

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ALYNNE CARVALHO GALVÃO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELA CARBOXIMETIL-
GLUCANA(CM-G) SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS
NORMOTENSOS E HIPERTENSOS**

JOÃO PESSOA – PB

2021

ALYNNE CARVALHO GALVÃO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELA CARBOXIMETIL-GLUCANA
(CM-G) SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS
NORMOTENSOS E HIPERTENSOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal da Paraíba como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

JOÃO PESSOA – PB

2021

G182a Galvão, Alynne Carvalho.

Avaliação dos efeitos induzidos pela
carboximetil-glucana (CM-G) sobre o sistema
cardiovascular de ratos normotensos e hipertensos /
Alynne Carvalho Galvão. - João Pessoa, 2021.
105 f. : il.

Orientação: Valdir de Andrade Braga.

Tese (Doutorado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Hipertensão. 2. Hiperatividade simpática. 3.
Sensibilidade do barorreflexo. 4. Reatividade vascular.
5. Estresse oxidativo. 6. Carboximetil-glucana. I.
Braga, Valdir de Andrade. II. Título.

UFPB/BC

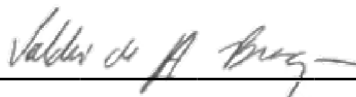
CDU 616.12-008.331.1

ALYNNE CARVALHO GALVÃO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELA CARBOXIMETIL-GLUCANA
(CM-G) SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS NORMOTENSOS
E HIPERTENSOS**

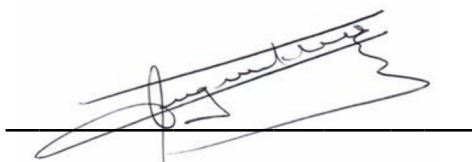
Aprovado em 11 de maio de 2021

BANCA EXAMIDADORA



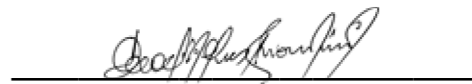
Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

ORIENTADOR



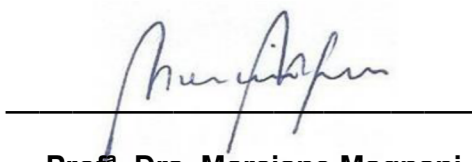
Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

AVALIADOR EXTERNO



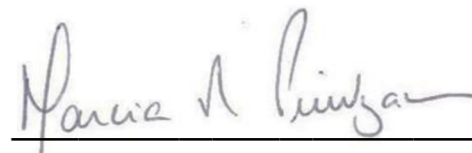
Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr

AVALIADOR EXTERNO



Prof^a. Dra. Marciane Magnani

AVALIADORA INTERNA



Prof^a. Dra. Márcia Regina Piuvezam

AVALIADORA INTERNA

Dedicatória

Dedico esta tese à Helena, luz da minha vida.

Te amo mais que tudo.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ter abençoado todos os dias da minha vida.

Aos meus pais e familiares, pelo permanente incentivo e preocupação com que sempre acompanharam minha longa trajetória. Ao meu esposo e minha filha, pela paciência, amor e compreensão nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga, pelo acolhimento, ensinamentos e oportunidades ao longo de todos esses quase 11 anos de parceria. Muito obrigada.

A todos os mestres que tanto contribuíram para o meu processo de formação, em especial aos que fazem parte do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão (LACONCHA). Agradeço ainda a todos os amigos que fiz dentro do laboratório e carreguei com tanto carinho sempre.

À Prof. Dra. Marciane Magnani e toda equipe do Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos (CT – UFPB), obrigada pela parceria indispensável para que este trabalho pudesse se tornar possível.

À banca de qualificação de doutorado, Profa. Dra. Sandra Mascarenhas, Profa. Dra. Camille Balarini e Prof. Dr. Ian Amaral, por todas as valiosas contribuições dadas a este estudo.

Agradeço também à banca de defesa deste trabalho, Prof. Dr. Deoclécio Chianca, Profa. Dra. Marciane Magnani, Prof. Dra. Márcia Regina Piuvezam e Prof. Dr. Vagner Antunes, pela gentileza e disponibilidade de participarem deste momento tão importante.

Ao Departamento de Farmacologia da Louisiana State University, em Nova Orleans (EUA), onde estive por um período “sanduíche” entre os anos de 2017 e 2018, em especial ao Dr. Eric Lazartigues e seu time de alunos e colaboradores. Um agradecimento especial à Profa. Dra. Maria do Socorro França pela confiança em oportunizar tamanha experiência.

Obrigada aos meus amigos mais antigos e colegas de trabalho que, observando tudo de fora, sempre me fizeram sentir orgulho de onde cheguei quando tudo parecia difícil demais de compreender.

Aos técnicos do LACONCHA, Sara Madeiro, Clênia Cavalcanti e Matheus Monteiro pelo serviço de excelência prestado por todos esses anos. Agradeço também a todos que fazem a Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM, em especial à Dra. Roberta Nunes.

A todos que fazem parte do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e do Centro de Biotecnologia (UFPB), especialmente à Profa. Dra. Josiane Cruz, coordenadora do programa.

À Universidade Federal da Paraíba por possibilitar a realização desta pesquisa, e ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

Resumo

Avaliação dos efeitos induzidos pela carboximetil-glucana (CM-G) sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos e hipertensos. CARVALHO-GALVÃO, A. Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. CBIotec/UFPB. 2021.

RESUMO

A hipertensão arterial (HA) é uma doença de alta prevalência em todo o mundo, sendo caracterizada por uma condição clínica multifatorial. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da carboximetil-glucana (CM-G) na pressão arterial (PA), sensibilidade do barorreflexo (SBR) e modulação vascular em ratos com hipertensão renovascular. Ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: SHAM+SALINA; 2R1C+SALINA (submetidos à cirurgia de indução da hipertensão dois rins um clipe); SHAM+CM-G (tratados com CM-G) e 2R1C+CM-G (tratados com CM-G). O tratamento diário com CM-G (40 mg/kg) foi realizado durante o período de duas semanas. Pressão arterial, frequência cardíaca (FC), variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS), sensibilidade do barorreflexo e tônus vascular simpático foram avaliados. Após seis semanas da cirurgia de indução da hipertensão, ratos do grupo 2R1C apresentaram hipertensão arterial (171 ± 11 vs. 118 ± 4 mmHg, $p < 0.05$), redução na SBR (-1.30 ± 0.10 vs. -2.59 ± 0.17 bpm.mmHg $^{-1}$, $p < 0.05$) e aumento da atividade simpática em 81%, quando comparados aos animais normotensos. A administração oral de CM-G em ratos com hipertensão renovascular reduziu a hipertensão (126 ± 4 vs. 171 ± 11 mmHg, $p < 0.05$) e melhorou a SBR (-2.03 ± 0.16 vs. -1.30 ± 0.10 bpm.mmHg $^{-1}$, $p < 0.05$) em ratos hipertensos quando comparado ao grupo 2R1C tratado apenas com salina. Estes efeitos parecem ter sido causados por uma redução na atividade simpática. Ademais, ratos do grupo 2R1C apresentaram aumento da contratilidade vascular em resposta à fenilefrina ($126.60\% \pm 2.97\%$ vs. $95.24\% \pm 5.49\%$; $p < 0.05$), que foi normalizada pelo tratamento com CM-G ($90.26\% \pm 8.54\%$ vs. $95.24\% \pm 5.49\%$; $p > 0.05$). O vasorelaxamento em resposta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio foi potencializado pelo tratamento com CM-G. Por fim, o tratamento oral com CM-G reduziu os níveis séricos de malondialdeído, um importante biomarcador utilizado na avaliação do estresse oxidativo, em animais hipertensos tratados quando comparados aos tratados apenas com salina ($14,62 \pm 0,93$ vs. $21,82 \pm 1,27$ nmol/mL, $p < 0,05$). O presente estudo revelou pela primeira vez que o tratamento com CM-G reduziu a hipertensão arterial e restaurou a sensibilidade do barorreflexo por meio da redução no tônus simpático, normalização da reatividade vascular e redução do estresse oxidativo em ratos com hipertensão renovascular.

Palavras-chave: hipertensão, hiperatividade simpática, sensibilidade do barorreflexo, reatividade vascular, estresse oxidativo, carboximetil-glucana.

Abstract

Evaluation of the effects induced by carboxymethyl-glucan (CM-G) on the cardiovascular system of normotensive and hypertensive rats. CARVALHO-GALVÃO, A. Thesis presented to the Postgraduate Program in Physiological Sciences. CBIOTEC/UFPB. 2021.

ABSTRACT

Hypertension is a highly prevalent disease worldwide, being characterized by a multifactorial clinical condition. In this context, this study was designed to investigate the effects of a newly synthesized carboxymethyl-glucan (CM-G) on blood pressure (BP), baroreflex sensitivity (BRS) and sympathetic vascular modulation in renovascular hypertensive rats. Male Wistar rats were divided into four groups: SHAM+SALINE, 2K1C+SALINE (subjected to renal artery clipping to induce renovascular hypertension); SHAM+CM-G (treated with CM-G) and 2K1C+CM-G (treated with CM-G). The daily treatment with CM-G (40 mg/kg) was performed for 2 weeks. Blood pressure, heart rate (HR), systolic BP variability, baroreflex sensitivity (BRS) and sympathetic vascular tone were evaluated. After six weeks of renal artery clipping, 2K1C rats exhibited arterial hypertension (171 ± 11 vs. 118 ± 4 mmHg, $p < 0.05$), impaired BRS (-1.30 ± 0.10 vs. -2.59 ± 0.17 bpm.mmHg⁻¹, $p < 0.05$) and enhanced sympathetic activity by 81% when compared to sham rats. Oral administration of CM-G in renovascular hypertensive rats reduced hypertension (126 ± 4 vs. 171 ± 11 mmHg, $p < 0.05$) and improved the BRS (-2.03 ± 0.16 vs. -1.30 ± 0.10 bpm.mmHg⁻¹, $p < 0.05$) in 2K1C rats when compared to placebo. Those effects seem to be caused by a reduction in sympathetic activity. Besides, hypertensive rats have greater contraction to phenylephrine ($126.60\% \pm 2.97\%$ vs. $95.24\% \pm 5.49\%$; $p < 0.05$), which was restored by CM-G treatment ($90.26\% \pm 8.54\%$ vs. $95.24\% \pm 5.49\%$; $p > 0.05$). Furthermore, vasorelaxation to acetylcholine and sodium nitroprusside was diminished in hypertensive rats, which was also restored by CM-G. Finally, oral treatment with CM-G reduced serum levels of malondialdehyde, an important biomarker used in the assessment of oxidative stress, in treated hypertensive animals when compared to untreated animals (14.62 ± 0.93 vs. 21.82 ± 1.27 nmol/ml, $p < 0.05$). The present study revealed for the first time that treatment with CM-G reduced arterial hypertension and restored baroreflex sensitivity through a reduction in sympathetic tone, in addition to normalizing vascular reactivity and reducing oxidative stress in rats with renovascular hypertension.

Key words: hypertension, sympathetic overactivity, baroreflex sensitivity, vascular reactivity, oxidative stress, carboxymethyl-glucan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Vias patogênicas da hipertensão renovascular.....	28
Figura 2:	Diagrama esquemático dos mecanismos centrais e periféricos da regulação simpática	30
Figura 3:	Mecanismos neurais envolvidos na regulação do barorreflexo para o coração e vasos de resistência	31
Figura 4:	Contribuição das espécies reativas de oxigênio (EROs) para a disfunção endotelial da hipertensão – mecanismos moleculares.....	33
Figura 5:	Representação da β -D-glucana entre os componentes da parede celular de fungos.	35
Figura 6:	Representação da cadeia lateral da carboximetil-glucana (CM-G). Um grupo carboxila (CH_2COOH) é adicionado ao grupo hidroxila	36
Figura 7:	Desenho Experimental do Estudo	43
Figura 8:	Esquema representativo do protocolo de verificação da viabilidade funcional do tecido muscular e endotelial vascular	46
Figura 9:	Esquema representando o protocolo para avaliação da reatividade vascular em animais suplementados ou não com CM-G sobre anéis de artéria mesentérica	46
Figura 10:	Ilustração do procedimento de implantação do clipe de prata na artéria renal direita	48
Figura 11:	Rins esquerdo e direito de um animal submetido a indução de hipertensão 2R1C.....	49

Figura 12:	Ilustração do procedimento de implantação dos cateteres vasculares.	51
Figura 13:	Traçado original demonstrando a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) em um animal representativo de cada grupo	57
Figura 14:	Traçados representativos de um animal de cada grupo, ilustrando a variação da pressão arterial pulsátil (PAP), da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca após administração de fenilefrina (8µg/kg, i.v.) e nitroprussiato de sódio (25µg/kg, i.v.)	61
Figura 15:	Traçados representativos de um animal de cada grupo, ilustrando a variação da pressão arterial pulsátil (PAP) e pressão arterial média (PAM) após administração de hexametônio (30mg/kg, i.v.).	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da solução fisiológica da solução de Tyrode.... 44

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Pressão arterial média basal dos grupos SHAM+SALINA, SHAM+CM-G, 2R1C+SALINA e 2R1C+CM-G. 58
- Gráfico 2:** Frequência cardíaca dos grupos SHAM+SALINA, SHAM+CM-G, 2R1C+SALINA e 2R1C+CM-G. 59
- Gráfico 3:** Representação gráfica do ganho do barorreflexo de todos os grupos determinado pelo método de Oxford modificado 62
- Gráfico 4:** Representação gráfica do ganho do barorreflexo de todos os grupos determinado pelo método de sequências..... 63
- Gráfico 5:** Variação da pressão arterial média (Δ mm Hg) após administração intravenosa de hexametônio (30mg/kg) em animais dos grupos SHAM+SALINA, SHAM+CM-G, 2R1C+SALINA e 2R1C+CM-G. 66
- Gráfico 6:** Alterações no componente de baixa frequência (LF) da análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) em animais dos grupos SHAM+SALINA, SHAM+CM-G, 2R1C+SALINA e 2R1C+CM-G. 68
- Gráfico 7:** A. Curva de contração em resposta a administração de concentrações cumulativas de fenilefrina (FEN) em anéis mesentéricos de animais normotensos e hipertensos tratados ou não com carboximetil-glucana (CM-G) durante 14 dias por via oral. B. Efeito máximo de contração promovido pela FEN em animais normotensos e hipertensos tratados e não tratados com CM-G 69
- Gráfico 8:** A. Curva de relaxamento em resposta a administração de concentrações cumulativas de nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis mesentéricos de animais normotensos e hipertensos tratados ou não com carboximetil-glucana (CM-

G) durante 14 dias por via oral. B. Efeito máximo de relaxamento promovido pelo NPS em animais normotensos e hipertensos tratados e não tratados com CM-G..... 71

Gráfico 9: A. Curva de relaxamento em resposta a administração de concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em anéis mesentéricos de animais normotensos e hipertensos tratados ou não com carboximetil-glucana (CM-G) durante 14 dias por via oral. B. Efeito máximo de relaxamento promovido pela ACh em animais normotensos e hipertensos tratados e não tratados com CM-G..... 73

Gráfico 10: Estresse oxidativo sérico em animais normotensos e hipertensos tratados ou não com carboximetil-glucana (CM-G) durante 14 dias por via oral. 76

LISTA DE ABREVIATURAS

2R1C – 2-rins-1-clipe

ACh - Acetilcolina

ANG II – Angiotensina II

AP – Área Postrema

AV – Nodo Átrio-Ventricular

CBIOTEC – Centro de Biotecnologia

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CM-G – Carboximetil-Glucana

CT – Centro de Tecnologia

CVLM – Medula Ventrolateral Caudal

DS – Grau de Substituição

EDRFs – Fatores de Relaxamento Derivados do Endotélio

Emáx – Efeito Máximo

eNOS – Sintase de Óxido Nítrico Endotelial

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FC – Frequência Cardíaca

FEN – Cloridrato de L (-) Fenilefrina

GALT – Tecido Linfoide Associado ao Intestino

GPCRs – Receptores Acoplados à Proteína G.

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HEX – Cloreto de Hexametônio

HF – Alta Frequência

IML – Coluna Intermediolateral da Medula Espinhal

ISB – Índice de Sensibilidade do Barorreflexo

IpeFarM – Instituto Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

LACONCHA – Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão

LF – Baixa Frequência

MDA – Malondialdeído

NO – Óxido Nítrico

NPS – Nitroprussiato de Sódio

NRF2 – Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado ao Fator 2;

NTS – Núcleo do Trato Solitário

PA – Pressão Arterial

PAS – Pressão Arterial Sistêmica

PVN – Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

RMN – Ressonância Magnética

RVLM – Medula Ventrolateral Rostral

SA – Nodo Sinoatrial

SFO – Órgão Subfornical

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNS – Sistema Nervoso Simpático

SOD – Superóxido Dismutase

SRA – Sistema Renina-Angiotensina

SRRA – Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

VE – Ventrículo Esquerdo

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	OBJETIVO GERAL	40
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
3	METODOLOGIA.....	42
3.1	LOCAL DA PESQUISA E ÉTICA.....	42
3.2	ANIMAIS	42
3.3	DROGAS UTILIZADAS.....	42
3.4	SUBSTÂNCIA TESTE.....	42
3.5	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	43
3.6	SOLUÇÕES NUTRITIVAS.....	44
3.7	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS <i>IN VITRO</i>	44
3.7.1	ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR).....	44
3.7.1.1	PREPARAÇÃO DE ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATOS.....	44
3.7.2	AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO SÉRICO	47
3.8	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS <i>IN VIVO</i>	47
3.8.1	INDUÇÃO DO MODELO DE HIPERTENSÃO RENOVASCULAR DOIS RINS UM CLIPE (2R1C).....	47
3.8.2	CATETERES VASCULARES	49
3.8.3	REGISTRO DIRETO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA	49
3.8.4	AVALIAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR INDUZIDO PELO TRATAMENTO ORAL COM CM-G SOBRE A PRESSÃO	

	ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS NÃO ANESTESIADOS	51
3.8.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM CM-G SOBRE NO BARORREFLEXO DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS NÃO ANESTESIADOS.....	51
3.8.5.1	<i>Método de Oxford (modificado)</i>	52
3.8.5.2	<i>Método da sequência</i>	52
3.8.6	AVALIAÇÃO INDIRETA DA MODULAÇÃO AUTÔNOMICA DA RESISTÊNCIA VASCULAR.....	53
3.8.7	AVALIAÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO VASCULAR APÓS TRATAMENTO ORAL COM CM-G EM ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS NÃO ANESTESIADOS.....	54
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4	RESULTADOS	56
4.1	EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM CM-G NA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA DE ANIMAIS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR.....	56
4.2	EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM CM-G NA SENSIBILIDADE DO BARORREFLEXO DE ANIMAIS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR.....	60
4.3	EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM CM-G SOBRE O TÔNUS SIMPÁTICO DE ANIMAIS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR	64
4.4	EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM CM-G SOBRE O COMPONENTE DE BAIXA FREQUÊNCIA (LF) DA PRESSÃO	

	ARTERIAL SISTÓLICA DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS	67
4.5	EFEITO DO TRATAMENTO COM CM-G VIA ORAL NA REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS	69
4.6	EFEITO DO TRATAMENTO COM CM-G VIA ORAL NO ESTRESSE OXIDATIVO SÉRICO DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS	75
5	DISCUSSÃO	78
6	REFERÊNCIAS	85
	ANEXOS.....	100

Introdução

1. INTRODUÇÃO

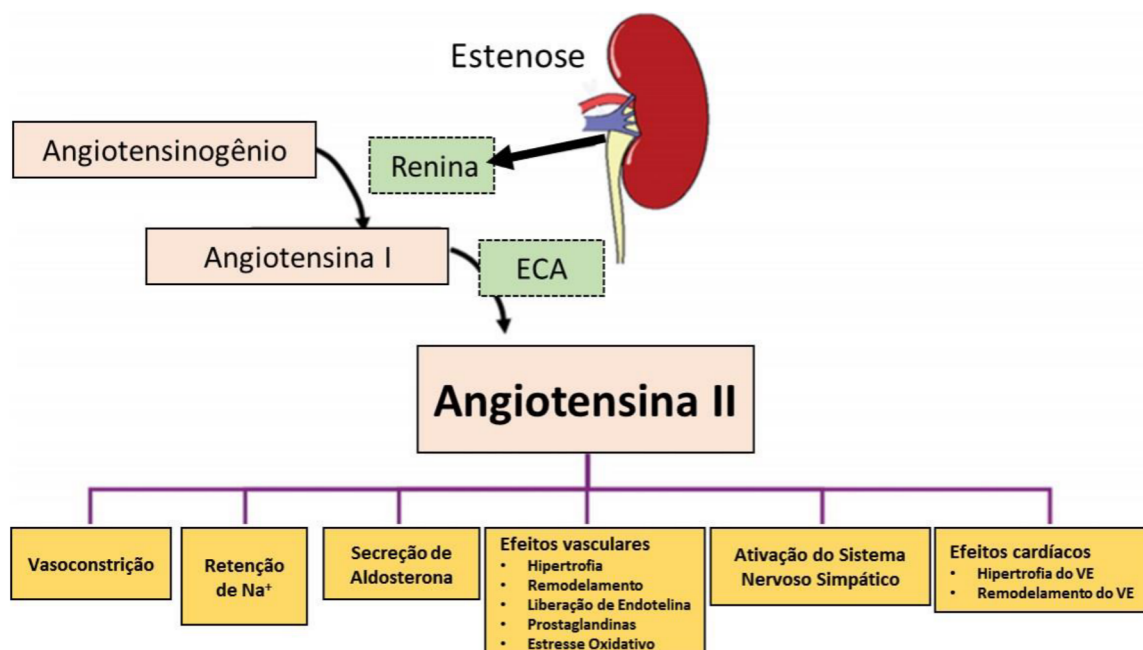
A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (BARROSO et al., 2021). Um indivíduo é considerado hipertenso se apresentar valores de pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou de pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg em aferições de consultório. O diagnóstico deverá ser sempre validado por aferições repetidas, em condições ideais em pelo menos três ocasiões diferentes (FIGUEIREDO et al., 2009; MANCIA et al., 2011). Com base em uma análise de dados de estudos populacionais realizados em 90 países, estimou-se que, em 2010, a prevalência global de hipertensão em adultos acima de 18 anos era de 31,1% (MILLS et al., 2016); mundialmente, o número de pessoas com esta condição passou de 594 milhões em 1975 para mais de 1 bilhão em 2015 (NCD RISK FACTOR COLLABORATION, 2017).

Nas últimas décadas, diversos estudos têm relacionado a oclusão renovascular à regulação da pressão arterial, podendo desencadear um quadro de hipertensão renovascular, responsável por ocasionar de 1 a 2% dos casos de hipertensão da população em geral, podendo chegar a 6,8% em maiores de 65 anos (HERRMANN; TEXTOR, 2017). Em condições experimentais, o modelo de hipertensão 2-rins-1-clipe (2R1C) de Goldblatt tem sido uma importante ferramenta para o entendimento dos mecanismos acerca da hipertensão renovascular, sendo utilizado por diversos grupos de pesquisa em todo o mundo (GOLDBLATT et al., 1934; CAVALCANTI et al., 2016; MILANEZ et al., 2018).

