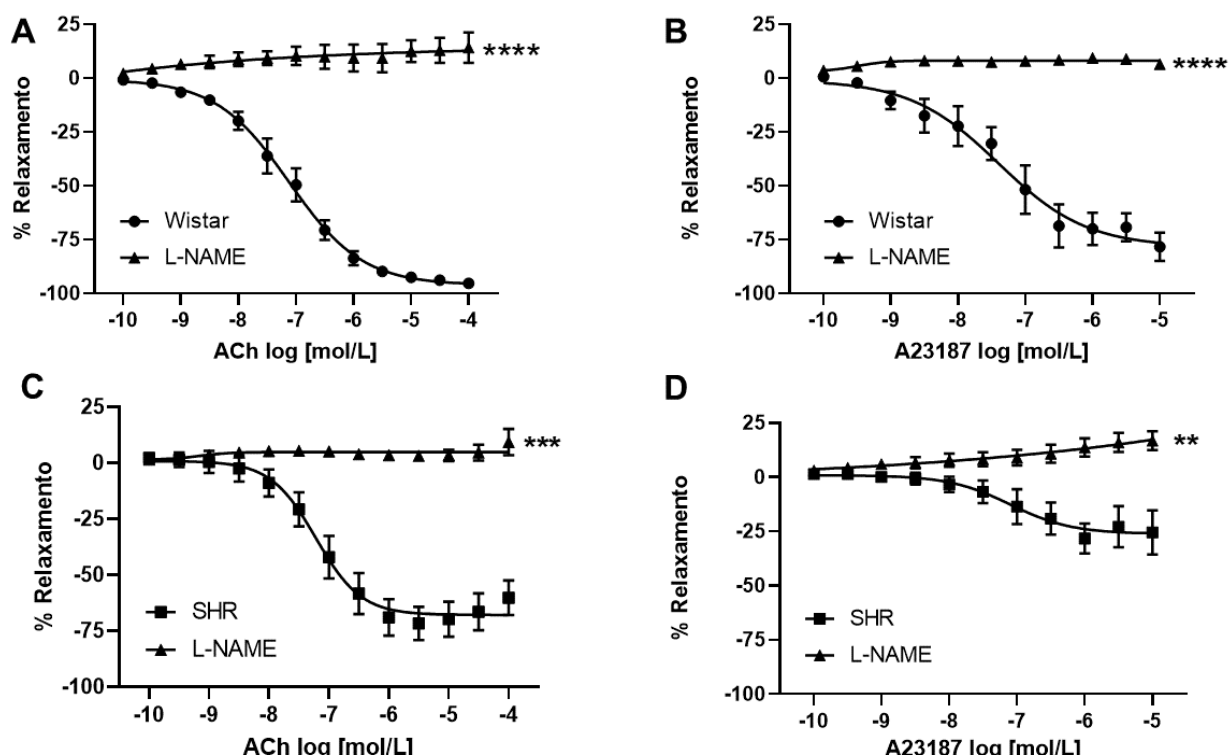


Figure 3. Curva concentração-resposta para acetilcolina (ACh, 0.1 nmol/L - 100 μmol/L) e ionóforo de cálcio (0.1 nmol/L - 10 μmol/L) em aortas de ratos Wistar (A,B; n=5-3) e SHR (C-D; n=7-3, na ausência e na presença de L-NAME (100 μmol/L)).**p<0.01, diferença no efeito máximo da resposta ao A23187 em aorta de SHR na presença de L-NAME; ***p<0.001, diferença de efeito máximo a ACh em aorta de SHR na presença de L-NAME e ****p<0.0001, diferença de efeito máximo em aortas de ratos Wistar tanto para ACh quanto para A23187 na presença de L-NAME.

A incubação das aortas com dextrina não alterou significativamente as curvas para o ionóforo de cálcio A23187 em aortas de ratos Wistar (Figura 5A) e em aortas de SHR (Figura 5B). Na presença de dextrina, observamos que as curvas concentração-efeito para A23187 em aortas de SHR estavam bem deslocadas para a direita e o Emax diminuído (Figura 5C).

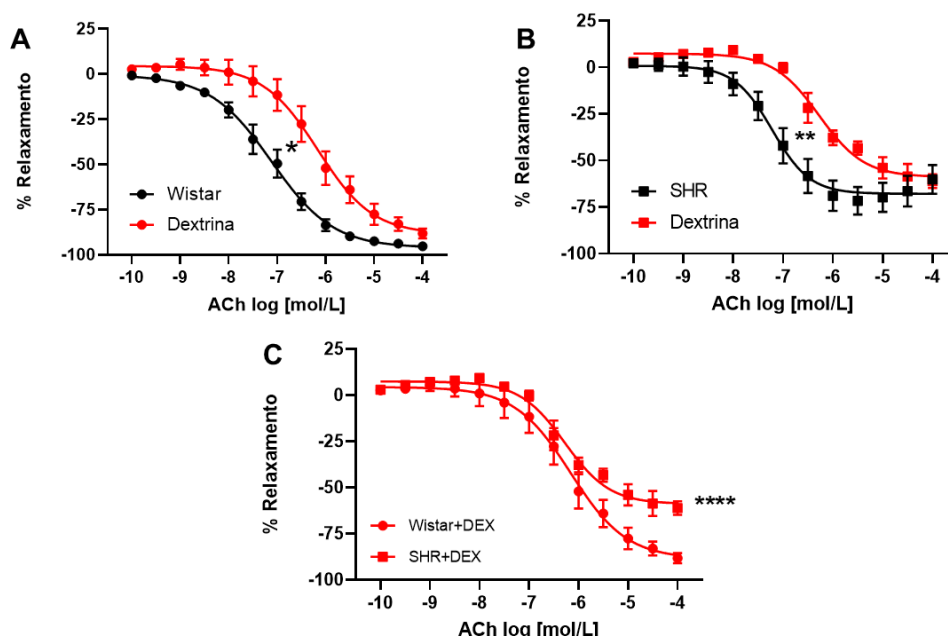


Figure 4. Comparação das curvas de concentração- resposta para acetilcolina (ACh, 0,1 nmol/L - 100 μ mol/L) entre anéis de aorta de ratos Wistar (n=8-6) e SHR (n=6) na ausência e presença de metil- β -ciclodextrina (dextrina, 10 mmol/L). Em A, *p<0,05 entre valores de pD₂ das curvas obtidas na presença e ausência de dextrina; em B, **p<0.01 nos valores de pD₂ entre as curvas na presença e ausência de dextrina em SHR e em C ****p<0.0001 entre os valores de E_{max}, obtidos na presença de dextrina, em anéis de Wistar e SHR.

5.4. O tratamento com Apocinina melhorou a resposta vasodilatadora para ACh em aortas de SHR, mas não alterou o efeito vasodilatador do A23187 em ambos os grupos:

Na segunda parte de nosso estudo, avaliamos se o tratamento dos ratos com Apocinina alteraria as respostas vasodilatadoras a ACh, ao A23187 e o efeito da dextrina. Para isto, comparamos os efeitos farmacológicos destas drogas entre aortas de ratos tratados com Apocinina, aos efeitos observados em aortas de ratos não-tratados, descritos acima.

Em aortas de ratos normotensos Wistar tratados com Apocinina, não observamos alteração do efeito máximo vasodilatador e dos valores de pD₂ para as curvas concentração-resposta para ACh (Figura 6A). No entanto, em anéis de aorta de SHR tratados com Apocinina (Figura 6B) houve aumentando significativo da resposta máxima

estimulada por ACh (EMax, SHR não tratado: $60.16 \pm 7.17\%$, $n=7$; SHR tratado: $94.23 \pm 2.92\%$, $n=10$, $p<0.001$) e deslocamento das curvas para ACh para a esquerda (pD_2 , SHR: 7.17 ± 0.1 , $n=7$; SHR tratado: 7.36 ± 0.11 , $n=10$). A prejudicada resposta vasodilatadora à ACh observada em aortas de SHR não tratado quando comparada as aortas de ratos Wistar não tratados (Figura 2A) não foi mais observada entre aortas de rato Wistar tratado e SHR tratado (Figura 6C). Interessantemente, aortas de SHR tratados com Apocinina ($pD_2 = 7.32 \pm 0.1$) apresentaram maior sensibilidade à ACh que aortas de ratos Wistar tratados ($pD_2 = 6.88 \pm 0.1$).

