

AMANDA COELHO DE LIMA

**O TRATAMENTO COM APOCININA É CAPAZ DE
RESTAURAR A RESPOSTA VASODILATADORA
MEDIADA PELO RECEPTOR AT_2 À ANGIOTENSINA II
NA AORTA TORÁCICA DE RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**

ARAÇATUBA

2026

AMANDA COELHO DE LIMA

**O TRATAMENTO COM APOCININA É CAPAZ DE
RESTAURAR A RESPOSTA VASODILATADORA
MEDIADA PELO RECEPTOR AT₂ À ANGIOTENSINA II
NA AORTA TORÁCICA DE RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Mestra.

Área de Concentração: Ciências Fisiológicas

Orientador(a): Prof. Titular Cristina Antoniali Silva

ARAÇATUBA

2026

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

L732t Lima, Amanda Coelho de.
O tratamento com apocinina é capaz de restaurar a resposta vasodilatadora mediada pelo receptor AT2 À Angiotensina II na aorta torácica de Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) / Amanda Coelho de Lima. - Araçatuba, 2026
65 f. : il.

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

1. Angiotensina II 2. Ratos endogâmicos SHR 3. Receptor tipo 2 de angiotensina II

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedico esse trabalho ao meu avô, **Roberto de Souza Gomes Coelho**, que segue presente em minhas lembranças, em meus valores e em cada passo da minha caminhada. Sua ausência é saudade, mas também é força que me impulsiona. Esta dissertação é dedicada a você, com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Jesus Cristo, por serem minha base, minha força e minha luz ao longo de toda essa caminhada. Por me concederem sabedoria, perseverança e serenidade nos momentos mais desafiadores.

À minha orientadora, professora Cristina, pela orientação, dedicação e confiança depositada em mim. Sua contribuição foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho e para minha formação acadêmica e pessoal.

Ao meu namorado, Andrey, pelo amor, paciência, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos, sendo essencial para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, por todo amor e apoio ao longo da minha vida. Por nunca medirem esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Aos meus familiares e amigos, por estarem presentes, pelo apoio, pelas palavras de encorajamento e pelos momentos de leveza durante esse percurso.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), pelo suporte acadêmico e financeiro, e pela estrutura oferecida para a realização desta pesquisa.

Ao meu grupo de pesquisa incluindo a doutoranda Mariana Quirino Santana e integrantes de iniciação científica, Lívia Venturian, Lívia Valeri, Maria Luiza Abiko, Brenda Lopes e João Victor Narciso, pelo companheirismo, pelas trocas de conhecimento e por todo o apoio durante essa jornada.

Aos amigos do Departamento de Ciências Básicas, em especial do Laboratório de Farmacologia, da FOA, incluindo Lucas Custódio e Beatriz Travalon, pelo apoio, ensinamentos, risos e amizade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Mesmo a menor das pessoas pode mudar o curso do futuro”.
— *O Senhor dos Anéis*, J. R. R. Tolkien

COELHO, A. **A apocinina reprograma a sinalização do receptor Ang II restaurando a vasodilatação mediada por AT₂ na aorta de ratos hipertensos.** 2026. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2026.

RESUMO

O estresse oxidativo é um importante contribuinte para a disfunção vascular na hipertensão e exerce profunda influência na sinalização dos receptores da angiotensina II (Ang II). Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), a ativação sustentada do eixo receptor de Ang II do tipo 1 (AT₁R) – NAD(P)H oxidase promove a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO), reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e contribui para a disfunção endotelial. Considerando o papel contrarregulador do receptor de Ang II do tipo 2 (AT₂R), investigamos se a modulação redox com apocinina restaura as respostas vasodilatadoras mediadas por AT₂R na aorta de SHR. O relaxamento dependente do endotélio, as respostas contráteis e as curvas concentração-resposta à Ang II foram avaliadas em anéis de aorta de ratos Wistar e SHR, tratados ou não com apocinina, na ausência ou na presença de losartana. SHR não tratados apresentaram redução do relaxamento induzido por acetilcolina e ausência de vasodilatação induzida por Ang II sob o bloqueio do AT₁R, indicando disfunção endotelial e supressão da sinalização via AT₂R. O tratamento com apocinina melhorou o relaxamento dependente do endotélio e restaurou a vasodilatação dependente da concentração induzida por Ang II em SHR após o bloqueio do AT₁R, sem alterar significativamente as respostas contráteis mediadas por AT₁R. Esses achados funcionais são consistentes com evidências prévias que demonstraram que a apocinina reduz a atividade da NAD(P)H oxidase, diminui a expressão de AT₁R, aumenta a expressão de AT₂R e eleva a biodisponibilidade de NO em vasos de SHR. Em conjunto, nossos dados demonstraram que o estresse oxidativo suprime seletivamente a sinalização vasodilatadora mediada por AT₂R na hipertensão e que a modulação redox com apocinina reprograma funcionalmente o equilíbrio dos receptores de Ang II em direção a um fenótipo protetor.

Palavras-chave: Apocinina. Ratos Espontaneamente Hipertensos. Angiotensina II. Losartana. Receptor AT₂.

COELHO, A. Apocynin reprograms Ang II receptor signaling by restoring AT₂-mediated vasodilation in hypertensive rat aorta. 2026. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2026.

ABSTRACT

Oxidative stress is a key contributor to vascular dysfunction in hypertension and profoundly influences angiotensin II (Ang II) receptor signaling. In spontaneously hypertensive rats (SHR), sustained activation of the angiotensin type 1 receptors (AT₁R)–NAD(P)H oxidase axis promotes reactive oxygen species (ROS) overproduction, reduces nitric oxide (NO) bioavailability, and contributes to endothelial dysfunction. Given the counter-regulatory role of the AT₂ receptor (AT₂R), we investigated whether redox modulation with apocynin restores AT₂R-mediated vasodilatory responses in SHR aorta. Endothelium-dependent relaxation, contractile responses, and Ang II concentration–response curves were evaluated in aortic rings from Wistar and SHR, treated or not with apocynin, in the absence or presence of losartan. Untreated SHR exhibited impaired acetylcholine-induced relaxation and absence of Ang II–induced vasodilation under AT₁R blockade, indicating endothelial dysfunction and suppression of AT₂R signaling. Apocynin treatment improved endothelium-dependent relaxation and restored Ang II–induced concentration-dependent vasodilation in SHR following AT₁R blockade, without significantly altering AT₁R-mediated contractile responses. These functional findings are consistent with previous evidence showing that apocynin reduces NAD(P)H oxidase activity, decreases AT₁R expression, increases AT₂R expression, and enhances NO bioavailability in hypertensive vessels. Collectively, our data demonstrate that oxidative stress selectively suppresses AT₂R-mediated vasodilatory signaling in hypertension and that redox modulation with apocynin functionally reprograms Ang II receptor balance toward a protective phenotype.

Keywords: Apocynin. Spontaneously Hypertensive Rats. Angiotensin II. Losartan. AT₂ receptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Autorradiografias típicas e expressão proteicas dos receptores de Ang II.	23
Figura 2 - Gráfico de contração induzida por KCl em anéis de aorta de diferentes grupos.	36
Figura 3 - Gráfico de contração induzida por PE em anéis de aorta de diferentes grupos.	38
Figura 4 - Gráfico de curvas de concentração-resposta à Ang II de ratos Wistar Controle e SHR Controle.	40
Figura 5 - Gráfico de contração de curvas de concentração-resposta à Ang II de ratos Wistar Controle e Wistar Tratado.	41
Figura 6 - Gráfico de contração de curvas de concentração-resposta à Ang II de SHR e SHR Tratado.	42
Figura 7 - Gráfico de contração de comparação entre curvas de concentração-resposta à Ang II de diferentes grupos.	43
Figura 8 - Gráfico de relaxamento à Ach em anéis de aorta de todos os grupos.	45
Figura 9 - Gráfico de contração da PE em anéis de aorta de grupos Wistar e Wistar tratado com e sem losartana.	47
Figura 10 - Gráfico de contração da PE em anéis de aorta de grupos SHR e SHR tratado com e sem losartana.	49
Figura 11 - Gráfico de contração da PE em anéis de aorta de todos os grupos com losartana.	50
Figura 12 - Gráfico de relaxamento de Ang II em anéis de aorta de Wistar e Wistar tratado.	52

Figura 13 - Gráfico de relaxamento de Ang II em anéis de aorta de SHR e SHR tratado.

53

Figura 14 - Gráficos de relaxamento induzido por Ang II, mediado pelo AT₂R, em anéis de aorta de todos os grupos.

55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - porcentagem

ACh – acetilcolina

Ang II – angiotensina II

AT₁R – receptor de angiotensina II do tipo I (do inglês, *AT₁ receptor*)

AT₂R – receptor de angiotensina II do tipo II (do inglês, *AT₂ receptor*)

BH₄ – tetraidropiopterina

Ca²⁺ – cálcio

CaM – calmodulina

cGMP – guanosina monofosfato cíclico

CO₂ – dióxido de carbono

EC₅₀ – concentração necessária para 50% do efeito máximo

E_{max} – efeito máximo

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

EPM – erro padrão da média

ERO – espécies reativas de oxigênio

GC – guanilato ciclase

GCa – guanilato clicase ativa

GPCR – receptores acoplados à proteína G

GTP – guanosina trifosfato

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

KCl – cloreto de potássio

Kg – quilogramas

L-NAME – NG-nitro-L-arginina metil éster

L-VOCCs – Canais de Cálcio do Tipo L Dependentes de Voltagem (do inglês, *L-type Voltage-Operated Calcium Channels*)

mg – miligramas

mL – mililitro

mmHg – milímetro de mercúrio

mmol/L – milimol por litro

mN – miliNewtons

n – número amostral

NAD(P)H oxidase ou NOX – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

nmol/L – nanomol por litro

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

O_2^- – ânion superóxido

O_2 – oxigênio molecular

$ONOO^-$ – peroxinitrito

PAS – pressão arterial sistólica

pD_2 – logaritmo negativo da EC_{50}

PE – fenilefrina

PVAT – tecido adiposo perivascular (do inglês, *Perivascular Adipose Tissue*)

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

SRA – Sistema Renina-Angiotensina

$\mu\text{mol/L}$ – micromol por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 HIPÓTESE	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais.....	29
4.2 Tratamento com apocinina.....	29
4.3 Reatividade vascular da artéria aorta.....	31
4.4 Protocolos experimentais.....	31
4.4.1 Reatividade vascular diferencial ao KCl, PE, Ang II e ACh.....	31
4.4.2 Reatividade vascular mediada pelo AT ₂ R à Ang II.....	31
4.5 Parâmetros farmacológicos.....	32
4.6 Análise estatística.....	32
4.7 Sais, Drogas e Reagentes.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 O tratamento com apocinina promoveu uma restauração parcial da contração induzida por KCl observada em SHR.....	35
5.2 A redução da contração induzida por PE em aortas intactas de SHR é parcialmente melhorada pelo tratamento com apocinina.....	37
5.3 O tratamento com apocinina não modifica as respostas contráteis induzidas pela Ang II em aortas de SHR.....	39
5.4 O tratamento com apocinina melhora as respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio em aortas de SHR.....	44
5.5 A contração induzida pela PE não é significativamente alterada pelo losartana em aortas de SHR.....	46
5.6 O tratamento com apocinina restaura as respostas vasodilatadoras mediadas pelo receptor AT ₂ R à Ang II em aortas de SHR.....	51
6 CONCLUSÕES.....	57

REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS.....	65

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Frequentemente referida como “assassina silenciosa”, a hipertensão arterial emerge como uma das condições mais prevalentes e insidiosas do século XXI, sendo considerada a doença crônica de atenção primária mais comum de ser tratada entre os profissionais da saúde. É de ocorrência sistêmica multifatorial, definida pela elevação persistente da pressão arterial sistólica superior a 140 mmHg e/ou da pressão arterial diastólica acima de 90 mmHg (WEBER *et al.*, 2014). Está comumente associada ao maior risco de eventos cardiovasculares, alterações metabólicas e comprometimentos estruturais e funcionais em órgãos-alvo, podendo ser classificada como primária (ou essencial), quando não há causa identificável, e secundária, quando decorre de uma condição subjacente específica (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; MALACHIAS *et al.*, 2016).

No Brasil, estima-se que 30% da população adulta possui a forma primária da doença, configurando-se como relevante problema de saúde pública e um importante determinante de morbidade e mortalidade precoce (MALTA *et al.*, 2018) promovendo alterações cardiovasculares tanto por mecanismos adaptativos diretos, como hipertrofia vascular e ventricular decorrentes da sobrecarga hemodinâmica, quanto por mecanismos indiretos associados ao dano endotelial e à progressão de alterações vasculares, incluindo processos ateroscleróticos. Apesar dos avanços na área, os mecanismos fisiopatológicos pelos quais a hipertensão se desenvolve ainda permanecem incompreendidos (CAREY, 2016; WILLEY *et al.*, 2014).