O modelo experimental consiste na estenose da artéria renal, por meio da inserção de um clipe de prata, levando a uma redução do fluxo sanguíneo renal, desencadeando a liberação de renina, a qual inicia a série de reações enzimáticas para a formação da angiotensina II (FINK, 1997). O aumento dos níveis plasmáticos de angiotensina II e de seus receptores AT_1 está envolvido na patogenia da hipertensão e de outras doenças cardiovasculares

(FERRARIO, 2006; BRAGA, 2010). Diversos mecanismos são conhecidos e estão comprovadamente envolvidos na manutenção da hipertensão renovascular, o que inclui aumento da circulação de angiotensina II (Ang II), aumento da reabsorção de sódio, aumento do estresse oxidativo, disfunção do barorreflexo e maior ativação da atividade simpática vasomotora (MARTINEZ-MALDONADO, 1991) (Figura 1).

Figura 1 – Vias patogênicas da hipertensão renovascular. VE – ventrículo esquerdo.



Fonte: Adaptado de HERRMANN; TEXTOR, 2017.

Apesar do rim ser um órgão com capacidade de autoregulação, a redução prolongada da perfusão renal, causada pela estenose arterial, desencadeia a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), além de estimular a atividade nervosa simpática, causando, entre outros eventos, a elevação da pressão arterial sistêmica (PAS) (BOUTARI et al., 2020).

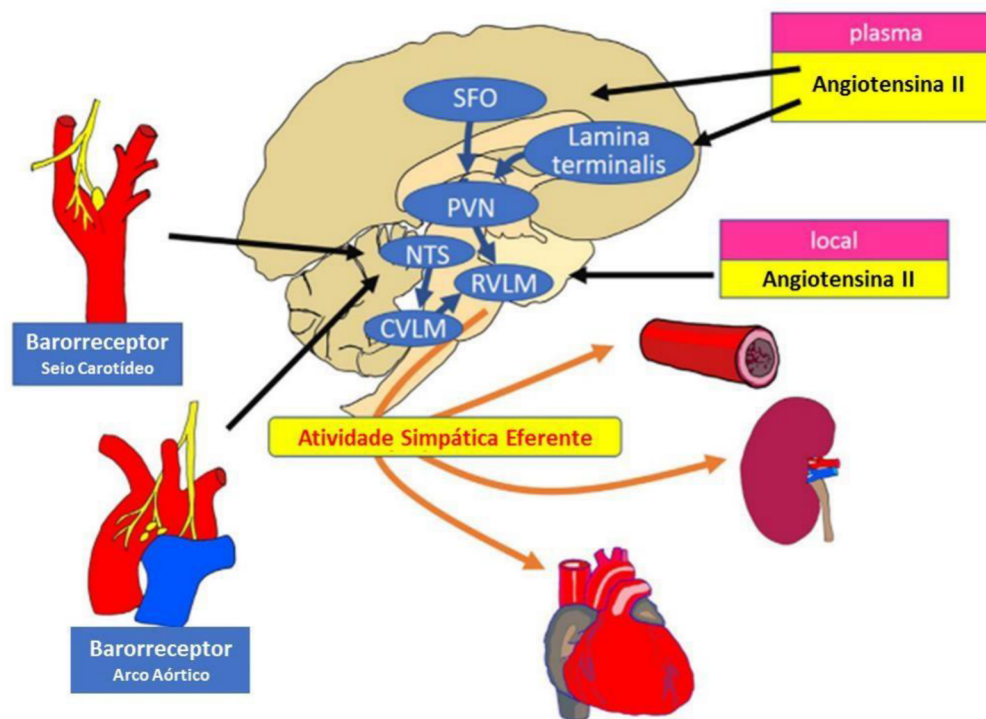
O controle da pressão arterial (PA), por sua vez, se dá por diferentes mecanismos regulatórios que atuam de forma integrada para proporcionar

uma perfusão tecidual adequada sob diferentes circunstâncias (DUKE-NOVAKOVSKI; CARR, 2015). Quaisquer alterações nesses eventos de regulação, a exemplo da estenose renal no modelo de hipertensão de Goldblatt, podem levar a distúrbios fisiológicos como o aumento da PAS (CAIN; KHALIL, 2002). E apesar de diversos mecanismos estarem envolvidos no controle da PA, estudos mostram que um papel particularmente importante é desempenhado pelo sistema nervoso autônomo (SNA), em especial o sistema nervoso simpático (SNS) (MASI et al., 2019).

O sistema renina-angiotensina (SRA), por sua vez, está intimamente envolvido na regulação de funções autonômicas e neuroendócrinas. A Ang II é o maior efetor molecular do SRA, exercendo a maioria das funções fisiológicas, o que inclui a regulação da PA, através da ativação de receptores AT_1 . Distúrbios no SRA no sistema nervoso central levam ao aumento da síntese de Ang II local, resultando no aumento da atividade simpática e da pressão arterial (MOHAMMED et al., 2020).

A elevação da atividade simpática central pode ser desencadeada pelo aumento da Ang II circulante, que atinge áreas específicas do encéfalo, como o órgão subfornical (SFO), um importante órgão circunventricular, provocando um aumento da síntese de Ang II local, graças a expressão de renina, angiotensinogênio e receptores AT_1 e AT_2 também de origem local (BRAGA et al., 2011). O SFO possui projeções para outras duas importantes áreas de regulação do sistema nervoso simpático: o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e a medula ventrolateral rostral (RVLM). A ativação de neurônios do RVLM, que pode ser potencializada pelo aumento da síntese de Ang II ao longo do eixo SFO-PVN-RVLM, causa o aumento da atividade simpática nervosa, que pode ser modulada, por exemplo, pelo reflexo barorreceptor (OSBORN et al., 2007) (Figura 2).

Figura 2 – Diagrama esquemático dos mecanismos centrais e periféricos da regulação simpática. SFO – órgão subfornical; PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo; NTS – núcleo do trato solitário; RVLM – medula ventrolateral rostral; CVLM – medula ventrolateral caudal.



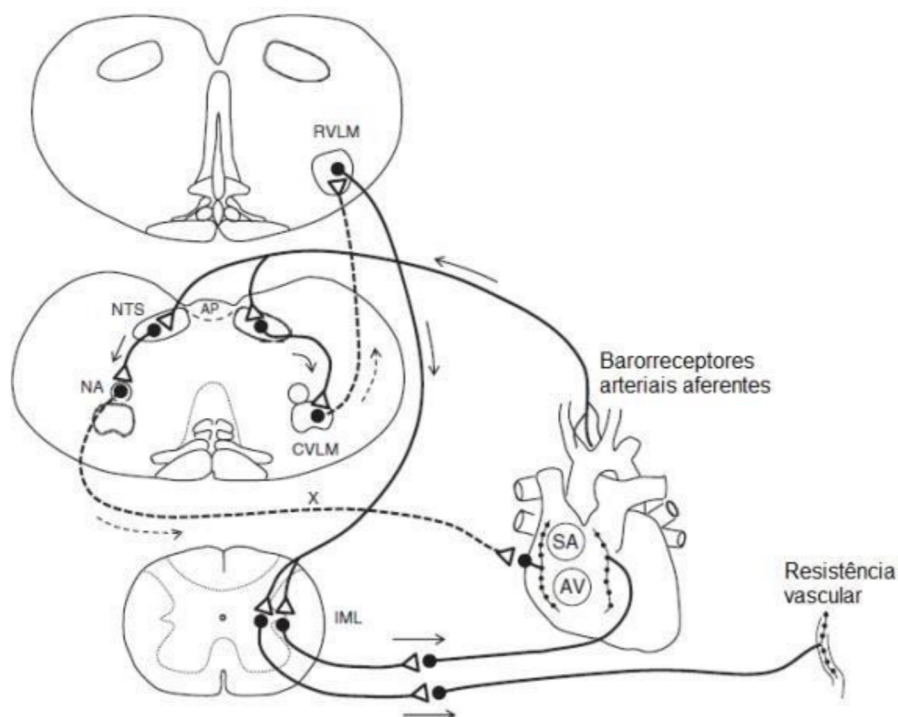
Fonte: Adaptado de SATA et al., 2018.

O barorreflexo, ou sistema barorreceptor, possui destaque no controle a curto prazo da pressão arterial. Este sistema apresenta terminações sensoriais localizadas no arco aórtico e no seio carotídeo denominadas barorreceptores, que são mecanorreceptores responsáveis por monitorar os níveis de pressão arterial batimento a batimento, gerando informações que são enviadas ao sistema nervoso central para que ajustes no sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático sejam promovidos, de modo a garantir que a pressão arterial seja mantida em níveis considerados normais (SHEPHERD; MANCIA, 1986).

Os barorreceptores, localizados no arco aórtico e no seio carotídeo, detectam o estiramento produzido pela pressão exercida pelo fluxo

sanguíneo. Esse estiramento leva à ativação dos barorreceptores, que enviam estímulos elétricos através das fibras aferentes dos nervos vago e glossofaríngeo (nervo de Hering), projetando-se até o núcleo do trato solitário (NTS). Por sua vez, os neurônios do NTS ativam os neurônios inibitórios da medula ventrolateral caudal (CVLM) que se projetam para a medula ventrolateral rostral (RVLM). Projeções de neurônios do RVLM para neurônios pré-ganglionares na coluna intermediolateral da medula espinal são responsáveis pelo fluxo simpático basal para a periferia. Assim, a ativação de barorreceptores induzida pelo aumento da PA suprime o fluxo simpático central inibindo o RVLM, levando a reduções substanciais na atividade simpática e na PA (Figura 3) (LONG; KIRBY, 2008; BRAGA et al., 2011; DUKE-NOVAKOVSKI; CARR, 2015; LOHMEIER; ILIESCU, 2015) (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismos neurais envolvidos na regulação do barorreflexo para o coração e vasos de resistência. AP – área postrema; SA – nodo sinoatrial; AV – nodo átrio-ventricular; IML – coluna intermédio-lateral da medula espinal.



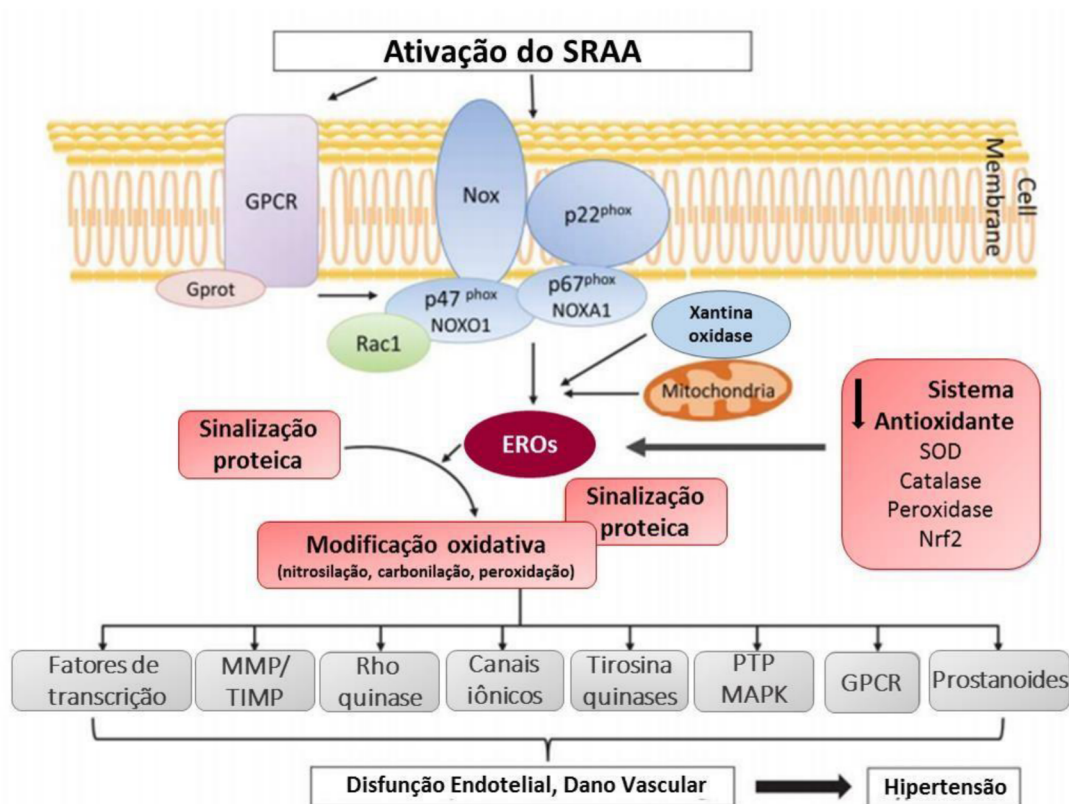
Fonte: Adaptado de CHARKOUDIAN; WALLIN, 2014.

Disfunções no barorreflexo, amplamente relatadas em diversos modelos de HA, reduzem a atividade parassimpática e aumentam significativamente a atividade simpática, elevando a PA, devido à desregulação desse sistema (BOTELHO-ONO et al., 2011; LOHMEIER; ILIESCU, 2015).

Outro fator que pode contribuir com a HA são os níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (EROs), gerando respostas de proliferação celular, que corroboram com o remodelamento vascular e consequentemente a disfunção endotelial (PEREIRA et al., 2018). Sendo assim, a busca por estratégias mais eficazes e que possibilitem o melhor controle da pressão arterial, diminuem as chances de indivíduos desenvolverem complicações cardiovasculares (ETTEHAD et al., 2016). Diversos estudos, inclusive desenvolvidos em nosso laboratório, têm demonstrado que o aumento do estresse oxidativo, caracterizado por um estado patológico causado por um excesso na produção de EROs ou por uma alteração nos mecanismos antioxidantes intracelulares, eleva a atividade simpática e pode contribuir para o desenvolvimento e a manutenção da hipertensão arterial (GUIMARAES et al., 2012; QUEIROZ et al., 2012; CAVALCANTI et al., 2016; CHANG et al., 2020).

Entre as EROs, destacam-se o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, e a maneira como cada uma delas atua é dependente do local de produção, meia vida, permeabilidade à membrana celular e concentração local, por exemplo (RAY et al., 2012). Na hipertensão, com a ativação do SRAA e do SNS, a produção de EROs por enzimas como a NADPH oxidase é estimulada, o que, junto à redução de mecanismos antioxidantes leva ao aumento dos níveis intracelulares de EROs e ao estresse oxidativo, promovendo uma série de modificações na sinalização proteica, desencadeando disfunção endotelial e danos vasculares (MONTEZANO et al. 2015) (Figura 4).

Figura 4 – Contribuição das espécies reativas de oxigênio (EROs) para a disfunção endotelial da hipertensão – mecanismos moleculares. SRAA – sistema renina-angiotensina-aldosterona; SOD – superóxido dismutase; Nrf2 – fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; GPCR – receptores acoplados à proteína G.



Fonte: Adaptado de MONTEZANO, 2015.

O endotélio é uma importante camada celular presente no lúmen dos vasos sanguíneos e desempenha um importante papel na homeostase vascular, como modulação do tônus, manutenção do fluxo sanguíneo e participação na regulação da resposta imunológica (INCALZA et al. 2017). Sendo considerado um componente endócrino no organismo, o endotélio vascular é responsável por liberar substâncias vasoativas denominados fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRF), sendo o óxido nítrico (NO) o mais potente agente vasodilatador, inibidor da agregação plaquetária, da coagulação e da proliferação celular (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

Disfunções endoteliais são definidas como um desequilíbrio entre a produção de fatores vasodilatadores e vasoconstritores, predispondo a vasculatura a um fenótipo caracterizado por vasoconstrição, mitogênico e pró-oxidativo, sendo bastante comuns em casos de doenças como aterosclerose, diabetes e hipertensão (VERMA; ANDERSON, 2002).

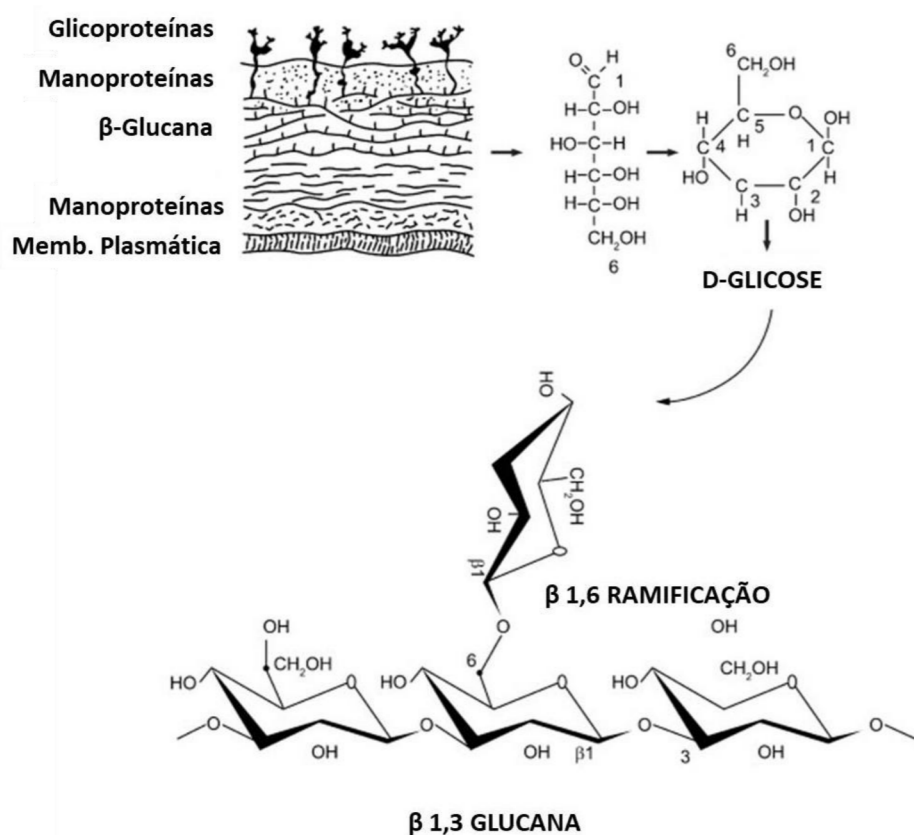
Na hipertensão, alterações como estas estão associadas à redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio, resultante de uma menor biodisponibilidade do NO, que pode estar diminuída pela sua menor produção e/ou por um aumento das EROs, causando sua inativação (LI et al., 2006). Além do mais, o aumento das EROs estimula vias PI3K/Akt-MAPKs relacionadas a fatores transcricionais, resultando na inibição da expressão do mRNA para a sintase de NO endotelial (eNOS), também reduzindo sua atividade, levando a uma redução na disponibilidade de NO. Recentes estudos mostraram que em adição à esta redução na biodisponibilidade de NO, o aumento de fatores de contração derivados do endotélio também contribuem para uma disfunção endotelial, reduzindo o relaxamento vascular na hipertensão (SILVA et al., 2012; AHMAD et al. 2017).

Os antioxidantes são substâncias que têm sido amplamente estudadas por mostrarem potencial efeito na redução de EROs e nos danos oxidativos causados nas células. Por essa razão, é interessante sugerir que terapias ou intervenções com potencial efeito antioxidativo podem ser uma importante estratégia de melhoria na sensibilidade do barorreflexo, na reatividade vascular e na redução da pressão arterial em indivíduos hipertensos. Uma recente meta-análise sugeriu que terapias de ativação do barorreflexo podem ter efeitos benéficos na PA em casos de hipertensão resistente, no entanto, novos experimentos e dados clínicos são necessários para confirmar a aplicação da ativação do barorreflexo sob condições de pressão arterial aumentada (WALLBACH; KOZIOLEK, 2018).

As β -D-glucanas são polissacarídeos que podem ser extraídos de leveduras, plantas, algas marinhas, fungos e de alguns cereais, como aveia e cevada, tendo recebido especial atenção por suas propriedades bioativas, em especial no que se refere à imunomodulação e aos efeitos

protetivos contra danos celulares causados pelo estresse oxidativo (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008; MACHOVÁ et al, 2014). A parede celular de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* é uma importante fonte de β -D-glucana, sendo constituída por um esqueleto linear central de unidades de glicose ligadas na posição β (1-3) e cadeias laterais unidas por ligações β (1-6) (CLOETENS et al., 2012; BEZERRA et.al. 2017) (Figura 5).

Figura 5 – Representação da β -D-glucana entre os componentes da parede celular de fungos.



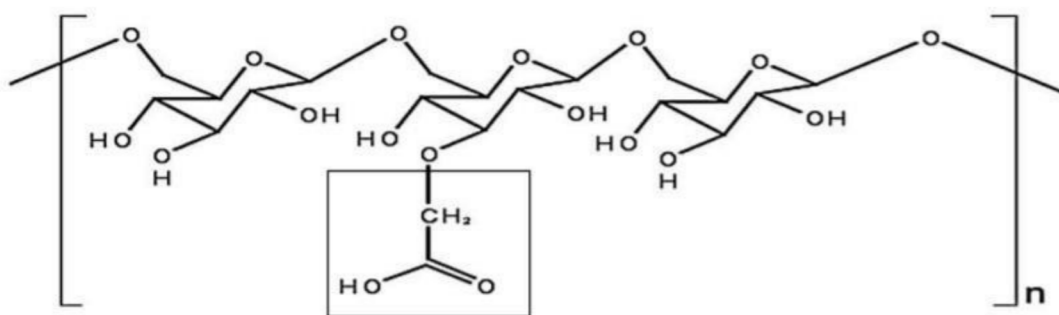
Fonte: Adaptado de CHAN, 2009.

A *Saccharomyces cerevisiae*, importante fonte de β -D-glucana, é uma levedura conhecida por fazer parte dos processos de panificação e cervejaria, tratando-se de um microrganismo eucariótico unicelular, sendo caracterizada

pelo rápido crescimento e um elevado grau de adaptação ambiental. Através da obtenção de diferentes linhagens de levedura, a β -D-glucana pode ser obtida como material solúvel ou insolúvel, onde os derivados de *S. cerevisiae* envolvem processos de extração e lavagem relativamente longos (JAMAS, 1997; MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008).

Estudos realizados com a β -D-glucana mostram que características como peso molecular, estrutura e solubilidade podem ser fatores decisivos na atividade biológica dessa estrutura. De forma que β -glucanas com elevado grau de ramificações são consideradas solúveis, sendo mais eficientes em sua bioatividade (PETRAVIĆ-TOMINAC, et al., 2010; KAGIMURA et al., 2014; ZHU et al., 2016). Nesse contexto, dentre os derivados solúveis, destaca-se a carboximetil-glucana (CM-G), com massa molar de aproximadamente 220 kDa, obtida através da adição de grupos carboxilas em grupos hidroxilas existentes, desencadeando aumento da solubilidade, da viscosidade e do poder antioxidante, potencializando as propriedades biológicas e físico-químicas desses polissacarídeos (CHEN et al., 2013) (Figura 6).

Figura 6 – Representação da cadeia lateral da carboximetil-glucana (CM-G). Um grupo carboxila (CH_2COOH) é adicionado ao grupo hidroxila.



Fonte: KAGIMURA et al, 2014.

Importantes atividades anticarcinogênicas, antimutagênicas e imunomoduladoras estão associadas a estes derivados carboximetilados, e o peso molecular parece estar relacionado com a atividade biológica (MAGNANI, 2010; MAGNANI et al., 2011). É sabido que β -D-glucanas de

peso molecular intermediário ou baixo possuem atividade biológica *in vivo*, porém, seus efeitos celulares são menos conhecidos (BROWN; GORDON, 2003).