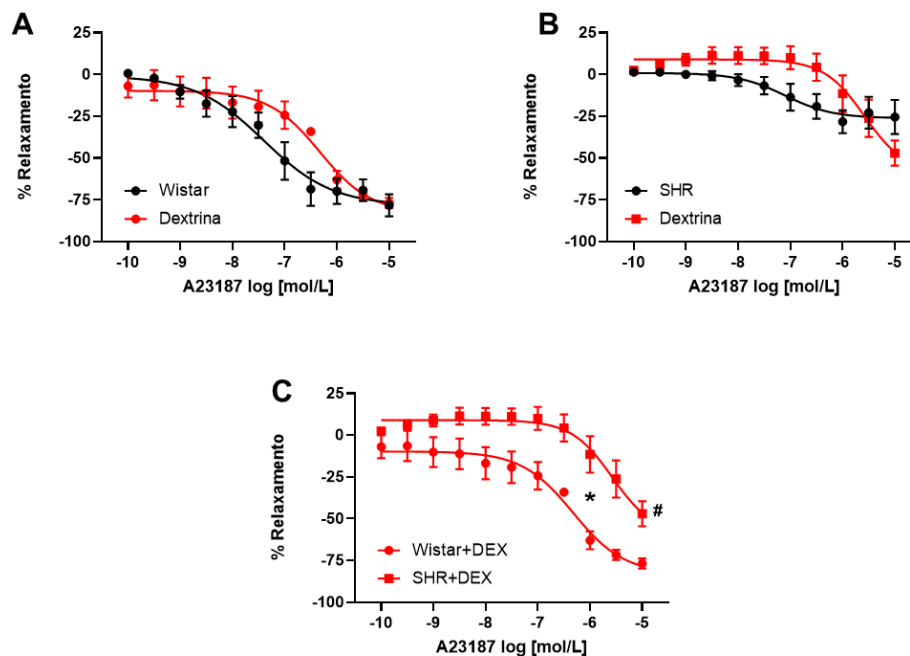


Figura 5. Comparação das curvas concentração-resposta para A23187 (0.1 nmol/L - 10 μ mol/L) entre anéis de aorta de Wistar ($n=5-3$) e SHR ($n=8-3$), na ausência e na presença de metil- β -ciclodextrina (dextrina, 10 mmol/L). * $p<0.05$ entre valores de pD_2 e # $p<0.05$ entre os valores de Emax das curvas para A23187 na presença de dextrina em aortas de Wistar e SHR.

A reatividade ao A23187 também foi comparada entre os grupos tratados e não tratados com Apocinina (Figura 7). Como pode ser observado na Figura 7A, a reatividade de aortas de Wistar tratados com Apocinina ao A23187 não foi diferente da reatividade de aortas de Wistar não tratados. Da mesma forma, aortas de SHR tratados com Apocinina

não apresentaram melhor reatividade ao A23187 se comparada a reatividade de aortas de SHR não tratados (Figura 7B).

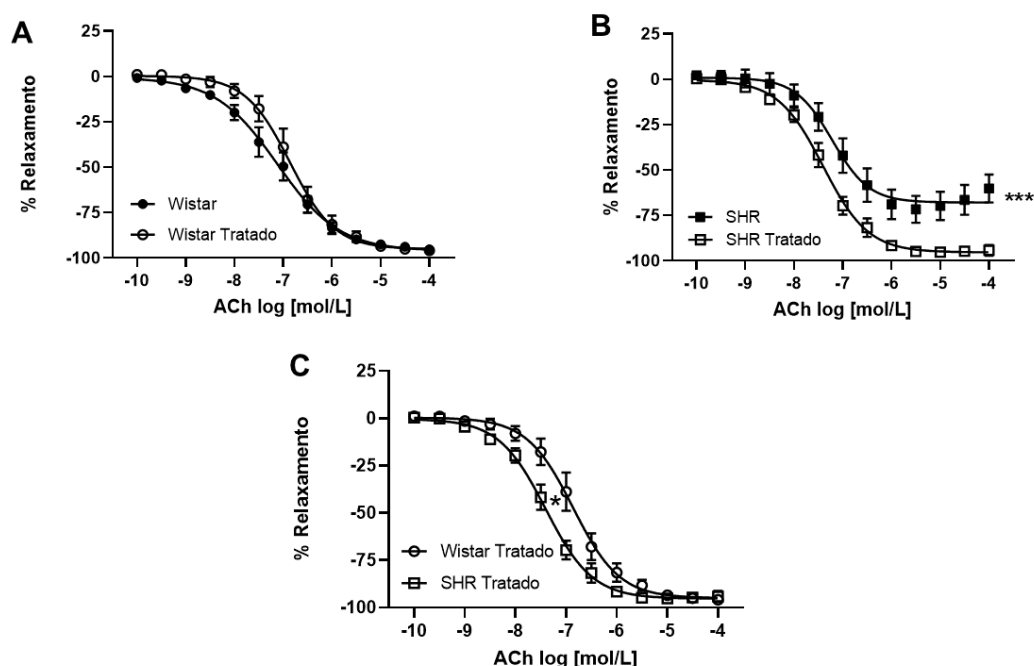


Figure 6. Curvas concentração-resposta (em A-C) para acetilcolina (ACh. 0.1 nmol/L - 100 μmol/L) em anéis de aorta de ratos Wistar normotenso (n=8-5) e SHR (n=10-7) não tratados e tratados com Apocinina (30 mg/Kg). * $p < 0.05$ entre valores de pD₂ em aortas de SHR tratado quando comparado as aortas de Wistar tratado e *** $p < 0.001$ entre valores de E_{max} em aortas de SHR tratado e em aortas de SHR não tratado.

A fim de avaliarmos a participação da ciclooxigenase e produção de prostaglandinas na resposta ao ionóforo de cálcio A23187, avaliamos as curvas concentração-resposta para A23187 na presença de indometacina (Figura 8), usada aqui como bloqueadora inespecífica de COX-1 e COX-2. Após a incubação por 30 minutos com indometacina (10 nmol/L), observamos uma alteração nos valores de pD₂ das curvas obtidas em aortas de Wistar tratado em comparação as aortas de Wistar não tratados (Figura 8A). Não observamos alterações das respostas vasodilatadoras ao A23187 pela indometacina entre aortas de SHR e SHR tratados (Figura 8B).

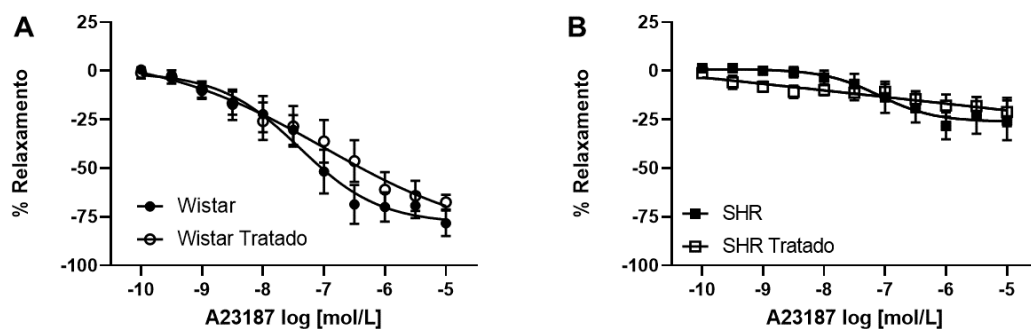


Figura 7. Comparação das curvas de concentração-resposta para A23187 (0.1 nmol/L - 10 μ mol/L) entre anéis de aorta de Wistar tratado e não tratado (A, n=5-3) com Apocinina e SHR tratado e não tratado (B, n=8-3) com Apocinina (30mg/kg).