Estudos sugerem que um dos fatores que podem estar envolvidos no desenvolvimento da hipertensão arterial é o Sistema Renina-Angiotensina (SRA), que configura uma complexa cascata hormonal de grande importância fisiopatológica, que contribui com inúmeras alterações em órgãos-alvo, sendo elas estruturais e funcionais (SANTOS; KRIEGER; PEREIRA, 2012; CAREY, 2013). Este sistema gera um subproduto denominado Angiotensina II (Ang II), sendo seu principal peptídeo efector. Esse peptídeo exerce um papel fundamental na regulação vascular, atuando como mediador central na regulação da pressão arterial, remodelamento vascular e na função renal, contribuindo para a manutenção da homeostase cardiovascular (CALZERRA; GOMES; QUEIROZ, 2018).

Níveis circulantes e teciduais elevados de Ang II demonstraram ser potentes estimulantes que contribuem com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), além de elevar a produção de citocinas pró-inflamatórias que amplificam o estresse oxidativo, o que pode contribuir para o desenvolvimento e, principalmente, a manutenção

da hipertensão (SILVA *et al.*, 2017; CALZERRA; GOMES; QUEIROZ, 2018). A Ang II induz respostas biológicas por meio da ativação de duas categorias de receptores, sendo eles, receptor de Ang II do tipo I (AT₁R) e receptor de Ang II do tipo II (AT₂R) (PHIPPS *et al.*, 2019). Tais receptores participam de fatores derivados do endotélio, possuindo funções de contração e/ou relaxamento vascular (BAPTISTA, 2015; CAREY, 2017).

O receptor AT₁R é um receptor acoplado à proteína G, apresentando ampla distribuição tecidual, sendo encontrado em vasos sanguíneos, rins, coração e glândula adrenal. A ativação desse receptor pela Ang II desencadeia diversos efeitos fisiológicos, incluindo aumento da contratilidade cardíaca, aumento da filtração glomerular e da perfusão renal, além de estimular processos de hipertrofia cardíaca e vascular e promover a secreção de aldosterona (CSIKOS; CHUNG; UNGER, 1998; CAREY, 2013). A resposta vasoconstritora resultante da interação entre Ang II e AT₁R também está associada ao aumento da produção de ânion superóxido (O₂⁻), decorrente da ativação da NAD(P)H oxidase (NOX) na parede vascular (TOUZY; SCHIFFRIN, 1999).

Em contrapartida, o AT₂R, também acoplado à proteína G, envolvido no crescimento e desenvolvimento fetal, na diferenciação celular e na apoptose (TOUZY; SCHIFFRIN, 2000), age com efeitos contrários às respostas vasoconstritoras produzidas pela Ang II possuindo mecanismos de proteção, contrabalanceando os efeitos adversos da via **AT₁R** induzindo a vasodilatação por meio da produção de óxido nítrico (NO) através da ativação da síntese do guanilato monofosfato cíclico (cGMP) presentes nas células do músculo liso vascular (YOU *et al.*, 2005; DAS *et al.*, 2017; GRATON *et al.*, 2019).

Segundo Carey (2017), experimentos *in vitro* demonstraram que a ativação do AT₂R induz a vasodilatação cerca de 30-40% em vasos pré-contraídos, através da via de sinalização do NO. Esses resultados foram adquiridos por meio da avaliação das respostas contráteis (*in vitro*) ao antagonista específico de AT₂R, o PD 123319 (PD) (GASPARO *et al.*, 2000). Estudos mostraram que camundongos *knockout* para AT₂R exibiram níveis basais de pressão arterial mais elevados do que camundongos controle, demonstrando uma hipersensibilidade pressora à Ang II, porém, em contraste, as respostas pressoras à Ang II foram prejudicadas em camundongos que superexpressam os AT₂R na musculatura lisa vascular de artérias mesentéricas (WIDDOP *et al.*, 2003; HANNAN; DAVIS; WIDDOP, 2003; CAREY, 2017).

Em roedores, experimentos realizados com bloqueio do AT₁R mostraram que sob infusão concomitante de Ang II ou infusão do agonista de AT₂R, o CGP 42112A (CGP), levou à redução da pressão arterial, uma resposta que foi abolida pelo bloqueio simultâneo

de AT₂R utilizando a PD 123319. Essas respostas vasculares geradas frente à manipulação do AT₂R sugeriram que esses receptores são contrarreguladores às ações pressoras da Ang II através do receptor AT₁R e que, a ativação direta do AT₂R utilizando agonistas específicos reduz a pressão arterial (WAN *et al.*, 2004; CAREY, 2017).

Diversos modelos experimentais foram desenvolvidos para investigar os mecanismos envolvidos na hipertensão arterial. Entre eles, o rato espontaneamente hipertenso (SHR, do inglês *Spontaneously Hypertensive Rats*) destaca-se como um dos modelos mais amplamente utilizados por desenvolver hipertensão sem uma causa etiológica definida (OKAMOTO; AOKI, 1963). Esses animais têm sido utilizados como modelos experimentais de hipertensão primária (ou essencial) por apresentarem características fisiopatológicas associadas à hipertensão como o aumento de níveis plasmáticos de Ang II, aumento da resistência vascular periférica e maior atividade do sistema nervoso simpático (BOLTERMANN *et al.*, 2005). Os SHR são roedores geneticamente selecionados e foram obtidos através do endocruzamento de ratos da linhagem Wistar-Kyoto que apresentavam níveis elevados de pressão arterial superiores a 130 mmHg a partir da décima semana de vida, dando origem à indivíduos naturalmente hipertensos (OKAMOTO; AOKI, 1963; ROMERO-NAVA *et al.*, 2016).

Neves *et al.* (2016) relata que esses animais são normotensos ao nascerem, apresentando valores de pressão arterial sistólica (PAS) semelhantes aos Wistar-Kyoto, e vão desenvolvendo hipertensão gradualmente nos primeiros 2-4 meses de vida e, aos 6 meses, já apresentam uma hipertensão sustentada, tendo valores de PAS aumentados, fazendo com que sejam modelos mais próximos das desordens hipertensivas que acometem humanos, tais como a disfunção endotelial e o estresse oxidativo (OKAMOTO; AOKI, 1963; NABHA *et al.*, 2005; AMENTA; DI TULLIO; TOMASSONI, 2023).

Atualmente, reconhece-se o endotélio como um órgão endócrino sensível a estímulos hormonais, neurais e mecânicos. Ele desempenha um papel fundamental na síntese e na liberação de substâncias que efetuam funções cruciais na regulação do tônus vascular, coagulação, trombólise, angiogênese, remodelamento vascular e resposta inflamatória (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; ROCHA, 2020). A regulação da vasomotricidade envolve uma variedade de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras que são produzidas e liberadas pelas células endoteliais, realizando um importante papel ao estimular tanto o relaxamento, quanto a constrição das células do músculo liso vascular (MARUHASHI; KIHARA; HIGASHI, 2018; ROCHA, 2020).

Em condições fisiológicas, o endotélio realiza sua função por meio da liberação de mediadores vasoativos, entre os quais o NO exerce papel central ao promover vasodilatação (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; VANHOUTTE *et al.*, 2016). Ele influencia o fluxo sanguíneo, a pressão nos capilares e exerce o controle sobre a agregação plaquetária, adesão de moléculas nas paredes do endotélio, além de afetar a proliferação das células do músculo liso vascular (UMANS; LEVI, 1995; SILVA, 2023).

Sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, por atividade da enzima NOS (Óxido Nítrico Sintase), o NO é considerado um radical livre sendo produzido no endotélio pela eNOS (Óxido Nítrico Endotelial) na presença de cofatores, como por exemplo, a NAD(P)H, tetraidropiopterina (BH₄), calmodulina (CaM) e cálcio (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; DUDZINSKI *et al.*, 2005). A ativação da eNOS ocorre a partir da atividade de vias de sinalização dependentes de receptores de membrana acoplados a proteína G (GPCR), como por exemplo, receptores AT₁R ou AT₂R. Em circunstâncias fisiológicas, a ativação dos receptores da membrana das células endoteliais pode ocorrer através de estímulos solúveis, incluindo ACh, adenosina difosfato, bradicinina, serotonina, ou por estímulos mecânicos como o estresse de cisalhamento (*shear-stress*) (BUSCONI; MICHEL, 1993; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Esses mecanismos levam a ativação da eNOS e produção de NO, que se difunde para as células do músculo liso vascular (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). No músculo liso vascular, o NO interage com a enzima guanilato ciclase (GC), resultando na sua modificação, tornando-a ativa (GCa) (GEWALTIG; KOJDA, 2002). A GCa facilita a saída de dois grupos de fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), ocasionando na formação da cGMP. Desse modo, o aumento da concentração de cGMP nas células musculares lisas resulta no seu relaxamento, ocorrendo vasodilatação (NELSON; COX, 2014).

A disfunção endotelial é uma alteração vascular caracterizada pelo comprometimento da integridade e da funcionalidade da camada endotelial, resultando em um estado de maior vasoconstrição e redução da capacidade vasodilatadora, além de promover alterações estruturais e funcionais da musculatura lisa vascular (BROCQ *et al.*, 2008; XIAO; LIU; WANG, 2014; MONTEZANO *et al.*, 2015). Esse processo se manifesta por meio de uma atividade endotelial anormal, envolvendo tanto alterações em moléculas de sinalização intracelular, quanto aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais (VANHOUTTE, 2002).

Uma das principais causas da disfunção endotelial é o estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de ERO e os sistemas antioxidantes

endógenos, favorecendo o predomínio de agentes oxidantes (CAI; HARRISON, 2000; BETTERIDGE, 2000). Quando esse desequilíbrio se estabelece, ocorre redução da biodisponibilidade de NO, principalmente devido à sua inativação pela reação com ERO, entre elas, destaca-se o O_2^- , que ao reagir com o NO forma o peroxinitrito ($ONOO^-$), uma ERO associada a danos vasculares e ao desenvolvimento da hipertensão arterial (INCALZA *et al.*, 2017; SHAITO *et al.*, 2022).

ERO são geradas nos organismos vivos como subprodutos do metabolismo celular normal. Em concentrações baixas, essas moléculas participam de importantes processos fisiológicos, contribuindo para a regulação da função endotelial e do tônus vascular. Entretanto, quando produzidas em níveis elevados, podem provocar alterações prejudiciais em diversos componentes celulares, incluindo o DNA, lipídios e proteínas, modificando suas estruturas químicas e comprometendo suas funções. Esse processo pode desencadear respostas celulares como inflamação, apoptose, proliferação celular, fibrose e angiogênese, levando ao remodelamento da parede vascular e à disfunção endotelial (TOUYZ; BRIONES, 2011; BIRBEN *et al.*, 2012; SHAITO *et al.*, 2022).

Essas ERO correspondem a metabólitos derivados do oxigênio molecular, sendo que algumas apresentam elétrons desemparelhados em sua camada externa, característica que lhes confere elevada reatividade química, entre as quais se destacam o O_2^- e o NO. Outras ERO, embora não possuam elétrons desemparelhados, também podem participar de reações de oxirredução por meio da transferência de elétrons com outras moléculas, como ocorre com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o peroxinitrito ($ONOO^-$) e o oxigênio molecular (O_2) (GUZIK; HARRISON, 2006; BARDAWEEL *et al.*, 2018). No caso dos modelos experimentais de hipertensão, o SHR, observa-se um aumento na produção de O_2^- (GRATON *et al.*, 2019).

Níveis elevados de ERO tem sido associado ao desenvolvimento de diversas condições clínicas, incluindo doenças neurodegenerativas, neoplasias (RAUF *et al.*, 2023), doenças pulmonares e renais, além de diferentes alterações cardiovasculares, incluindo aterosclerose, cardiomiopatias, hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca e hipertensão arterial (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; GUZIK; GRIENDLING, 2009).

Apesar da disponibilidade de diversas abordagens terapêuticas eficazes e amplamente utilizadas no tratamento da hipertensão arterial, uma parcela significativa de pacientes apresenta baixa resposta ou resistência às terapias farmacológicas atualmente disponíveis. Essa limitação evidencia a necessidade de investigar e desenvolver novas estratégias

terapêuticas com potencial efeito anti-hipertensivo (CARRETERO; OPARIL, 2000; WU *et al.*, 2015).

Estudos têm demonstrado que a apocinina apresenta efeitos promissores como agente anti-hipertensivo (GRATON *et al.*, 2019). Sendo um princípio ativo extraído da erva medicinal denominada de *Prickorhiza kurroa*, a apocinina é uma importante substância bioativa no sistema cardiovascular, tendo efeitos anti-hipertensivos e antioxidantes, estando envolvida na prevenção de doenças vasculares, disfunção endotelial e remodelamento cardíaco (WILLIAMS; GRIENLING, 2007; ZHANG *et al.*, 2015; VIRDIS; GESI; TADEI, 2016; FENG *et al.*, 2016). Ela age como um inibidor de NOX em células fagocíticas e não fagocíticas (PETRÔNIO *et al.*, 2013; EL-SAWALHI; AHMED, 2014).