Os mecanismos de atuação das β -D-glucanas ainda não foram totalmente esclarecidos. No que diz respeito à sua ação hipolipemiante acredita-se que, por serem fibras e, portanto, não digeridas no trato gastrointestinal, as β -D-glucanas lineares ligam-se ao colesterol e aos sais biliares aumentando sua excreção pelas fezes e, conseqüentemente, diminuindo a absorção intestinal, mantendo o perfil lipídico sérico em níveis aceitáveis (GIAVASIS, 2014). Já em relação à atividade imunomoduladora, sabe-se que as β -D-glucanas são estruturas exógenas e, portanto, não sintetizadas por componentes do organismo, fazendo com que o sistema imunológico não as reconheça, induzindo uma resposta inata e adaptativa. A captação intestinal dessas moléculas se daria através de células membranosas nas placas de Peyer no intestino, através do Tecido Linfoide Associado ao Intestino (GALT), com posterior fagocitose pelos macrófagos e transporte para órgãos linfoides, fígado, rins, nódulos linfáticos e medula óssea (RAHAR et al., 2011; SAMUELSEN; SCHREZENMEIR; KNUTSEN, 2014)

Conhecida por suas propriedades antioxidantes, a carboximetil-glucana é capaz de reduzir níveis de malondialdeído em indivíduos saudáveis e possui um importante papel na proteção de membranas biológicas, sendo seu mecanismo melhor aceito o que consiste na capacidade da CM-G em reduzir as EROs do meio (BABINCOVA et al., 2002; ARAUJO et al., 2015). Em relação aos efeitos cardiovasculares da CM-G de *S. cerevisiae*, os dados ainda são poucos, e às vezes até mesmo conflitantes, por utilizar diferentes fontes, metodologias, doses, tratamentos e vias de administração, por exemplo (AARSAETHER et al., 2012). Recentemente, um estudo de BEZERRA e seus colaboradores (2017) sugeriu que a CM-G possui a capacidade de modular a função vascular e de reduzir significativamente a agregação plaquetária em ratos.

Dessa forma, tendo em vista as propriedades antioxidantes da CM-G relatadas na literatura e a escassez de dados que mostrem o impacto desta glucana na hipertensão arterial, este estudo testou a hipótese de que o tratamento oral com CM-G pode promover melhorias na sensibilidade do barorreflexo, na reatividade vascular e no estresse oxidativo, além de estabilizar os níveis de pressão arterial em animais com hipertensão renovascular.

Objetivos

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos induzidos pelo tratamento com carboximetil-glucana no sistema cardiovascular de ratos normotensos e de ratos com hipertensão renovascular.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os possíveis efeitos induzidos pelo tratamento oral com carboximetil-glucana por 14 dias sobre a pressão arterial e sobre a sensibilidade do barorreflexo em animais normotensos e hipertensos;
- Avaliar os efeitos induzidos pelo tratamento com carboximetil-glucana na atividade simpática de animais normotensos e hipertensos por meio de análise espectral do componente de baixa frequência da pressão arterial sistólica;
- Avaliar a influência do tratamento com CM-G sobre o tônus vascular simpático de ratos normotensos e hipertensos;
- Averiguar os potenciais efeitos do tratamento com CM-G sobre a reatividade vascular de animais normotensos e hipertensos;
- Investigar os efeitos do tratamento com carboximetil-glucana no estresse oxidativo em animais normotensos e hipertensos.

Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1 LOCAL DA PESQUISA E ÉTICA

Os protocolos experimentais foram realizados no Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão (LACONCHA), localizado no Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – Campus I.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB nº 102/2016) UFPB.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (150-300g) provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Instituto Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM-UFPB). Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno e mantidos sob condições monitoradas em salas com temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ \text{C}$), obedecendo o ciclo claro/escuro 12:12 horas, sendo a fase clara de 6:00 às 18:00 horas. Os animais tiveram livre acesso a ração tipo *pellets* (Labina®, Purina, Paulinea, SP, Brasil) e água.

3.3 DROGAS UTILIZADAS

Foram utilizadas as seguintes substâncias: Cloridrato de cetamina (Quetamina® Laboratório – Vetnil, Brasil); xilazina (Dopaser - Laboratório Calier, Espanha). Acetilcolina (ACh), Cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN); nitroprussiato de sódio (NPS); cloreto de hexametônio (HEX). Todas foram obtidas da Sigma-Aldrich®.

3.4 SUBSTÂNCIA TESTE

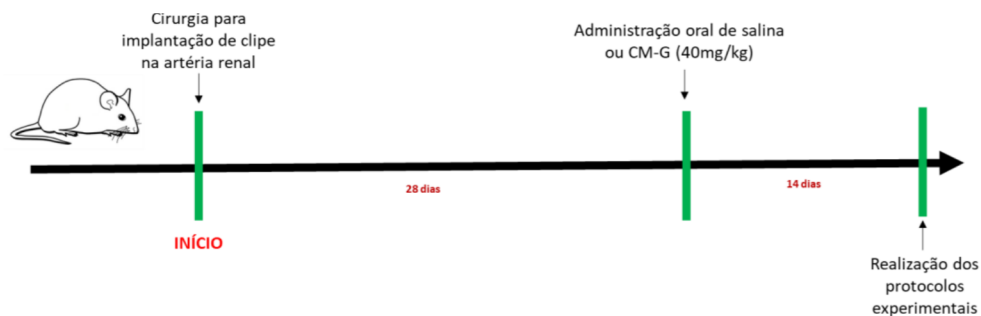
A Carboximetilglucana (CM-G) derivada da *Saccharomyces cerevisie*, gentilmente sintetizada e cedida pelo Laboratório de processos Microbianos em Alimentos, localizado no Centro de Tecnologia (CT) da UFPB – Campus I, coordenado pela Prof. Dra. Marciane Magnani. foi obtida a partir de creme de levedura por um processo de obtenção do polímero puro, utilizando sonicação e tratamento enzimático após extração com água quente, conforme descrito por Magnani et al. (2009). A derivatização foi realizada usando ácido monocloroacético para atingir grau de substituição (DS) de 0.8, conforme solubilidade e bioatividade identificada em estudos anteriores (MAGNANI et al., 2010; ARAUJO et al., 2015). A DS foi controlada por titulação potenciométrica com solução de hidróxido de potássio (ŠANDULA et al., 1999). A identidade química e modificações estruturais foram confirmadas por ressonância magnética (RMN) e análise de infravermelho (MAGNANI et al., 2009).

Para os protocolos experimentais, a CM-G foi solubilizada em solução salina em volume suficiente para atingir a dose necessária para os tratamentos.

3. 5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para todos os experimentos descritos nesta seção, os animais foram divididos em quatro grupos: SHAM, SHAM+CM-G, 2R1C e 2R1C+CM-G. Nos grupos CM-G, a carboximetil-glucana (40 mg/kg) foi administrada diariamente durante 14 dias. O tratamento foi realizado por meio de gavagem, e iniciado 28 dias (4 semanas) após a cirurgia de indução da hipertensão renovascular (ou cirurgia SHAM) (Figura 7).

Figura 7 – Desenho Experimental do Estudo.



3. 6 SOLUÇÕES NUTRITIVAS

Para os estudos de reatividade vascular (*ex vivo*) foram usadas soluções nutritivas aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) emantidas a 37° C, todas obtidas da Sigma-Aldrich®. A composição da solução fisiológica Tyrode está descrita na tabela 1.

Tabela 1: Composição da solução fisiológica Tyrode.

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
Tyrode	
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl₂	2,0
MgCl₂	1,05
NaHCO₃	10,0
NaH₂PO₄	0,42
C₆H₁₂O₆	5,6

3. 7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*

3. 7. 1 ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR

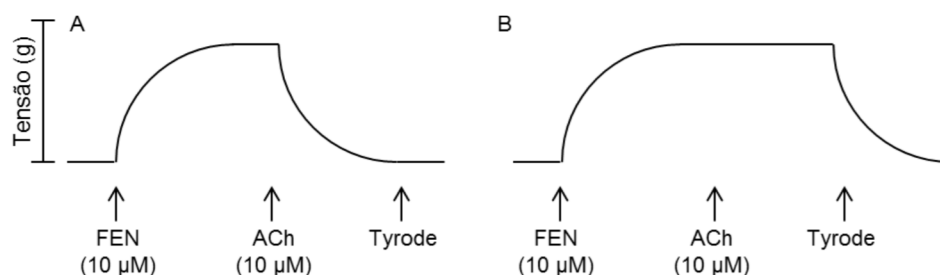
3. 7. 1. 1 PREPARAÇÃO DE ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATOS

Ratos normotensos e hipertensos tratados com CM-G por 14 dias foram eutanasiados com o auxílio da guilhotina. Por meio de uma incisão na região ventral do animal, a artéria mesentérica cranial foi identificada, removida e imediatamente colocada em solução Tyrode, onde todo o tecido aderente foi removido para obter os anéis da artéria (1-2 mm), que foram mantidos gaseificados em uma mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantidos

a 37°C, a pH 7,4. Em parte dos protocolos, os anéis tiveram o seu endotélio removido por atrito mecânico entre as paredes internas do vaso e uma haste de metal. Estes anéis foram montados verticalmente em duas hastes de aço inoxidável em forma de triângulo em uma cuba de tecido (10 mL), suspensos por linhas de algodão conectadas a um transdutor de força sensível a variações de tensões isométricas (PowerLab TM, ADInstruments, MA, EUA) e submetidos à uma tensão basal de aproximadamente 0,75 g, durante 60 minutos para estabilização (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Durante este período a solução fisiológica do banho foi trocada a cada 15 minutos, para prevenir a interferência de metabólitos e a linha de base foi ajustada quando necessário (ALTURA; ALTURA, 1970).

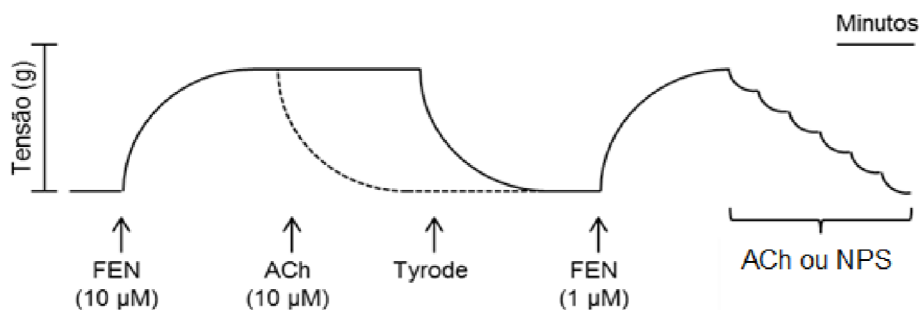
Após o período de estabilização inicial, a viabilidade funcional do tecido muscular e a presença de endotélio funcional foram verificadas por meio de uma contração induzida por fenilefrina (FEN, 10 μ M), um agonista α -adrenérgico (BYLUND, 1992; BÜSCHER et al., 1999), e pelo relaxamento dos anéis após adição de acetilcolina (ACh, 10 μ M), um agonista dos receptores muscarínicos (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), respectivamente. Foram considerados com endotélio funcional (E+), os anéis com relaxamento superior a 80 % sobre pré-contracção com fenilefrina. Se o relaxamento fosse inferior a 80 % e superior a 10 % os anéis eram descartados. Já os anéis com relaxamento inferior a 10 % foram considerados sem endotélio funcional (E-). Os anéis que obtiveram uma contração superior a 0,30 g da linha de base, foram considerados viáveis. Após isso, a solução de Tyrode foi trocada sucessivas vezes até o retorno dos valores de tensão basal inicial, retirando todas as drogas utilizadas anteriormente e metabólitos, e em seguida foram realizados os protocolos experimentais.

Figura 8 - Esquema representativo do protocolo de verificação da viabilidade funcional do tecido muscular e endotelial vascular. (A) Anéis considerados com endotélio funcional. (B) Anéis considerados sem endotélio funcional.



Após um período de estabilização de 60 minutos e posterior verificação do endotélio funcional, foi induzida uma contração com FEN (10 μ M). Logo após, concentrações crescentes do ACh (10⁻¹⁰ - 10⁻⁴), de maneira cumulativa, foram aplicadas para a obtenção de uma curva concentração-resposta, em anéis com endotélio funcional e o nitroprussiato de sódio (NPS) (10⁻¹² – 10⁻⁵) em anéis sem endotélio funcional. O relaxamento foi expresso como porcentagem reversa da contração induzida pela FEN. Adicionalmente, foi realizada uma curva concentração-resposta à FEN (10⁻¹⁰ – 10⁻⁴) em anéis submetidos à tensão basal. Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foram calculados os valores de Emáx (efeito máximo).

Figura 9 - Esquema representando o protocolo para avaliação da reatividade vascular em animais suplementados ou não com CM-G sobre anéis de artéria mesentérica. Foram avaliados anéis com endotélio funcional (linha pontilhada) e anéis desprovidos de endotélio funcional (linha cheia).



3.7.2 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO SÉRICO

Após o período de tratamento, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado para a análise do estresse oxidativo. Todas as amostras foram usadas para a dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), como descrito por Cavalcanti et al., 2016. Nesse ensaio o malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico para produzir um complexo de cor vermelha, funcionando como um indicador do estresse oxidativo sérico. Para tanto, depois de coletadas as amostras de sangue dos animais foram centrifugadas a 2000 g, 4° C, durante 15 minutos para a obtenção do soro. Posteriormente 250 µL do soro foi aquecido em aquecedor a uma temperatura de 37 °C por 1 hora. Em seguida, 400 µL de ácido perclórico (35%) foram adicionados, misturados e centrifugados a 600 g, 4° C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, e adicionado a 400 µL do ácido tiobarbitúrico (0,6%). A mistura foi aquecida a uma temperatura de 100 °C durante 1 hora, e a absorbância foi lida no espectrofotômetro ChemWell T em um comprimento de onda de 532 nm. Uma curva padrão do MDA com concentrações de 0 a 100 nmol/ml foi construída antes da leitura das amostras, e os resultados foram expressos como nmol de MDA/mL.

3. 8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO*

3. 8. 1 INDUÇÃO DO MODELO DE HIPERTENSÃO RENOVASCULAR DOIS RINS UM CLIPE (2R1C)

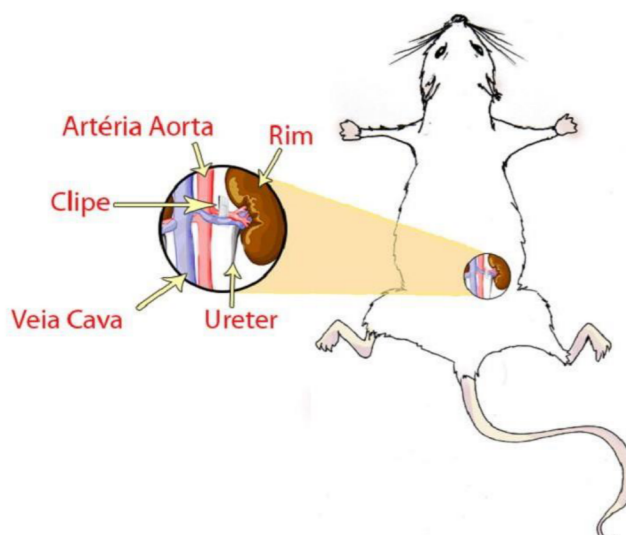
Para esse estudo foi utilizado o modelo experimental de hipertensão desenvolvido por Goldblatt (1934) e adaptada por Schaffenburg (1959), no qual os animais são submetidos a um procedimento cirúrgico para implantação de um clipe de prata na artéria renal direita induzindo uma hipertensão renovascular (Figura 10).

Para isso, ratos pesando aproximadamente 180g foram anestesiados com cetamina 75 mg/kg e xilazina 10 mg/kg (i.p.). Foi realizada uma incisão na região

dorsal média do animal, logo abaixo da última costela, onde a artéria renal direita foi exposta e cuidadosamente separada da veia renal direita e dos tecidos circundantes. Em seguida um clipe de prata em forma de U (0,2 mm de diâmetro interno) foi colocado ao redor do vaso, próximo à aorta abdominal. No final a incisão foi suturada e limpa com iodeto de potássio.

O mesmo procedimento foi realizado nos animais controle (Sham), envolvendo todas as etapas cirúrgicas descritas anteriormente, com exceção da implantação do clipe de prata na artéria renal direita. Após os procedimentos, os animais foram devolvidos às suas gaiolas, onde permaneceram em recuperação para os protocolos seguintes.

Figura 10 - Ilustração do procedimento de implantação do clipe de prata na artéria renal direita.



Para o grupo 2R1C, foram considerados hipertensos os animais que, após seis semanas, apresentaram PAM ≥ 140 mmHg, além do rim direito clipado com massa menor que a massa do rim esquerdo não clipado (Figura 11). O impedimento parcial do fluxo sanguíneo provocado pelo clipe aplicado na artéria renal direita induz uma diminuição da função e subsequente atrofia ou hipotrofia do órgão. Já o rim não clipado (esquerdo) é submetido a uma sobrecarga com o objetivo de realizar a função pendente do rim clipado, levando a um aumento compensatório de massa (BURTZTYN et al., 2001).

Figura 11 – Rins esquerdo e direito de um animal submetido a indução de hipertensão 2R1C.



Essa diferença apresentada em animais submetidos ao modelo de hipertensão 2R1C foi particularmente importante como item de inclusão/exclusão de animais do grupo 2R1C+CM-G, já que o valor da PAM pôde sofrer interferência mediante tratamento com carboximetil-glucana. Assim, para este grupo, a diferença do índice de massa dos órgãos (massa do órgão/massa corpórea), entre rim direito e esquerdo, foi crucial para que os animais fossem utilizados. Animais que não apresentaram esta diferença foram excluídos do estudo.

3. 8. 2. CATETERES VASCULARES

Foram utilizados tubos de polietileno PE-10 (diâmetro externo e interno de 0,61 e 0,28 mm, respectivamente) e PE-50 (diâmetro externo e interno de 0,96 e 0,58 mm, respectivamente) e os cateteres foram confeccionados de forma a possuírem extensões suficientemente capazes de atingir os vasos-alvo (a artéria aorta e a veia cava caudal), de acordo com as medidas abaixo:

- Cateter Arterial: PE-10= 4,0 cm; PE-50= 18 cm
- Cateter Venoso: PE-10= 2,0 cm; PE-50= 18 cm

3. 8. 3 REGISTRO DIRETO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA

Seis semanas após os procedimentos cirúrgicos para indução da hipertensão 2R1C, tempo necessário para a recuperação dos animais, assim como para o desenvolvimento do modelo de hipertensão utilizado, os grupos SHAM, SHAM+CM-G, 2R1C e 2R1C+CM-G foram novamente anestesiados com cetamina e xilazina (75 e 10 mg/kg, i.p.), e em seguida colocados em decúbito dorsal sobre uma prancha cirúrgica. Por meio de incisão na região femoral, artéria e veia femorais foram identificadas e dissecadas. As extremidades PE-10 dos cateteres de polietileno foram introduzidas em direção à aorta abdominal, via artéria femoral, para registro dos parâmetros cardiovasculares e em direção à veia cava caudal, por meio da veia femoral, para administração das drogas. Os cateteres foram fixados por linhas cirúrgicas e tunelizados subcutaneamente com trajeto em direção à região dorsal, onde foram exteriorizados. Os cateteres foram preenchidos com solução salina (NaCl 0,9%) acrescida de 500 UI de heparina, a fim de evitar obstruções. Os animais foram colocados em gaiolas individuais com comida e água *ad libitum* e o registro da PA foi realizado 24 horas após a implantação dos cateteres (Figura 12).

O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (Modelo BRPL2, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, EUA) acoplado a um amplificador e conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, New South Wales, Austrália), e a medida da PA foi realizada em ratos conscientes e com livre movimentação. Como software de aquisição e análise foi utilizado o LabChart 5.0.

Figura 12 - Ilustração do procedimento de implantação dos cateteres vasculares.

A, identificação e dissecação da artéria e veia femoral, locais de inserção dos cateteres. B, exteriorização dos cateteres na região dorsal do animal.



3. 8. 4 AVALIAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR INDUZIDO PELO TRATAMENTO ORAL COM CM-G SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) EM RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS NÃO ANESTESIADOS

Passadas 24 horas após o procedimento de implantação das cânulas, os animais foram conectados ao sistema de aquisição para a medida da PA e FC, como descrito anteriormente. Os grupos passaram por um período de aclimação de 50 minutos, e durante esse tempo também foram registrados os valores hemodinâmicos basais de cada animal.

3. 8. 5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM CM-G SOBRE NO BARORREFLEXO DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS NÃO ANESTESIADOS

A sensibilidade do barorreflexo foi avaliada nos grupos SHAM, SHAM+CM-G, 2R1C e 2R1C+CM-G. Para esta avaliação foram utilizados dois métodos: o primeiro, através da ativação do barorreflexo utilizando drogas vasoativas clássicas (modificação do Método de Oxford; Braga et al, 2008); o

segundo, através do método espontâneo, a partir de flutuações recíprocas da frequência cardíaca e pressão arterial média.

3.8.5.1 Método de Oxford (modificado)

Após registros da PA e da FC basal por 50 minutos, o barorreflexo foi ativado com o uso de drogas vasoativas clássicas. A fenilefrina (FEN, 8 µg/kg) e o nitroprussiato de sódio (NPS, 25 µg/kg) foram administrados por via endovenosa através do cateter venoso. Os dados foram analisados como $\Delta\text{bpm}/\Delta\text{mmHg}$, foi realizado uma regressão linear, onde a inclinação da reta determinou o índice de sensibilidade do barorreflexo, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{ISB} = \Delta\text{FC} / \Delta\text{PAM}$$

Onde:

ISB = Índice de Sensibilidade do Barorreflexo;

ΔFC = Variação da FC (bpm);

ΔPAM = Variação da PAM (mmHg).

3.8.5.2 Método da sequência

O traçado do registro basal, adquirido através do sistema de aquisição de sinais biológicos, foi plotado no software Cardioseries (v2.4, disponível em: <<https://www.sites.google.com/site/cardioseries/home>>). A região de interesse do traçado foi selecionada com base nas menores flutuações (ou na ausência delas) na pressão arterial, e a avaliação do barorreflexo espontâneo foi realizada de acordo com os seguintes parâmetros: 1) coeficiente de correlação de 0,85; 2) limiar de pressão de 20 mmHg; 3) sequências com comprimento de 4 (3 variações) ou mais batimentos consecutivos. Foi utilizado, portanto, o método da sequência, que consiste na análise de séries temporais da pressão arterial sistólica (PAS) e do intervalo RR para identificar sequências de aumento (+RR/+PAS) ou queda (-RR/-PAS) nessas variáveis (BRAGA et al., 2008).

Para cada sequência de aumento e queda da pressão, foi calculado o slope da regressão linear e considerada a média de todos os slopes com coeficiente de correlação $> 0,85$ em todo o período de repouso. Esta média dos slopes representa a medida do índice da sensibilidade barorreflexa espontânea.