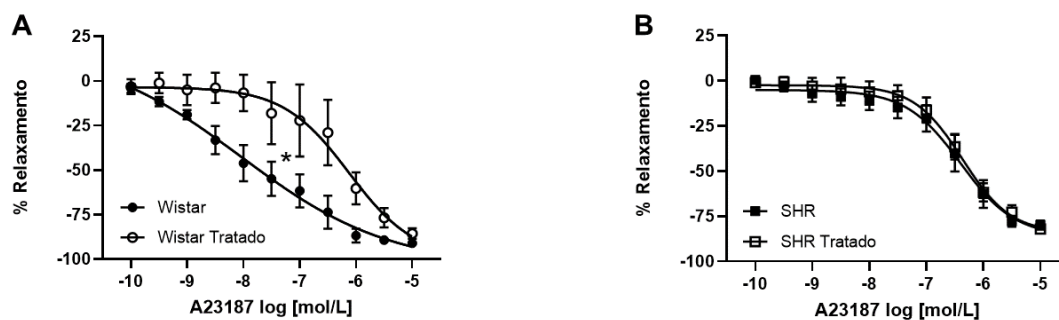


Figura 8. Curvas de concentração-resposta para A23187 (0.1nmol/L - 10 μ mol/L) na presença de Indometacina (10 nmol/L), em anéis de ratos Wistar tratados e não tratados com Apocinina (n=5-4) e SHR não tratado e tratado com Apocinina (n=8-3) *p<0.05, para os valores de pD₂ entre aortas de Wistar e Wistar tratados.

5.5. O tratamento com Apocinina preveniu o efeito da dextrina em aortas de ratos SHR.

Como observado na Figura 4, a pré-incubação com a dextrina promoveu deslocamento significativo das curvas concentração-resposta de ACh para a direita em aortas de ratos Wistar (Figura 4A) e em aortas de SHR (Figura 4B). Avaliamos agora o efeito da dextrina na resposta vasodilatadora à ACh em anéis de aorta de Wistar e SHR tratados com Apocinina (Figura 9).

A pré-incubação com dextrina deslocou as curvas de ACh para a direita em aortas de Wistar tratados com Apocinina ($pD_2 = 6.2 \pm 0.1$, Figura 9A), mas não alterou a resposta máxima vasodilatadora ($EMax = 90.6 \pm 3.2\%$), mesmo efeito observado em aortas de Wistar não-tratados (Figura 4A). Na presença de dextrina, as curvas para ACh obtidas em aortas de Wistar não-tratados e tratados estavam sobrepostas.

Interessantemente, o efeito da dextrina foi bastante diferente em aortas de SHR tratados com Apocinina.

Em aortas de SHR não tratados, a dextrina prejudicou ainda mais a resposta vasodilatadora estimulada pela ACh, ao deslocar a curva de ACh para a direita (Figura 4B). No entanto, em aortas de SHR tratados com Apocinina, a dextrina não causou alteração na resposta máxima ou nos valores de pD_2 da curva concentração-efeito para ACh (Figura 9B). Quando comparamos as curvas para ACh entre os anéis de aorta dos diferentes grupos, é possível observar que a reatividade de aortas de SHR tratados com Apocinina não foi alterada pela dextrina (Figura 9B). Mais ainda, ao comparamos a reatividade de aortas incubadas com dextrina, verificamos que as curvas concentração-efeito para ACh obtidas em aortas de SHR tratados com Apocinina estavam bem deslocadas para a esquerda e o efeito máximo atingiu 100% de relaxamento, mostrando que o perfil das curvas de ACh em aortas de SHR tratados, mesmo na presença de dextrina, apresentou melhor sensibilidade à ACh se comparado aos outros grupos (Figura 9C).

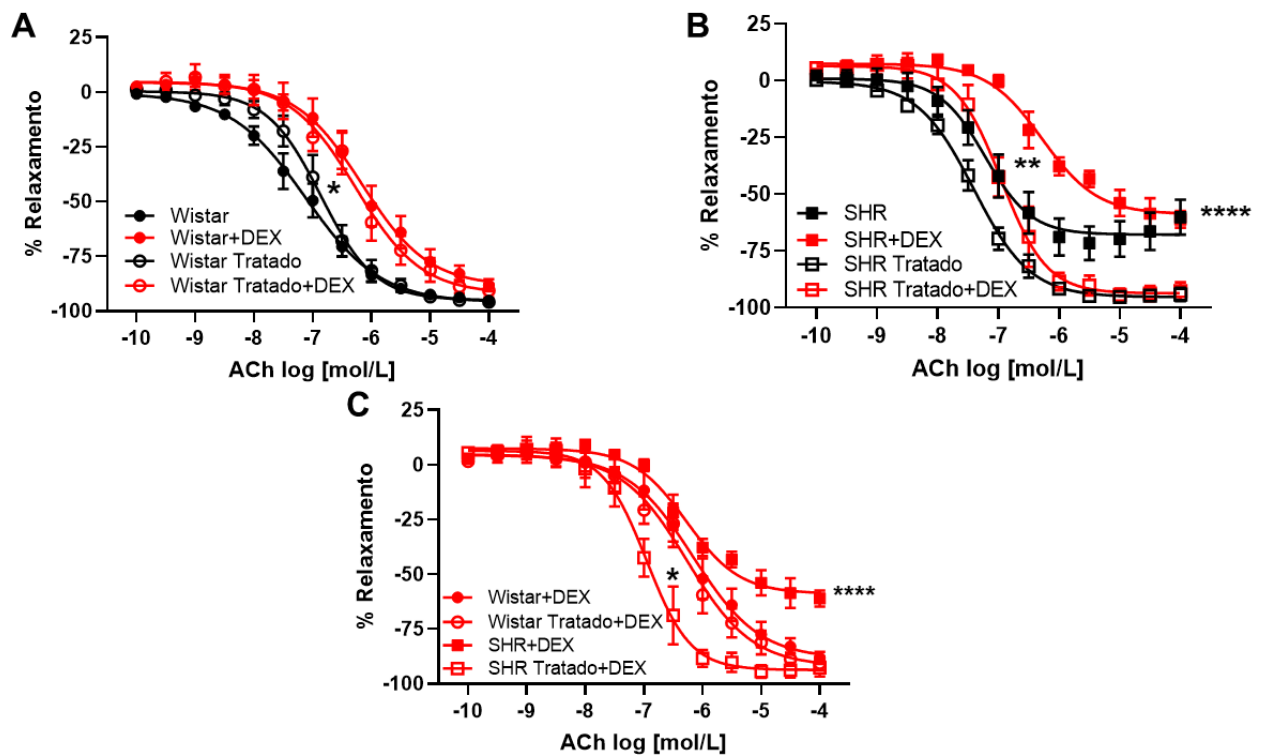


Figure 9. Efeito da metil-β-ciclodextrina (10 mmol/L, após 60 min de incubação) na curva concentração-resposta para acetilcolina (ACh, 0.1nmol/L - 100 μmol/L) em aortas ratos Wistar e SHR. (A) Curva de ACh entre os grupos Wistar tratados e não tratados com Apocinina na presença e ausência de dextrina, (B) Curvas para ACh na presença e ausência de dextrina em SHR tratados e não tratados com Apocinina e (C) Curvas para ACh na presença de dextrina em aortas dos diferentes grupos. * $p < 0.05$ de diferença estatística nos valores de efeito máximo entre Wistar não tratado com dextrina e Wistar tratados na ausência de dextrina, pD_2 entre Wistar não tratado na ausência de dextrina e grupos com dextrina, e pD_2 de SHR não tratado e tratado na presença de dextrina. *** $p < 0.001$ em efeito máximo entre os grupos SHR não tratado sem dextrina e SHR tratado com e sem dextrina, valor de pD_2 entre SHR não tratado com dextrina e SHR tratado e efeito máximo de SHR não tratado com dextrina e todos os outros grupos com dextrina.