Savla; Laddha; Kulkarni (2021) propuseram que a apocinina exerce efeito inibitório sobre a NAD(P)H oxidase (NOX) ao impedir a fosforilação e a translocação do componente citosólico p47phox para membrana de neutrófilos. Heumuller e colaboradores (2008) demonstraram, em células HEK293 que expressavam as isoformas NOX1, NOX2 ou NOX4, que as mieloperoxidases foram capazes de reduzir a produção de ânion superóxido. Além disso, observaram que, em células endoteliais ou do musculo liso vascular tratadas com apocinina, também ocorreu diminuição na produção de O_2^- sem alteração na atividade de NOX, sugerindo que a apocinina possa atuar principalmente como um agente antioxidante (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).

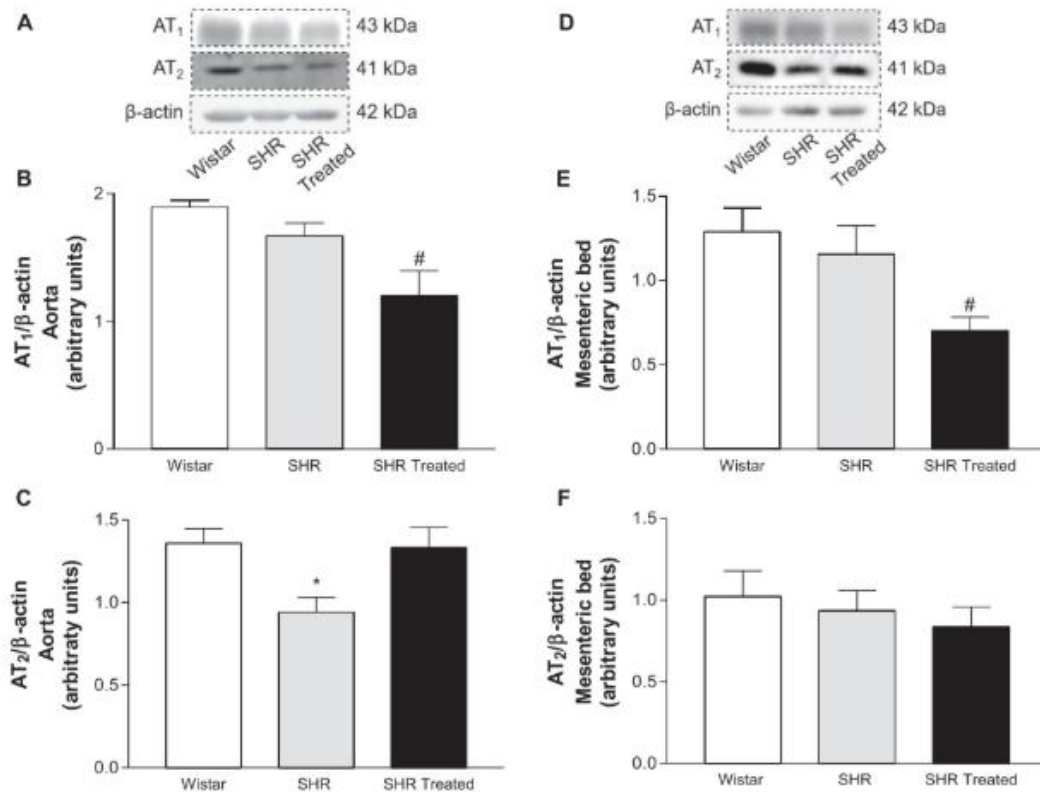
Em diversos modelos experimentais de hipertensão arterial, a administração de apocinina por diferentes vias tem demonstrado efeitos cardiovasculares favoráveis. Estudos observaram que essa droga foi capaz de prevenir a elevação da pressão arterial em camundongos com hipertensão induzida por Ang II (VIRDIS *et al.*, 2004). Além disso, o tratamento também reduziu o aumento de marcadores relacionados ao estresse oxidativo e à produção de O_2^- , porém não apresentou efeito significativo sobre níveis pressóricos em modelos de hipertensão induzida por endotelina-1 e sódio (ELMARAKBY *et al.*, 2005).

Nosso grupo de pesquisa tem investigado os efeitos do tratamento crônico com apocinina sobre a pressão arterial, a função endotelial vascular e a biodisponibilidade de NO em SHR. Os resultados demonstraram que o tratamento com apocinina promove redução da pressão arterial, previne o desenvolvimento da disfunção endotelial e restabelece os níveis sistêmicos e intracelulares de ERO. Além disso, o tratamento foi capaz de aumentar as concentrações intracelulares de NO e cálcio, bem como a expressão proteica da eNOS. Esses achados indicam melhora da função endotelial por mecanismos relacionados não apenas à

diminuição das ERO, mas também ao aumento da biodisponibilidade de NO (PERASSA *et al.*, 2016; GRATON *et al.*, 2019).

Sabe-se que a Ang II ativa o AT₁R através da atividade de NOX. Desse modo, foi proposto que o tratamento com apocinina poderia modificar os efeitos da Ang II em aortas e artérias mesentéricas do SHR, por inibir a atividade NOX (PERASSA *et al.*, 2016). Segundo Graton *et al* (2019), o tratamento crônico com apocinina em SHR reduziu os efeitos pressores da Ang II, por meio da diminuição da biodisponibilidade de ERO dependentes de NOX em aortas e artérias mesentéricas. Também foi observado uma redução da expressão de AT₁R na aorta e no leito mesentérico e o aumento da expressão de AT₂R na aorta de SHR, conforme indicado na figura 1 (GRATON *et al.*, 2019).

Figura 1 - Autorradiografias típicas e expressão proteicas dos receptores de Ang II



Fonte: Graton *et al.*, 2019 – retirado e adaptado com permissão

Legenda: Autorradiografias típicas (A e D) e expressão proteicas, em unidades arbitrárias, dos receptores de Ang II tipo 1 (AT₁R) e do tipo 2 (AT₂R) em aorta (A, B e C) e artéria mesentérica (D, E e F) de ratos Wistar (barras brancas), SHR (barras cinzas) e SHR tratados com apocinina (30 mg/kg/dia) (barras pretas). Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) dos resultados, n= 5-6. $p < 0,05$ SHR tratados *versus* ratos Wistar, $*p < 0,05$ SHR *versus* outros grupos.

Dado que a apocinina reduz as respostas vasoconstritoras mediadas por AT₁R e aumenta a expressão de AT₂R, levantamos a hipótese de que seus efeitos cardiovasculares envolvam a modulação preferencial da via AT₂R. Para testar essa possibilidade, avaliamos a ação da apocinina sob bloqueio farmacológico de AT₁R, com seu antagonista Losartana (CORRIU *et al.*, 1995), permitindo analisar especificamente a contribuição funcional do AT₂R sobre a reatividade vascular.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

O tratamento com apocinina é capaz de restaurar a resposta vasodilatadora mediada pelo receptor AT_2R à Ang II na aorta torácica de ratos espontaneamente hipertensos.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar os mecanismos pelos quais o tratamento crônico com apocinina melhora a resposta vasodilatadora da Ang II, mediada por receptor AT₂R em aortas de SHR.

3.2 Objetivos Específicos

Foram os objetivos específicos deste trabalho:

- 1) Determinar se a contração induzida pela PE é alterada pelo losartana em aortas de SHR
- 2) Determinar se o tratamento com apocinina melhora as respostas vasodilatadoras induzidas pela Ang II, mediada pelo AT₂R em aortas de SHR

MATERIAIS E MÉTODOS

4 Materiais e Métodos

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba (CEUA FOA, protocolo nº 2023-0886, encontrado no ANEXO A).

4.1 Animais

Nesse estudo foram utilizados ratos da linhagem SHR mantida pelo Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP/FOA), no biotério do Departamento de Ciências Básicas (DCB). Também foram utilizados ratos normotensos da linhagem Wistar fornecidos pelo Biotério Central da mesma instituição. Foi realizado o endocruzamento de ratos SHR machos e fêmeas com pressão arterial sistólica (PAS) igual ou superior a 150 mmHg (GRATON *et al.*, 2019).

Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (entre 22 – 24° C), com um ciclo de iluminação de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, além de receberem alimentação e água *ad libitum*.

4.2 Tratamento com apocinina

Os animais foram divididos em quatro grupos: Wistar controle (n=10), Wistar tratado (n=10), SHR controle (n=10) e SHR tratado (n=10). O protocolo de tratamento utilizado foi o mesmo utilizado previamente por nosso grupo de pesquisa (PERASSA *et al.*, 2016; GRATON *et al.*, 2019).

Os grupos tratados receberam apocinina na dose de 30 mg/kg/dia, por via oral, diluída na água de beber, se iniciando a partir da 4ª semana de vida dos animais, seguindo até a 10ª semana de vida. Trocas do tratamento foram feitas duas vezes na semana, sendo ajustado de acordo com o peso dos animais. Os grupos não tratados receberam água sem apocinina.

Finalizando a 10^a semana de vida, os animais foram utilizados nos protocolos experimentais segundo as metodologias descritas a seguir.

4.3 Reatividade vascular em artéria aorta

Os animais foram submetidos à anestesia em uma câmara saturada com isoflurano e, posteriormente, eutanasiados por decapitação. O segmento torácico da aorta foi retirado, colocado em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (mmol/L: 130 NaCl, 14.9 NaHCO₃, 4.7 KCl, 1.18 KH₂PO₄, 1.17 MgSO₄·7H₂O, 5.5 dextrose e 1.60 CaCl₂), a 4° C, com pH de 7,4, sendo dissecado do tecido adiposo perivascular (PVAT). A aorta foi seccionada em anéis de 2 mm de extensão utilizando instrumentos cirúrgicos adequados. Os anéis foram, então, posicionados entre dois ganchos de aço inoxidável conectados a um transdutor de força isométrica (DTM, ADInstruments, Melbourne, VIC, Australia) em cubas contendo 5 mL de solução de Krebs-Henseleit, em temperatura de 37° C, pH de 7,4 e suprimento gasoso de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Esses anéis foram submetidos a uma tensão basal de 30 mN de força e mantidos nessa condição por um período de 30 minutos até estabilização. Posteriormente, os anéis foram estimulados com uma solução contendo alta concentração de potássio (KCl 120 mmol/L) durante 15 minutos para avaliar a integridade funcional da musculatura lisa vascular, e então lavadas com solução de Krebs-Henseleit até a reestabilização.

A funcionalidade e integridade do endotélio vascular foram avaliadas por meio do grau de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh, 10 µmol/L) após uma contração prévia de fenilefrina (PE, 1 µmol/L). Foram considerados anéis com endotélio intacto aqueles que obtiveram um relaxamento em resposta à ACh igual ou superior a 80% da resposta contrátil à PE. Para aortas de SHR não tratados, que exibem disfunção endotelial relacionada à hipertensão, consideramos a integridade e funcionalidade do endotélio quando a ACh (10 µmol/L) apresenta-se um relaxamento igual ou superior a 50% da resposta contrátil à PE. Apenas anéis de aorta com endotélio intacto foram utilizados nos experimentos.

4.4 Protocolos experimentais

Todos os protocolos experimentais foram conduzidos sob condições idênticas nos seguintes grupos: Wistar controle, Wistar tratado com apocinina, SHR controle e SHR tratado com apocinina,

4.4.1 Reatividade vascular diferencial ao KCl, PE, Ang II e ACh

Foram realizados experimentos para avaliar as diferenças na reatividade da aorta entre os grupos em resposta a agentes vasoconstritores (KCl, PE e Ang II) e ao agente vasodilatador (ACh), bem como para avaliar os efeitos do tratamento crônico com apocinina nessas respostas.

Os anéis de aorta foram estimulados com KCl (120 mmol/L), e após sua estabilização, contraídos com PE (1 μ mol/L), e posteriormente relaxados com ACh (10 μ mol/L). As respostas contráteis e de relaxamento foram registradas e comparadas entre os grupos tratado e não tratados.

A reatividade à Ang II foi avaliada em anéis de aorta previamente contraídos utilizando PE (0,1 μ mol/L, concentração capaz de induzir 30 – 40% da contração máxima provocada por KCl 120 mmol/L), uma vez que a estimulação direta com Ang II não desencadeou respostas contráteis. Em seguida, foram adicionadas concentrações cumulativas de Ang II (0,1 ou 100 μ mol/L).

4.4.2 Reatividade vascular mediada pelo AT₂R à Ang II

Os experimentos foram conduzidos para investigar as diferenças nas respostas mediadas pelo AT₂R à Ang II nos anéis de aorta e a influência do tratamento com apocinina na vasodilatação induzida pela Ang II.

Anéis de aorta com endotélio intacto foram incubados durante 30 minutos com losartana (10 μ mol/L) com o objetivo de bloquear os AT₁R antes da exposição à PE. Após a obtenção de uma pré-contração estável com PE (1 μ mol/L), concentrações cumulativas de Ang II (0,1 a 100 μ mol/L) foram adicionadas às cubas.