3. 8. 6 AVALIAÇÃO INDIRETA DA MODULAÇÃO AUTÔNOMICA DA RESISTÊNCIA VASCULAR

Uma avaliação indireta da modulação autonômica da resistência vascular foi realizada através da análise da variabilidade da pressão arterial no domínio da frequência. Oscilações de pressão arterial e frequência cardíaca na faixa de baixa frequência (LF) são representativos dos efeitos moduladores da atividade simpática, enquanto oscilações na escala de alta frequência (HF) estão associados a uma modulação respiratória ou parassimpática dos vasos sanguíneos e do coração, respectivamente (MALLIANI et al., 1991; BERNARDI et al., 2001). No presente estudo, O componente de baixa frequência da pressão arterial sistólica (0.25 a 0.8 Hz) foi particular objeto de interesse para este estudo por estes sinais serem originados do RVLM (KUO; YANG; CHAN, 1997), e por isso refletirem o tônus vasomotor simpático neurogênico (LI et al., 2001).

Inicialmente, foram efetuados registros basais da PA e FC dos grupos SHAM, SHAM+CM-G, 2R1C e 2R1C+CM-G durante 50 minutos. Os trechos de registros foram divididos em períodos de segmentos de 350 batimentos e então realizada análise espectral auto regressiva, a fim de determinar os componentes oscilatórios de baixa-frequência do registro da pressão arterial, através de software apropriado (Cardioseries Software v2.4, disponível em: <https://www.sites.google.com/site/cardioseries/home>).

Para análise no domínio da frequência (análise espectral) da pressão arterial sistólica (PAS), uma série de valores basais desses parâmetros foram convertidos em pontos de dados a cada 100 ms usando interpolação cúbica e os dados foram divididos em conjuntos de sequências sobrepostos de 512 pontos de dados (51.2s). Todos os segmentos foram visivelmente inspecionados, e os dados não estacionários foram descartados. O espectro de

cada segmento foi calculado usando uma Transformada Rápida de Fourier direta. Oscilações menores do que 0,20 Hz não foram quantificadas.

3.8.7 AVALIAÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO VASCULAR APÓS TRATAMENTO ORAL COM CM-G EM ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS NÃO ANESTESIADOS

O tônus simpático vascular foi avaliado através do bloqueio ganglionar (nicotínico) por hexametônio (30 mg/kg, Sigma) e calculado pela diferença entre os valores de pressão arterial pulsátil antes e depois da administração intravenosa da droga. Ao final dos experimentos, as respostas cardiovasculares foram comparadas entre animais dos grupos SHAM, SHAM+CM-G, 2R1C e 2R1C+CM-G.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m). As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando o $p < 0,05$. Foi utilizado o teste *Anova One Way* para análise entre diferentes grupos e as comparações estatísticas entre duas variáveis foram realizadas por meio da utilização do teste *t* de Student não pareado.

Nas curvas concentração-resposta, os valores de $E_{\text{máx}}$ (efeito máximo em porcentagem de relaxamento) foram obtidos por regressão não linear.

Os dados foram analisados e plotados no programa estatístico GraphPad Prism 5.0®.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM CM-G NA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA DE ANIMAIS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

Após um período de estabilização, os parâmetros cardiovasculares de ratos não anestesiados dos grupos SHAM+SALINA, SHAM+CM-G, 2R1C+SALINA e 2R1C+CM-G foram avaliados. De acordo com os traçados originais (Figura 13) e a média dos grupos (Gráficos 1 e 2), após a implantação do clipe de prata na artéria renal direita, os animais 2R1C+SALINA apresentaram PAM elevada se comparados aos animais SHAM+SALINA (171 ± 11 mmHg vs. 118 ± 4 mmHg, $p < 0,05$). O tratamento oral com CM-G por 14 dias promoveu redução da pressão arterial média em animais do grupo 2R1C+CM-G em relação ao grupo hipertenso que recebeu apenas com salina (126 ± 4 mmHg vs. 171 ± 11 mmHg; $p < 0,05$).

Não foi observada alteração na frequência cardíaca em nenhum dos grupos deste estudo.

Figura 13: Traçado original demonstrando a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) em um animal representativo de cada grupo.

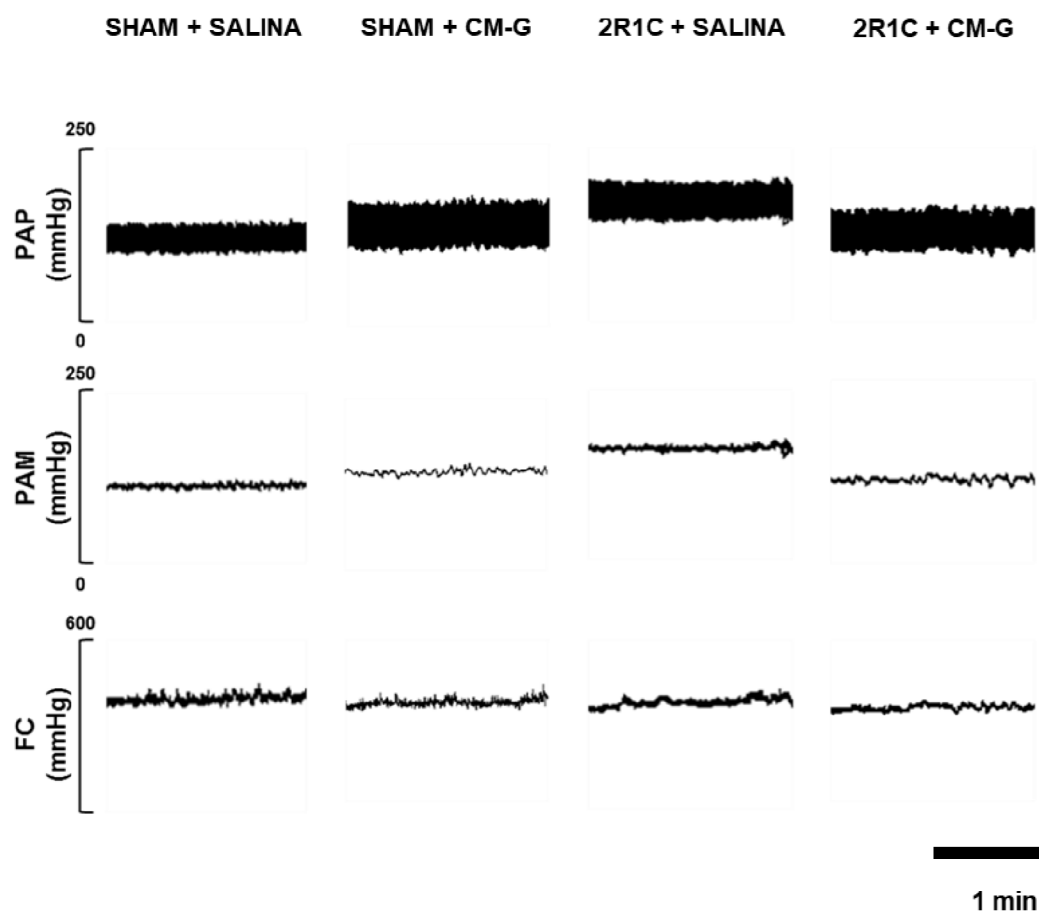


Gráfico 1 – Pressão arterial média basal dos grupos SHAM+SALINA, SHAM+CM-G, 2R1C+SALINA e 2R1C+CM-G. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ vs. SHAM+SALINA; # $p < 0,05$ vs. 2R1C+SALINA.

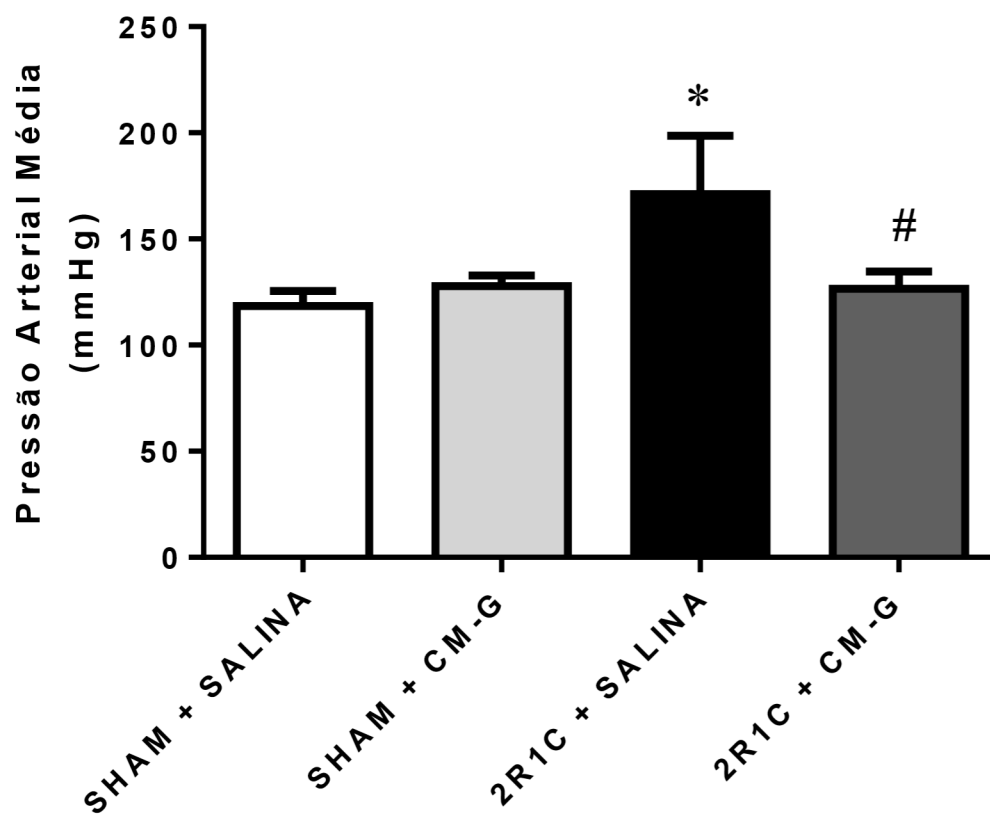
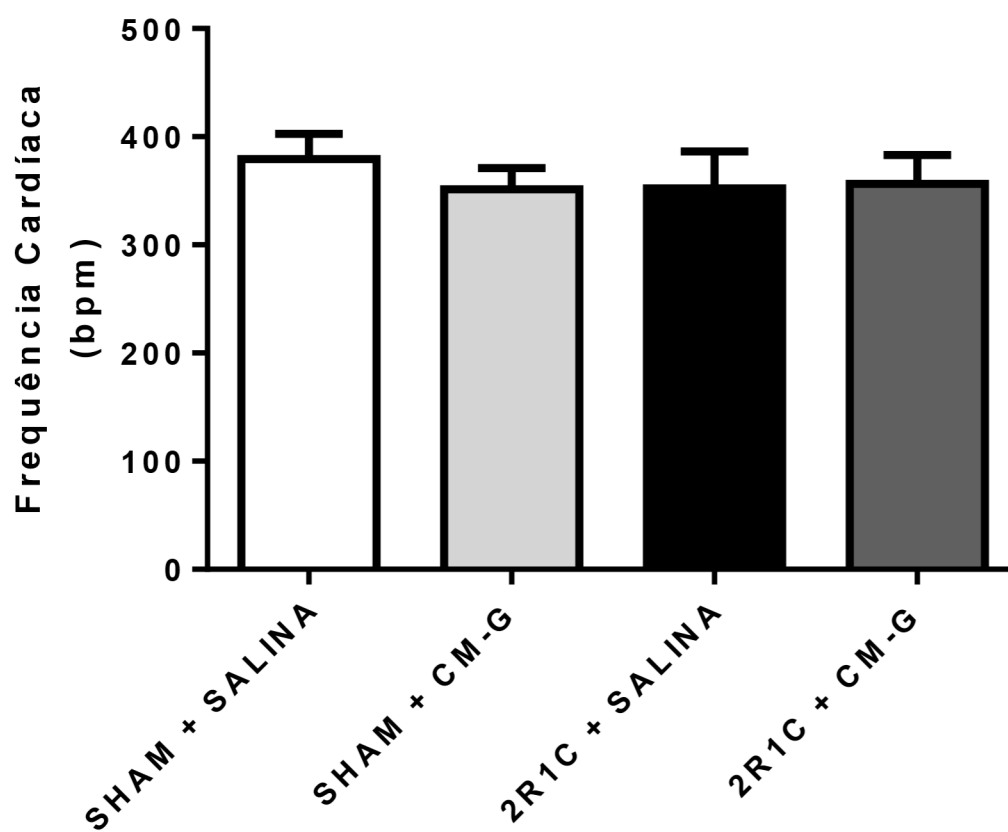


Gráfico 2 – Frequência cardíaca dos grupos SHAM+SALINA, SHAM+CM-G, 2R1C+SALINA e 2R1C+CM-G. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m.



4.2 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM CM-G NA SENSIBILIDADE DO BARORREFLEXO DE ANIMAIS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

De acordo com os dados traçados representativos (Figura 14) obtidos a partir da avaliação do índice de sensibilidade do barorreflexo (ganho) pelo método de Oxford modificado, também observados no Gráfico 3, o ganho do barorreflexo dos animais 2R1C+SALINA mostrou-se diminuído quando comparado aos animais SHAM+SALINA ($-1,30 \pm 0,10$ vs. $-2,59 \pm 0,17$ bpm.mmHg⁻¹).

A administração oral de CM-G por 14 dias restaurou o ganho do barorreflexo dos animais do grupo 2R1C+CM-G quando comparados aos animais 2R1C+SALINA ($-2,03 \pm 0,16$ bpm.mmHg⁻¹, vs. $-1,30 \pm 0,10$ bpm.mmHg⁻¹).

Figura 14 - Traçados representativos de um animal de cada grupo, ilustrando a variação da pressão arterial pulsátil (PAP), da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca após administração de fenilefrina (8µg/kg, i.v.) e nitroprussiato de sódio (25µg/kg, i.v.). Setas pretas representam a administração de fenilefrina; setas vazadas representam a administração de nitroprussiato de sódio.

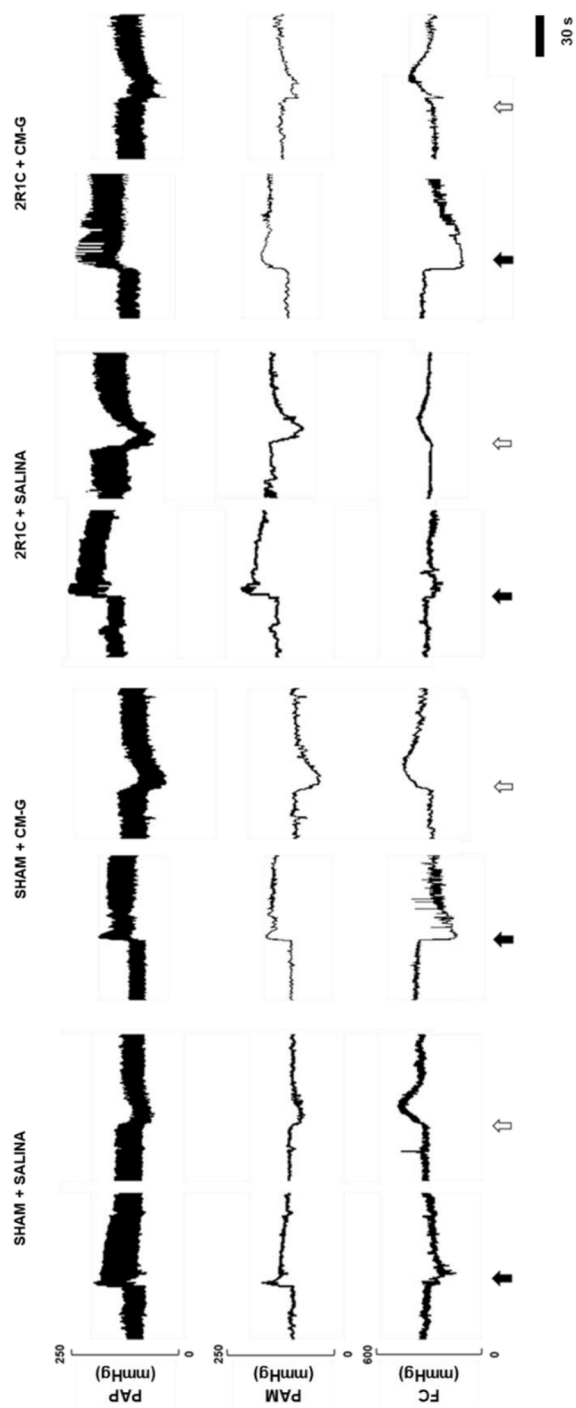
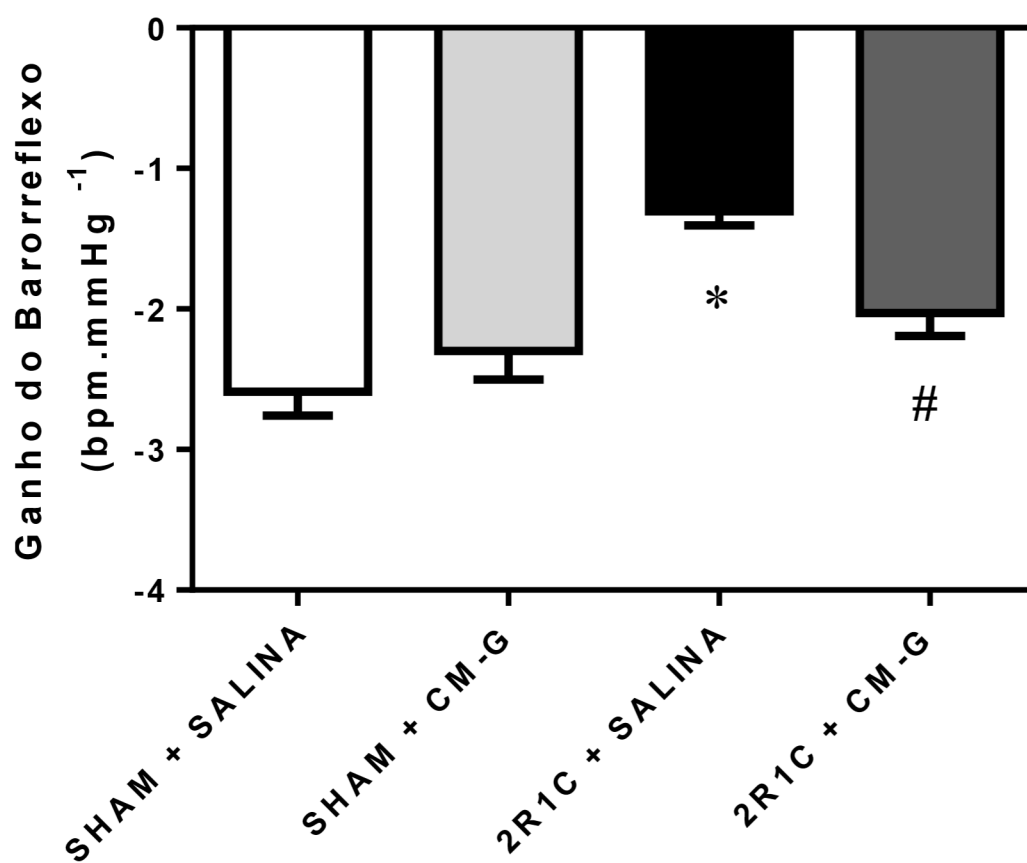


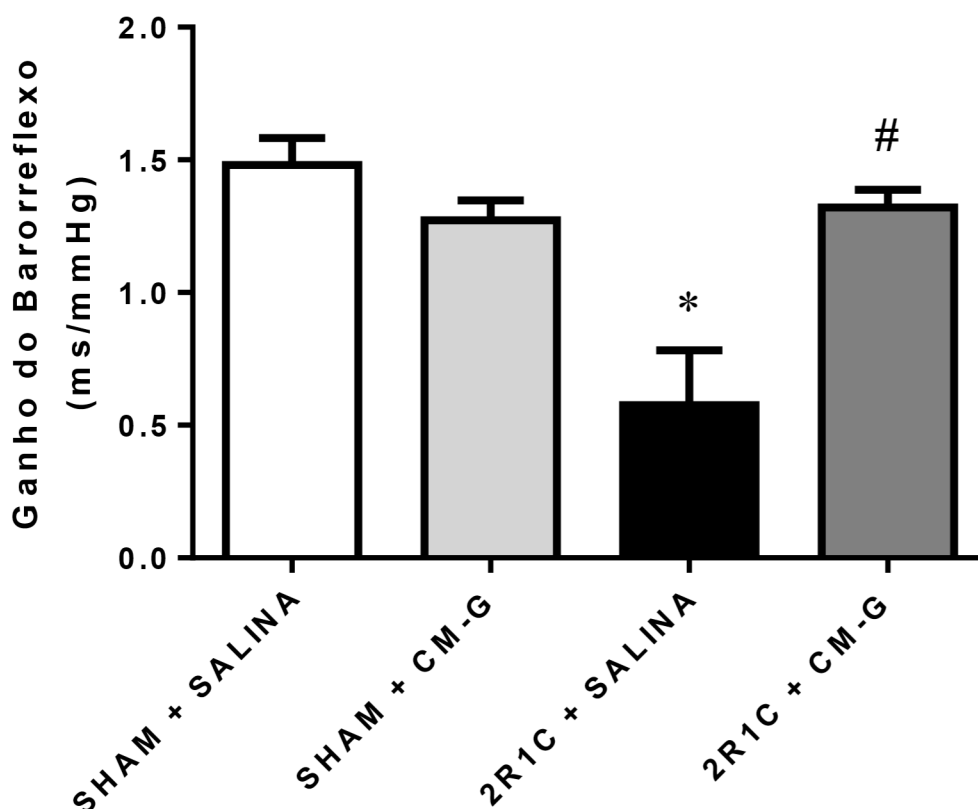
Gráfico 3 – Representação gráfica do ganho do barorreflexo de todos os grupos determinado pelo método de Oxford modificado. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ vs. SHAM+SALINA; # $p < 0,05$ vs. 2R1C+SALINA.



Resultado semelhante foi observado por meio da avaliação do ganho do barorreflexo pelo método da análise de sequência (Gráfico 4). Os valores do grupo 2R1C+SALINA foram menores se comparados ao grupo SHAM+SALINA ($0.58 \pm 0,08$ vs. $1.48 \pm 0,04$ ms/mmHg, respectivamente).

Assim como no resultado anterior, o tratamento oral com CM-G por 14 dias em animais com hipertensão renovascular restaurou a sensibilidade do barorreflexo espontâneo, se comparado aos resultados obtidos no grupo 2R1C que recebeu apenas salina ($1,32 \pm 0,03$ vs. $0.58 \pm 0,08$ ms/mmHg).

Gráfico 4 – Representação gráfica do ganho do barorreflexo de todos os grupos determinado pelo método de sequências. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m.. * $p < 0,05$ vs. SHAM+SALINA; # $p < 0,05$ vs. 2R1C+SALINA.



4.3 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM CM-G SOBRE O TÔNUS SIMPÁTICO DE ANIMAIS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

Os traçados representativos da figura 15 mostram variações de PAP e PAM após bloqueio ganglionar com hexametônio. No gráfico 5 é possível observar que a queda da pressão arterial em resposta ao hexametônio foi maior no grupo 2R1C+SALINA em relação ao grupo SHAM+SALINA (-60 ± 5 vs. -33 ± 2 Δ mmHg; $p < 0,05$).

O tratamento oral com CM-G por 14 dias reduziu a variação da PAM após bloqueio ganglionar com hexametônio em ratos com hipertensão renovascular se comparado ao grupo 2R1C que recebeu apenas salina (-35 ± 3 Δ mmHg vs. -60 ± 5 Δ mmHg; $p < 0,05$).