Aortas de ratos Wistar tratados com Apocinina não apresentaram diferenças na reatividade ao A23187 quando comparados aos animais controles, ou não tratados (Figura 10A). A pré-incubação com dextrina, não alterou o E_{max} das curvas para A23187 em aortas de Wistar tratados com Apocinina, porém, em semelhança do que foi observado em aortas de ratos não tratados (Figura 8A), promoveu um deslocamento para a direita das curvas para A23187.

Em aortas de SHR tratados com Apocinina, observamos um efeito interessante da dextrina. As aortas de SHR não tratados ou tratados com Apocinina se mostraram pouco reativas ao A23187 (Figura 10B). No entanto, quando estas aortas foram pré-incubadas com a Dextrina, houve melhora no perfil das curvas de relaxamento ao A23187 em aortas de SHR não tratados e tratados (Figura 10B), sendo o Emax das curvas para A23187 aumentado pela pré-incubação com dextrina em aortas de SHR tratados com Apocinina.

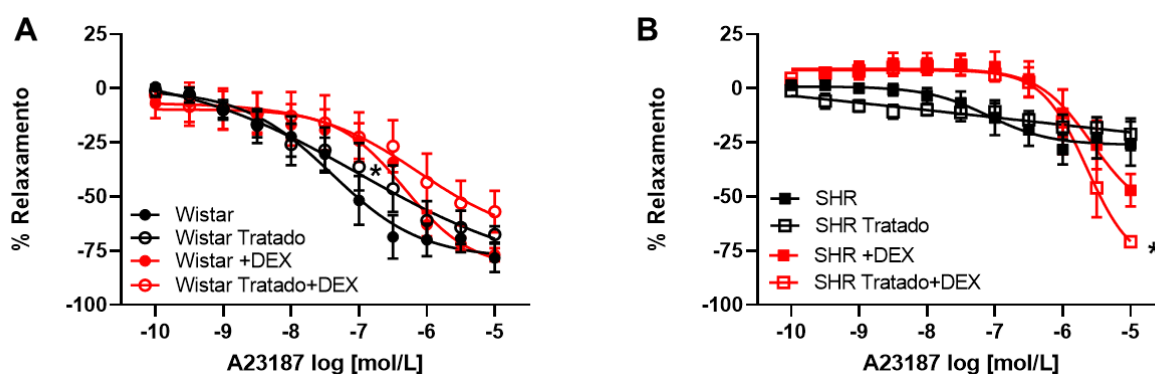


Figura 10. O efeito da metil- β -ciclodextrina (10 mmol/L, após 60 min de incubação) na curva concentração-resposta para A23187 (0.1 nmol/L - 10 μ mol/L) em aortas ratos Wistar e SHR. (A) Curva de A23187 entre os grupos de Wistar tratados e não tratados com Apocinina na presença e ausência de Dextrina. * $p < 0.05$, entre pD_2 das curvas de Wistar e Wistar tratado com incubação de dextrina. (B) Curvas para A23187 na presença e ausência de Dextrina em SHR tratados e não tratados com Apocinina. * $p < 0.05$, entre os valores de efeito máximo em aortas de SHR tratado na presença de dextrina e em aortas de SHR controle e tratado na ausência de dextrina e SHR controle na presença de dextrina.

5.6. O tratamento com Apocinina aumentou a concentração de NOx em aortas de Wistar e SHR. A dextrina não alterou a concentração de NOx aumentada em aorta de SHR tratados com Apocinina:

Avaliamos a concentração de nitrito (NOx) em aortas de ratos Wistar e SHR, não tratados e tratados com Apocinina, antes e após a incubação com dextrina (Figura 11). Os resultados dos experimentos mostraram que homogenatos de aortas de SHR ($0,07 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/mg}$; $n=11$) apresentaram concentração de nitrito 50% menor em relação as aortas de ratos Wistar ($0,15 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/mg}$; $n=7$). O tratamento com Apocinina aumentou a concentração de nitrito tanto em aortas de ratos Wistar ($0,29 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/mg}$; $n=9$), quanto em aortas de SHR ($0,36 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/mg}$; $n=11$). Comparados os aumentos quantificados, verificamos que o tratamento com Apocinina aumentou em quase 2 vezes a concentração de NOx em aortas de ratos Wistar, mas em aortas de SHR, o tratamento com Apocinina aumentou em mais de 5 vezes a concentração de NOx.

Avaliamos se a pré-incubação com Dextrina alteraria a concentração de nitrito em aortas de ratos Wistar e SHR, não tratados ou tratados com Apocinina. Para isto, as aortas foram incubadas com metil- β -ciclodextrina (100 mmol/L) durante 60 minutos, antes de homogeneizarmos os tecidos. Observamos que após a incubação com dextrina, houve uma redução na concentração de NOx quantificada em aortas de ratos Wistar ($0,07 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/mg}$; $n=7$) e Wistar tratado ($0,13 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/mg}$; $n=9$). Em aortas de SHR, a baixa concentração de nitrito não foi significativamente alterada pela incubação com dextrina ($0,04 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/mg}$; $n=8$), como observado em aortas de ratos Wistar. Porém, em aortas de SHR tratados com Apocinina ($0,36 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/mg}$; $n=6$), a dextrina não promoveu efeito significativo ($0,28 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/mg}$; $n=9$).

5.7. A expressão das proteínas eNOS e Cav-1 em células de veias umbilicais humanas foi aumentada pela incubação com Apocinina.

Avaliamos o efeito da Apocinina (100 $\mu\text{mol/L}$) na expressão de CAV-1 e eNOS em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Os resultados mostraram que a exposição de HUVEC por 60 minutos com Apocinina foi suficiente para aumentar a expressão de Caveolina-1 e aumentar também a expressão de eNOS nestas células.