As respostas mediadas pelos AT₂R foram expressas como porcentagem de relaxamento em relação à resposta contrátil induzida pela pré-contracção de PE e comparadas entre os grupos experimentais.

4.5 Parâmetros farmacológicos

Os parâmetros farmacológicos foram calculados utilizando o software GraphPad Prism versão 9.0. O efeito máximo (E_{max}) foi definido como a maior amplitude da resposta de Ang II mediada pelo AT₂R e expresso como porcentagem de relaxamento. A concentração de Ang II que produz 50% do efeito máximo (EC₅₀) foi determinada por análise de regressão não linear e expressa como o logaritmo negativo (pD₂).

4.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 9.0. Os dados apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), sendo n o número de anéis aórticos analisados. As comparações foram realizadas utilizando o teste *t* de Student não pareado. As comparações entre três ou mais grupos foram conduzidas utilizando ANOVA (*One-Way*), seguida de pós-teste Tukey, quando apropriado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises utilizadas se encontram presentes nas legendas das figuras.

4.7 Sais, Drogas e Reagentes

Nesse estudo foram utilizados os seguintes materiais de consumo:

Sais:

Sais utilizados cloreto de sódio (NaCl), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), cloreto de potássio (KCl), fosfato de potássio monohidratado (KH₂PO₄), sulfato de magnésio (MgSO₄), dextrose (C₁₂H₂₂O₁₁), cloreto de cálcio (CaCl₂).

Drogas:

Apocinina (4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon), PE (L-phenylephrine hydrochloride), ACh (acetylcholine chloride), Ang II e losartana (2-butyl-4-cloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1'-bifenil]-4-il]metil]-1H-imidazol-5-metanol monopotássico).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 Resultados e Discussão

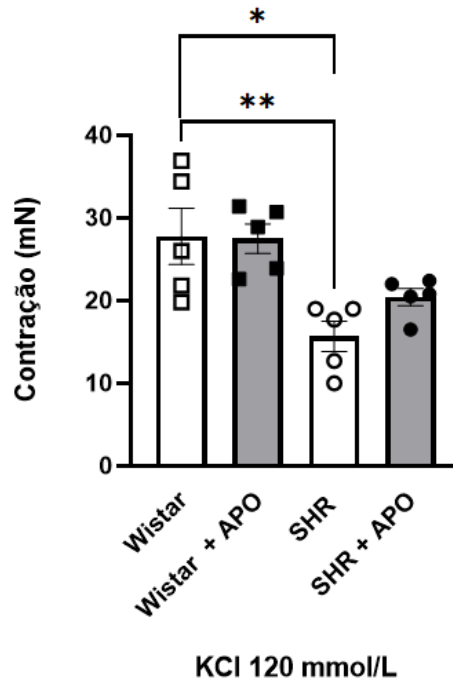
O tratamento com apocinina pode alterar a reatividade vascular a diferentes agentes vasoconstritores e vasodilatadores em SHR. No entanto, os resultados atuais indicam que seus efeitos mais significativos são observados nas respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio.

5.1 O tratamento com apocinina promoveu uma restauração parcial da contração induzida por KCl observada em SHR

Inicialmente, investigamos se o tratamento com apocinina poderia prevenir possíveis alterações na reatividade da aorta de SHR ao KCl, PE, ACh e Ang II, via ativação de AT₁R e AT₂R.

A estimulação com KCl (120 mmol/L) induziu contração em anéis de aorta de todos os grupos experimentais conforme mostrado na Figura 2.

Figura 2 – Gráfico de contração induzida por KCl em anéis de aorta de diferentes grupos.



Fonte: Elaborado pela própria autora

Legenda: Respostas contráteis ao KCl 120 mmol/L em anéis de aorta com endotélio de diferentes grupos. Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) dos resultados obtidos, n=

5. *p < 0,05. Análise estatística realizada utilizando 2way ANOVA

A integridade funcional do músculo liso vascular foi preservada tanto em ratos Wistar do grupo controle quanto em ratos Wistar tratados com apocinina, visto que não foram observadas diferenças entre esses grupos. Em contraste, os anéis de aorta de ratos SHR exibiram uma resposta contrátil significativamente reduzida em comparação com ratos Wistar normotensos ($p < 0,05$). Entretanto, observou-se que os ratos SHR tratados com apocinina exibiram uma recuperação parcial da resposta contrátil ao KCl, uma vez que não houve diferença significativa se comparados com o grupo Wistar ($p = 0,14$). É importante ressaltar que, mesmo com essa recuperação parcial, não foram detectadas diferenças significativas entre ratos SHR não tratados e tratados com apocinina.

A despolarização da membrana induzida por altas concentrações de KCl promove o influxo de Ca^{2+} através de canais de cálcio do tipo L dependentes de voltagem (L-VOCCs),

levando à contração sustentada do músculo liso vascular. O impacto da hipertensão na contração induzida por KCl em aortas de ratos SHR permanece controverso. Nossos resultados são consistentes com relatos anteriores que demonstraram reatividade reduzida de aortas intactas de ratos SHR ao KCl (FAHNING *et al.*, 2024). Por outro lado, estudos utilizando o modelo hipertensivo de 2K-1C relataram que uma única concentração de KCl (120 mmol/L) contraiu anéis de aorta de ratos 2K-1C e 2K com endotélio intacto de maneira semelhante (CALLERA *et al.*, 2001).

Alterações na contração induzida por KCl associadas à hipertensão podem refletir mudanças na funcionalidade dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-VOCC), na concentração extracelular de Ca^{2+} ou no influxo modificado de Ca^{2+} através desses canais. No presente estudo, o tratamento com apocinina promoveu uma restauração parcial da contração reduzida induzida por KCl observada em ratos SHR. No entanto, essa melhora não foi suficiente para restaurar completamente a resposta contrátil aos níveis observados em ratos normotensos. Esse achado sugere que, embora a apocinina possa atenuar parcialmente as alterações na função do músculo liso vascular associadas à hipertensão, mecanismos adicionais provavelmente contribuem para a disfunção contrátil observada em SHR. Estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos subjacentes a essas observações em SHR tratados com apocinina.

5.2 A redução da contração induzida por PE em aortas intactas de SHR é parcialmente melhorada pelo tratamento com apocinina

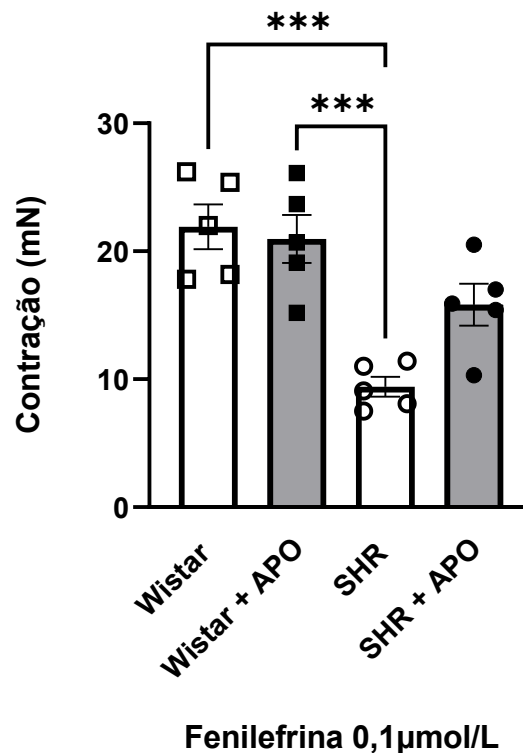
A estimulação de anéis de aorta intactos com PE induziu contração vascular em todos os grupos experimentais (Figura 3).

Não foram observadas diferenças significativas entre ratos Wistar do grupo controle e os tratados com apocinina, indicando que a apocinina não altera as respostas contráteis mediadas por receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos em animais normotensos.

Anéis intactos de aorta de SHR exibiram respostas contráteis marcadamente reduzidas em comparação com ratos Wistar normotensos ($p < 0,001$), confirmando a reatividade vascular prejudicada associada à hipertensão. Curiosamente, os SHR tratados com apocinina

não diferiram estatisticamente dos grupos normotensos (Figura 3), sugerindo que a apocinina atenuou, pelo menos em parte, a redução da responsividade à PE associada à hipertensão.

Figura 3 - Gráfico de contração induzida por PE em anéis de aorta de diferentes grupos.



Fonte: Elaborado pela própria autora

Legenda: Respostas contráteis à PE 1 $\mu\text{mol/L}$ em anéis de aorta com endotélio de diferentes grupos. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos resultados obtidos, $n = 5$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Análise estatística realizada por 2way ANOVA

A contração induzida por PE resulta da ativação de receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, desencadeando o acoplamento da proteína G-fosfolipase C, a formação de Inositol trifosfato e a mobilização intracelular de Ca^{2+} . Portanto, a responsividade reduzida observada em SHR pode estar relacionada a alterações na ativação do receptor $\alpha 1$ -adrenérgico ou em vias de sinalização intracelular subsequentes, incluindo comprometimento do acoplamento da proteína G-PLC ou distúrbios no manuseio de Ca^{2+} (ARCE *et al.*, 2017).

Em vasos intactos, a modulação endotelial também contribui significativamente para as respostas vasoconstritoras. A disfunção endotelial é uma característica bem estabelecida da hipertensão e pode influenciar a contração induzida por PE através da alteração na liberação de fatores relaxantes ou contráteis derivados do endotélio. Resultados anteriores do nosso grupo demonstraram que o tratamento com apocinina previne a disfunção endotelial em SHR. Assim, a restauração parcial da responsividade à PE observada neste estudo pode envolver uma melhor modulação endotelial, além de efeitos diretos na sinalização do músculo liso vascular (PERASSA *et al.*, 2016).

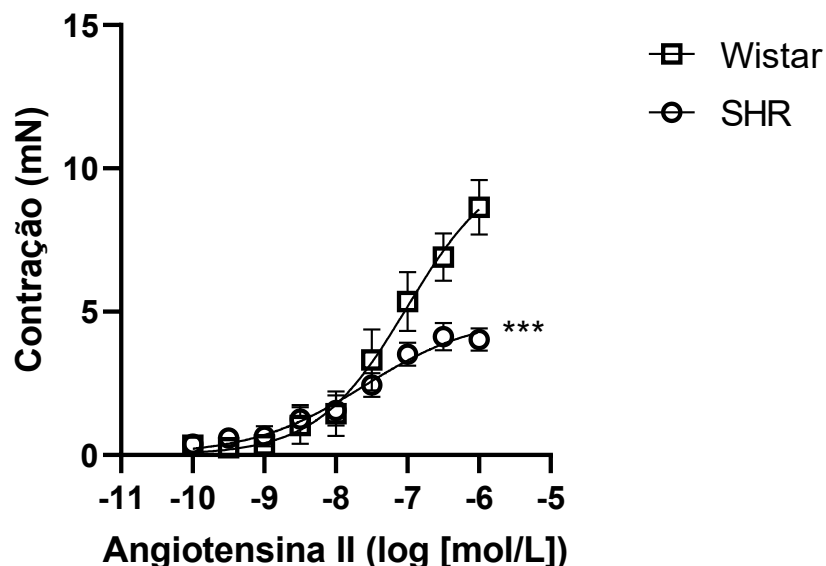
É importante ressaltar que, em contraste com a ausência de efeito na contração induzida por KCl (Seção 5.1), a modulação das respostas à PE pela apocinina sugere que suas ações estão mais relacionadas a vias de sinalização dependentes de receptores do que a mecanismos de influxo de Ca^{2+} induzidos por despolarização.

5.3 O tratamento com apocinina não modifica as respostas contráteis induzidas pela Ang II em aortas de SHR

Após a análise da contração induzida por despolarização (Seção 5.1) e das respostas mediadas pelo receptor $\alpha 1$ -adrenérgico (Seção 5.2), investigamos se o tratamento com apocinina poderia influenciar a contração induzida por Ang II, que interage com AT_1R , ativando-o.

Ao comparar as curvas de concentração-efeito da Ang II entre anéis de aorta de ratos Wistar e SHR, observaram-se diferenças nas respostas contráteis dependentes de AT_1R entre os dois grupos (Figura 4). A estimulação com Ang II produziu contrações dependentes da concentração em ambos os grupos, no entanto, as inclinações das curvas diferiram. Os resultados mostraram que a contração mediada por Ang II foi reduzida nas aortas de SHR, possivelmente devido a respostas mais dispersas e progressivas em comparação com as observadas em ratos Wistar.

Figura 4 – Gráfico de contração de curvas de concentração-resposta à Ang II de ratos Wistar e SHR Controle



Fonte: Elaborado pela própria autora

Legenda: Curvas de concentração-resposta à Ang II (0,1 nmol/L – 1 μ mol/L) em anéis de aorta com endotélio, previamente contraídos com PE, de ratos Wistar e SHR. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos resultados, n = 7. ***p < 0,001. Análise estatística realizada por 2way ANOVA.