Figura 15 – Traçados representativos de um animal de cada grupo, ilustrando a variação da pressão arterial pulsátil (PAP) e pressão arterial média (PAM) após administração de hexametônio (30mg/kg, i.v.). As setas vazadas representam o momento da administração do hexametônio.

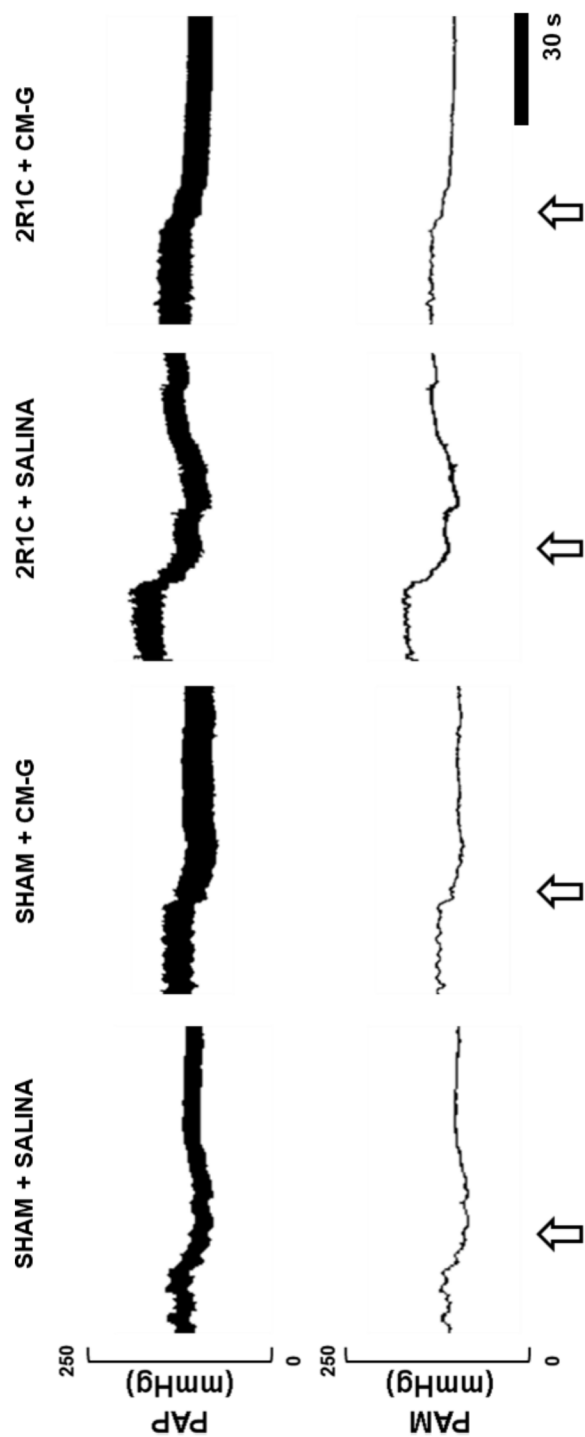
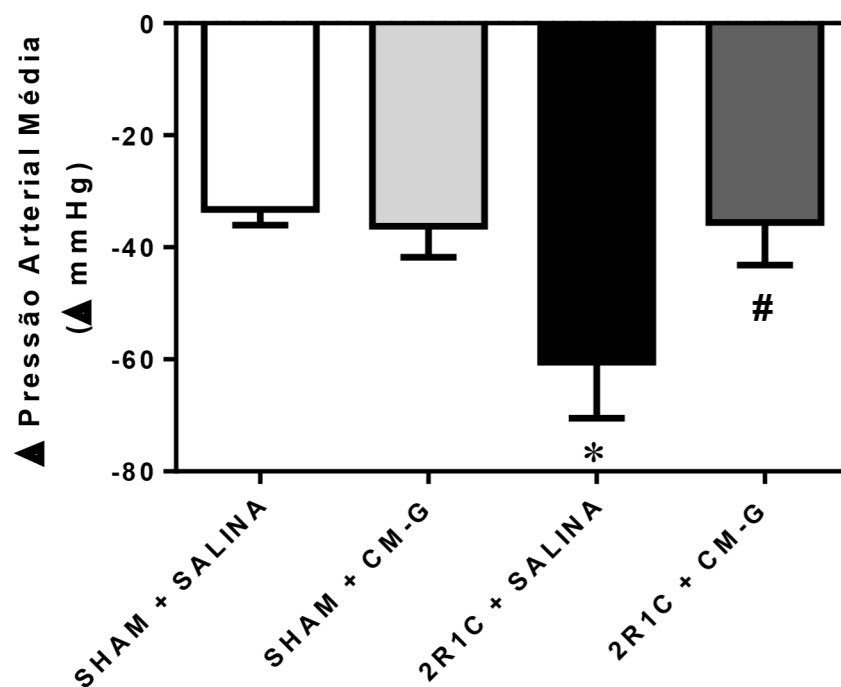


Gráfico 5 – Variação da pressão arterial média (Δ mm Hg) após administração intravenosa de hexametônio (30mg/kg) em animais dos grupos SHAM+SALINA, SHAM+CM-G, 2R1C+SALINA e 2R1C+CM-G. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p<0,05$ vs. SHAM+SALINA; # $p<0,05$ vs. 2R1C+SALINA.

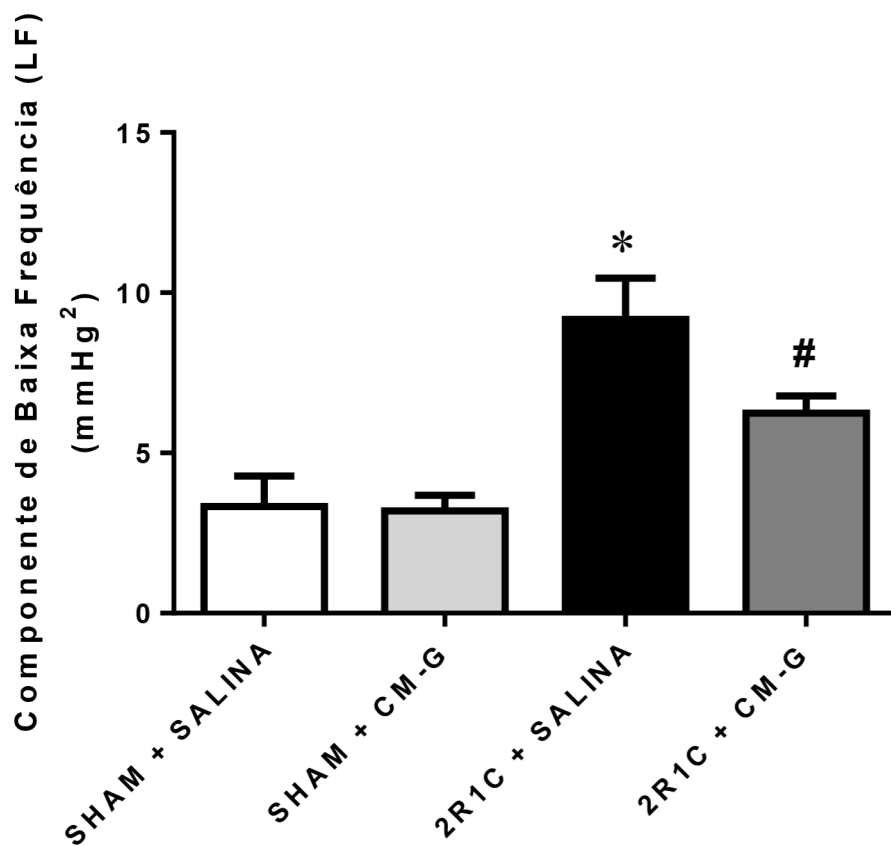


4.4 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM CM-G SOBRE O COMPONENTE DE BAIXA FREQUÊNCIA (LF) DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

Os dados mostraram que os animais do grupo 2R1C+SALINA apresentaram um aumento no componente de baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica, um índice que representa a modulação da atividade vasomotora simpática (DEBOER et al., 1987), quando comparados ao grupo SHAM+SALINA ($9.16 \pm 0,52 \text{ mmHg}^2$ vs. $3,32 \pm 0,38 \text{ mmHg}^2$; $p < 0,05$).

No grupo 2R1C+CM-G, os valores do LF apresentaram-se diminuídos quando comparados ao grupo 2R1C+SALINA ($6,23 \pm 0,46 \text{ mmHg}^2$ vs. $9.16 \pm 0,52 \text{ mmHg}^2$; $p < 0,05$) (Gráfico 6). Estes dados complementam os resultados que mostram a redução do tônus simpático, por meio do bloqueio ganglionar com hexametônio, em animais com hipertensão 2R1C tratados CM-G.

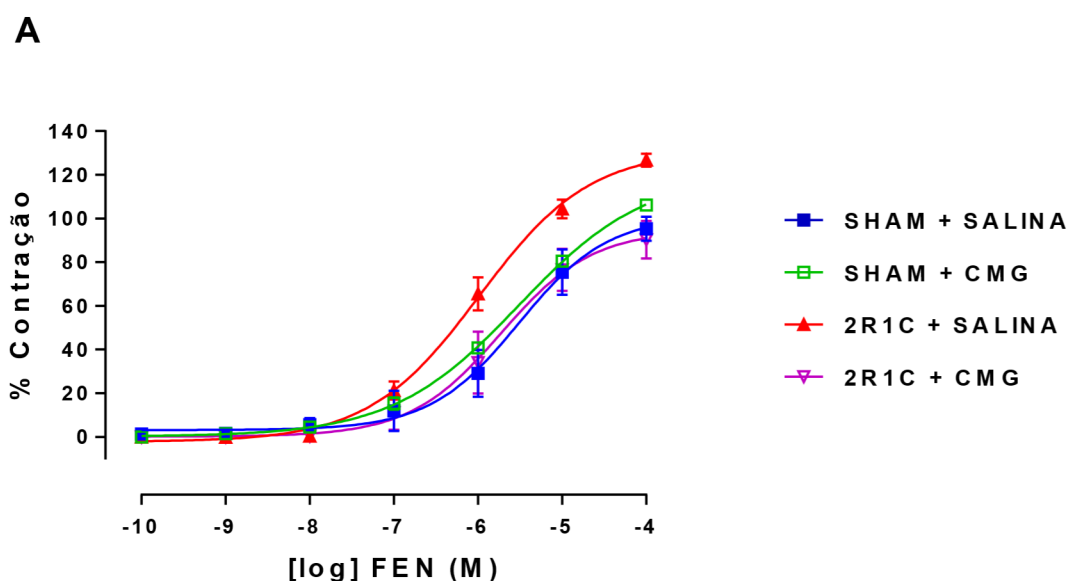
Gráfico 6 – Alterações no componente de baixa frequência (LF) da análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) em animais dos grupos SHAM+SALINA, SHAM+CM-G, 2R1C+SALINA e 2R1C+CM-G. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m.; * $p < 0,05$ vs. SHAM+SALINA; # $p < 0,05$ vs. 2R1C+SALINA.

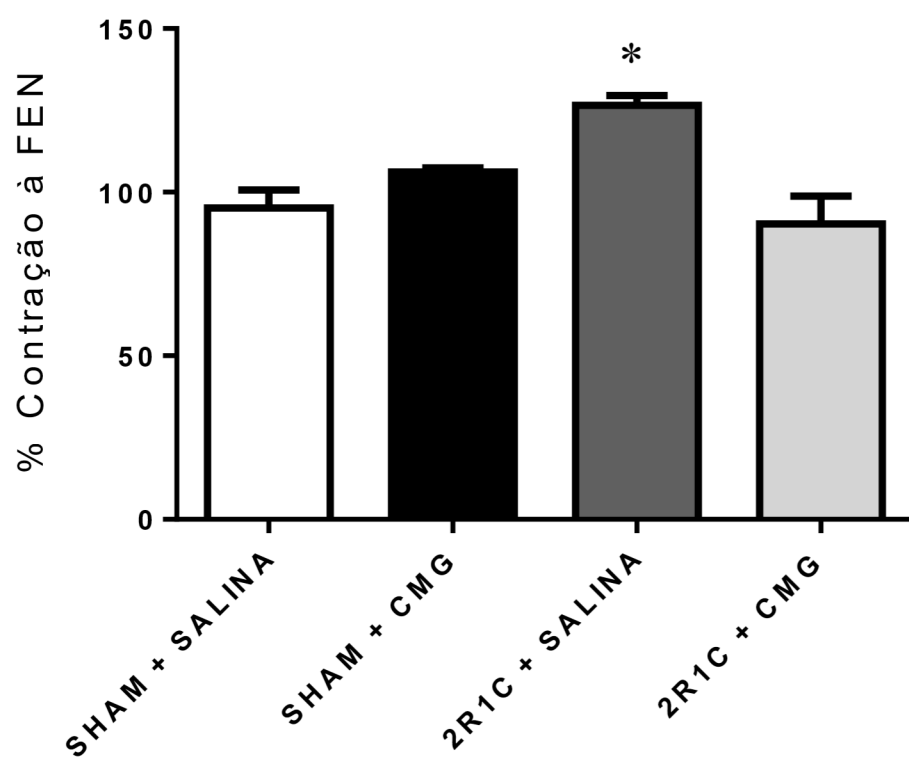


4.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM CM-G VIA ORAL NA REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

No gráfico 7A observa-se a curva de vasoconstrição induzida pela administração de concentrações cumulativas de FEN nos anéis mesentéricos isolados de ratos normotensos e hipertensos que receberam ou não a CM-G durante 14 dias por via oral. O grupo 2R1C+SALINA apresentou maior porcentagem de contração máxima quando comparado ao grupo SHAM+SALINA (Emáx: $126,6 \pm 2,9\%$ vs. $95,2 \pm 5,49\%$, respectivamente). O tratamento com CM-G reduziu o efeito contraturante máximo induzido pela FEN em animais hipertensos quando comparado ao 2R1C tratado apenas com salina (Emáx: $90,2 \pm 8,54$ vs. $126,6 \pm 2,9\%$) (Gráfico 7B).

Gráfico 7 – A. Curva de contração em resposta a administração de concentrações cumulativas de fenilefrina (FEN) em anéis mesentéricos de animais normotensos e hipertensos tratados ou não com carboximetilglucana (CM-G) durante 14 dias por via oral. B. Efeito máximo de contração promovido pela FEN em animais normotensos e hipertensos tratados e não tratados com CM-G. * $p < 0,05$ vs. SHAM+SALINA; # $p < 0,05$ vs. 2R1C+SALINA.

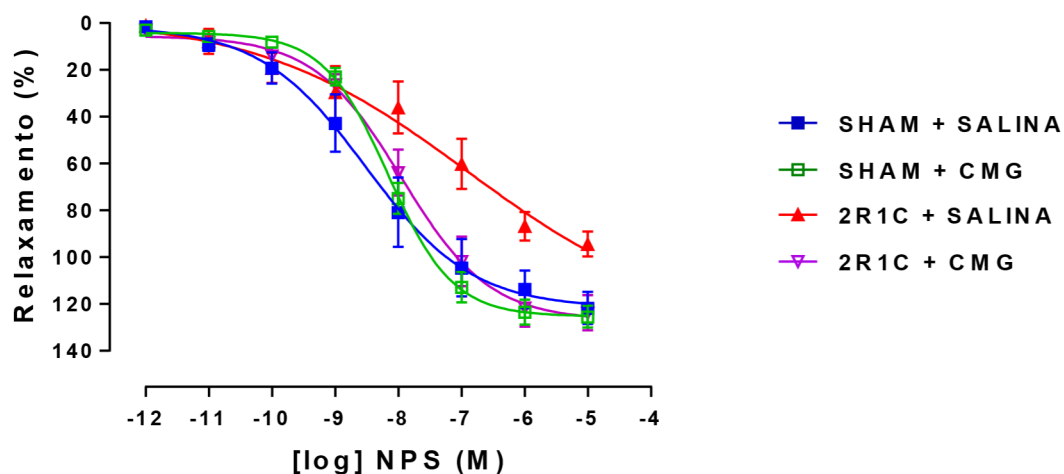


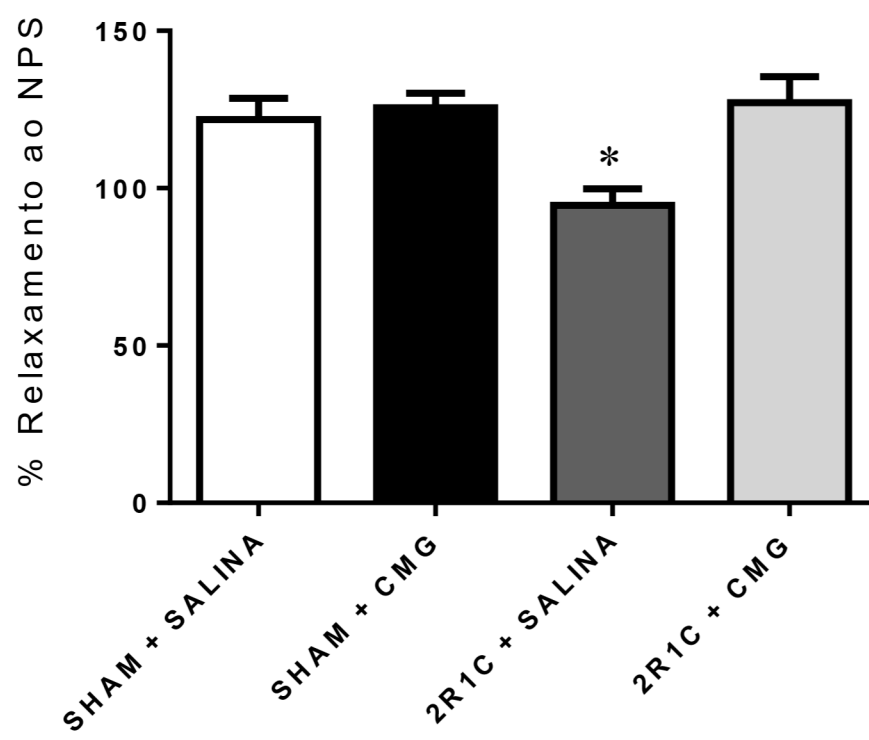
B

No gráfico 8A observa-se a curva de vasorrelaxamento induzida pelo NPS nos anéis mesentéricos isolados de ratos normotensos e hipertensos que receberam ou não a CM-G durante por 14 dias por via oral. O grupo 2R1C+SALINA apresentou redução no efeito máximo produzido pelo NPS quando comparado com o grupo SHAM+SALINA (Emáx: $94.3 \pm 5,34$ vs. $121,8 \pm 6,8\%$, respectivamente). O tratamento com CM-G melhorou o efeito máximo relaxante induzido pelo NPS em animais hipertensos quando comparados ao grupo 2R1C tratado apenas com salina (Emáx: $127,2 \pm 8,2$ vs. $94.3 \pm 5,34$) (Gráfico 8B).

Gráfico 8 – A. Curva de relaxamento em resposta a administração de concentrações cumulativas de nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis mesentéricos de animais normotensos e hipertensos tratados ou não com carboximetil-glucana (CM-G) durante 14 dias por via oral. B. Efeito máximo de relaxamento promovido pelo NPS em animais normotensos e hipertensos tratados e não tratados com CM-G. * $p < 0,05$ vs. SHAM+SALINA; # $p < 0,05$ vs. 2R1C+SALINA.

A

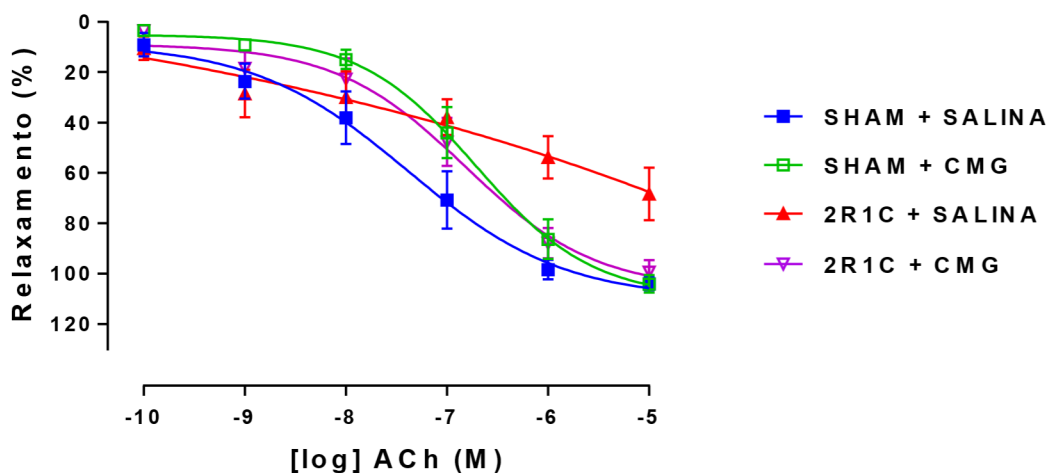


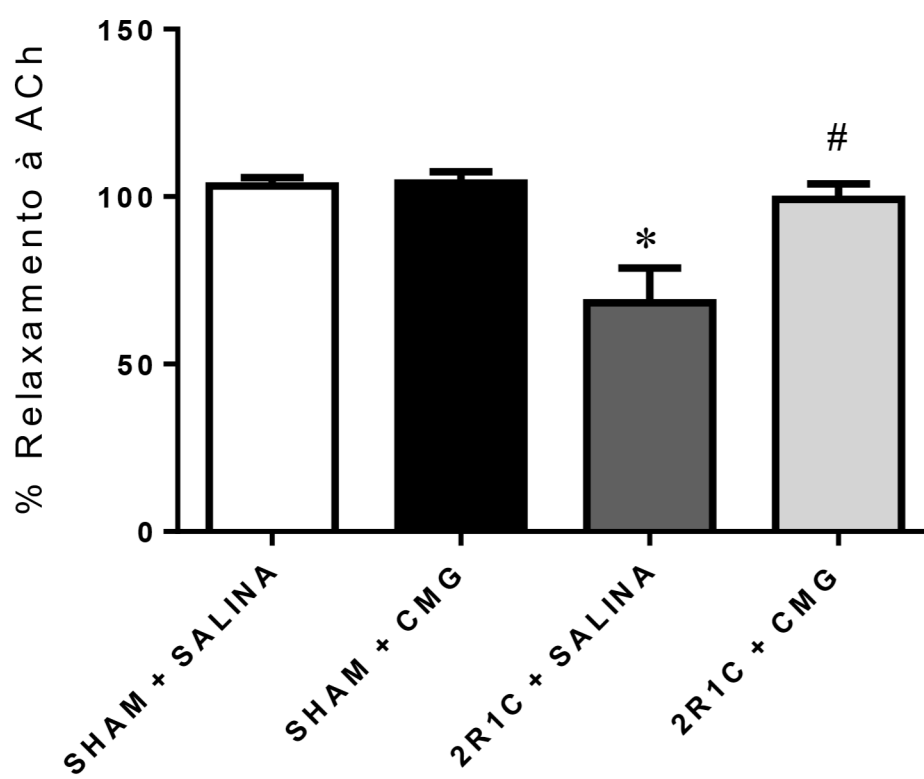
B

No Gráfico 9A observa-se que a curva de vasorrelaxamento produzida pela ACh em anéis de artéria mesentérica superior isolada dos animais normotensos e hipertensos tratados ou não com CM-G. O grupo 2R1C+SALINA apresentou prejuízo no perfil de relaxamento produzido pela ACh com efeito máximo reduzido quando comparado com o grupo SHAM+SALINA (Emáx: $68,3 \pm 10,44$ vs. $103,2 \pm 2,51\%$, respectivamente). Os anéis isolados de animais 2R1C tratados com CM-G apresentaram uma melhoria no perfil de relaxamento induzido pela ACh em animais 2R1C tratados quando comparados ao grupo 2R1C tratado apenas com salina (Emáx: $99,18 \pm 4,57$ vs. $68,3 \pm 10,44$) (Gráfico 9B).