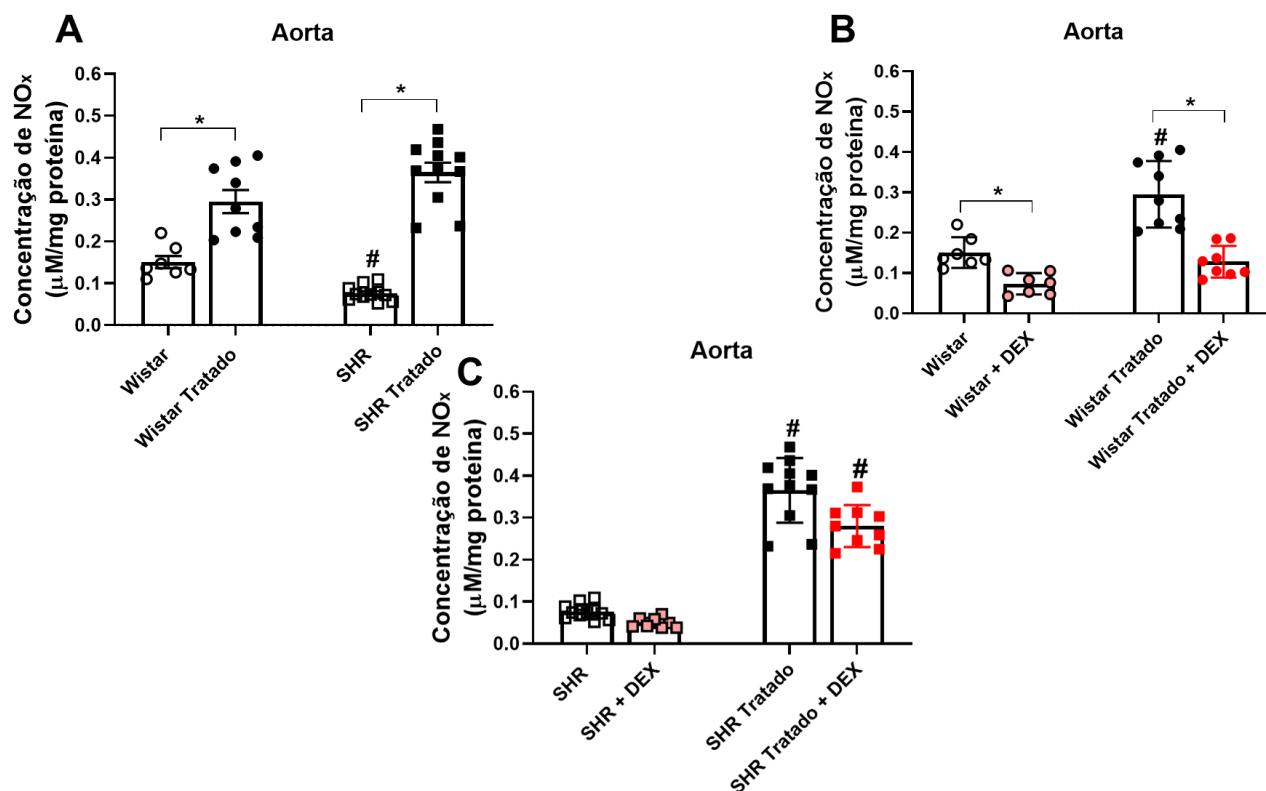


Figura 11. Concentração de nitrito (NO_x) em homogenatos de aortas de ratos Wistar e SHR (n=6), não tratados e tratados com Apocinina (n=6), na ausência e na presença de metil-β-ciclodextrina (10 mmol/L, após 60 minutos incubação). *p<0,05; #p<0,05 entre os grupos tratados e não tratados com Apocinina, na presença e ausência de dextrina.

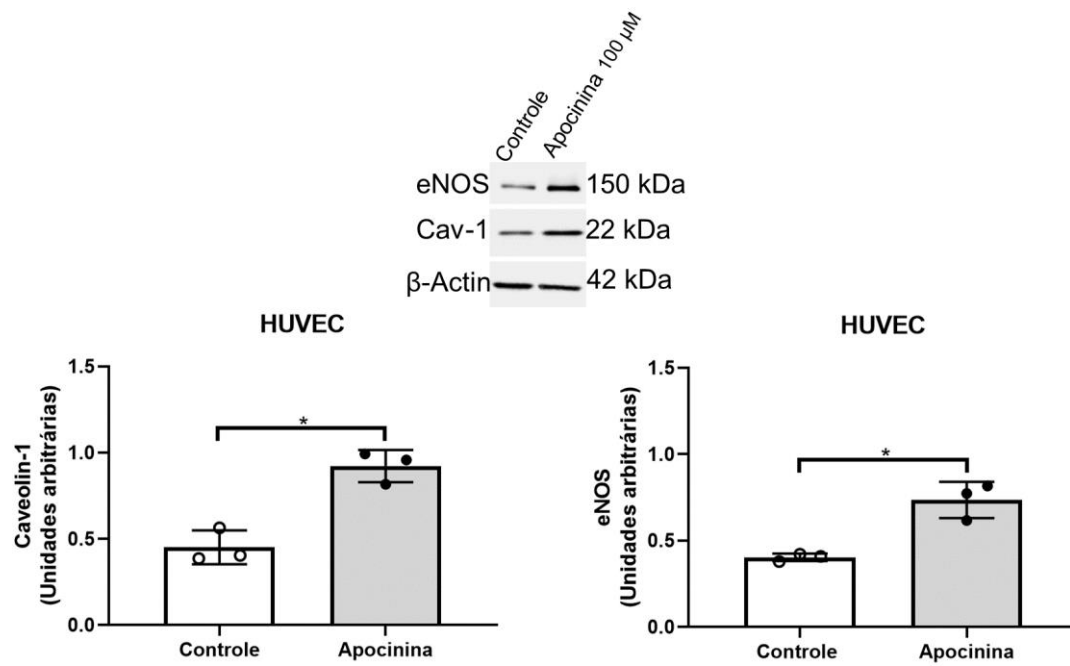


Figura 12. Representação da expressão proteica da Caveolina-1 e eNOS, avaliada por western blot em HUVEC na ausência (Controle) e presença, após incubação por 30 minutos, com Apocinina (100 μ mol/L). * $p < 0,05$

DISCUSSÃO

6.DISSCUSSÃO

Neste estudo, a hipótese levantada foi comprovada pelos resultados apresentados. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com Apocinina previne a disfunção endotelial por melhorar a função das cavéolas nas células endoteliais de aortas de SHR.

Nosso estudo mostrou que o tratamento com Apocinina reduziu a pressão arterial sistólica (PAS) em SHR, mas não alterou em ratos normotensos Wistar (Figura 1). O efeito anti-hipertensivo da Apocinina foi muito questionado, uma vez que os resultados apresentados por diferentes grupos eram contraditórios. Baumer et al. (2007) mostraram o efeito anti-hipertensivo da Apocinina em SHR de 10 semanas de idade, tratados por via oral, com dose de 33 mg/Kg/dia durante 4 semanas. No entanto, o tratamento com Apocinina, por via oral, em doses crescentes (50, 100 e 150 mg/Kg/ dia) durante 3 semanas não promoveu efeito anti-hipertensivo em SHR, com 10 semanas de idade (SCHLÜTER et al., 2008). Mais ainda, o tratamento de SHR de 7 meses de idade, por 8 semanas, com Apocinina (16 mg/kg, v.o), adicionada na água de beber, também não alterou os valores aumentados de pressão arterial dos ratos hipertensos (ROSA et al., 2016). Em nosso laboratório, o tratamento com Apocinina (30 mg/Kg/dia, via oral) por 6 semanas consecutivas, iniciado na 4ª semana de vida e se estendendo até a 10ª semana, reduziu significativamente os valores de PAS (GRATON et al., 2019, 2022; PERASSA et al., 2016). Resultados semelhantes também foram observados por Tain et al. (2012) que trataram SHR da 4ª semana até a 12ª semana de vida, com Apocinina (2.5 mmol/L), e observaram redução dos valores de PAS, PAD e PAM, assim como no estudo desenvolvido pelo grupo de Pechánová (PECHÁNOVÁ; JENDEKOVÁ; VRANKOVÁ, 2009) que mostraram redução significativa da PAS em SHRs tratados com Apocinina (30mg/Kg/dia) durante 6 semanas de tratamento. Os resultados apresentados neste estudo (Figura 1) corroboram os resultados acima descritos e mostram que apesar de não serem normalizados, os valores de PAS de SHR tratados com Apocinina tiveram redução significativa e se mantiveram em torno de 137 ± 5 mmHg (n=5), valores que são próximos aos valores de PAS aferidos em rato Wistar, considerado por muitos laboratórios de pesquisa, como controle normotenso para estudos com SHR (ANISHCHENKO et al., 2015; TAIN et al., 2012). Em conjunto estes resultados sugerem que a eficácia da Apocinina como anti-hipertensivo em SHR depende da dose de Apocinina utilizada, do

tempo de tratamento e da idade do animal no início do tratamento, uma vez que a Apocinina parece ser mais eficaz no tratamento preventivo da hipertensão.