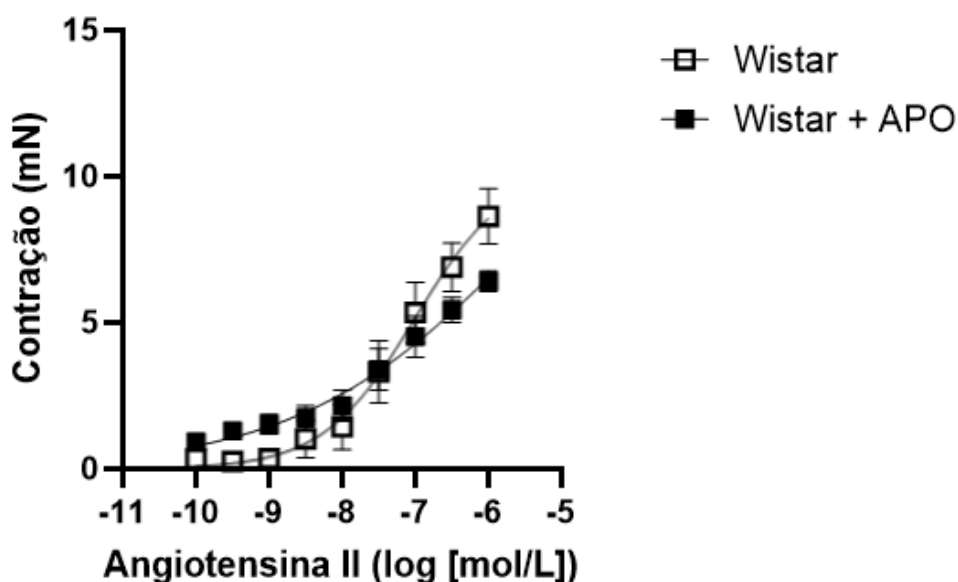
Estudos anteriores do nosso grupo não demonstraram diferenças significativas na contração induzida por Ang II entre aortas intactas de SHR e Wistar (GRATON *et al.*, 2019). No entanto, valores de Emax aumentados sugeriram maior reatividade das artérias mesentéricas de SHR à Ang II em comparação com as artérias de ratos Wistar.

Na hipertensão, a exposição aumentada à Ang II pode promover a dessensibilização e/ou *downregulation* do AT₁R, com consequente redução dos componentes da via Gq/PLC-IP₃ e alteração da mobilização intracelular de Ca²⁺ no músculo liso vascular (MEHTA; GRIENDLING, 2006). Embora algumas evidências sugerem superexpressão do AT₁R nos vasos de SHR, contribuindo para a manutenção da resistência vascular neste modelo experimental (SZCZEPANSKA-SADOWSKA; CZARZASTA; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, 2018), não observamos diferenças na expressão do AT₁R em aortas ou

artérias mesentéricas de SHR em comparação com ratos normotensos (GRATON *et al.*, 2019).

Ao comparar as curvas concentração-efeito da Ang II em ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado com apocinina, observaram-se respostas contráteis semelhantes em ambos os grupos (Figura 5), indicando que o tratamento com apocinina não interferiu na integridade da sinalização mediada por AT₁R em condições normotensas.

Figura 5 - Gráfico de contração de curvas de concentração-resposta à Ang II de ratos Wistar Controle e Wistar Tratado



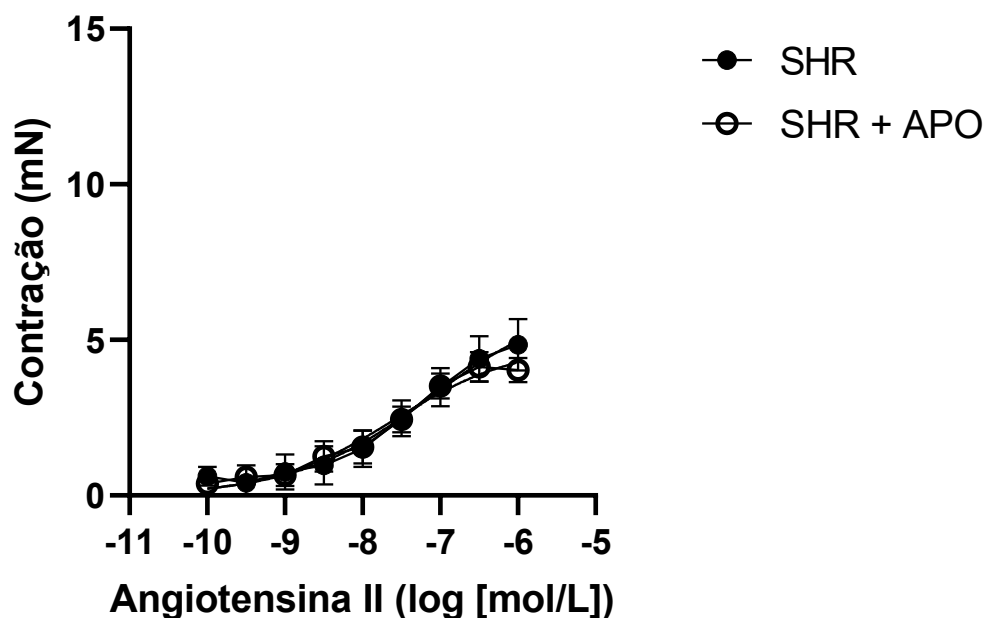
Fonte: Elaborado pela própria autora

Legenda: Curvas de concentração-resposta à Ang II (0,1 nmol/L – 1 μ mol/L) em anéis de aorta com endotélio de ratos Wistar, não tratados e tratados com apocinina. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos resultados, n=7. Análise estatística realizada por 2way ANOVA.

Da mesma forma, não foram observadas diferenças entre as curvas de concentração-efeito da Ang II obtidas em aortas de SHR controle e tratados com apocinina (Figura 6), indicando que o tratamento com apocinina não modificou as respostas contráteis mediadas por AT₁R, mesmo na presença de alterações associadas à hipertensão. Os achados mostrados

na Figura 6 foram inesperados, visto que prevíamos uma redução significativa na contração induzida por Ang II em SHR tratados, considerando que o tratamento com apocinina reduziu significativamente a expressão de AT₁R nesses vasos. Em artérias mesentéricas de SHR tratados com apocinina, a menor expressão de AT₁R foi associada à redução da eficácia da Ang II (GRATON *et al.*, 2019).

Figura 6 – Gráfico de contração de curvas de concentração-resposta à Ang II de SHR e SHR Tratado



Fonte: Elaborado pela própria autora

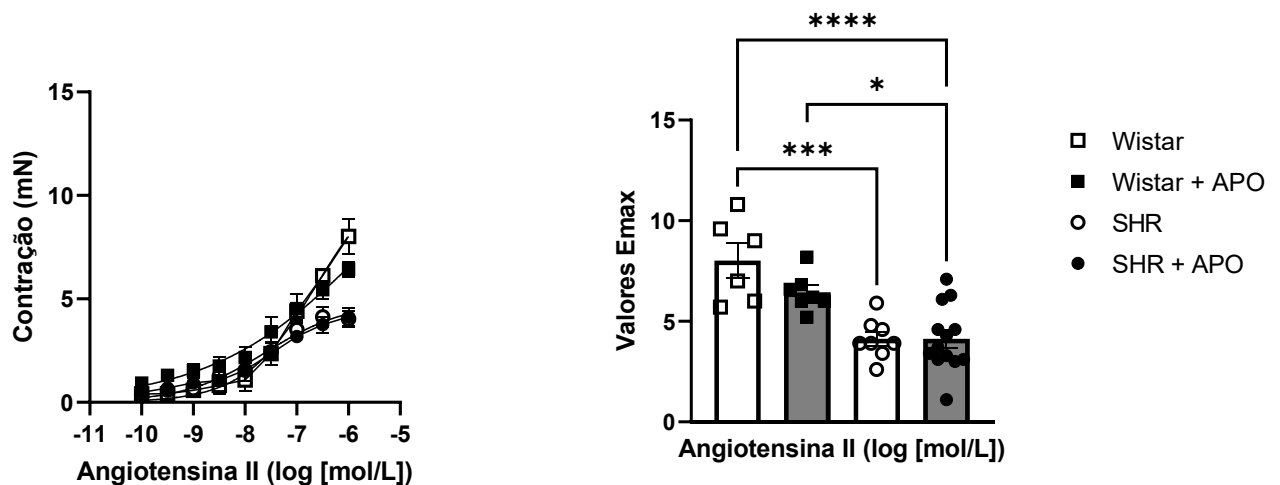
Legenda: Curvas de concentração-resposta à Ang II (0,1 nmol/L – 1 µmol/L) em anéis de aorta com endotélio de SHR, não tratados e tratados com apocinina. Os valores representam a média ± SEM dos resultados, n=7. Análise estatística realizada por 2way ANOVA.

Quando todas as curvas de concentração-resposta da Ang II foram analisadas coletivamente, a reatividade aórtica reduzida à Ang II associada à hipertensão permaneceu inalterada pelo tratamento com apocinina (Figura 6). De acordo com nossos achados, a incubação aguda com apocinina (100 µmol/L) não modificou a contração induzida por Ang II em aortas de ratos hipertensos 2K e 2K-1C (FAHNING *et al.*, 2024).

A resposta contrátil à Ang II observada em SHR, independentemente do tratamento, sugere que a hipertensão nesses animais pode estar associada a adaptações moleculares e funcionais do AT₁R, como dessensibilização e/ou *downregulation*, acoplamento alterado às vias de mobilização de Ca²⁺, ativação prejudicada dos receptores IP3 e remodelamento vascular, como discutido anteriormente. Essas adaptações são consistentes com a exposição crônica à Ang II característica da hipertensão estabelecida (FILTZ; NIIBORI, 2004; FAHNING *et al.*, 2024).

Além disso, embora a apocinina interfira diretamente nas vias oxidativas associadas à NOX, os dados sugerem que a redução da biodisponibilidade de EROs plasmática e celular (PERASSA *et al.*, 2016; GRATON *et al.*, 2019) pode não ser suficiente para normalizar as respostas contráteis mediadas por AT₁R em aortas de SHR (Figura 7).

Figura 7 – Gráfico de contração de comparação entre curvas de concentração-resposta à Ang II de diferentes grupos



Fonte: Elaborado pela própria autora

Legenda: Comparação entre curvas de concentração-resposta à Ang II (0,1 nmol/L – 1 µmol/L) em anéis de aorta com endotélio de diferentes grupos e valores de Emax. Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) dos resultados, n = 7-10. *p < 0,05, **p < 0,01, p < 0,001.

Análise estatística realizada por 2way ANOVA.

Em conjunto com as conclusões das Seções 5.1 e 5.2, os resultados atuais indicam que o tratamento com apocinina não previne as alterações associadas à hipertensão nos mecanismos contráteis da aorta em resposta aos agentes vasoconstritores estudados. Esses achados provavelmente refletem adaptações vasculares crônicas e processos de remodelação que reduzem a capacidade contrátil em resposta a estímulos tanto independentes quanto dependentes de receptores (BILLET *et al.*, 2008).

5.4 O tratamento com apocinina melhora as respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio em aortas de SHR

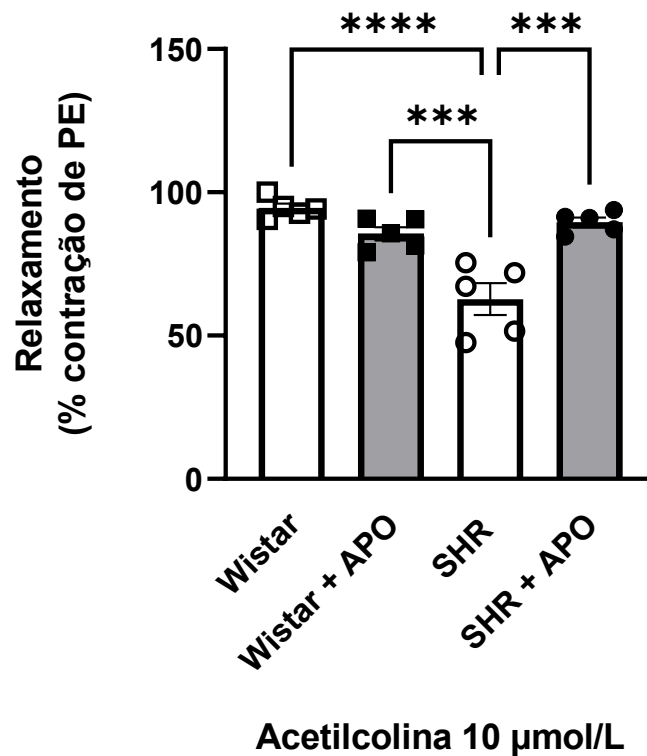
Em contraste com a ausência de efeitos significativos na contração induzida por Ang II, e com a modulação parcial observada nas respostas ao KCl e à PE, o tratamento com apocinina influencia marcadamente os mecanismos vasodilatadores dependentes do endotélio.

Curiosamente, o efeito benéfico da apocinina na vasodilatação dependente do endotélio tem sido consistentemente relatado em aortas e vasos de resistência de ratos hipertensos, sugerindo uma melhora da função endotelial após o tratamento com apocinina (YOU *et al.*, 2005; PERASSA *et al.*, 2016; GRATON *et al.*, 2019).