Gráfico 9 - A. Curva de relaxamento em resposta a administração de concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em anéis mesentéricos de animais normotensos e hipertensos tratados ou não com carboximetil-glucana (CM-G) durante 14 dias por via oral. B. Efeito máximo de relaxamento promovido pela ACh em animais normotensos e hipertensos tratados e não tratados com CM-G.
* $p < 0,05$ vs. SHAM+SALINA; # $p < 0,05$ vs. 2R1C+SALINA.

A

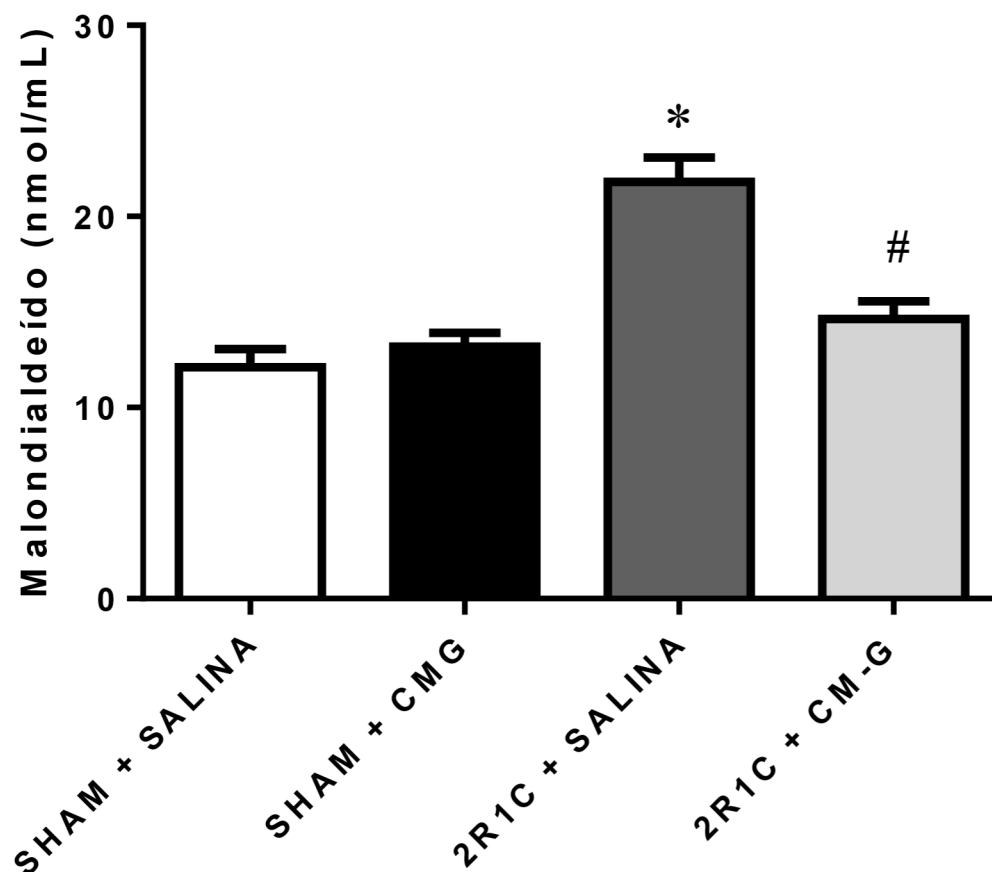


B

4.6. EFEITO DO TRATAMENTO COM CM-G VIA ORAL NO ESTRESSE OXIDATIVO SÉRICO DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

No ensaio de reação ao TBA, a concentração de MDA é utilizada como indicador do estresse oxidativo sistêmico. O MDA foi medido de amostras de soro obtidos do sangue dos animais utilizados neste trabalho. Como observado no Gráfico 4, o grupo 2R1C+SALINA apresentou maiores concentrações de MDA quando comparado ao SHAM+SALINA ($21,82 \pm 1,27$ vs. $12,12 \pm 0,95$ nmol/mL, $p < 0,05$), sugerindo um maior estresse oxidativo sérico na hipertensão renovascular. O tratamento oral durante 14 dias com CM-G foi capaz de causar redução nas concentrações de MDA nos animais hipertensos quando comparado ao grupo 2R1C tratado apenas com salina ($14,62 \pm 0,93$ vs. $21,82 \pm 1,27$ nmol/mL, $p < 0,05$).

Gráfico 10 - Estresse oxidativo sérico em animais normotensos e hipertensos tratados ou não com carboximetil-glucana (CM-G) durante 14 dias por via oral. * $p < 0,05$ vs. SHAM+SALINA; # $p < 0,05$ vs. 2R1C+SALINA.



Discussão

5. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou, de forma inédita, que o tratamento oral com CM-G por 14 dias foi capaz de reduzir a pressão arterial e melhorar a sensibilidade do barorreflexo de animais com hipertensão renovascular, benefícios esses que parecem estar relacionados com a redução do tônus simpático. Além do mais, este mesmo tratamento reduziu a reatividade vascular e os níveis séricos de malondialdeído, um importante biomarcador utilizado na avaliação do estresse oxidativo, em animais hipertensos.

O modelo de hipertensão renovascular 2R1C descrito por Goldblatt e adaptada por Shaffenburg para animais de pequeno porte é um modelo amplamente estabelecido e empregado no estudo da estenose da artéria renal e da hipertensão renovascular (GOLDBLATT et al., 1934; SCHAFFENBURG, 1959). Esse modelo fornece um método clínico relevante e reprodutível de hipertensão sistêmica, exibindo respostas fisiológicas no qual o rim submetido ao processo estenótico parcial forçado, pela implantação do clipe de prata, apresenta uma atrofia progressiva, enquanto o outro rim aumenta de tamanho (GUAN et al., 1992; CHENG et al., 2009; SANTUZZI et al., 2015). Assim como na doença renovascular, o modelo 2R1C promove uma elevação da atividade do sistema SRAA, na qual a cascata de eventos começa com aumento da secreção de renina a partir do rim clipado levando ao aumento da angiotensina II circulante (PLOTH, 1983; NAVAR et al., 1998; OLIVEIRA-SALES et al., 2016).

Nossos resultados mostraram que seis semanas após a cirurgia para o implante dos cliques de prata houve um aumento da pressão arterial média nos animais hipertensos (submetidos à indução da hipertensão 2R1C) quando comparado aos animais normotensos (Figura 13; Gráfico 1). Assim como outros estudos, que mostraram a redução da pressão arterial em animais hipertensos frente a um tratamento antioxidante de forma aguda (COSTA et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2012; MENGAL et al., 2016), o presente trabalho sugeriu que o tratamento com CM-G pode ser eficaz na redução da PA na hipertensão renovascular. Este achado é particularmente relevante, já que parte dos estudos que utilizam terapia antioxidante na hipertensão encontrados na literatura,

mostram redução na PA apenas após três ou quatro semanas de tratamento ininterrupto (ALVES et al., 2015; QUEIROZ et al., 2012).

Um dos principais mecanismos que envolvem o controle e a manutenção da pressão arterial é o barorreflexo (GRASSI et al., 1998). Os barorreceptores, localizados no arco aórtico e no seio carotídeo, detectam mudanças na pressão arterial, levando a ajustes autonômicos (MALPAS et al., 1997; KANBAR et al., 2007; SALGADO et al., 2007). Na hipertensão, a sensibilidade do barorreflexo encontra-se alterada, impedindo esse controle refinado na pressão arterial a nível autonômico (GAO et al., 2002; NAGAI et al., 2003; MARTINKA et al., 2005). O modelo experimental de hipertensão 2R1C tem como uma de suas características o aumento do estresse oxidativo, disfunção autonômica e redução na sensibilidade do barorreflexo (HEITZER et al. 1999). Nosso estudo mostrou que o tratamento com CM-G restaurou a sensibilidade do barorreflexo em animais com hipertensão renovascular (Figura 14; Gráfico 3; Gráfico 4). Apesar de não haver mecanismo de ação claro para justificar este resultado, considerando a eficácia de terapias antioxidantes na melhoria da sensibilidade do barorreflexo em modelos de hipertensão dependentes de Ang II (BOTELHO-ONO et al., 2011; QUEIROZ et al., 2012; MENDES-JUNIOR et al., 2013; ALVES et al., 2015), é pertinente sugerir que nosso resultado tenha sido obtido pelo efeito antioxidante do tratamento oral com CM-G. Não foi observado efeito na sensibilidade do barorreflexo de animais normotensos, corroborando com dados de outros estudos com terapia antioxidante (LI et al., 1996; PICKERING et al., 2008). Este resultado sugere que o uso de antioxidantes na ausência de estresse oxidativo pode não ter influência na sensibilidade do barorreflexo.

No SNC, as espécies reativas de oxigênio possuem um importante papel na modulação da atividade simpática e na PA de animais hipertensos, sugerindo que o estresse oxidativo pode contribuir na neuropatogênese da hipertensão (MALPAS, 2010; CHAN & CHAN, 2014). Em 1983, Faber & Brody já relatavam aumento do tônus simpático no modelo de hipertensão 2R1C; outros estudos mostram elevação de receptores adrenérgicos na vasculatura entre a 4^a e 6^a semana após implantação do clipe de prata (MCELROY; ZIMMERMAN.1989; NAKADA et al., 1996). Neste estudo, o tratamento com CM-G resultou na

diminuição do tônus simpático de animais com hipertensão renovascular (Figura 15; Gráfico 5). No entanto, estudos complementares se fazem necessários para avaliar se a redução da hiperatividade simpática se dá por consequência da melhoria da sensibilidade do barorreflexo ou se o tratamento com CM-G pode atuar como terapia antioxidante diretamente na rede neuronal envolvida no controle simpático (HUBER & SCHREIHOFFER, 2010).

No intuito de explorar esta redução do tônus simpático em animais tratados com CM-G, avaliamos o componente de baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica por meio da análise espectral, um índice amplamente aceito na avaliação da modulação simpática da pressão arterial (INOUE et al., 1991). Os animais 2R1C apresentaram aumento do componente LF quando comparados ao grupo SHAM (Gráfico 6). Estes dados são semelhantes aos achados de Oliveira-Sales e colaboradores (2014), que relatam um aumento considerável de LF por volta da quarta semana após implantação do clipe de prata, indicando elevada atividade simpática vasomotora. Assim como na avaliação do tônus simpático utilizando protocolo com hexametônio, sob as mesmas condições experimentais, a análise espectral sugeriu que o tratamento com CM-G reduz a atividade simpática em animais com hipertensão renovascular.

O aumento na atividade simpática está intimamente relacionado a mudanças na reatividade vascular, o que contribui para a progressão da hipertensão. O aumento na pressão arterial, desencadeado pelo aumento da produção e liberação de Ang II local no SNC, pode levar, entre outros efeitos, ao aumento da resistência vascular periférica (ALLEN et al., 2000; HUBER et al., 2017; CARVALHO-GALVÃO et al., 2018). Nas células do músculo liso vascular, a Ang II induz ativação da NADPH oxidase, elevando os níveis e espécies reativas de O_2 , em particular do ânion superóxido, que, em excesso, pode aumentar a concentração intracelular de Ca^{2+} e, conseqüentemente, os eventos contráteis no músculo liso vascular (TOUYZ et al., 2003).

No presente estudo, a reatividade vascular de animais com hipertensão renovascular 2R1C mostrou-se alterada, corroborando com estudos prévios (CASTRO et al., 2012; MENDES-JUNIOR et al., 2013). Na curva dose-resposta

à FEN, um agonista do receptor $\alpha 1$ adrenérgico, nossos resultados mostraram que a capacidade de contração se encontra aumentada em ratos hipertensos (Gráfico 7A e 7B). O aumento da reatividade vascular à fenilefrina pode ser atribuído ao remodelamento vascular, característico da hipertensão, levando a uma redução do fator relaxante do endotélio e do NO, além de uma expressão aumentada de proteínas e receptores relacionados à contração no músculo liso (INTENGAN & SCHIFFRIN, 2001; MULVANY, 2008). Neste estudo, o tratamento com CM-G durante 14 dias normalizou a contração induzida por FEN em animais com hipertensão. Apesar do mecanismo pelo qual a CM-G induz a normalização da reatividade vascular a este agente constritor ainda ser desconhecido, este resultado pode estar associado à redução do estresse oxidativo causado pela glucana, aumentando a biodisponibilidade do NO e do fator relaxante do endotélio.

A fim de avaliar a capacidade de relaxamento em resposta ao NO, sem a interferência de NO endógeno, realizamos uma curva dose-resposta com nitroprussiato de sódio, um clássico doador de óxido nítrico, em anéis de artéria mesentérica sem endotélio de ratos. Nestas condições, observamos uma redução na capacidade vasorrelaxante de animais hipertensos em resposta ao NO. No entanto, o tratamento oral com CM-G restaurou a capacidade de vasorelaxamento em animais 2R1C (Gráfico 8A e 8B).

Diversos estudos mostram que a alteração da reatividade vascular durante a hipertensão renovascular acontece principalmente pela diminuição da biodisponibilidade de NO, o que pode ser observado na atenuação do vasorrelaxamento induzido pela administração de ACh, um agonista do receptor muscarínico para acetilcolina (ARRUDA et al. 2005; OLIVEIRA et al 2009; STANKEVICIUS et al. 2002). Neste estudo, foi observada esta atenuação do vasorrelaxamento no grupo hipertenso sem tratamento quando realizada uma curva dose-resposta para ACh em anéis de artéria mesentérica com endotélio de ratos, demonstrando comprometimento do endotélio durante a hipertensão renovascular, podendo estar relacionado ao aumento do estresse oxidativo dependente de Ang II (Gráfico 9A e 9B). O mecanismo pelo qual o tratamento com CM-G restaura o vasorrelaxamento induzido por ACh também pode estar

relacionado ao seu efeito antioxidativo, reduzindo as espécies reativas de oxigênio.

Ao longo dos últimos anos, estudos mostram que polissacarídeos com origem a partir de leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae* possui grande capacidade de redução de radicais livres, sendo extensamente explorada como potencial antioxidante (XU et al., 2009; WANG et al., 2014). A peroxidação lipídica mediada por EROs tem sido relacionada à fisiopatologia de várias doenças. O malondialdeído é um produto da peroxidação lipídica, sendo amplamente utilizado como uma medida de produção de radicais livres e, portanto, obtendo-se dessa forma uma espécie de índice de peroxidação. Os resultados deste estudo mostraram um aumento na concentração de MDA no plasma de animais hipertensos não tratados (Gráfico 10), corroborando com dados semelhantes que comprovam o aumento e a influência das EROs neste modelo, provavelmente em decorrência da ativação do eixo renina-angiotensina-aldosterona (MENDES-JUNIOR et al., 2013; GOMÉZ & VELARDE, 2018).

Nosso estudo demonstrou, de forma inédita, que o tratamento oral com CM-G em animais com hipertensão renovascular foi capaz de reduzir o estresse oxidativo sérico, quando comparado aos animais hipertensos não tratados (Gráfico 10). Experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram ao longo dos últimos anos os efeitos benéficos promovidos pela administração das mais diversas moléculas com potencial antioxidante em ratos hipertensos, levando à redução da pressão arterial e melhoria na sensibilidade do barorreflexo, resultados esses também observados no presente estudo (BOTELHO-ONO et al, 2011; GUIMARÃES et al, 2012; MENDES-JUNIOR et al, 2013).

Acredita-se que derivados solúveis de β -glucanas, incluindo a CM-G, administrados oralmente, são absorvidos através das paredes do trato gastrointestinal, alcançando a circulação sistêmica e exercendo seus efeitos antioxidantes (RICE et al., 2005; ARAÚJO et. al., 2015; VETVICKA et al., 2015). Em relação a este efeito antioxidante, a carboximetilação da β -glucana, que gera a CM-G, substitui grupos hidroxila da molécula original, potencializando seus

efeitos, fazendo com que grupos carboximetila sejam capazes de doar muito mais elétrons em comparação ao grupo hidroxila, causando redução das EROs (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984; RICE et al., 2005).

Resumidamente, nossos dados mostram que o tratamento oral agudo com CM-G reduziu a pressão arterial e restaurou a sensibilidade do barorreflexo via redução do tônus simpático, além de normalizar a reatividade vascular em reduzir o estresse oxidativo em animais com hipertensão experimental 2R1C. De fato, o sítio de ação pelo qual a terapia com CM-G produz seus efeitos a fim de melhorar a hipertensão permanecem desconhecidos. No entanto, identificamos um novo composto com atividades moduladoras e antioxidantes inéditas e sua relação com a hipertensão renovascular dependente de Ang II.

Referências

6. REFERÊNCIAS

- AARSAETHER, E., STRAUMBOTN, E., RÖSNER, A., BUSUND, R. Oral β -glucan reduces infarction size and improves regional contractile function in a porcine ischaemia/reperfusion model. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**. 41(4), 919-925. 2012.
- AHMAD, K.A., YUAN YUAN, D., NAWAZ, W., ZE, H., ZHUO, C.X., TALAL, B., TALEB, A., MAIS, A., QILONG, D. Antioxidant therapy for management of oxidative stress induced hypertension. **Free Radical Research**, 51(4), p. 428-438, 2017.
- ALLEN, A.M., ZHUO, J. AND MENDELSON, F.A. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. **American Journal of Hypertension**. 13, 31S–38S. 2000.
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, 219(6), p. 1698–1705, 1970.
- ALVES, N. F., PORPINO, S. K., MONTEIRO, M. M., GOMES, E. R., AND BRAGA, V. A. Coconut oil supplementation and physical exercise improves baroreflex sensitivity and oxidative stress in hypertensive rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**. 40, 393–400. 2015.
- ARAUJO, V. B., DE MELO, A. N., DE SOUZA, N. T., DA SILVA, V. M., CASTRO-GOMEZ, R. H. SILVA, A. S., et al. Oral intake of Carboxymethyl-Glucan (CM-G) from yeast (*Saccharomyces uvarum*) reduces malondialdehyde levels in healthy men. **Molecules**. 20, 14950–14958. 2015.
- ARRUDA, R.M., PEOTTA, V.A., MEYRELLES, S.S., AND VASQUEZ, E.C. Evaluation of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin dependent renovascular hypertension. **Hypertension**, 46(4): 932–936. 2005.

BABINCOVA, M., BACOVA, Z., MACHOVA, E., KOGAN, G. Antioxidant properties of carboxymethyl glucan: comparative analysis. **J. Med. Food.** 5, 79–83. 2002.

BARROSO, W. K. S. et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial - 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** 116 (3), 516-658. 2021.

BERNARDI, L., PORTA, C., GABUTTI, A., SPICUZZA, L., SLEIGHT, P. Modulatory effects of respiration. **Autonomic Neuroscience.** 90, p.47-56. 2011.

BEZERRA, L. S., MAGNANI, M., CASTRO-GOMEZ, R. J. H., CAVALCANTE, H. C., SILVA, T. A. F., VIEIRA, R. L. P., MEDEIROS, I. A., VERAS, R. C. Modulation of vascular function and anti-aggregation effect induced by (1 → 3) (1 → 6)-β-D-glucan of *Saccharomyces cerevisiae* and its carboxymethylated derivative in rats. **Pharmacological Reports.** 69(3), 448-455. 2017.

BOTELHO-ONO, M.S., PINA, H.V., SOUSA, K.H.F., NUNES, F.C., MEDEIROS, I.A., BRAGA, V.A. Acute superoxide scavenging restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical,** 159, p.38-44. 2011.

BOUTARI, C., GEORGIANOU, E., SACHINIDIS, A., KATSIMARDOU, A., CHRISTOU, K., PIPERIDOU, A., KARAGIANNIS, A. Renovascular Hypertension: Novel Insights. **Current Hypertension Reviews,** 16, p.24-29. 2020.

BRAGA, V.A., BURMEISTER, M.A., SHARMA, R.V., DAVISSON, R.L. Cardiovascular responses to peripheral chemoreflex activation and comparison of different methods to evaluate baroreflex gain in conscious mice using telemetry. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology,** 295(4), p. R1168-1174. 2008.

BRAGA, V.A. Dietary salt enhances angiotensin-II-induced superoxide formation in the rostral ventrolateral medulla. **Autonomic Neuroscience,** 155(1-2), p.14-8. 2010.

BRAGA, V.A., MEDEIROS, I.A., RIBEIRO, T.P., FRANÇA-SILVA, M.S., BOTELHO-ONO, M.S., GUIMARÃES, D.D. Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: implications in neurogenic hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 44, p. 871-876. 2011.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. **Immunity**. 19(3), 311-315. 2003.

BURZTYN, M., FLYYBJERG, A., WEISS, O., MEKLER, J., RAZ, I. Atrophy or hypertrophy in chronic renal ischemia: role of the IGF-I system, **American Journal of Hypertension**. 14, p. 1211-1218. 2001.

BÜSCHER, R.; HERRMANN, V.; RING, K. M.; KAILASAM, M. T.; O'CONNOR, D. T.; PARMER, R. J.; INSEL, P. a. Variability in phenylephrine response and essential hypertension: a search for human $\alpha(1B)$ -adrenergic receptor polymorphisms. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, 291(2), p. 793–8, 1999.

BYLUND, D.B. Subtypes of α 1- and α 2-adrenergic receptors. **The FASEB Journal**, 6(3), p. 832–839, 1992.

CAIN, A. E.; KHALIL, R. A. Pathophysiology of essential hypertension: role of the pump, the vessel, and the kidney. **Send to Semin Nephrol.**, v. 22, p. 3–16, 2002.

CARVALHO-GALVAO, A., OGUNLADE, B., XU, J. SILVA-ALVES, C.R.A., MENDES-JUNIOR, L.G., GUIMARAES, D.D., CRUZ, J.C., QUEIROZ, T.M., BALARINI, C.M., BRAGA, V.A., FILIPEANU, C.M., LAZARTIGUES, E., FRANCA-SILVA, M.S. Central administration of TRV027 improves baroreflex sensitivity and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. **Clinical Science**. 132, p. 1513–1527. 2018.

CASTRO, M.M., RIZZI, E., CERON, C.S., GUIMARAES, D.A., RODRIGUES, G.J., BENDHACK, L.M. Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. **Nitric Oxide**, 26(3): 162–168. 2012.

CAVALVANTI, C.O., ALVES, R.R., OLIVEIRA, A.L., CRUZ, J.C., FRANÇASILVA, M.S., BRAGA, V.A., BALARINI, C.M. Inhibition of PDE5 Restores Depressed Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats. **Frontiers in Physiology**, 7:15. 2016.

CHAN, G., CHAN, W. K., SZE, D. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*. 10, 2-25. 2009.

CHAN, S. H., CHAN, J. Y. Brain stem NOS and ROS in neural mechanisms of hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**. 20, 146–163. 2014.