Aortas de SHR apresentam disfunção endotelial, a qual pode ser estudada e demonstrada por experimentos funcionais de reatividade vascular. A prejudicada resposta vasodilatadora à ACh observada em aortas de animais hipertensos, quando comparada a aorta de ratos normotensos, tem sido classicamente considerada uma prova experimental de disfunção endotelial. Em nosso estudo mostramos que as respostas vasodilatadoras (Figura 2), dependente do endotélio e da atividade de NOS (Figura 3), estimuladas pela ACh e A23187 em aortas de SHR, estão bastante prejudicadas em comparação as observadas em aortas de ratos Wistar.

Poucos estudos avaliaram o efeito vasodilatador do A23187 em aortas de SHR. Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios que mostraram que as respostas vasodilatadoras ao ionóforo de cálcio estavam prejudicadas em aorta de SHR (GLUAIS et al., 2006; YANG et al., 2004). Além disso, observamos que na presença de L-NAME, a estimulação com altas concentrações de A23187 promoveu contração de aortas de SHR (Figura 3 B-D), sugerindo que fatores contráteis, derivados do endotélio, modulariam o efeito vasodilatador do NO ou de fator relaxante produzido pela atividade da NOS. No estudo de Yang et al. (2004) foi observado que o relaxamento estimulado por A23187, bastante prejudicado em aortas de SHR, foi melhor observado em aortas incubadas previamente com indometacina, bloqueador inespecífico de cicloxigenase, e S18886, um bloqueador de receptores TP do Tromboxano A₂. Como é possível observar ao comparar as curvas para A23187 em aortas de SHR na ausência (Figura 3) e presença de indometacina (Figura 8), a incubação com a indometacina aumentou significativamente a resposta vasodilatadora ao ionóforo de cálcio, atingindo em torno de 75% de relaxamento na presença de indometacina. Em células endoteliais de SHR, os fatores contráteis derivados do endotélio são gerados por drogas que promovem o relaxamento vascular dependente do endotélio após estimulação de receptores (ACh, ATP) e independente de receptor (A23187) (YANG et al., 2004). Em nosso estudo, os resultados sugerem que o efeito vasodilatador do A23187 em aortas de SHR é mediado pela liberação de fatores relaxantes derivado do endotélio dependentes da atividade de NOS (Figura 3), porém este efeito é contrabalanceado pela liberação concomitante de fatores contráteis dependentes de COX (Figura 8). A pré-incubação com indometacina (Figura 8) aumentou o efeito vasodilatador do A23187 em aortas de SHR, sem alterar este efeito

do A23187 em ratos Wistar. Resultados prévios mostraram que fatores contráteis dependentes de COX, principalmente o Tromboxano A_2 , a PGI_2 e PGH_2 são estimulados pelo A23187 e têm papel relevante na disfunção endotelial em aortas de SHR. (GLUAIS et al., 2006)

Até aqui nossos resultados reforçaram a observação que a disfunção endotelial em aortas de SHR, associada a valores aumentados de PAS, é consequente de mecanismos independentes da estimulação de receptores muscarínicos, mas que envolve redução da atividade de NOS e redução da produção de NO. Além disso, os resultados sugerem que mecanismos distintos aos estimulados pela ACh seriam estimulados pelo A23187 em aortas de SHR. Nestes vasos, o A23187 além da estimular a prejudicada atividade da NOS e produção de NO, também estimula a produção de fatores contráteis dependentes da atividade de COX.

Os passos seguintes de nosso estudo foram conduzidos com o objetivo de avaliarmos se o tratamento com Apocinina reverteria a prejudicada resposta vasodilatadora estimulada pela ACh e A23187 em aortas de SHR.

Os resultados apresentados neste estudo mostram que o tratamento com Apocinina reduziu a pressão arterial e foi eficaz em reverter a disfunção endotelial em aortas de ratos espontaneamente hipertensos. Observamos, que as curvas para ACh em aortas de SHR tratados com Apocinina apresentaram efeito máximo de 100% de relaxamento (Figura 6B) e estavam deslocadas para a esquerda (Figura 6C), sugerindo maior potência da ACh em aortas de SHR tratados. Este resultado está de acordo com os apresentados em outros estudos desenvolvidos pelo nosso grupo, nos quais o tratamento com Apocinina melhorou o efeito vasodilatador da ACh em artérias de SHR, sem nenhuma alteração em artérias de ratos normotensos Wistar (PERASSA et al., 2016). No entanto, interessante, mostramos pela primeira vez que as respostas vasodilatadoras estimuladas pelo ionóforo de cálcio não são alteradas em aortas de SHR tratados com Apocinina (Figura 7B), na ausência e presença de indometacina (Figura 8B).

O mecanismo proposto para a resposta vasodilatadora dependente de endotélio e estimulada pela ACh e A23187, envolve o aumento da concentração intracelular de cálcio nas células endoteliais, formação do complexo cálcio-calmodulina e ativação da eNOS. O complexo Ca^{+2} - calmodulina promove o desligamento da eNOS da caveolina-1 e síntese de NO, que causa o relaxamento das células o músculo liso vascular. Em estudos

anteriores, demonstramos que o tratamento com Apocinina, aumentou as concentrações basais e estimuladas pela ACh, de cálcio e de NO em células endoteliais de SHR (PERASSA et al., 2016). No presente estudo, mostramos que a concentração de NOx foi aumentada em aortas de ratos tratados com Apocinina (Figura 11A). Baseados nestes resultados, esperávamos que as respostas vasodilatadoras estimuladas pelo A23187 fossem mais eficazes em aortas de SHR tratados com Apocinina, assim como observamos para a ACh. Não temos como comprovar até o momento o mecanismo envolvido no efeito diferencial entre ACh e A23187 em aortas de SHR tratados com Apocinina. No entanto, é possível sugerir que o tratamento com Apocinina não promoveu nenhuma alteração na resposta vasodilatadora ao A23187 em aortas de SHR por não alterar a produção de fatores contráteis dependentes pela COX em aortas de SHR. Novos experimentos serão necessários para comprovarmos esta sugestão.

Os resultados obtidos até aqui reforçam a sugestão de que o tratamento com Apocinina previne a disfunção endotelial ao prevenir alterações em mecanismos de transdução do sinal associados atividade da eNOS e liberação de NO, independentes da ativação do receptor muscarínico. A partir destes resultados passamos a avaliar se o tratamento com Apocinina alteraria o papel das cavéolas na disfunção endotelial em SHR.

As cavéolas estão presentes em variados tipos de células, entre elas, células do sistema cardiovascular, como células endoteliais, do músculo liso vascular e miocárdio. Um reduzido número de cavéolas foi observado inicialmente no miocárdio de SHR de 20 semanas de idade com hipertrofia cardíaca estabelecida (GOTO et al., 1990). Alterações no número, integridade e função de cavéolas em células endoteliais tem sido associada à disfunção endotelial e hipertensão. Estudos prévios mostraram que há um menor número de cavéolas em células endoteliais de aortas e artérias mesentéricas de SHR, machos e fêmeas, quando comparadas as células endoteliais de ratos Wistar (POTJE et al., 2019; TROIANO et al., 2021). Menor número de cavéolas em células endoteliais e do músculo liso vascular também foi observado em outros modelos de hipertensão, como ratos 2K-1C (RODRIGUES et al., 2007, 2010b). Estes sinais morfológicos importantes têm sido relacionados diretamente a prejudicada resposta vasodilatadora dependente do endotélio e estimulada pela ACh em aortas e artérias mesentéricas de SHR (POTJE et al., 2019).

O papel das cavéolas no relaxamento vascular dependente de endotélio pode ser avaliado funcionalmente, por experimentos de reatividade vascular com artérias pré-incubadas com metil- β -ciclodextrina, uma substância química que remove o colesterol da

membrana plasmática e desta forma, prejudica a estrutura e função das cavéolas. Variações na concentração e tempo de incubação com dextrina podem determinar remoção de colesterol da membrana plasmática e de membranas intracelulares (ZIDOVETZKI; LEVITAN, 2007). Neste estudo, usamos a mesma concentração (10 mmol/L) de dextrina e tempo de incubação (60 minutos) utilizado em estudos prévios de nosso grupo, que prejudicariam a estrutura das cavéolas nas células endoteliais, sem alterá-las nas células do músculo liso vascular (POTJE et al., 2019; TROIANO et al., 2021).