Como mostrado na Figura 8, as aortas de SHR não tratados exibiram respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio reduzidas à ACh em comparação com ratos Wistar normotensos. O comprometimento do relaxamento observado em aortas intactas de SHR caracteriza funcionalmente a disfunção endotelial associada à hipertensão, uma característica bem estabelecida em modelos experimentais dessa condição (PERASSA *et al.*, 2016; FAHING *et al.*, 2024).

Em contraste, as aortas de SHR tratados com apocinina apresentaram respostas vasodilatadoras à ACh significativamente melhores em comparação com SHR não tratados. Em muitos casos, essas respostas foram comparáveis às observadas em aortas intactas de ratos normotensos, sugerindo que o tratamento com apocinina previne eficazmente a disfunção endotelial (YOU *et al.*, 2005; PERASSA *et al.*, 2016; GRATON *et al.*, 2019).

Figura 8 – Gráfico de relaxamento à ACh em anéis de aorta de todos os grupos



Fonte: Elaborado pela própria autora

Legenda: Respostas vasodilatadoras à ACh (10 µmol/L) em anéis de aorta com endotélio de grupos diferentes. Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) dos resultados, n = 5;

p < 0,01; *p < 0,001. Análise estatística realizada utilizando 2way ANOVA.

Com a função endotelial restaurada pelo tratamento com apocinina, seria esperado um aumento na atividade das vias de sinalização associadas à ativação do AT₂R, contribuindo potencialmente para a modulação das respostas vasodilatadoras induzidas pela Ang II.

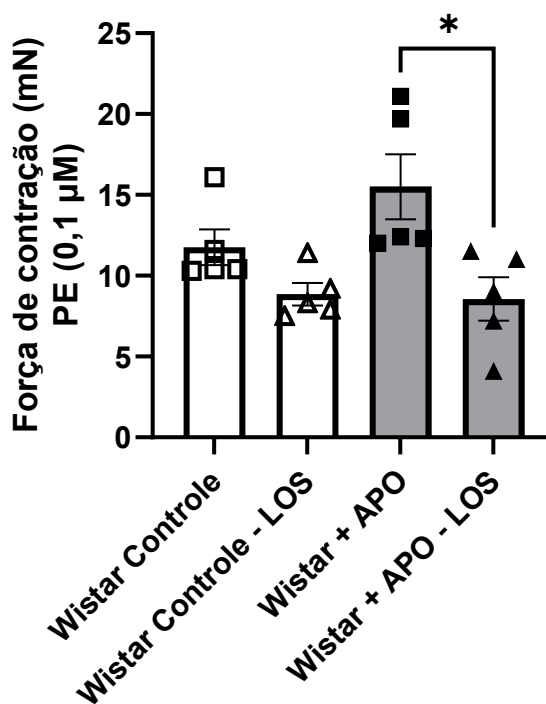
Para investigar essa hipótese, avaliamos o efeito do tratamento com apocinina nas respostas vasodilatadoras mediadas pelo AT₂R à Ang II em anéis de aorta nos quais o AT₁R havia sido previamente antagonizado com losartan. Todos os anéis de aorta foram pré-contráidos com PE para padronizar o tônus vascular basal antes da construção das curvas de concentração-resposta da Ang II na presença do losartan, minimizando assim a variabilidade nas respostas vasodilatadoras devido a diferenças no tônus pré-contrátil.

Inicialmente, avaliamos se o losartan alterava a pré-contracção induzida por PE em aortas de ratos Wistar e SHR, tanto não tratados quanto tratados com apocinina. Essa avaliação preliminar foi essencial, visto que o losartan pode reduzir as respostas contráteis induzidas por PE em anéis de aorta – particularmente em SHR – sugerindo um papel facilitador da Ang II endógena, atuando através dos AT₁R, na vasoconstrição mediada pela PE (LYLE; GRIENDLING, 2006).

5.5 A contracção induzida pela PE não é significativamente alterada pelo losartana em aortas de SHR

A Figura 9 mostra a resposta contrátil induzida pela PE (0,1 µmol/L) durante a pré-contracção de anéis de aorta de ratos Wistar controle e tratados com apocinina, na ausência e presença de losartana.

Figura 9 – Gráfico de contração da PE em anéis de aorta de grupos Wistar e Wistar tratado com e sem losartana



Fonte: Elaborado pela própria autora

Legenda: Resposta de contração à PE 0,1 µmol/L em anéis de aorta com endotélio de ratos Wistar, tratados e não tratados com apocinina, pré-incubados ou não com losartana 10 µmol/L. Os valores representaram a média ± erro padrão da média (EPM) dos resultados obtidos, n=5. *p < 0,05.

Análise estatística realizada por ANOVA *one-way*.

Alguns estudos sugeriram uma potencial interação farmacodinâmica entre apocinina e o losartana, uma vez que ambos atuam em pontos distintos dentro do eixo Ang II – AT₁R – estresse oxidativo. O losartana bloqueia a estimulação mediada pelo AT₁R, impedindo que a Ang II inicie sua cascata de sinalização subsequente, enquanto a apocinina modula a atividade da NAD(P)H oxidase e reduz a geração de ERO. Portanto, a modulação redox induzida pela apocinina poderia, teoricamente, alterar o estado funcional do eixo Ang II – AT₁R, de modo que o bloqueio de AT₁R pelo losartana poderia influenciar as respostas contráteis do músculo liso vascular (LYLE; GRIENDLING, 2006).

A presença de losartana não modificou a contração induzida por PE em aortas de ratos Wistar não tratados. Quando as respostas à PE foram comparadas em aortas de ratos Wistar tratados com apocinina, o losartana promoveu uma redução modesta, porém estatisticamente significativas, na resposta contrátil ($p < 0,05$). Contudo, essa redução não parece ser biologicamente relevante, visto que a contração induzida por PE na presença de losartana não difere entre os grupos de ratos Wistar não tratados e tratados com apocinina.

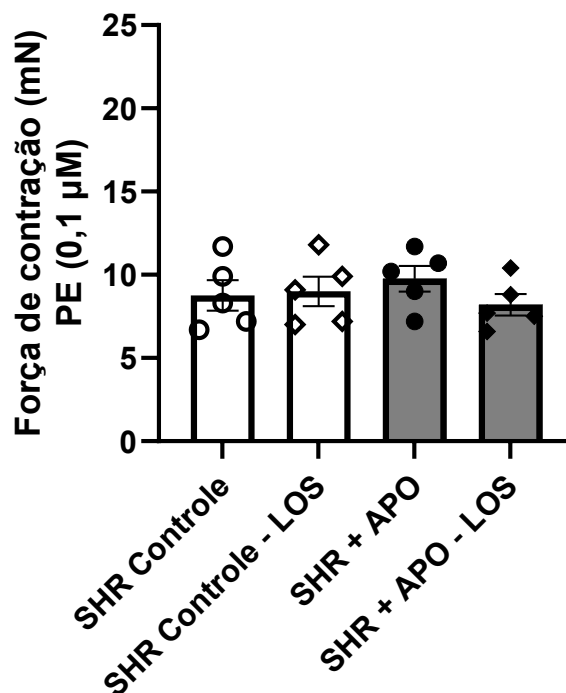
É importante ressaltar que a redução do tônus induzido pela PE observada na presença do losartana provavelmente não resulta de antagonismo parcial do receptor α_1 -adrenérgico, visto que o losartana não apresenta atividade antagonista α_1 (MAESO *et al.*, 1996). Esse efeito parece envolver um fator derivado do endotélio, uma vez que a resposta contrátil máxima atenuada à PE em anéis de aorta expostos ao losartana desaparece após a remoção do endotélio.

Em ratos Wistar tratados com apocinina, tal efeito poderia ser esperado se o tratamento com apocinina aumentasse a disponibilidade de NO nas células endoteliais, como observado anteriormente em células endoteliais de SHR (PERASSA *et al.*, 2016).

Quando a contração induzida por PE (0,1 $\mu\text{mol/L}$) foi avaliada em anéis de aorta de SHR controle e tratados com apocinina, na ausência e na presença de losartana, a magnitude da pré-contração induzida por PE foi semelhante entre todos os grupos experimentais (Figura 10).

Esses resultados indicam que o losartana não interferiu no estabelecimento de m tônus contrátil basal comparável em anéis de aorta de SHR, permitindo assim uma comparação adequada das respostas vasodilatadoras subsequentes induzidas por Ang II.

Figura 10 - Gráfico de contração da PE em anéis de aorta de grupos SHR e SHR tratado com e sem losartana



Fonte: Elaborado pela própria autora

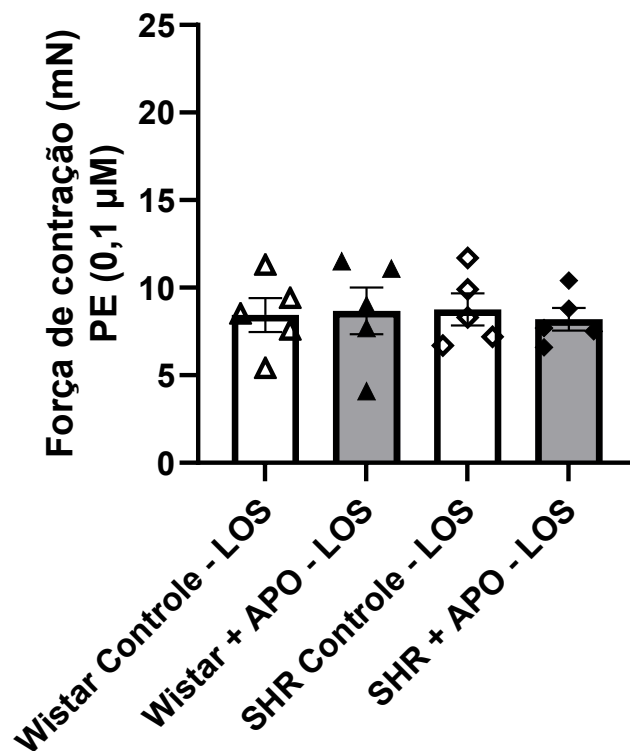
Legenda: Respostas de contração à PE 0,1 $\mu\text{mol/L}$ em anéis de aorta com endotélio de SHR, tratados ou não tratados com apocinina, pré-incubados ou não com losartana 10 $\mu\text{mol/L}$. Os valores representam a média $\pm$ EPM dos resultados obtidos, $n=5$. Análise estatística realizada por ANOVA *one-way*.

Os resultados demonstraram que, em aortas de SHR, nem o losartana nem sua combinação com apocinina alteraram, a contração induzida por PE. Essas descobertas sugerem que a contração vascular resultante da ativação de vias independentes mediadas pelo AT_1R e $\alpha 1$ -adrenérgicos não foi modificada nesses animais. A ausência de efeito do losartana na contração induzida por PE – particularmente no grupo tratado com apocinina – indica que, em SHR, a contribuição do eixo Ang II – AT_1R – estresse oxidativo para o aumento da responsividade à PE provavelmente está reduzida. Além disso, embora a remodelação vascular em SHR – associada à disfunção endotelial e à reprogramação do sistema renina-angiotensina possa, teoricamente, promover a comunicação cruzada entre as vias de

sinalização AT_1R e $\alpha 1$ -adrenérgicas, aumentando assim o tônus basal ou a responsividade contrátil, tal interação não foi corroborada pelas presentes descobertas (MAESO *et al*, 1996).

Ao comparar todas as respostas contráteis induzidas por PE obtidas na presença do losartana, os níveis de pré-contração permaneceram semelhantes entre os diferentes grupos experimentais (Figura 11). Esses resultados confirmam que o bloqueio do AT_1R não interferiu diretamente no tônus pré-contrátil induzido por PE, garantindo que o tônus vascular basal não fosse um fator de confusão na avaliação das respostas vasodilatadoras subsequentes mediadas pelo AT_2R (Figura 11).

Figura 11 - Gráfico de contração da PE em anéis de aorta de todos os grupos com losartana



Fonte: Elaborado pela própria autora

Legenda: Respostas de contração à PE 0,1 µmol/L em anéis de aorta com endotélio de diferentes grupos, pré-contráídos na presença de losartan (10 µmol/L). Os valores representam a média ± EPM dos resultados obtidos, n = 5. Análise estatística realizada por ANOVA *one-way*.