CHANG, X., ZHANG, T., ZHANG, W., ZHAO, Z., SUN, J. Natural Drugs as a Treatment Strategy for Cardiovascular Disease through the Regulation of Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2020.

CHARKOUDIAN, N., WALLIN, B.G. Sympathetic neural activity to the cardiovascular system: integrator of systemic physiology and interindividual characteristics. **Comprehensive Physiology**, 4(2), p.825-850. 2014.

CHEN, S., CHEN, H., TIAN, J., WANG, Y., XING, L., WANG, J. Chemical modification, antioxidant and -amylase inhibitory activities of corn silk polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**. 98, 428-437. 2013.

CHENG, J.; ZHOU, W.; WARNER, G. M.; KNUDSEN, B. E.; GAROVIC, V. D.; GRAY, C. E.; LERMAN, L. O.; PLATT, J. L.; ROMERO, J. C.; TEXTOR, S. C.; NATH, K. A.; GRANDE, J. P.; CE, G.; LO, L.; JL, P.; JC, R.; SC, T. Temporal analysis of signaling pathways activated in a murine model of two-kidney , one-clip hypertension. **American journal of physiology**. 2009.

CLOETENS, L., ULMIOUS, M., JOHANSSON-PERSSON, A., AKESSON, B., ONNING, G. Role of dietary beta-glucans in the prevention of the metabolic syndrome. **Nutrition Reviews**. 70(8), 444-458. 2012.

COSTA, C. A., AMARAL, T. A., CARVALHO, L. C., OGNIBENE, D. T., DA SILVA, A. F., MOSS, M. B. Antioxidant treatment with tempol and apocynin prevents endothelial dysfunction and development of renovascular hypertension. **American Journal of Hypertension**. 22, 1242–1249. 2009.

DEBOER, R.W., KAREMAKER, J.M., STRACKEE, J. Hemodynamic fluctuations and baroreflex sensitivity in humans: a beat-to-beat model. **American Journal of Physiology**. 253, H680-689. 1987.

DUKE-NOVAKOVSKI, T.; CARR, A. Perioperative Blood Pressure Control and Management Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice, 2015.

ETTEHAD, D. et al. Blood pressure lowering for the prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 387, n. 10022, p.957-967. 2016.

FABER, J.E., BRODY, M.J. Neural contribution to renal hypertension following acute renal artery stenosis in conscious rats. **Hypertension**, 5, p. 155-164. 1983.

FERRARIO, C.M. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. **Journal of the ReninAngiotensin-Aldosterone System**, 7(1),p.3-14. 2006.

FIGUEIREDO, D., AZEVEDO, A., PEREIRA, M.,DE BARROS, H. Definition of hypertension: the impact of number of visits for blood pressure measurement. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, 28(7-8), p.775 – 783. 2009.

FINK, G.D. Long-term sympatho-excitatory effect of angiotensin II: a mechanism of spontaneous and renovascular hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. 24(1), p.91-95. 1997.

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

GAO, S. A., JOHANSSON, M., RUNDQVIST, B., LAMBERT, G., JENSEN, G., AND FRIBERG, P. Reduced spontaneous baroreceptor sensitivity in patients with renovascular hypertension. **Journal of Hypertension**. 20, 111–116. 2002.

GIAVASIS, I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**. 26, 162-173. 2014.

GOLDBLATT, H., LYNCH, J., HANZAL, R.F., SUMMERVILLE, W.W. The Production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **The Journal of Experimental Medicine**. 59 (3), p 347-379. 1934.

GÓMEZ, G., VELARDE, V. Boldine Improves Kidney Damage in the Goldblatt 2K1C Model Avoiding the Increase in TGF- β . **International Journal of Molecular Sciences**. 19(7), 1864. 2018.

GRASSI, G.; CATTANEO, B.M.; SERAVALLE, G.; LANFRANCHI, A.; MANCIA, G. Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. **Hypertension**, 31, p. 68-72. 1998.

GUAN, S.; FOX, J.; MITCHELL, K. D.; NAVAR, L. G. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. **Hypertension**, 1992.

GUIMARÃES, D.D., CARVALHO, C.C., BRAGA,V.A. Scavenging of NADPH oxidase-derived superoxide anions improves depressed baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 39 (4): 373-378. 2012.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **The Biochemical Journal**. 219(1), 1-14. 1984.

HEITZER, T., WENZEL, U., HINK, U., KROLLNER, D., SKATCHKOV, M., STAHL, R. A. Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. **Kidney International**. 55, 252–260. 1999.

HERRMANN, S.M., TEXTOR, S.C. Current Concepts in the Treatment of Renovascular. **American Journal of Hypertension**, 31(2), p.139-149. 2018.

HUBER, D. A., AND SCHREIHOFFER, A. M. Attenuated baroreflex control of sympathetic nerve activity in obese Zucker rats by central mechanisms. **Journal of Physiology**. 588(Pt 9), 1515–1525, 2010.

HUBER, G., SCHUSTER, F. AND RAASCH, W. Brain renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiovascular diseases. **Pharmacological Research**. 125, 72–90. 2017.

INCALZA, M.A., D'ORIA, R. NATALICCHIO, A., PERRINI, S., LAVIOLA, L., GIORGINO, F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, 100, p.1-19. 2017.

INOUE, K., MIYAKE, S., KUMASHIRO, M., OGATA, H., UETA, T., AND AKATSU, T. Power spectral analysis of blood pressure variability in traumatic quadriplegic humans **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**. *Physiol.* 260, H842–H847. 1991

INTENGAN, H.D., AND SCHIFFRIN, E.L. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. **Hypertension**, 38(3 Pt 2): 581–587. 2001.

JAMAS, S.; EASSON, D. D.; OSTROFF, G. R. Glucan preparation. US Patent 5622939. 1997.

KAGIMURA, F. Y., CUNHA, M. A. A., BARBOSA, A. M., DEKKER, R. F. H., MALFATTI, C. R. M. Biological activities of derivatized d-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**. 72, 588–598. 2015.

KANBAR, R., OREA, V., BARRES, C., AND JULIEN, C. Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity during air-jet stress in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 292, R362–R367. 2007.

KUO, T.B.J., YANG, C.C.H., CHAN, S.H.H. Selective activation of vasomotor components of SAP spectrum by nucleus reticularis ventrolateralis in the rat. **American Journal of Physiology**, 272, p. H485-H492. 1997.

LI, Z., MAO, H. Z., ABBOUD, F. M., AND CHAPLEAU, M. W. Oxygen-derived free radicals contribute to baroreceptor dysfunction in atherosclerotic rabbits. **Circulation Research**. 79, 802–811. 1996.

LI, P.L., CHAO, Y.M., CHAN, S.H.H., CHAN, J.Y.H. Potentiation of baroreceptor reflex response by heat shock protein 70 in nucleus tractus solitarii confers cardiovascular protection during heatstroke. **Circulation**, 103, p. 2114-2119. 2001.

LI, H., WITTE, K., AUGUST, M., BRAUSCH, I., GODTEL-ARMBRUST, U., HABERMEIER, A., CLOSS, E.I., OELZE, M., MUNZEL, T. FORSTERMANN, U. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. **Journal of the American College of Cardiology**. 47(12), p.2536-2544. 2006.

LOHMEIER, T. E.; ILIESCU, R. The Baroreflex as a Long-Term Controller of Arterial Pressure. **Physiology**, 2015.

LONG, K. M.; KIRBY, R. An update on cardiovascular adrenergic receptor physiology and potential pharmacological applications in veterinary critical care. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**. 18(1), 2-25. 2008.

MACHOVÁ, E., CÍZOVÁ, A., BYSTRICKY, P. Effect of carboxymethylation on antioxidant properties and radicaldegradation of mannans and glucans. **Carbohydrate Polymers**. 112, 603-607. 2014.

MAGNANI, M., CASTRO-GOMEZ, R. J. β -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. **Semina: Ciências Agrárias**. 29(3), 631-650. 2008.

MAGNANI, M. CALLIARI, C. M., MACEDO-JR., F. C., MORI, M. P., SYLLOS-CÓLUS, I. M., CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Optimized methodology for extraction of (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-b-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. **Carbohydrate Polymers**. 78, 658–665. 2009.

MAGNANI, M., CASTRO-GOMEZ, R. H., AOKI, M. N., GREGÓRIO, E. P., LIBOS, F., WATANABE, M. A. E. Effects of carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the peripheral blood cells of patients with

advanced prostate cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**. 1, 859-862. 2010.

MAGNANI, M., CASTRO-GOMEZ, R. J., MORI, M. P., KUASNE, H., GREGORIO, E. P., LIBOS, F. Protective effect of carboxymethyl-glucan (CM-G) against DNA damage in patients with advanced prostate cancer. **Genetics and Molecular Biology**. 34, 131–135. 2011.

MALLIANI, A., PAGANI, M., LOMBARDI, F., CERUTTI, S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, 84, p. 482- 492. 1991.

MALPAS, S. C., GROOM, A. S., AND HEAD, G. A. Baroreflex control of heart rate and cardiac hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension in rabbits. **Hypertension** 29, 1284–1290. 1997.

MALPAS, S. C. Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. **Physiological Reviews**. 90(2), 513-557. 2010.

MANCIA, G., DEBACKER, G., DOMINICZAK, A., CIFKOVA, R., FAGARD, R., GERMANO, G. ESH-ESC. Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. **Journal of Hypertension**, 25, p.1751-1762. 2011.

MARTINEZ-MALDONADO, M. Pathophysiology of renovascular hypertension. **Hypertension**. 17(5), p. 707-719. 1991.

MARTINKA, P., FIELITZ, J., PATZAK, A., REGITZ-ZAGROSEK, V., PERSSON, P. B., AND STAUSS, H. M. Mechanisms of blood pressure variability-induced cardiac hypertrophy and dysfunction in mice with impaired baroreflex. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 288, R767–R776. 2005.

MASI, S., ULIANA, M., VIRDIS, A. Angiotensin II and vascular damage in hypertension: Role of oxidative stress and sympathetic activation. **Vascular Pharmacology**. 115, p. 13-17. 2019.

MCELROY, N.D., ZIMMERMAN, B.G. Characterization of intrarenal arterial adrenergic receptors in renovascular hypertension. **Hypertension**, 13, p. 851-858. 1989.

MENDES-JUNIOR, L.G., MONTEIRO, M.M.O., CARVALHO, A.S., QUEIROZ, T.M., BRAGA, V.A. Oral supplementation with the rutin improves cardiovagal baroreflex sensitivity and vascular reactivity in hypertensive rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, 38, p. 1099-1106. 2013.

MENGAL, V., SILVA, P. H., TIRADENTES, R. V., SANTUZZI, C. H., DE ALMEIDA, S. A., SENA, G. C. Aliskiren and L-arginine treatments restore depressed baroreflex sensitivity and decrease oxidative stress in renovascular hypertension rats. **Hypertension Research**. 39, 769–776. 2016.

MILANEZ, M.I.O., DISHI, E.E., SATO, A.Y.S., FUTURO-NETO, H.A., BERGAMARSCHI, C.T., CAMPOS, R.R. Control of renal sympathetic nerve activity by neurotransmitters in the spinal cord in Goldblatt hypertension. **Brain Research**, 1698, 43-53. 2018.

MILLS, K. T., BUNDY, J. D., KELLY, T. N., REED, J. E., KEARNEY, P. M., REYNOLDS, K., CHEN, J. HE, J. Global disparities of hypertension prevalence and control: a systematic analysis of population-based studies from 90 countries. **Circulation**, 134(6), 441-450. 2016.

MOHAMMED, M., BERDASCO, C., LAZARTIGUES, E. Brain angiotensin converting enzyme-2 in central cardiovascular regulation. **Clinical Sciences**, 134(19), p. 2535- 2547. 2020.

MONTEZANO, A., DULAK-LIS, M., TSIROPOULOU, S., HARVEY, A., BRIONES, A.M., TOUYZ, R.M. Oxidative stress and human hypertension: Vascular mechanisms, biomarkers and novel therapies. **Canadian Journal of Cardiology**, 31(5), p. 631-641. 2015.

MULVANY, M.J. Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. **Medical & Biological Engineering& Computing**. 46(5): 461– 467. 2008.

NAGAI, R., NAGATA, S., FUKUYA, F., HIGAKI, J., RAKUGI, H., AND OGIHARA, T. Changes in autonomic activity and baroreflex sensitivity with the hypertension process and age in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. 30, 419–425. 2003.

NAKADA, T., KUBOTA, Y., SUZUKI, H., SASAGAWA, I., WATANABE, M., ISHIGOOKA, M. Suppression of sympathetic nervous system attenuates the development of two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension. **Journal of Urology**, 156, p. 1480-1484. 1996.

NAVAR, L. G.; ZOU, L.; VON THUN, A.; TARNG WANG, C.; IMIG, J. D.; MITCHELL, K. D. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. **News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, 1998.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION. Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. **The Lancet**. 389, 37-55. 2017.

OLIVEIRA, A.P., LUNARDI, C.N., RODRIGUES, G.J., AND BENDHACK, L.M. Relaxation induced by calcium ionophore is impaired in carotid arteries from 2K-1C rats due to failed effect of nitric oxide on the smooth muscle cells. **Vascular Pharmacology**. 50(5–6): 153–159. 2009.

OLIVEIRA-SALES, E. B.; COLOMBARI, E.; ABDALA, A. P.; CAMPOS, R. R.; PATON, J. F. R. Sympathetic overactivity occurs before hypertension in the two-kidney, one-clip model. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 1, p. 67–80, 2016.

OSBORN, J.W., FINK, G.D., SVED, A.F., TONEY, G.M., RAIZADA, M.K. Circulating Angiotensin II and Dietary Salt: Converging Signals for Neurogenic Hypertension. **Current Hypertension Reports**, 9, p. 228-235. 2007.

PEREIRA, S. C. et al. Quercetin decreases the activity of matrix metalloproteinase-2 and ameliorates vascular remodeling in renovascular hypertension. **Atherosclerosis**, v. 270, p.146-153. 2018.

PETRAVIC-TOMINAC, V., ZECHNER-KRPAN, V., GRBA, S., SRECEC, S., PANJKOTA KRBAVCIC, I., LANA VIDOVIC, L. Biological effects of yeast β -glucans. **Agriculturae Conspectus Scientificus**. 75(4), 149-158. 2010.

PICKERING, A. E., SIMMS, A. E., AND PATON, J. F. Dominant role of aortic baroreceptors in the cardiac baroreflex of the rat in situ. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**. 142, 32–39. 2008.

PLOTH, D. W. Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney, one-clip renal vascular hypertension. **Am J Physiol**, 1983.

QUEIROZ, T.M., GUIMARÃES, D.D., MENDES-JUNIOR, L.G., BRAGA, V.A. α -Lipoic Acid Reduces Hypertension and Increases Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats. **Molecules**, 17, p.13357-13367. 2012.

RAHAR, S., SWAMI, G., NAGPAL, N., NAGPAL, M. A., SINGH, G. S. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**. 2(2), 94-103. 2011.

RAY, P.D., HUANG, B.W., TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, 24(5), p. 981-990. 2012.

RICE, P. et al. Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 314(3), 1079-1086. 2005.

SALGADO, H. C., BARALE, A. R., CASTANIA, J. A., MACHADO, B. H., CHAPLEAU, M. W., FAZAN. Baroreflex responses to electrical stimulation of aortic depressor nerve in conscious SHR. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**. 292, H593–H600. 2007.

SAMUELSEN, A. B. C, SCHREZENMEIR, J., KNUTSEN, S.H. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: a review. **Molecular Nutrition & Food Research**. 58(1), 183-193. 2014.

SANDULA, J., KOGAN, G., KACURAKOVA, M., MACHOVA, E. Microbial (1 → 3)-b-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate Polymers**. 38, 247-253. 1999.

SANTUZZI, C. H.; TIRADENTES, R. V.; MENGAL, V.; CLAUDIO, E. R. G.; MAUAD, H.; GOUVEA, S. A.; ABREU, G. R. Combined aliskiren and l-arginine treatment has antihypertensive effects and prevents vascular endothelial dysfunction in a model of renovascular hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2015.

SATA, Y., HEAD, G.A., DENTON, K., MAY, C.N., SCHLAICH, M.P. Role of the Sympathetic Nervous System and its Modulation in Renal Hypertension. **Frontiers in Medicine**, 5(82), p.1-10. 2018.

SCHAFFENBURG, C.A. Device to control constriction of main renal artery for production of hypertension in small animals. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**, 101, p.676–677. 1959.

SHEPHERD JT, MANCIA G. Reflex control of the human cardiovascular system. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. 105, p. 3-100, 1986.

SILVA, B.R., PERNOMIAN, L., BENDHACK, L.M. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Frontiers in Physiology**. 3, p. 441, 2012.

STANKEVICIUS, E., MARTINEZ, A.C., MULVANY, M.J., AND SIMONSEN, U. 2002. Blunted acetylcholine relaxation and nitric oxide release in arteries from renal hypertensive rats. **Journal of Hypertension**. 20(8): 1571–1579. 2002.

TOUYZ, R.M., TABET, F., AND SCHIFFRIN, E.L. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. 30(11): 860–866. 2003.

VERMA, S., ANDERSON, T.J., SIMA, P. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. **Circulation**. 105 (5), p. 546–549, 2002.

VETVICKA, V., VANNUCCI, L., AND SIMA, P. Role of β -glucan in biology of gastrointestinal tract. **Journal of Nature and Science**. 1:e129. 2015.

WALLBACH, M., KOZIOLEK, M. J. Baroreceptors in the carotid and hypertension-systematic review and meta-analysis of the effects of baroreflex activation therapy on blood pressure. **Nephrol. Dial. Transplant**. 33 (9), p. 1485–1493, 2018.

WANG, Q., CHEN, S., HAN, L., LIAN, M., WEN, Z., JIAYINAGULI, T., LIU, L., SUN, R., CAO, Y. Antioxidant activity of carboxymethyl (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-glucan (from the sclerotium of *Poria cocos*) sulfate (in vitro). **International Journal of Biological Macromolecules**. 69, 229-235. 2014.

XU, J., LIU, W., YAO, W., PANG, X., YIN, D., GAO, X. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro. **Carbohydrate Polymers**. 78, 227–234. 2009.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. **Food Hydrocolloids**. 52, 275-288. 2016.

Anexos

- Período Sanduíche na Louisiana State University Health Sciences Center (LSUHSC) em Nova Orleans, nos EUA (maio – 2017 a janeiro – 2018)



June 14, 2018

To whom it may concern,

It is my great pleasure to have the opportunity to write this letter of evaluation for Ms. Alynne Carvalho Galvão. Alynne joined my laboratory at LSUHSC-NO in May 2017 as part of a CAPES-sponsored "sandwich PhD program" and returned to Brazil in January 2018.

While in my lab, Alynne performed outstandingly. She worked on a project involving the role of ADAM17 in astrocytes and microglia in neurogenic hypertension. She contributed to the development of 2 new mouse models for which she oversaw the breeding, genotyping and phenotyping. As part of these activities, Alynne learned blood pressure recording using telemetry and tail-cuff systems, cryosectioning, immuno-histochemistry, enzyme assays for ACE2 and ADAM17, cell culture, quantitative real-time PCR and standard PCR.

Some of the data she generated were part of a manuscript that was very recently accepted for publication in *Clinical Sciences*, and for which Alynne is the first author. The remaining data will be part of another manuscript once the experiments have been completed by her co-authors.

Alynne integrated very well within my team and showed great collegiality. She assisted her labmates with their experiments and was very helpful in contributing to the lab functioning.

Alynne participated in departmental and school seminars. She also participated in the group's weekly meetings and presented her data to her colleagues in a timely fashion.

In closing, I was very satisfied with Alynne's performance during her stay in my lab and we all benefited from her positive attitude and hard work.

Please do not hesitate to contact me should you have any questions.

Sincerely,

Eric Lazartigues, Ph.D., FAHA
 Professor of Pharmacology and Neurosciences
 Louisiana State University Health Sciences Center
 Phone number: (504) 568-3210
 Fax number: (504) 568-2361
 E-mail address: elazar@lsuhsc.edu
 Webpage : <http://www.medschool.lsuhs.edu/faculty/Lazartigues>

- Artigos publicados durante o período de doutorado

2018 - Clinical Science – IF 5,23 (A1) – fruto do período sanduíche na LSUHSC (Nova Orleans – EUA)

Clinical Science (2018) 132 1513–1527
https://doi.org/10.1042/CS20180222



Research Article

Central administration of TRV027 improves baroreflex sensitivity and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats

Alyne Carvalho-Galvão^{1,2}, Blessing Ogunlade³, Jiaxi Xu², Cristiane R.A. Silva-Alves¹, Leônidas G. Mendes-Júnior¹, Drielle D. Guimarães¹, Josiane C. Cruz¹, Thyago M. Queiroz⁴, Camille M. Balarini^{1,5}, Valdir A. Braga¹, Catalin M. Filipeanu³, Eric Lazartigues² and Maria do Socorro de França-Silva¹

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil; ²Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics and Cardiovascular Center of Excellence, Louisiana State, University Health Sciences Center, New Orleans, LA, U.S.A.; ³Department of Pharmacology, College of Medicine, Howard University, Washington, DC, U.S.A.; ⁴Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil; ⁵Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

Correspondence: Maria do Socorro de França-Silva (francasilva@cbiotec.ufpb.br) or Eric Lazartigues (elazar@lsuhsc.edu)

TRV027 is a biased agonist for the Angiotensin (Ang)-II type 1 receptor (AT₁R), able to recruit β -arrestin 2 independently of G-proteins activation. β -arrestin activation in the central nervous system (CNS) was suggested to oppose the effects of Ang-II. The present study evaluates the effect of central infusion of TRV027 on arterial pressure (AP), autonomic function, baroreflex sensitivity (BRS), and peripheral vascular reactivity. Spontaneously hypertensive (SH) and Wistar Kyoto (WKY) rats were treated with TRV027 for 14 days (20 ng/h) delivered to the lateral ventricle via osmotic minipumps. Mechanistic studies were performed in HEK293T cells co-transfected with AT₁R and Ang converting enzyme type 2 (ACE2) treated with TRV027 (100 nM) or Ang-II (100 nM). TRV027 infusion in SH rats (SHR) reduced AP (~ 20 mmHg, $P < 0.05$), sympathetic vasomotor activity (Δ MAP = -47.2 ± 2.8 compared with -64 ± 5.1 mmHg, $P < 0.05$) and low-frequency (LF) oscillations of AP (1.7 ± 0.2 compared with 5.8 ± 0.4 mmHg, $P < 0.05$) compared with the SHR control group. TRV027 also increased vagal tone, improved BRS, reduced the reactivity of mesenteric arteries to Ang-II and increased vascular sensitivity to phenylephrine (Phe), acetylcholine (ACh), and sodium nitroprusside (SNP). *In vitro*, TRV027 prevented the Ang-II-induced up-regulation of ADAM17 and in contrast with Ang-II, had no effects on ACE2 activity and expression levels. Furthermore, TRV027 induced lesser interactions between AT₁R and ACE2 compared with Ang-II. Together, these data suggest that due to its biased activity for the β -arrestin pathway, TRV027 has beneficial effects within the CNS on hypertension, autonomic and vascular function, possibly through preserving ACE2 compensatory activity in neurones.