Mostramos que em aortas de ambos os grupos, Wistar e SHR, a dextrina prejudicou o relaxamento estimulado pela ACh, porém esse prejuízo foi maior em aortas de animais hipertensos (Figura 4), agravando a disfunção endotelial. Em aortas de fêmeas Wistar e fêmeas SHR, a dextrina deslocou para a direita as curvas concentração-efeito para a ACh (TROIANO et al., 2021), assim como em aorta e artéria mesentérica de machos SHR (POTJE et al., 2019). Na mesma concentração e tempo de incubação utilizados neste estudo, a dextrina reduziu o número de cavéolas em aortas e artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR, machos e fêmeas (POTJE et al., 2019; TROIANO et al., 2021). Em nosso estudo, observamos que a dextrina foi capaz de reduzir a concentração basal de nitrito (NOx) em aortas de ratos Wistar (Figura 11), e que este efeito da dextrina não foi estatisticamente significativo em aortas de SHR (Figura 11 B), possivelmente devido a concentração basal de NOx ser muito baixa. Previamente a este estudo, já havíamos observado que a dextrina foi capaz de reduzir a concentração basal de NOx em aorta e artéria mesentérica de SHR, além de reduzir a expressão da eNOS em vasos de SHR, (POTJE et al., 2019). Estes resultados juntos reforçam a importância da integridade da cavéola para a resposta vasodilatadora dependente do endotélio e da atividade da eNOS mesmo em situações patológicas, como na disfunção endotelial ou hipertensão (BERNAK-OLIVEIRA et al., 2021; DARBLADE et al., 2001; RODRIGUES et al., 2010b; XU et al., 2008). Efeito pouco significativo da dextrina foi observado nas respostas vasodilatadoras ao A23187, tanto em aorta de ratos Wistar quanto em SHR (Figura 5), sugerindo que o efeito vasodilatador do A23187 não envolveria a participação das cavéolas. Mais uma vez, os resultados sugerem que os mecanismos ativados pelo A23187 seriam distintos dos envolvidos na resposta à ACh.

A depleção de colesterol pela dextrina e consequente efeito sobre as cavéolas, promoveu desacoplamento da eNOS, aumentou a fosforilação da eNOS em resíduos de

serina1177 e aumentou significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em artérias de SHR (POTJE et al., 2019). A fosforilação da eNOS, na sua forma desacoplada, é um mecanismo associado a maior produção de EROs (CHEN et al., 2008).

Este mecanismo, associado a quantidade aumentada de EROs em células vasculares, maior atividade da NAD(P)H oxidase e expressão de suas isoformas e subunidades regulatórias, estaria associado a menor biodisponibilidade de NO em vasos sanguíneos de SHR (GRATON et al., 2019; PERASSA et al., 2016).

A dextrina prejudicou o efeito vasodilatador da ACh (Figura 9A) e do A23187 (Figura 10A) em aortas de Wistar tratados Apocinina, assim como em aortas de Wistar não tratados, sugerindo que a Apocinina não modificou o papel das cavéolas na aorta de ratos normotensos. No entanto, interessante, em aortas de SHR tratados com Apocinina, a dextrina não promoveu efeito, ou seja, não alterou o efeito vasodilatador da ACh (Figura 9B, Figura 9C). Mais ainda, observamos que mesmo na presença da dextrina, a ACh foi mais potente e promoveu uma resposta máxima vasodilatadora mais eficaz em aorta de SHR tratado com Apocinina se comparada as aortas dos outros grupos (Figura 9C). O A23187 promoveu, em altas concentrações, efeito vasodilatador mais eficaz em aortas de SHR tratados com Apocinina e incubadas com dextrina.

Estes resultados poderiam ser associados ao efeito da Apocinina e da dextrina sobre a concentração de NOx quantificada em aortas de ratos Wistar e SHR (Figura 11). O tratamento com Apocinina aumentou a concentração basal de NOx em aorta de ratos Wistar (Figura 11B), a qual foi reduzida pela dextrina, da mesma forma que observado em aortas de Wistar não tratados. Porém em aortas de SHR tratados, o aumento significativo na concentração de NOx não foi alterado pela dextrina (Figura 11C). Estes resultados em conjunto sugerem que em aortas de SHR, a Apocinina protegeu a integridade e/ou a função das cavéolas aos efeitos da dextrina. Para isto, deveríamos admitir possíveis diferenças estruturais, na composição ou localização de cavéolas entre células endoteliais de ratos normotensos e hipertensos tratados com Apocinina. Além destes efeitos, o tratamento com Apocinina poderia alterar a quantidade destas estruturas em aortas de SHR. Não encontramos até o momento, estudos que permitissem tal discussão e, também, não avaliamos até o momento, se o tratamento com a Apocinina poderia aumentar o número de cavéolas em células endoteliais de aortas de SHR. Se este efeito ocorresse, possivelmente a dextrina, na concentração utilizada, seria menos

prejudicial em aortas de SHR tratados com Apocinina do que em aortas de SHR não tratados.

A exposição de HUVEC à Apocinina aumentou significativamente a expressão de CAV-1 e de eNOS (Figura 12). Além de ser importante para a formação e manutenção da estrutura da cavéola, a CAV-1 é a principal proteína encontrada na estrutura das cavéolas e está associada a eNOS, no seu estado não ativado (CHEN et al., 2012; DRAB et al., 2001; LIAN et al., 2019; POTJE et al., 2019; WUNDERLICH et al., 2006; ZHAO et al., 2009). Em vasos de SHR, a expressão da CAV-1 apresenta-se reduzida se comparada a grupos normotensos (PIECH et al., 2003; POTJE et al., 2019; SANCHEZ et al., 2006; TROIANO et al., 2021; VERA et al., 2007b). O efeito da Apocinina observado em HUVEC reforçaria a sugestão que o tratamento com Apocinina poderia possivelmente aumentar o número de cavéolas em células endoteliais de SHR e desta forma, melhorar a atividade da eNOS e produção de NO.

O efeito da Apocinina na preservação da estrutura e função da cavéola em células endoteliais de aortas de SHR mostrado neste estudo, pode ser somado aos outros efeitos benéficos do tratamento com Apocinina em vasos sanguíneos de SHR. Estudos prévios de nosso grupo mostraram que os vasos sanguíneos de SHR tratados com Apocinina apresentam diferenças importantes em relação àqueles de SHR não tratados, ou seja, expressão aumentada de eNOS, na sua forma fosforilada ou não, aumento da concentração intracelular basal ou estimulada pela ACh de cálcio e NO, redução da expressão de isoformas NOX, da atividade NOX e da concentração intracelular de EROs (GRATON et al., 2019; PERASSA et al., 2016). Estes dados mostram o impacto positivo do tratamento com Apocinina na prevenção de alterações estruturais e funcionais das cavéolas que levariam a disfunção endotelial e a hipertensão.

Em uma revisão publicada em 2016, por um grupo de pesquisa importante na área (VIRDIS; GESI; TADDEI, 2016b), o estudo conduzido pelo nosso grupo sobre os efeitos da Apocinina em SHR (PERASSA et al., 2016) foi comentado e considerado como pano de fundo para futuras pesquisas ao propor que a Apocinina melhora a função endotelial por outros mecanismos além da modulação de EROs vascular. A Apocinina promove aumento na disponibilidade de NO, por meio de mecanismos direta ou indiretamente associados ao aumento da expressão e atividade de eNOS.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados apresentados neste estudo mostraram que o tratamento com Apocinina melhora a função das cavéolas em aortas de SHR. Este efeito, associado aos outros efeitos observados previamente, sugerem que o tratamento com Apocinina previne a disfunção endotelial, por mecanismos que aumentam a atividade da eNOS, a produção e biodisponibilidade de NO em vasos sanguíneos de SHR.

REFERÊNCIAS

8.REFERÊNCIAS

ANISHCHENKO, A. M. et al. Dynamics of Blood Pressure Elevation and Endothelial Dysfunction in SHR Rats During the Development of Arterial Hypertension. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 159, n. 5, p. 591–593, 2015.

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

BERNAK-OLIVEIRA, Â. et al. The protective role of neuronal nitric oxide synthase in endothelial vasodilation in chronic β -adrenoceptor overstimulation. **Life Sciences**, v. 285, p. 119939, 2021.

CHEN, C. A. et al. Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase regulates superoxide generation from the enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 40, p. 27038–27047, 2008.

CHEN, Z. et al. Nitric oxide-dependent Src activation and resultant caveolin-1 phosphorylation promote eNOS/caveolin-1 binding and eNOS inhibition. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 7, p. 1388–1398, 2012.

DARBLADE, B. et al. Alteration of plasmalemmal caveolae mimics endothelial dysfunction observed in atheromatous rabbit aorta. **Cardiovascular Research**, v. 50, n. 3, p. 566–576, 2001.

DRAB, M. et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. **Science**, v. 293, n. 5539, p. 2449–2452, 2001.

FRANK, P. G. et al. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 7, p. 1161–1168, 2003.

GARCÍA-CARDEÑA, G. et al. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: Implications for nitric oxide signaling (endothelial nitric oxide synthase/signal transduction/vascular biology/N-myristoylation). **Proceedings of**

the **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 13, p. 6448–6453, 1996.

GLUAIS, P. et al. In SHR aorta, calcium ionophore A-23187 releases prostacyclin and thromboxane A₂ as endothelium-derived contracting factors. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, p. 2255–2264, 2006.

Goto, Y. et al. Three-dimensional observation on sarcoplasmic reticulum and caveolae in myocardium of spontaneously hypertensive rats. **Journal of submicroscopic cytology and pathology**, v. 22, n. 4, p. 535–542, 1990.

GRATON, M. E. et al. Apocynin alters redox signaling in conductance and resistance vessels of spontaneously hypertensive rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 134, p. 53–63, 2019.

GRATON, M. E. et al. Comparative study between apocynin and protocatechuic acid regarding antioxidant capacity and vascular effects. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 1047916, 2022.

GRATTON, J. P.; BERNATCHEZ, P.; SESSA, W. C. Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. **Circulation Research**, v. 94, n. 11, p. 1408–1417, 2004.

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

JAMA, H. A. et al. Rodent models of hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 5, p. 918–937, 2022.

JU, H. et al. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 30, p. 18522–18525, 1997.

KLINGE, C. M. et al. Resveratrol stimulates nitric oxide production by increasing estrogen receptor α -Src-caveolin-1 interaction and phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 7, p. 2185–2197, 2008.

LIAN, X. et al. Pathophysiological Role of Caveolae in Hypertension. **Frontiers in Medicine**, v. 6, p. 153, 2019.

OELZE, M. et al. Vascular dysfunction in streptozotocin-induced experimental diabetes strictly depends on insulin deficiency. **Journal of Vascular Research**, v. 48, n. 4, p. 275–284, 2011.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**, v. 27, p. 282–293, 1963.

OKAMOTO, T. et al. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 10, p. 5419–5422, 1998.

PALIEGE, A. et al. Effect of apocynin treatment on renal expression of COX-2, NOS1, and renin in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 3, p. R694–R700, 2006.

PARTON, R. G.; SIMONS, K. The multiple faces of caveolae. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 3, p. 185–194. 2007.

PECHÁNOVÁ, O.; JENDEKOVÁ, L.; VRANKOVÁ, S. Effect of chronic apocynin treatment on nitric oxide and reactive oxygen species production in borderline and spontaneous hypertension. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 1, p. 116–122, 2009.

PENG, X. L. et al. Resveratrol ameliorates high glucose and high-fat/sucrose diet-induced vascular hyperpermeability involving Cav-1/eNOS regulation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 24 nov. 2014.

PERASSA, L. A. et al. Apocynin reduces blood pressure and restores the proper function of vascular endothelium in SHR. **Vascular Pharmacology**, v. 87, p. 38–48, 1 dez. 2016.

PETERS, K. R.; CARLEY, W. W.; PALADE, G. E. Endothelial plasmalemmal vesicles have a characteristic striped bipolar surface structure. **The Journal of Cell Biology**, v. 101, n. 6, p. 2233–2238, 1985.

PIECH, A. et al. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. **Cardiovascular Research**, v. 57, n. 2, p. 456–467, 2003.

POTJE, S. R. et al. Reduced caveolae density in arteries of SHR contributes to endothelial dysfunction and ROS production. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 6696, 1 dez. 2019.

RAZANI, B.; LISANTI, M. P. Caveolins and caveolae: Molecular and functional relationships. **Experimental Cell Research**, v. 271, n. 1, p. 36–44, 15 nov. 2001.

RODRIGUES, G. J. et al. Caveolae dysfunction contributes to impaired relaxation induced by nitric oxide donor in aorta from renal hypertensive rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 323, n. 3, p. 831–837, 2007.

RODRIGUES, G. J. et al. Decreased number of caveolae in endothelial cells impairs the relaxation induced by acetylcholine in hypertensive rat aortas. **European Journal of Pharmacology**, v. 627, n. 1–3, p. 251–257, 2010.

ROSA, C. M. et al. Apocynin influence on oxidative stress and cardiac remodeling of spontaneously hypertensive rats with diabetes mellitus. **Cardiovascular Diabetology**, v. 15, n. 1, 2016.

SÁNCHEZ, M. et al. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 24, n. 1, p. 75–84, 2006.

SAVLA, S. R.; LADDHA, A. P.; KULKARNI, Y. A. Pharmacology of apocynin: a natural acetophenone. **Drug Metabolism Reviews**, v. 53, n. 4, p. 542–562, 2021.

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

SHAUL, P. W. et al. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 11, p. 6518–6522, 1996.

SHAUL, P. W.; ANDERSON, R. G. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 5, p. L843–L851, 1998.

SOWA, G.; PYPAERT, M.; SESSA, W. C. Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 24, p. 14072–14077, 2001.

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

TROIANO, J. A. et al. Caveolin-1/Endothelial Nitric Oxide Synthase Interaction Is Reduced in Arteries From Pregnant Spontaneously Hypertensive Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. 9, p. 760237, 2021.

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

WUNDERLICH, C. et al. Disruption of caveolin-1 leads to enhanced nitrosative stress and severe systolic and diastolic heart failure. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, n. 2, p. 702–708, 2006.

XU, Y. et al. Caveolae and endothelial dysfunction: Filling the caves in cardiovascular disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, n. 2-3, p. 256–260, 2008.

YAMADA E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 1, n. 5, p. 445–458, 1955.

YANG, D. et al. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine, ATP and the calcium ionophore A 23187 in aortas from spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 18, n. 3, p. 321–326, 2004.

YAO, Y. et al. The differential protein and lipid compositions of noncaveolar lipid microdomains and caveolae. **Cell Research**, v. 19, n. 4, p. 497–506, 2009.

YERA, R. et al. Chronic administration of genistein improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: Involvement of eNOS, caveolin and calmodulin expression and NADPH oxidase activity. **Clinical Science**, v. 112, n. 3–4, p. 183–191, 2007.

ZHAO, Y. Y. et al. Persistent eNOS activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through PKG nitration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 7, p. 2009–2018, 2009.

ZIDOVETZKI, R.; LEVITAN, I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, n. 6, p. 1311–1324, 2007.