5.6 O tratamento com apocinina restaura as respostas vasodilatadoras mediadas pelo receptor AT₂ à Ang II em aortas de SHR

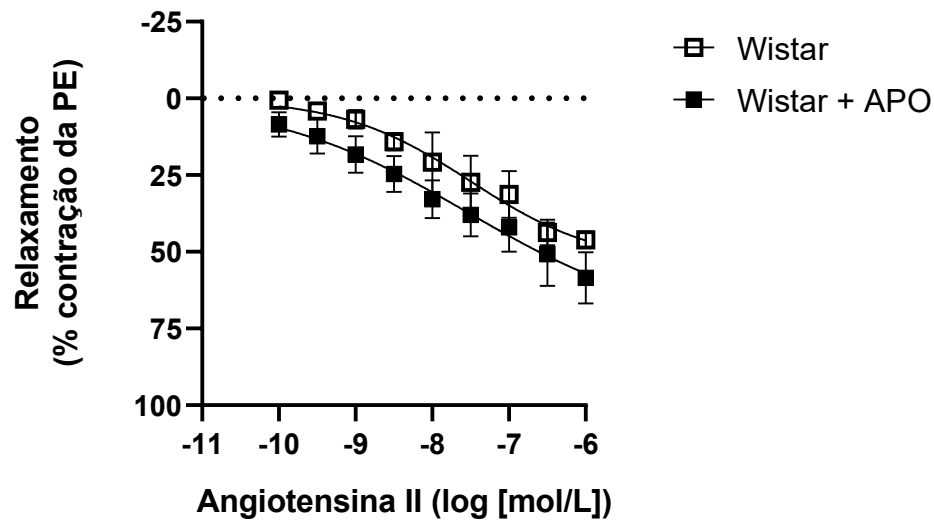
O presente estudo baseou-se em achados do nosso grupo de pesquisa (GRATON *et al.*, 2019), que demonstraram que o tratamento com apocinina em SHR altera o eixo da Ang II reduzindo a atividade da NOX e modulando componentes do sistema renina-angiotensina, com impacto direto nas respostas pressoras e vasoconstritoras à Ang II em SHR. Além disso, o tratamento com apocinina aumentou e normalizou a expressão do AT₂R nas aortas de SHR, sugerindo uma maior reatividade vascular à Ang II mediada pelo AT₂R.

Foi proposto que, na presença do losartana – um antagonista seletivo de AT₁R – a Ang II pode se ligar preferencialmente aos AT₂R não bloqueados. Uma vez que a Ang II demonstrou estimular a síntese de NO via AT₂R em células endoteliais (WIEMER *et al.*, 1993) e em microvasos coronários isolados (SEYEDI *et al.*, 1995), uma ligação mecanística entre a ativação do AT₂R e a vasodilatação mediada por NO é altamente plausível.

A Figura 12 mostra as curvas de concentração-resposta à Ang II em anéis de aorta pré-contráídos com PE após o bloqueio do AT₁R com losartana. Em aortas de ratos Wistar, tanto do grupo controle quanto do grupo tratado com apocinina, a Ang II induziu relaxamento dependente da concentração indicando que, na presença de antagonismo do AT₁R, a Ang II desencadeia respostas vasodilatadoras mediadas pelo AT₂R.

Nossos resultados são consistentes com relatos anteriores que demonstram que a vasodilatação resultante da ativação do AT₂R ocorre em vasos de grande capacitância, como a aorta de rato (YAYAMA *et al.*, 2004). Os relaxamentos induzidos por Ang II na presença de losartana foram inibidos pelo bloqueador seletivo do AT₂R, PD123319, pelo NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e pelo antagonista do receptor B2 HOE-140 (COSENTINO *et al.*, 2005).

Figura 12 – Gráfico de relaxamento de Ang II em anéis de aorta de Wistar e Wistar tratado



Fonte: Elaborado pela própria autora

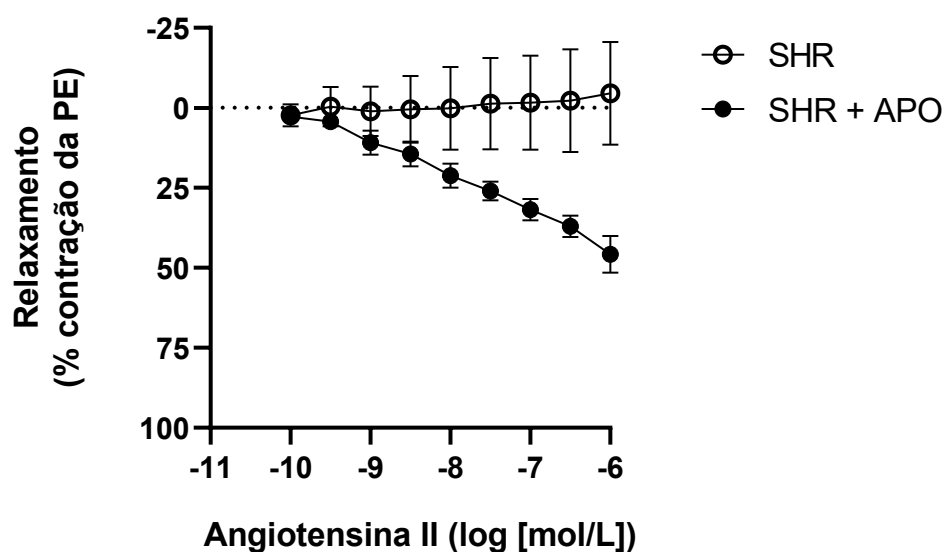
Legenda: Curvas de relaxamento induzidas por Ang II (0,1 nmol/L – 1 μ mol/L) na presença de losartan em anéis de aorta com endotélio de ratos Wistar, tratados e não tratados com apocinina. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos resultados. n = 10. Análise estatística realizada por 2way ANOVA.

No contexto do tratamento, a ausência de diferenças entre os grupos normotensos é consistente com o conceito de que o impacto vascular da apocinina depende de níveis elevados de ERO (PERASSA *et al.*, 2016) e, portanto, pode não alterar significativamente as respostas vasculares quando o estresse oxidativo não está aumentado. Assim, os dados apoiam a noção de que o relaxamento induzido por Ang II sob bloqueio de AT₁R é determinado principalmente pela integridade funcional da via AT₂R e que a apocinina não interfere nessa modulação em animais normotensos.

Em conjunto, esses resultados confirmam que: (i) sob bloqueio do AT₁R, a Ang II induz relaxamento em anéis de aorta pré-contraídos, consistente com a sinalização funcional mediada pelo AT₂R; (ii) o tratamento com apocinina não modifica as respostas vasodilatadoras induzidas pela Ang II em ratos Wistar, indicando que a modulação redox não impacta significativamente as vias dependentes do AT₂R na ausência de hipertensão.

Para determinar se o tratamento com apocinina modula as respostas vasodilatadoras mediadas pelo AT₂R em ratos hipertensos, curvas de concentração-resposta à Ang II foram construídas na presença de losartana. A Figura 13 mostra a porcentagem de relaxamento obtida em anéis de aorta pré-contraídos com PE de SHR controle e tratados com apocinina após o bloqueio do AT₁R.

Figura 13 - Gráfico de relaxamento de Ang II em anéis de aorta de SHR e SHR tratado



Fonte: Elaborado pela própria autora

Legenda: Relaxamento induzido por Ang II (0,1 nmol/L – 1 µmol/L) em anéis de aorta com endotélio de SHR, tratados e não tratados com apocinina. Os experimentos foram conduzidos na presença de losartana 10⁻⁵M. Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) dos resultados, n=10. Análise estatística realizada por 2way ANOVA.

Em SHR do grupo controle (Fig. 13), a Ang II não induziu relaxamento significativo, como evidenciado pela ausência de uma clara relação concentração-resposta. Esse achado é consistente com estudos que relatam redução acentuada ou perda funcional da sinalização mediada pelo AT₂R em SHR, associada à predominância de vias vasoconstritoras dependentes

de AT₁R (CASTRO *et al.*, 2012; GRATON *et al.*, 2019). Além disso, diversos relatos descreveram diminuição da expressão e/ou comprometimento da funcionalidade endotelial de AT₂R em doenças cardiovasculares e renais (PADIA; CAREY, 2012), limitando a capacidade da Ang II de desencadear respostas vasodilatadoras.

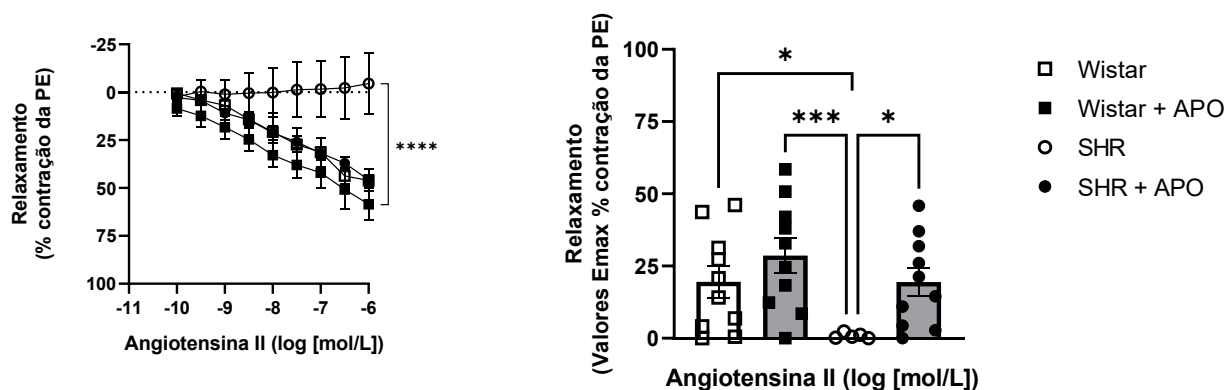
Evidências indicam que a ruptura do equilíbrio redox devido ao estresse oxidativo exacerbado característico dos estados hipertensivos (OLIVEIRA-SALES *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2012; PERASSA *et al.*, 2016; GRATON *et al.*, 2019) contribui para a supressão da via AT₂R, seja reduzindo a expressão do receptor ou prejudicando a sinalização subsequente. A ativação crônica do eixo Ang II – AT₁R na hipertensão estimula a NAD(P)H oxidase e promove a produção excessiva de ERO, reduzindo acentuadamente a biodisponibilidade do NO.

Em contraste com o grupo controle SHR, os anéis de aorta de SHR tratados com apocinina exibiram um relaxamento claro e dependente da concentração em resposta à Ang II após o bloqueio do AT₁R (Figura 13).

Observações anteriores (PERASSA *et al.*, 2016; GRATON *et al.*, 2019) demonstraram que o tratamento com apocinina em SHR reduz a expressão de NOX2 e de sua subunidade regulatória p47phox na aorta e no leito mesentérico, diminui a produção de oxidantes dependentes de NOX detectada por quimioluminescência de lucigenina, reduz a expressão de AT₁R e aumenta a expressão de AT₂R nas aortas. Além disso, os níveis de nitrato/nitrito no plasma e em homogeneizados vasculares, bem como os níveis de NO endotelial, estavam aumentados em SHR tratados com apocinina. Em conjunto, esses achados moleculares fornecem suporte mecanístico para a recuperação funcional do relaxamento mediado por AT₂R observada no presente estudo.

Assim, a ausência de relaxamento mediado por AT₂R em SHR não tratados provavelmente reflete disfunção endotelial, sinalização de NO prejudicada e/ou vias de AT₂R funcionalmente suprimidas secundárias à exposição crônica à Ang II. Em contraste, SHR tratados com apocinina apresentam responsividade endotelial preservada e expressão aumentada de AT₂R (PERASSA *et al.*, 2016), reforçando o conceito de que o estresse oxidativo é uma chave determinante do comprometimento funcional de AT₂R na hipertensão.

Figura 14 - Gráficos de relaxamento induzido por Ang II, mediado pelo AT₂R, em anéis de aorta de todos os grupos



Fonte: Elaborado pela própria autora

Legenda: Relaxamento induzido por Ang II (0,1 nmol/L – 1 μ mol/L) em anéis de aorta com endotélio de diferentes grupos e valores de Emax. Os experimentos foram conduzidos na presença de losartan (10 μ mol/L). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos resultados, n=10. *p < 0,05, ***p < 0,001. Análise estatística realizada por 2way ANOVA.

Em conjunto, esses achados demonstram que o estresse oxidativo desempenha um papel central na supressão funcional da vasodilatação mediada por AT₂R em SHR. Enquanto os mecanismos vasoconstritores mediados por AT₁R parecem relativamente resistentes à modulação redox, as vias dependentes de AT₂R são altamente sensíveis ao desequilíbrio oxidativo. A ativação crônica do eixo Ang II – AT₁R – NAD(P)H oxidase na hipertensão altera o fenótipo vascular para uma predominância da sinalização vasoconstritora, com comprometimento concomitante dos mecanismos contrarregulatórios de AT₂R.

Ao reduzir as ERO derivadas da NAD(P)H oxidase, restaurar a biodisponibilidade do NO e normalizar a expressão do AT₂R, a apocinina restabelece a contribuição funcional do AT₂R para a regulação do tônus vascular. Assim, o tratamento com apocinina altera o equilíbrio do eixo da Ang II em SHR, de um perfil predominantemente vasoconstritor mais fisiologicamente regulado, destacando a natureza redox-sensível da sinalização do AT₂R na hipertensão.