Received: 20 March 2018
Revised: 08 June 2018
Accepted: 13 June 2018

Accepted Manuscript Online:
14 June 2018
Version of Record published:
23 July 2018

Introduction

Arterial hypertension is an important health problem worldwide of difficult treatment due to the complexity of its underlying mechanisms. Diverse endogenous molecules are involved in the (dys)regulation of blood pressure (BP), including the renin-angiotensin (Ang)-aldosterone system (RAAS), whose imbalance is involved in the pathogenesis of hypertension [1,2]. Besides the peripheral effects induced by Ang-II [3], it was established that the hypertensive effects induced by circulating Ang-II are partly mediated by the central nervous system (CNS) [4].

2018 – Frontiers in Physiology – IF 3,39 (A2) – fruto de parte dos resultados apresentados nesta tese



A Newly Isolated Carboxymethyl-Glucan (CM-G) Restores Depressed Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats

Alyne Carvalho-Galvão¹, Danilo D. A. Gadelha¹, José L. de Brito Alves², Barkat A. Khan³, Raul J. H. Castro-Gomez⁴, Josiane C. Cruz¹, Marciane Magnani⁴ and Valdir A. Braga^{1*}

¹ Department of Biotechnology, Center of Biotechnology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, ² Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, ³ Faculty of Pharmacy, Gomal University, Dera Ismail Khan, Pakistan, ⁴ Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Eduardo Colombari,
Universidade Estadual Paulista Júlio
de Mesquita Filho (UNESP), Brazil

Reviewed by:

Marli Cardoso Martins-Pinge,
Universidade Estadual de Londrina,
Brazil
Olaf Grisk,
University of Greifswald, Germany

*Correspondence:

Valdir A. Braga
valdir@cbioec.ufpb.br

Specialty section:

This article was submitted to
Integrative Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 12 March 2018

Accepted: 04 May 2018

Published: 23 May 2018

Citation:

Carvalho-Galvão A, Gadelha DDA,
de Brito Alves JL, Khan BA,
Castro-Gomez RJH, Cruz JC,
Magnani M and Braga VA (2018) A
Newly Isolated Carboxymethyl-Glucan
(CM-G) Restores Depressed
Baroreflex Sensitivity in Renovascular
Hypertensive Rats.
Front. Physiol. 9:607.
doi: 10.3389/fphys.2018.00607

This study was designed to investigate the effects of a newly synthesized carboxymethyl-glucan (CM-G) on blood pressure (BP), baroreflex sensitivity (BRS) and sympathetic vascular modulation in renovascular hypertensive rats. Male Wistar rats were divided into four groups: Sham ($n = 10$); 2K1C (subjected to renal artery clipping to induce renovascular hypertension, $n = 10$); Sham + CM-G (treated with CM-G, $n = 7$) and 2K1C + CM-G (treated with CM-G, $n = 7$). The daily treatment with CM-G (40 mg/kg) was performed for 2 weeks. Blood pressure, heart rate (HR), systolic BP variability, baroreflex sensitivity (BRS) and sympathetic vascular tone were evaluated. After six weeks of renal artery clipping, 2K1C rats exhibited arterial hypertension (171 ± 11 vs. 118 ± 4 mmHg, $p < 0.05$), impaired BRS (-1.30 ± 0.10 vs. -2.59 ± 0.17 bpm.mmHg⁻¹, $p < 0.05$) and enhanced sympathetic activity as shown by the hexamethonium test (-60 ± 5 vs. -33 ± 2 ΔmmHg, $p < 0.05$) when compared to sham rats. Oral administration of CM-G in renovascular hypertensive rats reduced hypertension (126 ± 4 vs. 171 ± 11 mmHg, $p < 0.05$) and improved the BRS (-2.03 ± 0.16 vs. -1.30 ± 0.10 bpm.mmHg⁻¹, $p < 0.05$) in 2K1C rats when compared to placebo. Those effects seem to be caused by a reduction in sympathetic activity. The present study revealed for the first time that CM-G treatment reduces arterial hypertension and restores arterial baroreflex sensitivity via a reduction in the sympathetic tone in conscious renovascular hypertensive rats.

Keywords: hypertension, sympathetic overactivity, baroreflex sensitivity, carboxymethyl-glucan

Abbreviations: ANG II, Angiotensin II; BRS, Baroreflex sensitivity; BP, Blood pressure; CM-G, Carboxymethyl-glucan; HR, Heart rate; LF, Low-frequency; MAP, Mean arterial pressure; PAP, Pulsatile arterial pressure; ROS, Reactive oxygen species; SBRS, Spontaneous baroreflex sensitivity; SAP, Systolic arterial pressure; 2K1C, Two-kidney one-clip.



The novel organic mononitrate NDHP attenuates hypertension and endothelial dysfunction in hypertensive rats



Luciano L. Paulo^{a,b,1}, Josiane Campos Cruz^{b,1}, Zhengbing Zhuge^b, Alynne Carvalho-Galvão^a, Maria C.R. Brandão^c, Thiago F. Diniz^d, Sarah McCann Haworth^b, Petrônio F. Athayde-Filho^c, Virginia S. Lemos^d, Jon O. Lundberg^b, Marcelo F. Montenegro^b, Valdir A. Braga^{a,1}, Mattias Carlström^{b,e,1}

^a Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^b Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

^c Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^d Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Nitric oxide
Cardiovascular disease
Hypertension
Organic nitrates
Nitrite

ABSTRACT

Rationale: Development and progression of cardiovascular diseases, including hypertension, are often associated with impaired nitric oxide synthase (NOS) function and nitric oxide (NO) deficiency. Current treatment strategies to restore NO bioavailability with organic nitrates are hampered by undesirable side effects and development of tolerance. In this study, we evaluated NO release capability and cardiovascular effects of the newly synthesized organic nitrate 1, 3-bis (hexyloxy) propan-2-yl nitrate (NDHP).

Methods: A combination of *in vitro* and *in vivo* approaches was utilized to assess acute effects of NDHP on NO release, vascular reactivity and blood pressure. The therapeutic value of chronic NDHP treatment was assessed in an experimental model of angiotensin II-induced hypertension in combination with NOS inhibition.

Results: NDHP mediates NO formation in both cell-free system and small resistance arteries, a process which is catalyzed by xanthine oxidoreductase. NDHP-induced vasorelaxation is endothelium independent and mediated by NO release and modulation of potassium channels. Reduction of blood pressure following acute intravenous infusion of NDHP was more pronounced in hypertensive rats (two-kidney-one-clip model) than in normotensive sham-operated rats. Toxicological tests did not reveal any harmful effects following treatment with high doses of NDHP. Finally, chronic treatment with NDHP significantly attenuated the development of hypertension and endothelial dysfunction in rats with chronic NOS inhibition and angiotensin II infusion.

Conclusion: Acute treatment with the novel organic nitrate NDHP increases NO formation, which is associated with vasorelaxation and a significant reduction of blood pressure in hypertensive animals. Chronic NDHP treatment attenuates the progression of hypertension and endothelial dysfunction, suggesting a potential for therapeutic applications in cardiovascular disease.

1. Introduction

Arterial hypertension is a chronic degenerative disease of multifactorial etiology that involves functional alterations of the vascular, renal and central nervous systems [1–3]. Of note, hypertension is closely related to endothelial dysfunction mainly attributed to reduced nitric oxide (NO) bioavailability in the vascular wall [4,5] and increased oxidative stress, resulting in chronic and abnormal increase in vascular resistance [6].

NO is considered as the main endothelium-derived relaxing factor

regulating arterial blood pressure in several ways, including relaxation of vascular smooth muscle cells, inhibition of platelet aggregation, smooth muscle cell replication and neuronal communication [7–10]. This lipid soluble gas is synthesized from L-arginine by the action of NO synthases (NOS) [11,12]. NO exerts its biological action on the vascular smooth muscle by activating soluble guanylate cyclase (sGC), leading to increased intracellular cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels, which in turn activates protein kinase G (PKG), thus mediating vasodilation [13]. In addition to modulating the sGC-cGMP-PKG pathway, NO may also directly activate K⁺ channels; including calcium-

* Corresponding author.

E-mail address: Mattias.Carlstrom@ki.se (M. Carlström).

¹ Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.12.004>

Received 9 October 2017; Received in revised form 30 November 2017; Accepted 6 December 2017

Available online 11 December 2017

2213-2317/ © 2017 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

2018 - Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology – IF 2,19 (B2)

Received: 22 November 2018 | Revised: 28 August 2019 | Accepted: 5 September 2019

DOI: 10.1111/1440-1681.13174

ORIGINAL ARTICLE

Cardiovascular-Integrative



WILEY

Short- and long-term effects of maternal dyslipidaemia on blood pressure and baroreflex sensitivity in male rat offspring

Emmanuel Veríssimo de Araújo¹ | Lucas Alves Carneiro dos Santos¹ | Guilherme Fleury Fina Speretta² | Georgianna de Araújo Henriques Ferreira¹ | Micaelle Oliveira de Luna Freire¹ | David Filipe de Santana³ | Alynne Carvalho-Galvão⁴ | Josiane Campos Cruz⁴ | João Henrique da Costa-Silva³ | Valdir de Andrade Braga⁴ | José Luiz de Brito Alves^{1,4}

¹Department of Nutrition, Health Sciences Centre, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

²Department of Physiological Sciences, Biological Sciences Centre, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

³Department of Physical Education and Sport Sciences, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil

⁴Biotechnology Department, Biotechnology Centre, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Correspondence

José Luiz de Brito Alves, Federal University of Paraíba, Department of Nutrition, Campus I – Jd. Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brazil.
Email: jose_luiz_61@hotmail.com

Abstract

Maternal dyslipidaemia is a predisposing factor for arterial hypertension in male rat offspring at adulthood. This study was designed to investigate the short- and long-term effects of maternal dyslipidaemia on blood pressure (BP) and baroreflex control in male rat offspring. Animals were obtained from mothers who received a dyslipidaemic (DLP, $n = 7$) or control (CTL, $n = 7$) diet during pregnancy and lactation. At 30 and 90 days of age, arterial pressure (AP), heart rate (HR) and baroreflex function were evaluated. In addition, spectral analysis of the systolic AP, diastolic AP, mean AP, HR, and spontaneous baroreflex were assessed. Data were expressed as mean $\pm$ SEM and Student's t -test was used for comparison among groups, with statistical significance considered to be $P < .05$. At 30 days of age, male offspring had similar BP, HR and preserved baroreflex sensitivity. In addition, low frequency (LF) oscillation, high frequency (HF) oscillation and LF/HF ratio of AP and HR were similar in juvenile rats. At 90 days of age, male offspring from dyslipidaemic dams had augmented BP ($P < .05$) when compared to CTL group. Adult male rats from dyslipidaemic dams had a reduction in baroreflex control ($P < .05$) in comparison to CTL rats. The present study indicates that offspring from dams fed on a dyslipidaemic diet during pregnancy and lactation do not show alteration in blood pressure and baroreflex control in early life, but display a decline in baroreflex control and hypertension in adulthood.

KEYWORDS

arterial hypertension, baroreflex sensitivity, maternal dyslipidaemia

1 | INTRODUCTION

Nutritional insults during pregnancy and/or lactation phases increase the risk in offspring for future arterial hypertension.^{1–3} Maternal dyslipidaemia is a condition characterized by high levels of total cholesterol (TC), triacylglycerol (TAG), low-density lipoprotein (LDL) and decreased high-density lipoprotein (HDL).⁴ Although pregnancy

and/or lactation can be recognized as a period of life favourable to increased lipid profile in serum,⁵ the dyslipidaemia effects on the offspring are poorly understood.

We have developed a maternal diet-induced dyslipidaemic model in rats, characterized by increased serum levels of total cholesterol, LDL-cholesterol, and triacylglycerol, reduced HDL-cholesterol and compromised glucose tolerance and insulin sensitivity in dams.



Central Inhibition of Tumor Necrosis Factor Alpha Reduces Hypertension by Attenuating Oxidative Stress in the Rostral Ventrolateral Medulla in Renovascular Hypertensive Rats

Alyne Carvalho-Galvão¹, Drielle D. Guimarães^{1,2}, José L. De Brito Alves^{3*} and Valdir A. Braga^{1,2*}

¹ Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, ² Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden, ³ Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Kesia Palma-Rigo,
Universidade Estadual de Maringá,
Brazil

Reviewed by:

Kristy Larissa Jackson,
Baker Heart and Diabetes Institute,
Australia
Daniel Pentead Martins Dias,
Centro Universitário Barão de Mauá,
Brazil

*Correspondence:

José L. De Brito Alves
jose_luiz_61@hotmail.com
Valdir A. Braga
valdir@cbiotec.ufpb.br

Specialty section:

This article was submitted to
Integrative Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 08 January 2019

Accepted: 08 April 2019

Published: 30 April 2019

Citation:

Carvalho-Galvão A,
Guimarães DD, De Brito Alves JL and
Braga VA (2019) Central Inhibition of
Tumor Necrosis Factor Alpha
Reduces Hypertension by Attenuating
Oxidative Stress in the Rostral
Ventrolateral Medulla in Renovascular
Hypertensive Rats.
Front. Physiol. 10:491.
doi: 10.3389/fphys.2019.00491

Inflammation in the central nervous system is being considered a key player linked to neurogenic hypertension. Using combined *in vivo* and *in vitro* approaches, we investigated the effects of central inhibition of TNF- α on blood pressure, sympathetic tone, baroreflex sensitivity, and oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) of rats with 2-kidney-1-clip (2K1C) renovascular hypertension. Continuous infusion of pentoxifylline, a TNF- α inhibitor, into the lateral ventricle of the brain for 14 consecutive days reduced blood pressure and improved baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. Furthermore, central TNF- α inhibition reduced sympathetic modulation and blunted the increased superoxide accumulation in the RVLM of 2K1C rats. Our findings suggest that TNF- α play an important role in the maintenance of sympathetic vasomotor tone and increased oxidative stress in the RVLM during renovascular hypertension.

Keywords: renovascular hypertension, TNF- α , sympathetic nervous system, superoxide, baroreflex, proinflammatory cytokines

INTRODUCTION

Renovascular hypertension is characterized by the stenosis of one or two renal artery and is considered a secondary form of hypertension. Classical experiments performed by Goldblatt et al. (1934) demonstrated that the stenosis of one kidney induces massive renin release, leading to the activation of the renin-angiotensin-system. Studies by your group and others have documented that angiotensin-II (Ang-II) acting on the central nervous system is a key player in the development of the disease (Oliveira-Sales et al., 2010; Botelho-Ono et al., 2011; Burmeister et al., 2011).

It is well documented that inflammation in cerebral blood vessels induced by Ang-II plays a key role in the early stages of arterial hypertension (Winklewski et al., 2015). Circulating Ang-II activates leukocytes that produce proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α (Shi et al., 2010; Waki et al., 2011). TNF- α plays an important role in the immune system and in the propagation of inflammation. Moreover, via its TNFR1 receptor, TNF- α can directly induce oxidative stress by the activation of reactive oxygen species (ROS)-producing enzymes, such as

Nervous System

Dietary Nitrate Reduces Blood Pressure in Rats With Angiotensin II–Induced Hypertension via Mechanisms That Involve Reduction of Sympathetic Hyperactivity

Drielle D. Guimarães,* Josiane C. Cruz,* Alynne Carvalho-Galvão, Zhengbing Zhuge, Stefanne M. Marques, Lara M. Naves, A. Erik G. Persson, Eddie Weitzberg, Jon O. Lundberg, Camille M. Balarini, Gustavo R. Pedrino, Valdir A. Braga,* Mattias Carlström*

Abstract—Several experimental and clinical studies have shown that dietary nitrate supplementation can increase nitric oxide bioavailability. In the oral cavity, commensal bacteria reduce nitrate to nitrite, which is subsequently absorbed into the circulation where reduction to nitric oxide by enzymatic systems occur. Although it is well-known that boosting the nitrate–nitrite–nitric oxide pathway can improve cardiovascular, renal, and metabolic functions and that sympathoexcitation contributes to the development of the same disorders, the potential effects of dietary nitrate on sympathetic activity remain to be elucidated. In this study, we hypothesized that treatment with inorganic nitrate could prevent the increase in sympathetic nerve activity in an experimental model of Ang II (angiotensin II)–induced hypertension. Multiple in vivo approaches were combined, that is, Wistar rats orally treated with the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME (N(G)-nitro-L-arginine methyl ester, 0.5 g/L) and implanted with subcutaneous osmotic minipump for continuous delivery of Ang II (120 ng/kg per minute; 14 days). Simultaneously, rats were supplemented with sodium nitrate (10 mmol/L) or placebo (sodium chloride; 10 mmol/L) in the drinking water. Blood pressure, heart rate, and renal sympathetic nerve activity were recorded. In placebo-treated rats, Ang II+L-NAME treatment–induced arterial hypertension, which was linked with reduced spontaneous baroreflex sensitivity and increased renal sympathetic nerve activity, as well as upregulation of AT₁Rs (Ang II type-1 receptors) in the rostral ventrolateral medulla. Supplementation with nitrate normalized the expression of AT₁Rs in rostral ventrolateral medulla and reduced sympathetic nerve activity, which was associated with attenuated development of hypertension. In conclusion, chronic dietary nitrate supplementation blunted the development of hypertension via mechanisms that involve reduction of sympathetic outflow. (*Hypertension*. 2019;73:839–848. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12425.) • [Online Data Supplement](#)

Key Words: angiotensin II ■ blood pressure ■ hypertension ■ kidney ■ nitric oxide ■ sodium nitrate ■ sympathetic activity

Hypertension is a chronic multifactorial disorder related to metabolic, renal, endothelial, and brain dysfunctions.¹ Emerging evidence suggests that increased sympathetic nerve activity (SNA) can promote or accelerate the development of hypertension and cardiac hypertrophy, and therefore increase the risk of adverse complications.^{2,3} Nitric oxide (NO) is a signaling molecule that plays a fundamental role in the central and peripheral control of the cardiovascular system and reduced NO bioavailability has been associated with endothelial dysfunction and hyperexcitation of the sympathetic nervous system.^{4–6} Thus, different therapeutic strategies to increase NO bioavailability have been proposed and tested.⁶ Of note, organic nitrates represent the oldest class of NO donors

clinically available. However, the tolerance phenomenon is a limiting factor to their clinical use, which reinforces the necessity of new approaches that lack those undesirable effects.^{7,8}

Several preclinical and clinical studies support the idea that supplementation with novel organic^{9,10} and inorganic nitrate (NO₃[−])^{11–14} have beneficial effects on cardiovascular diseases, including hypertension, by increasing NO bioavailability. Inorganic NO₃[−], which is highly abundant in our diet especially in green leafy vegetables, is initially reduced to nitrite (NO₂[−]) in the oral cavity by commensal bacteria, and further reduced to NO and other bioactive nitrogen species in the acidic environment of the stomach.^{15,16} In addition, NO₂[−] can be absorbed in the intestines and converted to NO and other bioactive

Received November 25, 2018; first decision December 9, 2018; revision accepted January 13, 2019.

From the Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden (D.D.G., J.C.C., Z.Z., A.E.G.P., E.W., J.O.L., M.C.); Biotechnology Center (D.D.G., J.C.C., A.C.-G., C.M.B., V.A.B.) and Health Sciences Center (C.M.B.), Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; Department of Physiological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil (S.M.M., L.M.N., G.R.P.); and Department of Medical Cell Biology, Uppsala University, Sweden (A.E.G.P.).

*These authors contributed equally to this work.

The online-only Data Supplement is available with this article at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12425>.

Correspondence to Mattias Carlström, Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Biomedicum 5B, Solnavägen 9, SE-171 77 Stockholm, Sweden. Email mattias.carlstrom@ki.se

© 2019 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <https://www.ahajournals.org/journal/hyp>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12425



Contents lists available at ScienceDirect

Nitric Oxide

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yniox

The new organic nitrate 2-nitrate-1,3-dioctanoxypuran (NDOP) induces nitric oxide production and vasorelaxation via activation of inward-rectifier potassium channels (K_{IR})

Ricardo Bernardino-Paula^a, Alynne Carvalho-Galvão^a, Airlla L.M. Cavalcanti^a, Patrícia K. L. Rocha^a, Lucas R.R.A. Carvalho^a, Maria C.R. Brandão^b, Petronio F. Athayde-Filho^b, Thiago F. Diniz^c, Virginia S. Lemos^c, Maria S. França-Silva^a, Marcelo F. Montenegro^d, Eddie Weitzberg^d, Jon O. Lundberg^d, Mattias Carlström^{d,1}, Valdir A. Braga^{a,d,*,1}

^a Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^b Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^c Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

ARTICLE INFO

Keywords:

Organic nitrate
Nitric oxide donor
 K^+ channels
Xanthine oxidoreductase

ABSTRACT

Introduction: Cardiovascular diseases are coupled to decreased nitric oxide (NO) bioavailability, and there is a constant search for novel and better NO-donors. Here we synthesized and characterized the cardiovascular effects of the new organic nitrate 2-nitrate-1,3-dioctanoxypuran (NDOP).

Methods: A combination of *in vitro* and *in vivo* experiments was performed in C57BL/6 mice and Wistar rats. Thus, the ability of NDOP in donating NO in a cell-free system and in vascular smooth muscles cells (VSMC) and its ability to induce vasorelaxation in aortic rings from mice were evaluated. In addition, changes in blood pressure and heart rate to different doses of NDOP were evaluated in conscious rats. Finally, acute pre-clinical toxicity to oral administration of NDOP was assessed in mice.

Results: In cell-free system, NDOP increased NO levels, which was dependent on xanthine oxidoreductase (XOR). NDOP also increased NO levels in VSMC, which was not influenced by endothelial NO synthase. Furthermore, incubation with the XOR inhibitor febuxostat blunted the vasorelaxation in aortic ring preparations. In conscious rats, NDOP elicited dose-dependent reduction in blood pressure accompanied with increased heart rate. In vessel preparations, NDOP (10^{-8} – 10^{-3} mol/L) induced endothelium-independent vasorelaxation, which was inhibited by the NO scavengers 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide and hydroxocobalamin or by inhibition of soluble guanylyl cyclase using H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one. To investigate if NDOP acts through potassium channels, selective blockers were used. Inhibition of BK_{Ca} , K_v or K_{ATP} subtypes of potassium channels had no effect, but inhibition of inward-rectifier potassium channels (K_{IR}) significantly reduced NDOP-mediated vasorelaxation. Lastly, NDOP showed low toxicity (LD_{50} ~5000 mg/kg).

Conclusion: Bioactivation of NDOP involves functional XOR, and this new organic nitrate elicits vasorelaxation via NO-cGMP-PKG signaling and activation of K_{IR} channels. Future studies should further characterize the underlying mechanism and evaluate the therapeutic benefits of chronic NDOP treatment in relevant cardiovascular disease models.

1. Introduction

Cardiovascular disorders including hypertension, coronary heart disease, and cerebrovascular disease are major causes of morbidity and

mortality worldwide. The underlying mechanisms contributing to the development and the progression of these diseases, and associated adverse complications, are considered multifactorial but surely involve endothelial dysfunction, compromised function of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and oxidative stress [1–3].

* Corresponding author. Federal University of Paraíba, Biotechnology Center Campus I – Jd. Cidade Universitária, João Pessoa, PB, CEP: 58051-900, Brazil.

E-mail address: valdir@cbiotec.ufpb.br (V.A. Braga).

¹ Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.10.001>

Received 21 May 2020; Received in revised form 27 August 2020; Accepted 1 October 2020

Available online 7 October 2020

1089-8603/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.