CONCLUSÕES

6 Conclusões

Em resumo, o presente estudo identifica o estresse oxidativo como um determinante central do desequilíbrio funcional no eixo de sinalização da Ang II na hipertensão. Em SHR, a ativação sustentada da via AT_1R – NAD(P)H oxidase – ERO está associada à disfunção endotelial, à redução da biodisponibilidade de NO e à supressão da sinalização vasodilatadora mediada por AT_2R . Essa disrupção induzida pelo estado redox altera a resposta vascular à Ang II para um fenótipo predominantemente vasoconstritor.

A modulação farmacológica do estresse oxidativo com apocinina restaura a função endotelial, normaliza a expressão do receptor de Ang II e resgata funcionalmente o relaxamento dependente de AT_2R sob bloqueio de AT_1R . Novamente, enquanto as respostas contráteis mediadas por AT_1R forma relativamente resistentes à modulação redox, as vias vasodilatadoras mediadas por AT_2R mostraram-se altamente sensíveis ao estado oxidativo, revelando uma vulnerabilidade redox diferencial entre os subtipos de receptor de Ang II.

Esses resultados demonstram que o estresse oxidativo não apenas potencializa a vasoconstrição, mas suprime ativamente a sinalização contrarregulatória do receptor AT_2R , redefinindo assim a hierarquia funcional das respostas do receptor de Ang II na hipertensão. Ao restaurar a biodisponibilidade de NO e restabelecer o acoplamento efetivo entre AT_2R e NO, a apocinina altera o equilíbrio da sinalização da Ang II em direção a um perfil vasodilatador protetor.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ARCE, Cristina; VICENTE, Diana; SEGURA, Vanessa; *et al.* Activation of α_{1A} - adrenoceptors desensitizes the rat aorta response to phenylephrine through a neuronal NOS pathway, a mechanism lost with ageing. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 13, p. 2015–2030, 2017.
- BARDAWEEL, Sanaa K.; GUL, Mustafa; ALZWEIRI, Muhammad; *et al.* Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 50, n. 3, p. 193–201, 2019.
- BETTERIDGE, D John. What Is Oxidative Stress? **Metabolism**, v. 49, n. 2, Sup. 1, p. 3-8, 2000.
- BILLET, Sandrine; AGUILAR, Frédérick; BAUDRY, Camille; *et al.* Role of angiotensin II AT1 receptor activation in cardiovascular diseases. **Kidney International**, v. 74, n. 11, p. 1379–1384, 2008.
- BIRBEN, Esra; SAHINER, Umit Murat; SACKESEN, Cansin; *et al.* Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.
- BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 12, p. 8410–8413, 1993.
- BROCQ, Michelle Le; LESLIE, Stephen J.; MILLIKEN, Philip; *et al.* Endothelial Dysfunction: From Molecular Mechanisms to Measurement, Clinical Implications, and Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 9, p. 1631–1674, 2008.
- CAI, Hua; HARRISON, David G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. **Circulation Research**, v. 87, n. 10, p. 840–844, 2000.
- CALLERA, Glaucia Elena; VARANDA, Wamberto Antonio; BENDHACK, Lusiane Maria. Ca^{2+} Influx is Increased in 2-Kidney, 1-Clip Hypertensive Rat Aorta. **Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 592–596, 2001.
- CALZERRA, Natália Tabosa Machado; GOMES, Camila Figueiredo; DE QUEIROZ, Thyago Moreira. Aspectos fisiopatológicos da hipertensão arterial dependente de angiotensina II: revisão integrada da literatura. **Acta Brasiliensis**, v. 2, n. 2, p. 69, 2018.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, Maria José; HAIBARA, Andréa Siqueira. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. v. 8, 2001.

CAREY, Robert M. AT₂ Receptors: Potential Therapeutic Targets for Hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 339–347, 2017.

CAREY, Robert M. Newly Discovered Components and Actions of the Renin–Angiotensin System. **Hypertension**, v. 62, n. 5, p. 818–822, 2013.

CORRIU, C. *et al.* Effects of Losartan on Contractile Responses of Conductance and Resistance Arteries from Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 1995

COSENTINO, F; SAVOIA, C; DEPAOLIS, P; *et al.* Angiotensin II type 2 receptors contribute to vascular responses in spontaneously hypertensive rats treated with angiotensin II type 1 receptor antagonists. **American Journal of Hypertension**, v. 18, n. 4, p. 493–499, 2005.

CSIKÓS, T; CHUNG, O; UNGER, Th. Receptors and their classification: focus on angiotensin II and the AT₂ receptor. **Journal of Human Hypertension**, v. 12, n. 5, p. 311–318, 1998.

DUDZINSKI, David M.; IGARASHI, Junsuke; GREIF, Daniel; *et al.* THE REGULATION AND PHARMACOLOGY OF ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 235–276, 2006.

DUSSE, Luci Maria Sant’Ana; VIEIRA, Lauro Mello; CARVALHO, Maria Das Graças. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, 2003.

EL-SAWALHI, Maha M.; AHMED, Lamiaa A. Exploring the protective role of apocynin, a specific NADPH oxidase inhibitor, in cisplatin-induced cardiotoxicity in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 207, p. 58–66, 2014.

FAHNING, Bernah M; POTJE, Simone R; PAULA, Tiago D; *et al.* Ang II-induced contraction is impaired in the aortas of renovascular hypertensive animal model. **Vascular Biology**, v. 6, n. 1, p. e230021, 2024.

FILTZ, Theresa M.; NIIBORI, Yoshiko. Desensitization of angiotensin-stimulated inositol phosphate accumulation in human vascular smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 502, n. 1–2, p. 11–19, 2004.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Macmillan Journals Ltd**, v. 288, p. 373–376, nov 1980.

GEWALTIG, M. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovascular Research**, v. 55, n. 2, p. 250–260, 2002.

GUZIK, Tomasz J.; HARRISON, David G. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 11–12, p. 524–533, 2006.

GUZIK, Tomasz J.; GRIENDLING, Kathy K. NADPH Oxidases: Molecular Understanding Finally Reaching the Clinical Level? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 10, p. 2365–2370, 2009.

GRATON, Murilo E.; POTJE, Simone R.; TROIANO, Jéssica A.; *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.

HEUMÜLLER, Sabine; WIND, Sven; BARBOSA-SICARD, Eduardo; *et al.* Apocynin Is Not an Inhibitor of Vascular NADPH Oxidases but an Antioxidant. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 211–217, 2008.

INCALZA, Maria Angela; D'ORIA, Rossella; NATALICCHIO, Annalisa; *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v. 100, p. 1–19, 2018.

LYLE, Alicia N.; GRIENDLING, Kathy K. Modulation of Vascular Smooth Muscle Signaling by Reactive Oxygen Species. **Physiology**, v. 21, n. 4, p. 269–280, 2006.

MAESO, Rosaura; *et al.* Losartan reduces phenylephrine constrictor response in aortic rings from spontaneously hypertensive rats. Role of nitric oxide and angiotensin II type 2 receptors. **Hypertension**, v. 28, n. 6, p. 967 – 972, 1996.

MALACHIAS, Marcos V. B.; *et al.* 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, set 2016.

MALTA, Deborah Carvalho; SANTOS, Nadir Baltazar Dos; PERILLO, Rosângela Durso; *et al.* Prevalence of high blood pressure measured in the Brazilian population, National Health Survey, 2013. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 134, n. 2, p. 163–170, 2016.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: Physiology Pathophysiology, and Pharmacology. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 43, p. 109-134, 1991

MEHTA, Puja K.; GRIENDLING, Kathy K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. C82–C97, 2007.

MONTEZANO, Augusto C.; DULAK-LIS, Maria; TSIROPOULOU, Sofia; *et al.* Oxidative Stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, n. 5, p. 631–641, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2014

OKAMOTO, Kozo; AOKI, Kyuzo. Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. **Japanese Circulation Journal**, 1963.

PETRÔNIO, Maicon; ZERAIK, Maria; FONSECA, Luiz; *et al.* Apocynin: Chemical and Biophysical Properties of a NADPH Oxidase Inhibitor. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2821–2839, 2013.

PERASSA, Ligia A.; GRATON, Murilo E.; POTJE, Simone R.; *et al.* Apocynin reduces blood pressure and restores the proper function of vascular endothelium in SHR. **Vascular Pharmacology**, v. 87, p. 38–48, 2016.

PHAM-HUY, Lien Ai; HE, Hua; *et al.* Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, n. 2, p. 89–96, 2008.

RAUF, Abdur; KHALIL, Anees Ahmed; AWADALLAH, Samir; *et al.* Reactive oxygen species in biological systems: Pathways, associated diseases, and potential inhibitors—A review. **Food Science & Nutrition**, v. 12, n. 2, p. 675–693, 2024.

SANTOS, Paulo Caleb Junior Lima; KRIEGER, Jose Eduardo; PEREIRA, Alexandre Costa. Renin–Angiotensin System, Hypertension, and Chronic Kidney Disease: Pharmacogenetic Implications. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 120, n. 2, p. 77–88, 2012.

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

SHAITO, Abdullah; ARAMOUNI, Karl; ASSAF, Roland; *et al.* Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 27, n. 3, p. 105, 2022.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: Molecular Aptitudes. **Mediators of Inflammation**, v. 2008, n. 1, p. 106507, 2008.

SEYEDI, Nahid; XU, XiaoBin; NASJLETTI, Alberto; *et al.* Coronary Kinin Generation Mediates Nitric Oxide Release After Angiotensin Receptor Stimulation. **Hypertension**, v. 26, n. 1, p. 164–170, 1995.

TOUYZ, Rhian M.; ENDEMANN, Dierk; HE, Gang; *et al.* Role of AT₂ Receptors in Angiotensin II–Stimulated Contraction of Small Mesenteric Arteries in Young SHR. **Hypertension**, v. 33, n. 1, p. 366–372, 1999.

VANHOUTTE, P. Ageing and endothelial dysfunction. **European Heart Journal Supplements**, v. 4, p. A8–A17, 2002.

VANHOUTTE, Paul M.; ZHAO, Yingzi; XU, Aimin; *et al.* Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. **Circulation Research**, v. 119, n. 2, p. 375–396, 2016.

VIRDIS, Agostino; GESI, Marco; TADDEI, Stefano. Impact of apocynin on vascular disease in hypertension. **Vascular Pharmacology**, v. 87, p. 1–5, 2016.

WEBER, Michael A.; SCHIFFRIN, Ernesto L.; WHITE, William B.; *et al.* Clinical Practice Guidelines for the Management of Hypertension in the Community: A Statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 16, n. 1, p. 14–26, 2014.

WIEMER, Gabriele; *et al.* The possible role of angiotensin II subtype AT₂ receptors in endothelial cells and isolated ischemic rat hearts. **J Hypertens Suppl.**, v. 11, n. 5, p. S234–235, dez 1993.

WILLEY, Joshua Z.; MOON, Yeseon Park; KAHN, Emily; *et al.* Population Attributable Risks of Hypertension and Diabetes for Cardiovascular Disease and Stroke in the Northern Manhattan Study. **Journal of the American Heart Association**, v. 3, n. 5, p. e001106, 2014.

YAYAMA, Katsutoshi; HORII, Miyuki; HIYOSHI, Hiromi; *et al.* Up-Regulation of Angiotensin II Type 2 Receptor in Rat Thoracic Aorta by Pressure-Overload. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n. 2, p. 736–743, 2004.

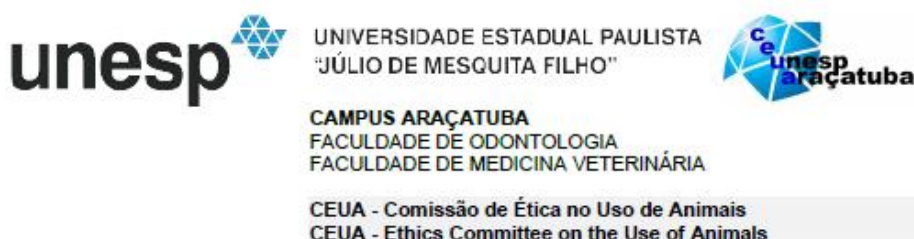
YOU, Dong; LOUFRANI, Laurent; BARON, Celine; *et al.* High Blood Pressure Reduction Reverses Angiotensin II Type 2 Receptor–Mediated Vasoconstriction Into Vasodilation in Spontaneously Hypertensive Rats. **Circulation**, v. 111, n. 8, p. 1006–1011, 2005.

XIAO, Lei; LIU, Yahan; WANG, Nanping. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 306, n. 3, p. H317–H325, 2014.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeito da Apocinina na reatividade vascular à Angiotensina II, mediada pelo receptor AT2, em aorta de SHR"**, Processo FOA nº 886-2023, sob responsabilidade de Cristina Antoniali Silva apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Novembro de 2023.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Janeiro de 2026.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 28 de Fevereiro de 2026.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effect of Apocinin on vascular reactivity to Angiotensin II, mediated by the AT2 receptor, in aorta of SHR"**, Protocol FOA nº 886-2023, under the supervision of Cristina Antoniali Silva presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on November 14, 2023.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 31, 2026.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: February 28, 2026.

Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator