

**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos**

Manoel Fernandes de Oliveira Neto

O efeito anti-hipertensivo do ácido sináptico está associado à melhora da sensibilidade do barorreflexo e da disfunção autonômica em ratos espontaneamente hipertensos: ensaios pré-clínicos e *in silico*

**João Pessoa-PB
2021**

Manoel Fernandes de Oliveira Neto

O efeito anti-hipertensivo do ácido sináptico está associado à melhora da sensibilidade do barorreflexo e da disfunção autonômica em ratos espontaneamente hipertensos: ensaios pré-clínicos e *in silico*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. **Área de concentração: Farmacologia.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Socorro de França Falcão

João Pessoa-PB

2021

048e Oliveira Neto, Manoel Fernandes de.

O efeito anti-hipertensivo do ácido sináptico está associado à melhora da sensibilidade do barorreflexo e da disfunção autonômica em ratos espontaneamente hipertensos : ensaios pré-clínicos e in silico / Manoel Fernandes de Oliveira Neto. - João Pessoa, 2021.

60 f. : il.

Orientação: Maria Socorro de França Falcão.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Ácido sináptico. 2. Barorreflexo. 3. Função autonômica. 4. Hipertensão. I. Falcão, Maria Socorro de França. II. Título.

O efeito anti-hipertensivo do ácido sinápico está associado à melhora da sensibilidade do barorreflexo e da disfunção autonômica em ratos espontaneamente hipertensos: ensaios pré-clínicos e *in silico*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. **Área de concentração: Farmacologia.**

Aprovada em 30/08/2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Socorro de França Falcão
(Orientadora)

Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz
(Examinador Externo – UFPE)

Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante Oliveira
(Examinadora Interna - UFPB)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a todos os
indivíduos neuro divergentes, que
lutam constantemente contra suas
limitações e contra o preconceito de
uma sociedade “perfeita”.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os **brasileiros** que foram sabotados por este sistema e roubados o direito à educação; por, indiretamente, me proporcionarem estudar em uma das melhores universidades públicas do país.

À toda a **minha família** por todo o amor, carinho e cuidado. E aqui incluo, também, todos os **meus amigos**. A minha trajetória seria impossível sem os braços da amizade verdadeira.

Aos **meus professores** desde Tia Lúcia do primário aos da pós graduação. Em especial, àqueles que desenvolveram, além de excelente didática, a empatia; e, portanto, compreendem que vinte alunos em uma sala de aula são também vinte mundos completamente diferentes.

A minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro**, que me deu a oportunidade de fazer parte da sua equipe, mesmo sem saber o trabalho que eu daria. E, mesmo assim, acredito que com o seu dom da maternidade, não desistiu de mim. E acreditou na minha capacidade, até quando eu era incapaz de acreditar.

A **Danilo Duarte Gadelha** por toda amizade e por todos os conhecimentos compartilhados desde química orgânica 1. Além de todo o apoio para realização desse trabalho e por todo apoio psicológico de um ombro amigo.

À **Clenia de Oliveira Cavalcanti** por todo o apoio nos experimentos, por trazer calma quando eu estava desesperado, por toda generosidade e disposição a ajudar.

À **Sara Alves Lucena Madeiro** por todos os puxões de orelha, conselhos e por me ajudar na pesquisa através da estrutura química; e os conhecimentos compartilhados.

Aos membros do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA), **Matheus Monteiro**, **Fran** e em especial **Mickael Luz** por todo o apoio nos experimentos iniciais, **Larissa Lins** por toda a amizade e conversas trocadas, **Gabriel Nunes** por toda a parceria e **Atalia Flor** pela disposição em tirar dúvidas e a ajuda nos experimentos.

À toda minha turma de mestrado, em especial **Barbara Cavalcanti**, **Kimberly** e **Catarina**, por todo o apoio psicológico durante os “os fins do mundo” me atormentavam.

A todos os **funcionários do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Ao **CNPq** e a **CAPES** pelo apoio financeiro. E por último, mas não menos importante, agradeço a uma das melhores universidades do país, a **Universidade Federal Da Paraíba**, por todo apoio desde a graduação e nessa próxima etapa que virá.

Manoel Fernandes Neto (Fernando Neto)

RESUMO

O ácido sináptico é um dos quatro ácidos hidroxinâmicos mais encontrados na natureza; presente em frutas, vegetais, oleaginosas, grãos de cereais. Ele apresenta diversas atividades farmacológicas como antioxidante, anti-inflamatória, ansiolítica e anti-hipertensiva, essa última em ratos L-NAME. Contudo, não há relatos de seus efeitos no modelo de hipertensão com ratos espontaneamente hipertensos (SHR) assim como também não há dados da sua participação na modulação autonômica da pressão arterial e seus mecanismos de controle. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos induzidos pelo ácido sináptico em parâmetros cardiovasculares de ratos normotensos (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR). Para isso, uma combinação de protocolos *in vivo* foi realizada em ratos WKY e SHR. Dessa forma, avaliou-se os efeitos do tratamento oral por 14 dias com o ácido sináptico sobre a pressão arterial, frequência cardíaca, atividade autonômica simpática, parassimpática e sensibilidade do barorreflexo. O tratamento oral com o ácido sináptico foi capaz de reduzir a pressão arterial apenas em ratos SHR ($184,5 \pm 6,114$ vs. $148,3 \pm 5,39$ mmHg, $p < 0,05$), sem provocar alterações na frequência cardíaca dos animais. A função autonômica foi avaliada utilizando ferramentas farmacológicas; e o ácido sináptico aumentou atividade parassimpática ($\Delta FC: +39 \pm 5,2$ vs. $+129 \pm 6$ bpm, $p < 0,05$) e diminuiu a hiperatividade simpática em ratos SHR ($\Delta PAM: -64,83 \pm 4,5$ vs $-40,8 \pm 7,7$ mmHg; $p < 0,05$). Já em relação ao barorreflexo induzido farmacologicamente com drogas vasoativas, o tratamento oral com o ácido sináptico foi capaz de melhorar a sensibilidade do barorreflexo ($-1,192 \pm 0,1441$ vs. $-2,366 \pm 0,1885$ bpm/mmHg, $p < 0,05$) por aumentar o índice do ganho parassimpático ($-0,683 \pm 0,111$ versus $-2,814 \pm 0,430$ bpm/mmHg, $p < 0,05$), sem diferença significativa em relação ao simpático. O tratamento com o ácido sináptico também foi capaz de reduzir o estresse oxidativo sérico nos ratos SHR ($54,75 \pm 6,2$ vs. $18,1 \pm 1,3$ nmol/ml, $p < 0,05$). Finalmente, em ensaios *in silico*, o ácido sináptico apresentou boa biodisponibilidade teórica após administração oral, boa solubilidade, estabilidade e absorção, ainda apresentando baixa toxicidade oral, bem como possíveis outras atividades farmacológicas sobre o sistema cardiovascular. Esses dados sugerem um efeito anti-hipertensivo do ácido sináptico, e esse efeito está associado à melhora do barorreflexo e da disfunção autonômica presente nesses animais. A redução do estresse oxidativo está envolvida, pelo menos em parte, nos efeitos apresentados pelo composto. As características do ácido sináptico sugeridas pelo estudo *in silico* podem estar envolvidas nas propriedades apresentadas pelo composto, encorajando a realização de futuras pesquisas sobre o ácido sináptico como alternativa para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica.

Palavras-chaves: Ácido sináptico, barorreflexo, função autonômica, hipertensão.

ABSTRACT

Sinapic acid is one of the four hydroxynamic acids most commonly found in nature; present in fruits, vegetables, oilseeds, cereal grains. It has several pharmacological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, anxiolytic and anti-hypertensive, the latter in L-NAME rats. However, there are no reports of its effects in the hypertension model with spontaneously hypertensive rats (SHR) as well as no data on its participation in the autonomic modulation of blood pressure and its control mechanisms. The present study aimed to evaluate the effects induced by sinapic acid on cardiovascular parameters of normotensive (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats. For this, a combination of in vivo protocols performed in WKY and SHR rats. Thus, the effects of oral treatment for 14 days with sinapic acid on blood pressure, heart rate, autonomic sympathetic and parasympathetic activity, and baroreflex sensitivity were evaluated. Oral treatment with sinapic acid was able to reduce blood pressure only in SHR rats (184.5 ± 6.114 vs. 148.3 ± 5.39 mmHg, $p < 0.05$), without causing changes in the heart rate of the animals. Autonomic function was assessed using pharmacological tools; and synaptic acid increased parasympathetic activity ($\Delta FC: +39 \pm 5.2$ vs. $+129 \pm 6$ bpm, $p < 0.05$) and decreased sympathetic hyperactivity in SHR rats ($\Delta PAM: -64.83 \pm 4.5$ vs. -40.8 ± 7.7 mmHg; $p < 0.05$). Regarding the pharmacologically induced baroreflex with vasoactive drugs, oral treatment with sinapic acid was able to improve the sensitivity of the baroreflex (-1.192 ± 0.1441 vs. -2.366 ± 0.1885 bpm / mmHg, $p < 0.05$) by increasing the parasympathetic gain index (-0.683 ± 0.111 versus -2.814 ± 0.430 bpm / mmHg, $p < 0.05$), with no smaller difference in relation to the sympathetic one. Sinapic acid treatment was also able to reduce serum oxidative stress in SHR rats (54.75 ± 6.2 vs. 18.1 ± 1.3 nmol / ml, $p < 0.05$). Finally, in *in silico* assays, sinapic acid has good theoretical bioavailability after oral administration, good solubility, stability and absorption, as well as low oral toxicity, as well as possible other pharmacological activities on the cardiovascular system. These data obtained an antihypertensive effect of sinapic acid, and this effect is associated with the improvement of the baroreflex and the autonomic dysfunction present in these animals. The reduction of oxidative stress is involved, at least in part, in the effects caused by the compound. The characteristics of sinapic acid suggested by the study on *silico* may be involved in the properties of the compound, encouraging research on sinapic acid as an alternative for the treatment of systemic arterial hypertension.

Keywords: Sinaptic acid, baroreflex, autonomic function, hypertension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ácidos hidroxincinamicos.....	24
Figura 2. Estrutura química do ácido sináptico.....	30
Figura 3. Espectrofotômetro	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito do tratamento oral com o AS sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos WKY e SHR.....	37
Gráfico 2. Efeito do tratamento oral com o AS sobre a frequência cardíaca (FC).....	38
Gráfico 3. Influência do tratamento oral com o AS no controle autonômico parassimpático.....	39
Gráfico 4. Influência do tratamento com o ácido sináptico no controle autonômico simpático.....	40
Gráfico 5. Efeito do tratamento com o AS sobre a sensibilidade do barorreflexo induzido por drogas vasoativas em ratos WKY e SHR.....	41
Gráfico 6. Componente parassimpático do barorreflexo.....	42
Gráfico 7. Componente simpático do barorreflexo.....	42
Gráfico 8. Influência do tratamento com o ácido sináptico sobre o estresse oxidativo sérico.....	43
Gráfico 9. Correlação de Pearson entre o estresse oxidativo sérico e atividade simpática.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades moleculares do AS calculadas no software <i>Molinspiration</i>	44
Tabela 2. Predição de bioatividades calculadas no Molinspiration para o ácido sináptico.....	45
Tabela 3. Tabela das propriedades ADMET para Ácido sináptico.....	46
Tabela 4. Atividades farmacológicas do AS in silico.....	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	A pressão arterial e seus principais mecanismos de controle.....	18
1.2	A fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica.....	20
1.3	A hipertensão arterial sistêmica: epidemiologia e farmacoterapia.....	22
1.4	Os ácidos hidroxicinâmicos e seus efeitos contra a hipertensão.....	23
1.5	Ácido sináptico e seu efeito cardioprotetor.....	25
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivo geral.....	28
2.2	Objetivos específicos.....	28
2.2.1	Ensaios in vivo e bioquímicos.....	28
2.2.2	Ensaios in silico.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	Animais.....	30
3.2	Substância teste e tratamento.....	30
3.3	Drogas utilizadas.....	31
3.4	Implantações de cateteres vasculares para registro a pressão arterial e frequência cardíaca.....	31
3.5	Avaliação da função autonômica.....	32
3.6	Avaliação da sensibilidade do barorreflexo.....	32
3.7	Avaliação do estresse oxidativo sérico.....	33
3.8	Estudos in silico.....	34
3.9	Molinspiration.....	34
3.10	AdmetSAR.....	34
3.11	Testes farmacológicos.....	35
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35

5	RESULTADOS.....	37
5.1	Efeitos do tratamento oral com o ácido sináptico sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos.....	37
5.2	Efeito do tratamento oral com o ácido sináptico na função autonômica em ratos WKY e SHR	38
5.3	Efeito do tratamento com o ácido sináptico na sensibilidade do barorrelexo de ratos WKY e SHR.	40
5.4	Efeito do tratamento oral com o ácido sináptico no estresse oxidativo sérico de ratos SHR e WKY.....	43
5.5	Estudo in silico.....	44
6	DISCUSSÃO.....	49
7	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	ANEXO A - Certificado de Comissão de Ética no uso de animais.....	62

“Trabalhar duro é importante, mas há uma coisa que importa ainda mais: confiar em si mesmo”.

Harry James Potter para a Armada de Dumbledore

(J.K. Rowling, 2003)

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 A pressão arterial e seus principais mecanismos de controle

O coração, o principal órgão do sistema cardiovascular, é formado por dois átrios e dois ventrículos localizados no lado esquerdo e direito deste órgão. Ele é responsável por bombear sangue para todo o corpo a partir de contrações regulares e contínuas (DONG, 2016). A contração ventricular é a força que cria o fluxo sanguíneo no sistema cardiovascular; a partir dela, o sangue é ejetado dos dois ventrículos e exerce uma pressão nos vasos arteriais: a pressão arterial (PA). Define-se, matematicamente, a PA pela equação $PA = DC \times RVP$. O DC (débito cardíaco) é o volume de sangue ejetado do coração a cada minuto, que é influenciado pelo volume sistólico (VS) e pela frequência cardíaca (FC), sendo estabelecido pela fórmula $DC = VS \times FC$ (GAASCH; ZILE, 2004; KASS, 2005). Já a resistência vascular periférica (RVP) é a resistência que os vasos sanguíneos arteriais fornecem ao fluxo de sangue. Ela é determinada pelo tônus vascular; e, dessa forma, torna-se um dos fatores envolvidos na regulação da PA.

A regulação da PA visa manter um débito cardíaco adequado e uma pressão de perfusão suficiente para os órgãos e, portanto, pode ser considerada uma das funções mais complexas do sistema cardiovascular, pois depende de ações integradas deste sistema com os sistemas renal, endócrino, imunológico e nervoso (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001). O controle nervoso da PA é realizado, principalmente, pelo sistema nervoso autônomo; o qual consiste de uma rede de neurônios aferentes e eferentes responsável por ligar o sistema nervoso central aos órgãos efetores. Os neurônios eferentes são divididos em simpáticos e parassimpáticos. Dessa forma, quando há alguma perturbação na PA, receptores presentes em todo o sistema cardiovascular identificam essas perturbações e enviam sinais elétricos, pelos neurônios aferentes, para o SNC; esse, por sua vez, interpreta e transmite a resposta necessária por meio das redes simpáticas e parassimpáticas (LANFRANCHI; SOMERS, 2002; DAMPNEY, 2016).

As divisões eferentes simpáticas e parassimpáticas do SNA consistem em vias diferentes e paralelas. Elas são compostas de neurônios colinérgicos pré-ganglionares, os quais liberam a acetilcolina, que atua em receptores nicotínicos de

neurônios pós-ganglionares simpáticos e parassimpáticos. A acetilcolina liberada por esses últimos é responsável, por exemplo, por diminuir a contratilidade e frequência cardíaca, atuando em seus receptores metabotrópicos (M_2) no nó sinoatrial e atrioventricular (GUYNET, 2006; MANCIA; GRASSI, 2014). Por outro lado, os neurônios pós-ganglionares simpáticos liberam, majoritariamente, a noradrenalina e inervam, principalmente o coração, rins, glândula adrenal e vasos sanguíneos. A noradrenalina, no coração, ativa os receptores beta adrenérgicos 1, aumentando a FC e a força de contração do músculo cardíaco. Dessa forma, tanto a divisão simpática como a parassimpática do SNA estão envolvidas no controle da PA, o qual pode ser realizado a longo prazo e curto prazo (GUYNET, 2006; DAMPNEY et al., 2018).

No SNC, os neurônios formam vias integradas em diversas regiões responsáveis por regular as eferências autonômicas envolvidas na modulação da pressão arterial. O controle simpático da PA é realizado por áreas como o órgão subfornicial (SFO), o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o bulbo ventrolateral rostral (RVLM). Já as áreas responsáveis pela modulação parassimpática da PA são o núcleo dorsal motor do vago (DMV) e o núcleo ambíguo (NA). Estas regiões estão envolvidas no controle da pressão arterial, seja ele a curto ou longo prazo; uma vez que, de forma direta ou indireta, afetam o funcionamento de diversos órgãos alvos (FENG et al., 2002; DUPONT; LEGAT, 2020).

A curto prazo a PA é controlada por meio de mecanismos reflexos, que conseguem reestabelecer a pressão arterial e a FC para os níveis basais. Dentre estes, destaca-se o barorreflexo, que é capaz de monitorar a PA batimento a batimento, alterando, quando necessário, os tônus simpático e parassimpático (DAMPNEY, 2017).

Os barorreceptores são mecanorreceptores sensíveis ao estiramento presentes no seio carotídeo e arco da aorta. Eles conseguem identificar alterações na PA e, por meio da ativação de uma rede de mecanismos neurais, corrigi-las (VEERMAN et al., 1995; ZENG et al., 2018). Quando há uma elevação da PA, por exemplo, os barorreceptores aumentam sua frequência de disparos, projetando-os para NTS. Esse torna-se mais excitado e, por fazer projeções com o NA, no qual contém corpos celulares de neurônios pré-ganglionares parassimpáticos, desencadeia o aumento vagal para o coração. Além disso, o NTS também se projeta para os neurônios inibitórios presentes no bulbo ventrolateral caudal (CVLM), que agem em neurônios pré-motores simpáticos presentes no RVLM, diminuindo o tônus

simpático para o coração e vasos. Desse modo, o aumento do tônus vagal e diminuição do tônus simpático causam uma redução na FC, força de contração e RVP. Essas alterações promovem, assim, o retorno dos valores anteriores da PA (BERNARROCH, 2005; GUYNET, 2006; CAMPOS, 2009).

Por outro lado, quando há uma diminuição nos níveis da pressão arterial, os barorreceptores reduzem sua frequência de disparos, diminuindo a estimulação do NTS. Esse, então, diminui o estímulo para os neurônios pré-ganglionares presentes no NA, reduzindo o tônus vagal sobre o coração. De forma paralela, o NTS deixa de estimular os neurônios depressores do CVLM. Com isso, a atividade intrínseca do RVLM não é inibida e a atividade simpática prevalece. Todos esses efeitos culminam em uma diminuição do tônus parassimpático e aumento do tônus simpático, consequentemente, elevação da PA (PILOWSKY; GOODCHILD, 2002).

A longo prazo a PA é controlada, principalmente, por uma interação entre o sistema endócrino e renal, que realizam o balanço eletrolítico e o equilíbrio dos fluidos corporais dos compartimentos intra e extracelulares. A ativação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) é um dos principais mecanismos envolvidos nesse controle. Esse sistema é composto pela enzima renina, que converte o angiotensinogênio no decapeptídio angiotensina I (ANG I) que é posteriormente clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA) no octapeptídio angiotensina II (ANGII) (DE MELO, 2017; WU et al., 2018). A AG II ativando os seus receptores de superfície celular acoplados à proteína G, AT1, causa elevação da PA por inúmeros mecanismos que incluem: ativação do sistema nervoso simpático, vasoconstrição, aumento do estresse oxidativo, proliferação celular, inflamação e ativação da resposta imune (SATOU; PENROSE; NAVAR, 2018; MILLER; ARNOLD, 2019; FERRARIO; MULLICK, 2017).

Todos esses mecanismos funcionam monitorando e ajustando a PA para valores necessários ao organismo. Entretanto, alguns indivíduos apresentam níveis de PA constantemente elevados, caracterizando o estado de hipertensão arterial sistêmica (HAS).

1.2 A fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica

A hipertensão arterial é uma condição clínica multifatorial caracterizada por um aumento sustentando nos valores de PA. Ela é classificada como primária ou

secundária, dependendo do mecanismo patogênico subjacente (POULTER; PRABHAKARAN; CAUFIELD, 2015). A hipertensão primária ou essencial representa a maioria dos casos, cerca de 90%, geralmente surge na vida adulta ou na velhice como resultado da interação entre fatores genéticos e ambientais não específicos. Em contraste com a hipertensão essencial, a hipertensão secundária afeta uma quantidade menor de pacientes, se desenvolve em uma idade mais precoce e está ligada a uma causa identificável como distúrbio renal ou endócrino e uso de contraceptivos orais (KHOR; CAI, 2017).

Sabe-se que, nessa condição, os mecanismos responsáveis pela regulação da PA como barorreflexo e/ou o SRAA estão com suas funções comprometidas, que são responsáveis, por exemplo, pela atividade exacerbada do sistema nervoso simpático (GUYNET, 2006). A hiperatividade simpática é responsável pela disfunção autonômica na hipertensão arterial, e isso foi demonstrado em modelos experimentais de hipertensão como o de ratos espontaneamente hipertensos (TAN et al., 2010), hipertensão renovascular (KHATOLI et al., 1982), ratos com hipertensão relacionados à obesidade (STOCKER et al., 2007) e induzida por DOCA-sal (YEMANE et al., 2010). Este aumento da atividade simpática contribui para desencadear e sustentar o estado hipertensivo e, consequentemente, causar danos a órgãos vitais. Além disso, o prejuízo da regulação autonômica da pressão arterial está relacionado a danos na sensibilidade do barorreflexo; causando, em indivíduos hipertensos, uma deficiência na regulação e uma maior variabilidade da PA ao longo do dia (GUYNET et al., 2018).

Diversos estudos mostram que a disfunção autonômica está relacionada com uma excessiva atividade do SRAA no cérebro e que essa condição envolve o excesso de espécies reativas de oxigênio no eixo órgão subfornical - núcleo paraventricular do hipotálamo – bulbo ventro lateral rostral (SFO-PVN-RVLM). A ativação dos receptores de ANGII nessas regiões aumenta a atividade da nicotinamida adenina dinucleotidio fosfato (NADPH) oxidase, induzindo a produção de EROs, especialmente o ânion superóxido (O_2^-). A geração EROs no SNC induzida por ANGII também resulta na diminuição da sensibilidade do barorreflexo. A superativação do SRAA periférico também está relacionada com o aumento do estresse oxidativo e a elevação da pressão arterial. Dessa forma o estresse oxidativo é um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento da hipertensão (GUYNET, 2006; GUYNET et al., 2018; QUEIROZ; MONTEIRO; BRAGA, 2013)

No intuito de elucidar os diversos mecanismos responsáveis pela fisiopatologia da hipertensão, diversos modelos foram desenvolvidos ao longo do tempo. Dentre estes, destacam-se os animais espontaneamente hipertensos (SHR), que possuem características comuns à hipertensão essencial humana como, por exemplo, a hiperatividade simpática (FOLKOW, 1982; FROHLICH E PFEFFER, 1975) e a perda da sensibilidade do barorreflexo (GIROUARD et al., 2004).

Dessa forma, esse modelo, que é um dos mais estudados pela literatura pertinente, torna-se uma boa escolha para investigação de novas formas de tratamento e dos mecanismos envolvidos nessa desordem (FAZAN; SILVA; SALGADO, 2001).

1.3 A hipertensão arterial sistêmica: epidemiologia e farmacoterapia

Segundo as últimas diretrizes brasileiras de hipertensão arterial, o paciente é considerado hipertenso quando, após exames repetidos, apresentar PA sistólica e diastólica superior ou igual a 140 e 90 mmHg, respectivamente. A verificação deve ser por meio de técnicas corretas; mais de uma vez em ocasiões diferentes No Brasil, cerca de 33% (36 milhões) de indivíduos adultos são hipertensos. Entre os idosos, esse número chega a 60%, contribuindo de forma direta ou indireta para 50% das mortes por DCV. Além disso, as complicações geradas pela hipertensão têm um impacto elevado na produtividade do trabalho e renda familiar, bem como um alto custo socioeconômico com internações, sendo necessário, pois, o estabelecimento de medidas para reduzir a ocorrência dessa desordem na população (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2021).

Determinantes comuns da hipertensão primária incluem envelhecimento, obesidade, resistência à insulina e ingestão excessiva de sal, calorias e álcool. Alguns estudos demonstram que o diagnóstico correto seguido da adesão ao tratamento e controle da HAS são fundamentais para que os danos ao sistema cardiovascular sejam reduzidos. As abordagens terapêuticas consistem em: medidas não farmacológicas; apesar de serem limitadas pela perda de adesão a médio e longo prazo; e uso de medicamentos anti-hipertensivos. Os principais grupos destes últimos são: (I) agentes diuréticos; (II) antagonistas adrenérgicos; (III) inibidores da enzima conversora de angiotensina; (IV) antagonistas dos receptores AT₁ (V) bloqueadores

dos canais para Ca^{2+} (VI) antagonistas dos receptores adrenérgicos; (VII) vasodilatadores (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2021).

Apesar de diversos medicamentos disponíveis para o tratamento da HAS, existem casos de pacientes hipertensos considerados resistentes ou de difícil tratamento e até mesmo o uso de múltiplos fármacos não é suficiente para manter a PA em níveis adequados. No Brasil, cerca de apenas 30% dos hipertensos tem controle efetivo da pressão arterial. Além disso, a utilização crônica de diversos medicamentos pode causar efeitos colaterais e adversos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2021).

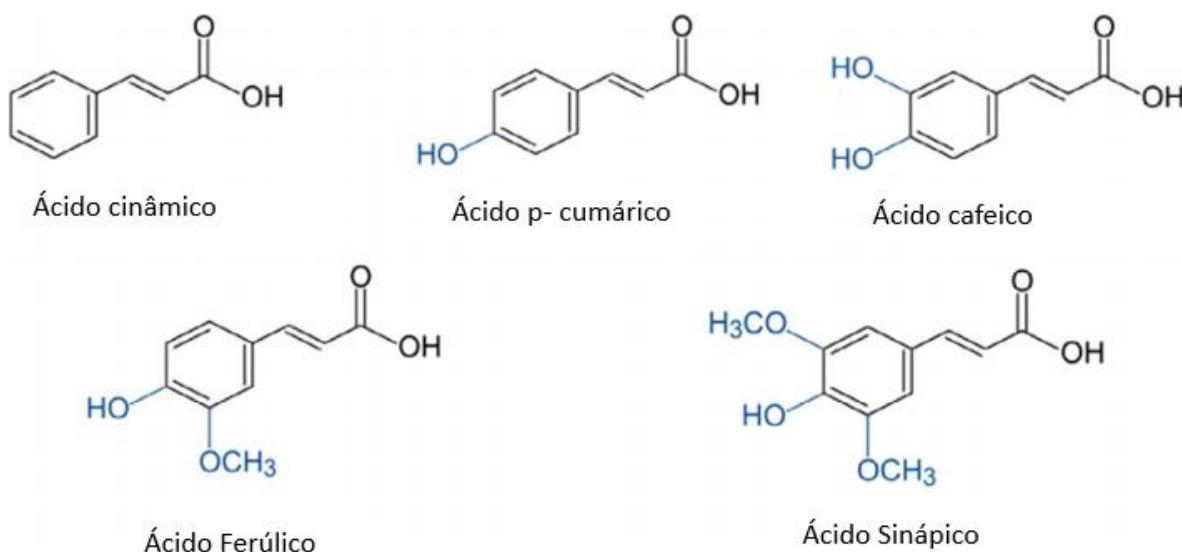
Dessa forma, é fundamental a descobertas de novas abordagens de tratamento. Nesse contexto, novas moléculas, naturais e sintéticas, vem sendo estudadas na modulação da pressão arterial. Dentre elas, os compostos fenólicos, como os da família dos ácidos hidroxicinâmicos, destacam-se por serem potentes antioxidantes.

1.4 Os ácidos hidroxicinâmicos e seus efeitos contra a hipertensão

Os ácidos fenólicos são geralmente divididos em dois grupos: os ácidos benzoicos, que contem 7 átomos de carbono, e os ácidos cinânicos possuindo 9 átomos de carbonos. Estes compostos podem existir como ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos, respectivamente (KRON, 1999; SHAIDI, 2010).

Os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 01) pertencem à classe de ácidos fenólicos com ácidos carboxílicos bioativos; a classe inclui principalmente ácido cumárico ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sinápico (NICIFOROFIC; ABROMOVIC, 2014; BENZEL, 2003). A estabilidade de ressonância presente no anel fenólico dessas moléculas pode, por exemplo, fazer com que eles consigam doar seu átomo de hidrogênio para neutralização dos radicais livres. Isso faz desses compostos moléculas importantes na busca de novas alternativas terapêuticas contra diversas doenças, principalmente, as que envolvem um aumento do estresse oxidativo como a hipertensão arterial. A quantidade de grupos hidroxilos também está relacionada por sua capacidade antioxidante (RICE EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Figura 1. Ácidos hidroxicinâmicos



Legenda: A figura mostra os ácidos hidroxicinâmicos. Na parte superior, da esquerda para à direita: ácido cinâmico, ácido p-cumárico, ácido cafeico. Na parte inferior, da esquerda para à direita: ácido ferúlico e o ácido sinápico.

Fonte: Adaptado de Comam, 2019

O ácido cafeico possui dois grupos hidroxilas presentes no anel aromático e parece ser, dentro do grupo, o com maior atividade antioxidante, explicada pela ligação de hidrogênio intramolecular, que ocorre em fenóis orto-substituídos (RAZAGUI et al., 2013). Anguloe et al (2019) mostraram que o ácido cafeico possui atividade anti-hipertensiva e que, possivelmente, o mecanismo que envolve esse efeito é a inibição da ECA, pela interação entre o grupo hidroxila e carboxila do ácido cafeico com resíduos funcionais dessa enzima.

A metoxilação de um dos grupos orto-hidroxila diminui a capacidade de eliminar os radicais livres do ácido férulico, quando comparado ao ácido sinápico, porém, ainda assim, essa atividade é mais potente que o do ácido cumaríco. Essa metoxilação interage com grupos sulfidrila da NADPH oxidase e inibe a atividade dessa enzima; e isso explica efeito anti-hipertensivo do ácido férulico em ratos SHR (KIKUZAKI et al., 2002; RAZAKI et al., 2013; ALAM et al., 2019)

O ácido sinápico possui dois grupos metoxil vizinhos; isso permite uma atividade antioxidante mais potente em relação ao ácido férulico, porém ainda inferior ao ácido cafeico (COMAN; VODNAR et al., 2019) Apesar do ácido sinápico apresentar

algumas atividades cardiovasculares já descritas na literatura, são poucos os estudos a respeito do seu efeito na modulação da pressão arterial e os mecanismos envolvidos no mesmo.

1.5 Ácido sináptico e seu efeito cardioprotetor

O ácido sináptico (AS) é um dos quatro ácidos hidroxicinâmicos mais conhecidos e comumente encontrado no reino vegetal (COMAN; VODNAR, 2020), como mostrado no tópico anterior (Figura 1). A comunidade científica vem demonstrando grande interesse por esse composto devido, principalmente, a sua potente ação antioxidante (COS et al., 2002); atividades anti-inflamatória (YUN et al., 2008); e anti-hipertensiva (SILAMBARASAN et al., 2014).

Além disso, um estudo realizado por Bin Jarden e colaboradores (2020) demonstrou o efeito cardioprotetor do ácido sináptico em ratos Wistar com cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina (DOX). O tratamento foi capaz de melhorar o índice cardíaco, e reduzir a atividade de enzimas como lactato desidrogenase (LDH) e creatina cinase-MB (CK-MB), as quais foram aumentadas significativamente com a administração de DOX. O ácido sináptico também foi capaz de diminuir significativamente os níveis de mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina 1 (IL-1) e mieloperoxidase (MPO).

Roy e colaboradores (2013) também demonstraram o papel cardioprotetor do AS; desta vez com um modelo de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol (ISO) em ratos Wistar. Nesse estudo o AS restabeleceu os níveis séricos de troponina T, triglicérides, colesterol total, ácidos graxos livres e LDL-colesterol, VLDL-colesterol, HDL-colesterol, os quais foram alterados de forma significativa com a administração de ISO.

Um estudo mostrou que o AS foi capaz de reduzir a nefrotoxicidade em ratos Wistar que receberam cisplatina. O mecanismo proposto foi por ativação dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ) sendo o AS, portanto, um possível agonista desses receptores (SINGH, H; SINGH, T; SINGH, R, 2020). Vale ressaltar que esses receptores estão envolvidos na regulação da função vascular e PA (DE SILVA et al., 2018).

Com relação à modulação da pressão arterial, o AS foi capaz de diminuir a PA sistólica em ratos Wistar que receberam o éster metílico de N-nitro-L-arginina (L-

NAME) (SILAMBARASAN et al., 2014). Em outro estudo, o tratamento com AS associado ao Captopril em ratos Wistar, que receberam o L-NAME, foi capaz de diminuir a PA, diminuir o estresse oxidativo e a hipertrofia cardíaca (ALDUBAYAN et al., 2020).

Diante do exposto, a nossa hipótese é de que o ácido sináptico é capaz de reduzir a pressão arterial em animais espontaneamente hipertensos, além de melhorar a disautonomia e a disfunção do barorreflexo presente nesses animais.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos cardiovasculares do ácido sináptico em ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Ensaios *in vivo* e bioquímicos

- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com o ácido sináptico sobre:
 - A pressão arterial média e frequência cardíaca;
 - A função autonômica simpática e parassimpática;
 - A sensibilidade do barorreflexo;
 - O estresse oxidativo sérico.

.

2.2.2 Ensaios *in silico*

- Analisar o perfil de biodisponibilidade oral do ácido sináptico;
- A toxicidade, revelando parâmetros teóricos sobre seu perfil de absorção, distribuição, metabolização e excreção;
- O perfil mutagênico;
- Possíveis atividades do ácido sináptico sobre o sistema cardiovascular.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

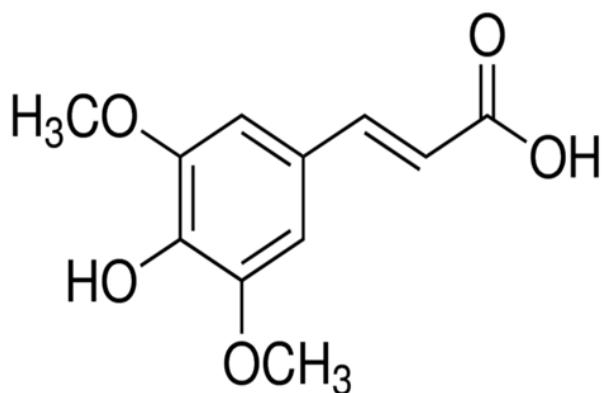
Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar Kyoto (WKY) com 12 semanas de idade provenientes da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisas em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (4 animais/gaiola), com água filtrada e ração *ad libitum* (Labina, Purina Agribands). E mantidos em ciclo claro escuro de 12h e com temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade controladas. Todos os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB sob parecer nº 3701150420 (ANEXO 1)

3.2 Substância teste e tratamento

O ácido sinápico, um composto sintético, foi adquirido da Sigma-Aldrich® (Brasil). O composto foi solubilizado em Tween 80 a 20% e diluído para dose de 40 mg/kg. A dose foi escolhida baseada no estudo de Silambarasan et al (2014) e preparada diariamente para a realização do tratamento)

Figura 2. Estrutura química do ácido sinápico

IUPAC: Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico. Massa molar: 224,2g/mol. Fórmula molecular: C₁₁H₁₂O₅



Fonte: Sigma-Aldrich®

Os animais foram divididos em quatro grupos: 1. Normotenso+ veículo (WKY CTRL); 2. Normotenso + Ácido sináptico (WKY AS); 3. Hipertenso + veículo (SHR CTRL); e 4. Hipertenso + Ácido sináptico (SHR AS). O ácido sináptico foi administrado por gavagem durante 14 dias, no 14º dia foi realizada a cirurgia de implantação dos cateteres vasculares para realização do registro 24 horas após.

3.3 Drogas utilizadas

Foram utilizadas as seguintes substâncias: heparina (Parinex® 5000 U.I/ml - Laboratório Hipolabor Brasil); cloridrato de cetamina (Quetamina® Laboratório – Vettinil, Brasil); xilazina (Dopaser - Laboratório Calier, Espanha); cloridrato de I (-) fenilefrina (FEN); nitroprussiato de sódio (NPS); atropina; cloreto de hexametônio; ácido tiobarbitúrico (TBA) e ácido perclórico. Todas foram obtidas da Sigma-Aldrich®

3.4 Implantações de cateteres vasculares para registro a pressão arterial e frequência cardíaca

Um dia antes dos registros de pressão arterial, os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg, i.p.) e cetamina (80 mg/Kg, i.p.) e em seguida foram implantados os cateteres de polietileno (PE₁₀ conectado ao PE₅₀) na artéria e veia femoral, para registro da pressão arterial e infusão de drogas, respectivamente. Os cateteres foram exteriorizados subcutaneamente ao nível escapular para facilitar a conexão do cateter ao transdutor e em seguida os animais receberam uma injeção de cetoprofeno (5 mg/kg, i.p.) para prevenir processos inflamatórios. Após a cirurgia, os animais permaneceram em recuperação por 24 h até o início dos experimentos.

O registro da PA e da frequência cardíaca (FC) foi realizado 24 horas após o procedimento cirúrgico em animais não anestesiados por meio da conexão da cânula da artéria femoral com o transdutor mecanoelétrico de pressão, cujo sinal foi devidamente amplificado (ML866/P, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Australia), digitalizado por meio de uma interface analógico/digital e amostrado a 2000 Hz em um microcomputador equipado com um software apropriado (LabChartTM Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália), para posterior análise. A pressão arterial média (PAM) e FC foram derivadas da pressão arterial pulsátil (PAP) por meio deste sistema de aquisição:

$$I_s = \frac{\Delta FC}{\Delta PAM}$$

- I_s = Índice de sensibilidade;
- ΔFC = Variação da FC (batimento/min)
- ΔPAM = Variação da PAM (mmHg);

3.5 Avaliação da função autonômica

No intuito de avaliar a função autonômica dos animais, foram administradas, intravenosamente, as seguintes drogas: hexametônio (30 mg/Kg), antagonista colinérgico ganglionar, a fim de avaliar a função autonômica simpática; a atropina (2 mg/Kg), um bloqueador colinérgico muscarínico, com o objetivo de avaliar a função autonômica parassimpática. As alterações na PAM ou FC promovidas por estas drogas foram comparadas entre os diferentes grupos.

3.6 Avaliação da sensibilidade do barorreflexo

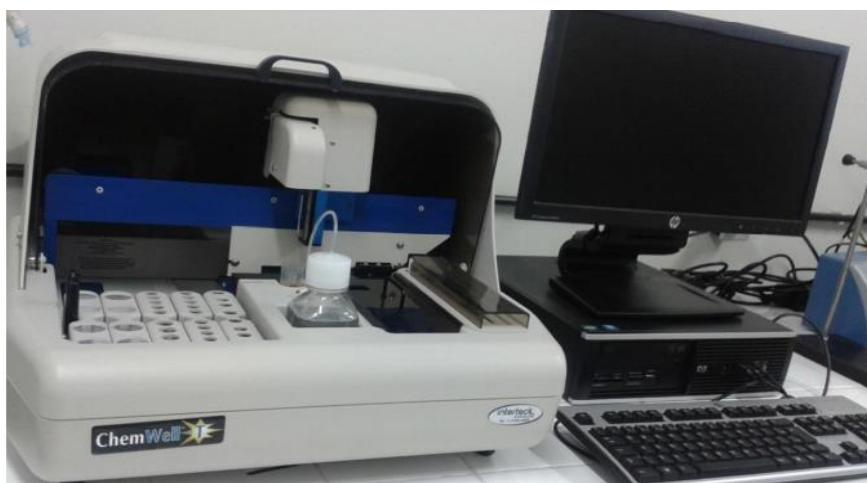
Diversos métodos são utilizados para avaliar experimentalmente esta variável, dentre eles, o mais frequente trata-se do método de Oxford que consiste na ativação do barorreflexo por drogas vasoativas, o que permite verificar as mudanças na frequência cardíaca em resposta a manipulações farmacológicas que aumentam ou diminuem a pressão arterial (BRAGA et al., 2008). O índice de sensibilidade do barorreflexo é um método bastante utilizado na literatura para se avaliar a responsividade, ou seja, o ganho do barorreflexo (Farah, et al. 2009), sendo determinado pela seguinte fórmula:

Nesse estudo, o ganho do barorreflexo foi avaliado em todos os grupos de ratos como resposta a injeções (*in bolus*) de fenilefrina (8 µg/kg) nitroprussiato de sódio (25 µg/kg). A fenilefrina foi utilizada para avaliar o componente parassimpático do barorreflexo cardíaco enquanto que o nitroprussiato de sódio foi empregado para avaliar o componente simpático do barorreflexo cardíaco. Todos os dados de cada grupo foram analisados por regressão linear usando o programa GraphPad Prism e o slope da regressão linear forneceu o ganho do barorreflexo de cada grupo.

3.7 Avaliação do 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 vermelho, o que funciona como um indicador do estresse oxidativo sérico. Portanto, depois de coletadas as amostras de sangue dos animais foram centrifugadas a 2000 g, 4º C, durante 15 min para a obtenção do soro, posteriormente 250 µL do soro foi aquecido à 37 °C por 1 hora. Em seguida, 400 µL de ácido perclórico (35%) foram adicionados, misturado e centrifugado a 600 g, 4º C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, e adicionado a 400 µL do ácido tiobarbitúrico (0,6%), a mistura foi aquecida a 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.

Figura 3. Espectrofotômetro.



Fonte: Cavalcante, 2016

3.8. Estudos *in silico*

A investigação teórica das características do ácido sináptico foi em colaboração com o Profº Drº Abrahão Alves de Oliveira Filho realizada sob posse de um computador com a utilização de softwares que calculam as propriedades moleculares com base em descritores moleculares. Software Molinspiration Online Property Calculation Toolkit (www.molinspiration.com/), e os parâmetros relacionados à absorção, toxicidade e metabolização foram avaliados pela ferramenta admetSAR (<http://lmmecust.ecust.edu.cn:8000/>).

3.9. Molinspiration

As propriedades moleculares foram calculadas com base em descritores moleculares, utilizando a regra dos cinco de Lipinski no software *Molinspiration Online Property Calculation Toolkit* (www.molinspiration.com/). Essa regra traça um perfil para moléculas de fármacos dentro de limites de massa molar e lipofilia, que é representada pelo coeficiente de partição, log P, e hidrofilia, representada pelo número de doadores e receptores de ligação de hidrogênio.

A regra dos cinco estabelece alguns parâmetros estruturais relevantes para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral. Esta biodisponibilidade está associada à absorção e a permeabilidade de possíveis fármacos e depende de cinco parâmetros: (a) número de grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH) menor ou igual a 10; (b) número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) menor ou igual a 5; (c) massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g/mol; (d) coeficiente de partição octanol-água (milog P) menor ou igual a 5; (e) área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 Å. As moléculas que não atendem mais do que uns destes parâmetros podem ter problemas com a biodisponibilidade (SILVA, 2015).

3.10 AdmetSAR

Os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos teóricos (ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) foram calculados com o objetivo de analisar se o ácido sináptico possui as características essenciais para ser considerado um possível fármaco. Alguns parâmetros relacionados à absorção,

toxicidade e metabolismo foram avaliados pela ferramenta admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/>) (SOUZA, 2015). Esses parâmetros são permeabilidade da barreira hematoencefálica, permeabilidade Caco-2, absorção no intestino, se são substratos e inibidores das enzimas do complexo citocromo e se são inibidores de transporte renal de cátions. Através desta ferramenta, avaliou-se o metabolismo, utilizando algumas enzimas do complexo citocromo P450, e foi comparado se a substância é substrato para os citocromos CYP450 2D6, CYP450 3A4, CYP450 2C9, se é inibidor dos citocromos CYP450 1A2, CYP450 2C9, CYP450 2D6, CYP450 2C19, CYP450 3A4 assim como a promiscuidade de inibição dos citocromos.

3.11 Testes farmacológicos

Para a análise das propriedades farmacológicas do ácido sináptico foi utilizado o software gratuito PASS online®. A previsão do espectro de atividade para substâncias - PASS online® é um software gratuito que objetiva avaliar o potencial biológico de uma molécula orgânica quando em contato com o organismo humano. Por meio deste, é possível ter previsões simultâneas de múltiplos tipos de atividades biológicas com base na estrutura dos compostos orgânicos, além de permitir estimar o potencial de atividade de uma substância, podendo esta ser classificada como índices Pa (probabilidade "de ser ativo") e Pi (probabilidade "de ser inativo"), podendo ser acessado pelo endereço: (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>) (SRINIVAS et al., 2014).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m) e foram analisados por ANOVA One Way, seguido do pós-teste de Tukey. Para examinar as correlações entre algumas variáveis foi realizado o teste de correlação com coeficiente de Pearson (r), . Os dados foram analisados por meio do software GraphPad Prism® 7.0 (Califórnia, EUA). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

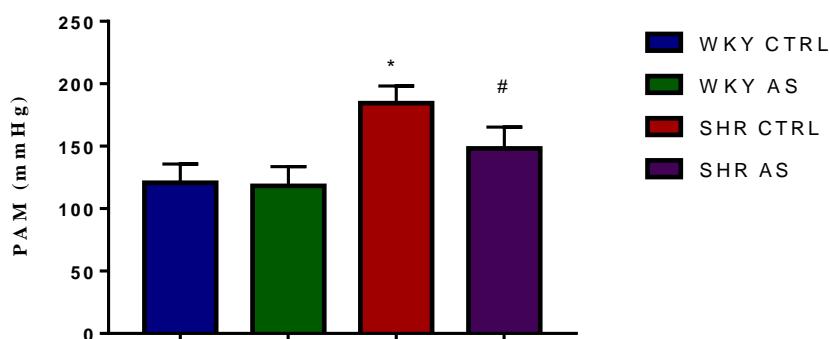
RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos do tratamento oral com o ácido sinápico sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos

Como esperado, observamos que os níveis da pressão arterial média do grupo SHR foram superiores aos do grupo WKY ($184,5 \pm 6,114$ vs. $120,66 \pm 5,57$ mmHg, $p < 0,05$). Além disso, ao compararmos os valores de PAM do grupo SHR CTRL com os do grupo SHR AS ($184,5 \pm 6,114$ vs. $148,3 \pm 5,39$ mmHg, $p < 0,05$), é possível notar que o tratamento por 14 dias com o AS foi capaz de reduzir a pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (gráfico 1).

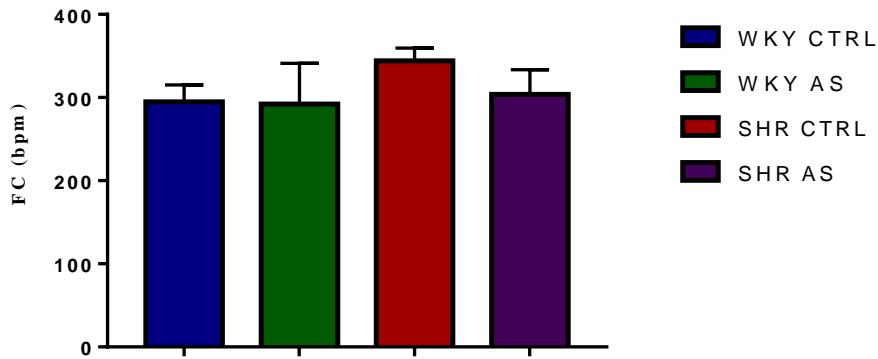
Gráfico 1. Efeito do tratamento oral com o AS sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos WKY e SHR.



As barras verticais representam a média \pm e.p.m, onde * ($p < 0,05$ vs. WKY) e # ($p < 0,05$ vs. SHR). WKY, $n=6$; WKY+ AS $n=6$; SHR CTRL $n=6$; SHR+AS, $n=10$. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

Não houve diferença significativa na FC entre o grupo WKY+ AS e seu controle (292 ± 20 versus $294,6 \pm 8$ bpm) nem entre os grupos SHR+ AS e seu controle (303 ± 9 versus 344 ± 6 bpm) (Gráfico 2).

Gráfico 2. Efeito do tratamento oral com o AS sobre a frequência cardíaca (FC).

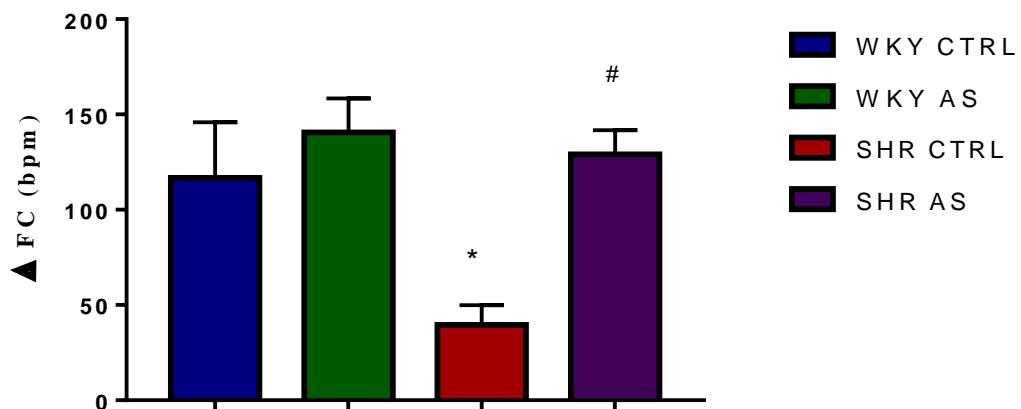


As barras verticais representam a média \pm e.p.m, onde * ($p < 0,05$ vs. WKY) e # ($p < 0,05$ vs. SHR). WKY, n=6; WKY+ AS n=6; SHR CTRL n=6; SHR+AS, n=10. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

5.2 Efeitos do tratamento oral com o ácido sináptico na função autonômica em ratos WKY E SHR

Observamos que o grupo SHR controle apresentou um Δ FC inferior ao observado para o grupo WKY (+39 \pm 5,2 vs. +116,6 \pm 17 bpm, respectivamente; $p < 0,05$), O tratamento oral com o AS (40 mg/Kg/dia) foi capaz de melhorar significativamente este componente (39 \pm 5,2 vs. +129 \pm 6 bpm , $p < 0,05$)

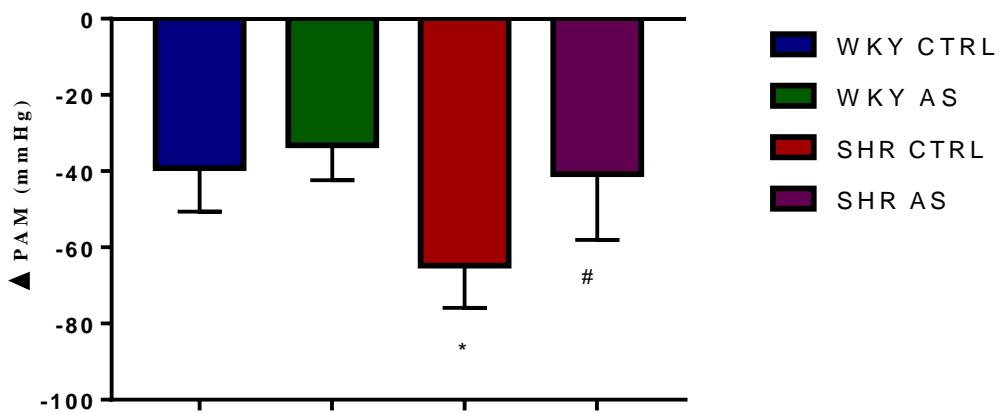
Gráfico 3 – Influência do tratamento oral com o AS no controle autonômico parassimpático



As barras verticais representam a média \pm e.p.m onde * ($p < 0,05$ vs. WKY) e # ($p < 0,05$ vs. SHR). WKY, n=3; WKY AS, n=4; SHR, n=4; SHR AS, n=5. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

A administração do hexametônio no grupo SHR induziu a uma maior diminuição dos valores de PAM, quando comparado aos animais WKY ($-64,83 \pm 4,5$ vs. $-39,2 \pm 5,1$ mmHg, $p < 0,05$), demonstrando a hiperatividade simpática no grupo. O tratamento com o AS no grupo SHR+AS preveniu esse efeito ($-40,8 \pm 7,7$; $p < 0,05$), igualando-se estatisticamente ao grupo WKY. Este dado sugere que o tratamento oral com o AS (40 mg/Kg/dia) é capaz de diminuir a hiperatividade simpática presente nos animais espontaneamente hipertensos.

Gráfico 4 - Influência do tratamento com o ácido sináptico no controle autonômico simpático.

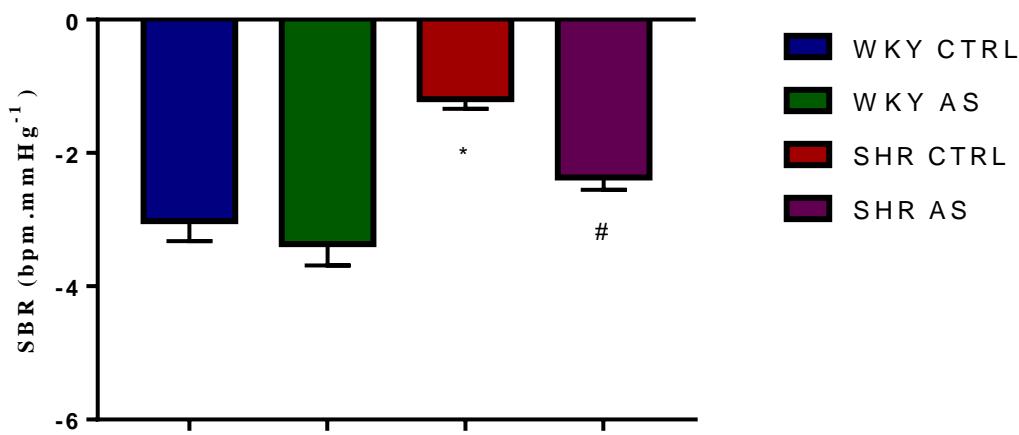


As barras verticais representam a média \pm e.p.m, onde * ($p < 0,05$ vs. WKY). WKY, n=5; WKY AS, n=5; SHR, n=6; SHR AS, n=5. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

5.3 Efeitos do tratamento com o ácido sináptico na sensibilidade do barorrelexo de ratos WKY E SHR

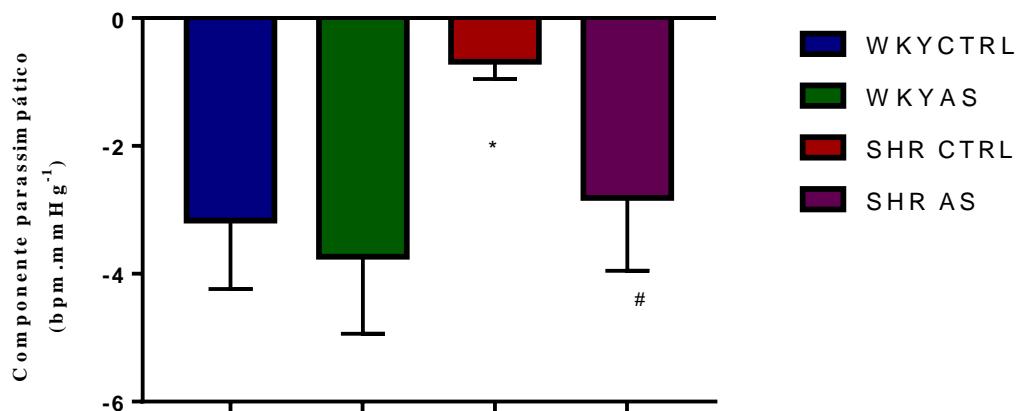
O barorreflexo dos animais foi avaliado pela injeção intravenosa de fenilefrina (FEN = 8 μ g/kg) e nitroprussiato (NPS = 25 μ g/kg). Os ratos SHR apresentaram diminuição na sensibilidade do barorreflexo, quando comparados aos ratos WKY ($-1,192 \pm 0,1441$ vs. $-3,025 \pm 0,2972$ bpm/mmHg, respectivamente, $p < 0,05$). O tratamento com o AS melhorou a sensibilidade do barorreflexo nos animais SHR ($-1,192 \pm 0,1441$ vs. $-2,366 \pm 0,1885$ bpm/mmHg, $p < 0,05$).

Gráfico 5. Efeito do tratamento com o AS sobre a sensibilidade do barorreflexo induzido por drogas vasoativas em ratos WKY e SHR.

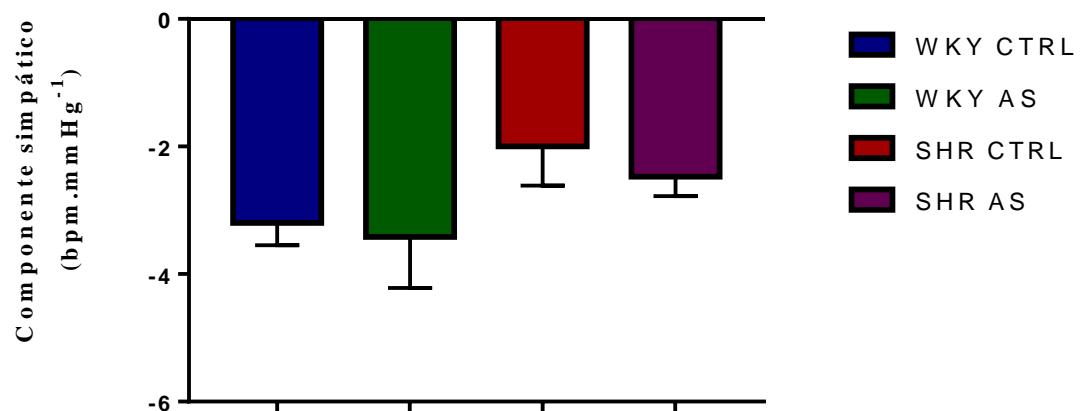


As barras verticais representam a média \pm e.p.m do slope de cada grupo, obtido pela $\Delta FC/\Delta PAM$, onde * ($p < 0,05$ vs. WKY) e # ($p < 0,05$ vs. SHR). WKY, n=3; WKY AS, n=6; 2R1C, n=6; SHR AS, n=8. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

Analizando os componentes do barorreflexo separadamente, verifica-se que o ácido sináptico restaura a sensibilidade do barorreflexo em ratos SHR por melhorar a resposta ao componente parassimpático ($-0,683 \pm 0,111$ versus $-2,814 \pm 0,430$ bpm/mmHg, $p < 0,05$). Por outro lado, não houve diferença significativa em relação ao componente simpático ($-2 \pm 0,274$ e $-2,47 \pm 0,115$ bpm/mmHg, $p > 0,05$) desses animais. O tratamento não promoveu alterações em ambos os componentes do barorreflexo de ratos normotensos: componente simpático ($-3,2 \pm 0,2$ versus $-3,4 \pm 0,327$, $p > 0,05$); componente parassimpático ($-3,167 \pm 0,617$ e $-3,773 \pm 0,492$; $p > 0,05$).

Gráfico 6. Componente parassimpático do barorreflexo

O componente parassimpático foi avaliado utilizando a fenilefrina 8 µg/kg. As barras verticais representam a média ± e.p.m do slope de cada grupo, obtido pela razão $\Delta FC / \Delta PAM$, onde * ($p < 0,05$ vs. WKY) e # ($p < 0,05$ vs. SHR). WKY, n=3; WKY AS, n=6; 2R1C, n=6; SHR AS, n=8. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

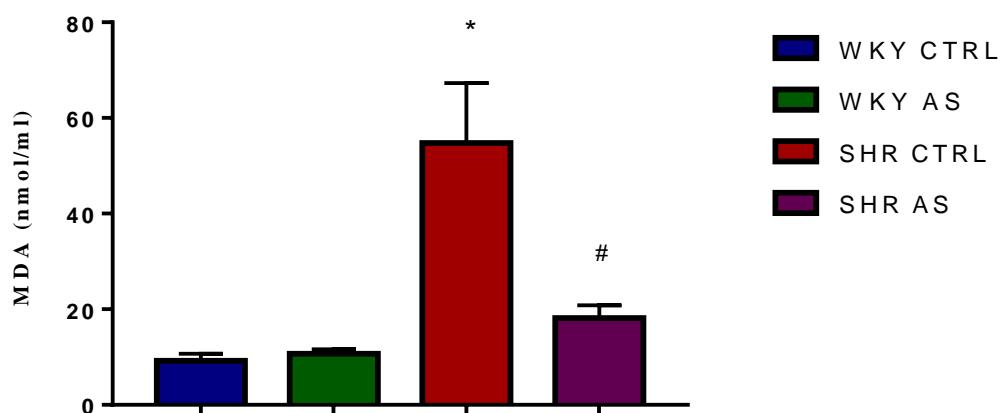
Gráfico 7. Componente simpático do barorreflexo

O componente simpático foi avaliado utilizando o (NPS = 25 µg/kg). As barras verticais representam a média ± e.p.m do slope de cada grupo, obtido pela $\Delta FC / \Delta PAM$, onde * ($p < 0,05$ vs. WKY) e # ($p < 0,05$ vs. SHR). WKY, n=3; WKY AS, n=6; 2R1C, n=6; SHR AS, n=8. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey

5.4 Efeito do tratamento oral com o ácido sináptico no estresse oxidativo sérico de ratos SHR E WKY

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 mostrado no gráfico, o grupo SHR controle apresentou maiores concentrações de MDA quando comparado ao WKY ($54,75 \pm 6,2$ vs. $9,2 \pm 0,735$ nmol/ml, $p < 0,05$), sugerindo um maior estresse oxidativo sérico nos animais espontaneamente hipertensos. O tratamento oral com o AS durante 14 dias foi capaz reduzir significativamente o estresse oxidativo ($54,75 \pm 6,2$ vs. $18,1 \pm 1,3$ nmol/ml, $p < 0,05$)

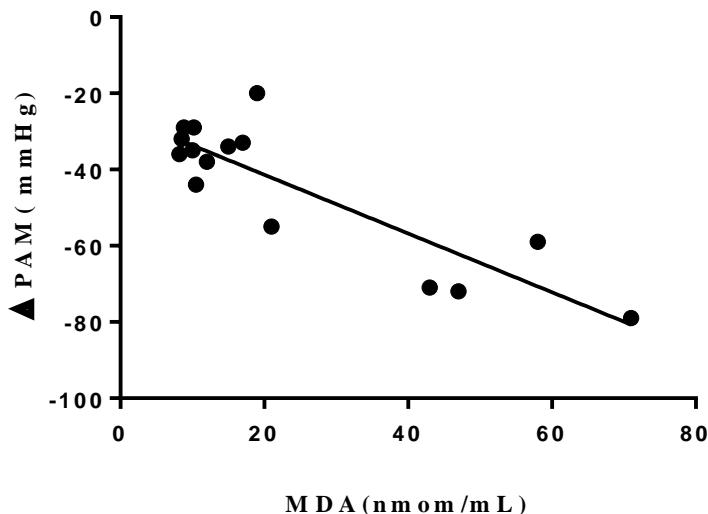
Gráfico 8. Influência do tratamento com o ácido sináptico sobre o estresse oxidativo sérico



As barras verticais representam a média \pm e.p.m, onde * ($p < 0,05$ vs. WKY). WKY, n=4; WKY +AS, n=4; SHR, n=4; SHR+AS, n=5. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey

Dados da literatura sugerem que o aumento do estresse oxidativo, principalmente no RVLM, está relacionado a hiperatividade simpática. Com base nisso, usamos o coeficiente de Pearson para investigar se existe essa relação nos grupos estudados no nosso trabalho. Ao observar o gráfico 10, notamos que a redução do estresse oxidativo está relacionada com a diminuição da atividade simpática ($r = -0,8645$).

Gráfico 9. Correlação de Pearson entre o estresse oxidativo sérico e atividade simpática



O eixo das abscissas representa a concentração de MDA sérico dos animais e o eixo das ordenadas a variação da pressão arterial média após o uso do hexametônio. Cada ponto representa um animal, o n total de animais é de 37. (Slope $-0,7709 \pm 0,1243$ r= - 8645; p<0,05).

5.5 Estudo *in silico*

As propriedades moleculares do AS calculadas no software *Molinspiration* são representadas na tabela 1. A substância demonstrou boa biodisponibilidade teórica por via oral, uma vez que atendem aos requisitos preconizados pela — “Regrados cinco” de Lipinski. Segundo esta regra, ao atender 3 dos 4 parâmetros (miLogP, MM, nALH e nDLH), a substância provavelmente terá uma boa biodisponibilidade quando administrada por via oral.

A regra dos cinco de Lipinski afirma que a maioria das moléculas “semelhantes a drogas” deve ter coeficiente de partição octanol/água $\log P \leq 5$, peso molecular ≤ 500 (Da), número de receptores de ligação de hidrogênio (nALH) ≤ 10 , número de doadores de ligação de hidrogênio (nDLH) ≤ 5 , Área de Superfície Polar Total (TPSA) $\leq 140 \text{ \AA}^2$ e com ligações de rotativas (nrotb) ≤ 10 (PARAMASHIVAM et al., 2015; DEGE et al., 2020).

Tabela 1. Propriedades moleculares do AS calculadas no software *Molinspiration*

miLogP	MM	nALH	nDLH	nvioolações	TPSA	nrotb
1,26	224,21	5	2	0	76	4

A molécula com pontuação de bioatividade superior a 0,00 é susceptível a possuir atividades biológicas consideráveis, valores de -0,50 a 0,00 devem ser moderadamente ativos e se o escore for inferior a -0,50, presume-se ser inativo (PARAMASHIVAM et al., 2015; DIRAR et al., 2016). Diante disso, o AS apresenta probabilidade teórica de possuir atividade biológica frente à ligação de GPCR (-0,32), como modulador de canal iônico (ICM) (-20), inibidor de cinase (KI) (-0,47), ligante de receptor nuclear (NRL) (-0,03), e inibidor de enzimático (-0,03) (EI). Já em relação a atividade inibidor protease, o AS apresentou escore superior a -0,50 (-0,56) como foi analisado teoricamente pelo programa *Molinspiration*.

Tabela 2. Predição de bioatividades calculadas no *Molinspiration* para o ácido sináptico

Ligante GPCR	Modulador de canal iônico	Inibidor de cinase	Ligante de receptor nuclear	Inibidor de protease	Inibidor enzimático
-0,32	-0,2	-0,47	-0,03	-0,56	0,03

As tabelas a seguir abordam as propriedades previstas para o AS, tais como absorção, distribuição, metabolismo e perfil de toxicidade. Ao observar as propriedades de AS na tabela podemos notar que ele, possivelmente, apresentará a capacidade de sofrer absorção através da barreira hematoencefálica e do intestino humano, e possui permeabilidade teórica em Caco-2, que é uma linha celular de câncer epitelial do cólon humano usada para estimar a permeabilidade intestinal humana *in vitro* do fármaco em comparação com enterócitos humanos. Mostrou-se como não substrato da glicoproteína P, bem como não inibidor. Também não é inibidor do transporte renal de cátions orgânicos, em teoria. Metabolicamente, AS mostrou-se não ser substrato das enzimas microssomais do complexo Citocromo P450, e não inibidor das CYPS, com baixa promiscuidade inibitória.

Para os parâmetros de toxicidade foi possível observar que, teoricamente, o composto avaliado é fraco inibidor do gene codificador de canais de potássio (HERG), não tóxico pelo teste AMES, classificado como não carcinogênico, não prontamente biodegradável e a categoria de toxicidade oral aguda foi III, que inclui compostos com DL50 de valores superiores a 500 mg/kg e inferiores a 5000 mg/kg, com uma possível DL50 teórica para toxicidade aguda em ratos de 2.2035 mol/kg (Tabela 3).

Tabela 3. Tabela das propriedades ADMET para Ácido sináptico.

Modelo	Resultado	Probabilidade
Absorção		
Barreira hematoencefálica	BBB+	0.5785
Absorção intestinal humana	HIA+	0.9578
Permeabilidade em Caco-2	Caco 2+	0.7324
Substrato da glicoproteína P	Não substrato	0.5655
Inibidor da glicoproteína P	Não inibidor	0,873
	Não inibidor	0,8588
	Não inibidor	
Transporte renal de cátions orgânicos		
Distribuição		
Localização celular	Mitocôndria	0.8118
Metabolismo		
Substrato CYP450 2C9	Não substrato	0.7999
Substrato CYP450 2D6	Não substrato	0.8919
Substrato CYP450 3A4	Não substrato	0.6052
Inibidor CYP450 1A2	Não inibidor	0,8445
Inibidor CYP450 2C9	Não inibidor	0.8380
Inibidor CYP450 2D6	Não inibidor	0.9297
Inibidor CYP450 2C19	Não inibidor	0.7182
Inibidor CYP450 3A4	Não inibidor	0,8748
Promiscuidade Inibitória do CYP	Promiscuidade Inibidora baixa do CYP	0.5320
Toxicidade		
HERG	Fraco inibidor	0.9815
Inibição genética	Não inibidor	0.9688
Toxicidade no teste de AMES	Não tóxico em AMES	0.9023
Carcinógeno	Não carcinogênico	0.8848
Toxicidade em peixes	Alta toxicidade	0.9388
Herk	Fraco inibidor	0,9815
Toxicidade AMES	Não toxic	0,9023
Carcionogenio	Não carcinogenio	0,8848
Inibidor de gene	Não inibidor	0,9688
	Alta toxicidade	0.9804
Toxicidade em Tetrahymena Pyriformis		

		Valor	Unidade
Toxicidade da abelha do mel	Baixa toxicidade	0,7902	
Biodegradação	Facilmente biodegradavel	0,5854	
Toxicidade aguda oral	III	0,455	
Modelo			
Absorção			
Solubilidade aquosa	-2,5763	LogS	
Permeabilidade em Caco-2	0,8099	LogPapp, cm/s	
Toxicidade			
Toxicidade Aguda em ratos	2,2035	LD50, mol/kg	
Toxicidade em peixes	1,1446	pLC50, mg/L	
Toxicidade em Tetrahymena Pyriformis	1,1128	pIGC50, ug/L	

Na análise do potencial biológico de uma molécula orgânica, quando em contato com o organismo humano, o ácido sináptico revelou uma probabilidade de que as moléculas fossem semelhantes a fármacos com 12 atividades sobre o sistema cardiovascular, sobretudo: antiinflamatória (Pa: 0,612 e Pi: 0,029), antagonista dos canais de calcio (Pa: 0,237 e Pi: 0,019), cardioprotetor (Pa: 0,379 e Pi: 0,034) e vasodilatador (Pa: 0,414 e Pi: 0,035); em que Pa e Pi variam em uma escala de 0 a 1, quanto mais próximo de 1 for o valor de Pa ou Pi indica a probabilidade de ser ativo ou inativo e executar ou não seu efeito, conforme descrito na tabela.

Tabela 4. Atividades farmacológicas do AS *in silico*

Atividade	Pa	Pi
Anti-inflamatório	0,612	0,029
Antagonista dos canais de Ca ²⁺	0,237	0,019
Cardioprotetor	0,379	0,034
Vasodilatador	0,414	0,035
Vasodilatador periférico	0,618	0,019
Vasoprotetor	0,706	0,01
Vasodilatador coronário	0,448	0,037
Anti hipoxia	0,738	0,005
Antifibrinolítico	0,249	0,046
Estimulante da angiogênese	0,352	0,026
Antitrombótico	0,552	0,021

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os dados obtidos no presente estudo demostram que o ácido sináptico exerce atividade anti-hipertensiva associada ao aumento da atividade parassimpática; diminuição da atividade simpática; melhora na sensibilidade do barorreflexo e diminuição do estresse oxidativo sérico de ratos espontaneamente hipertensos. Não houve alterações significativas entre os animais normotensos tratados, sugerindo que os efeitos do ácido sináptico envolvem mecanismos fisiopatológicos da hipertensão arterial sistêmica.

A hipertensão essencial resulta de diversas alterações nos mecanismos fisiológicos de controle da PA, causando assim, uma elevação sustentada dos níveis pressóricos. O modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) é adequado para estudar o desenvolvimento e progressão da hipertensão, pois se assemelha à hipertensão essencial humana. Essas semelhanças incluem uma predisposição genética para a PA elevada sem etiologia específica, aumento da resistência periférica total sem expansão de volume, perda da sensibilidade do barorreflexo, hiperativação do sistema nervoso simpático, bem como do sistema renina angiotensina aldosterona (MASSON et al., 2015; FAZAN JR; SALGADO, 2001).

Como esperado, os ratos do grupo SHR controle apresentaram níveis elevados de PA quando comparados aos do grupo WKY controle. Contudo, não houve alteração significativa na frequência cardíaca, o que condiz com o estudo de Dickhout e Lee (1998), eles observaram que, nos ratos SHR, há uma taquicardia pré-hipertensiva e o aumento da FC ocorre paralelamente ao aumento da PA até a quarta semana de vida; a partir daí a PA continua aumentando, já a FC começa a reduzir até se equiparar aos valores apresentados pelo grupo WKY.

O ácido sináptico apresentou efeito anti-hipertensivo em ratos SHR, não havendo alterações nos níveis de PAM de ratos WKY. Esses dados corroboraram, em parte, os de Silabamrasam et al (2014), os quais mostraram

que o AS foi capaz de reduzir a pressão arterial e a hipertrofia cardíaca em ratos com hipertensão L- NAME. Além disso, outros integrantes da família dos ácidos hidroxicinâmicos apresentaram efeitos anti-hipertensivos (SILABAMRASAM et al 2014)

Suzuki et al (2002) mostraram que o tratamento com o ácido ferúlico foi capaz de reduzir a pressão arterial de ratos SHR, sem mudanças significativas nos animais WKY. O estudo realizado por Oahsaki et al (2008) mostrou que uma única dose do ácido ferúlico foi capaz de reduzir a PA de ratos SHR. Utilizando esse mesmo modelo de hipertensão, Bhullar et al (2014) demonstraram o efeito anti-hipertensivo do ácido cafeico por inibir o sistema SRAA. Dessa forma, os ácidos hidroxinâmicos apresentam efeitos benéficos no controle da PA, consequentemente, tornam-se alvos interessantes na descoberta de novos medicamentos para o tratamento da hipertensão (SUZUKI et al, 2002; OAHSAKI et al, 2008; BHULLAR et al, 2014).

Um dos principais mecanismos causadores da HAS é o desarranjo da função autonômica, com uma hiperatividade do sistema nervoso simpático e diminuição da atividade parassimpática.

Para avaliar a influência do tratamento com o AS no controle autonômico da pressão arterial, realizamos bloqueios na atividade parassimpática e simpática, utilizando atropina (2 mg/Kg) e hexametônio (30 mg/Kg), respectivamente. A atropina é um antagonista muscarínico, que impede a ação da acetilcolina, liberada pelo sistema nervoso autônomo parassimpático em seus órgãos alvos. No coração, a atropina liga-se aos receptores muscarínicos do tipo M₂ presentes nas células do nó sinoatrial e atrioventricular, impedindo a ligação da acetilcolina, isso, por sua vez, culmina no aumento da frequência cardíaca. Já o hexametônio é um bloqueador nicotínico ganglionar que, quando usado, cessa a função autonômica. Contudo, diferentemente de como é feito quando se utiliza a atropina, o parâmetro observado após o uso do hexametônio, com o objetivo de avaliar o componente simpático, é a pressão arterial média dos animais, uma vez que, na maioria dos vasos, só existe ineração simpática.

O tratamento com o ácido sinápico foi capaz de melhorar a atividade parassimpática dos animais SHR. Apesar de não investigarmos o mecanismo desse efeito, o estudo de Karakida et al (2007) mostrou que o AS pode estar envolvido na regulação da acetilcolina no SNC. Além disso, Szwajgier e Borowic

(2012) relataram que o ácido sináptico, o ácido ferúlico, e outros compostos fenólicos, presentes no malte, são capazes de inibir a acaetilcolinesterase e butirilcolinesterase; enzimas responsáveis por degradar a acetilcolina. O estudo de Szwajgier (2015) mostrou que o ácido sináptico é capaz de inibir, *in vitro*, a acetilcolinesterase. Finalmente, Lataro et al (2019) mostraram que o tratamento crônico com inibidores da acetilcolinesterase reduzem a hipertensão e inflamação de ratos SHR. Dessa forma, torna-se interessante a investigação da ação do ácido sináptico sobre essas enzimas nos modelos de hipertensão, visto que, a maioria dos estudos apontam a atividade exacerbada do sistema nervoso simpático como responsável pela instalação da hipertensão arterial.

No nosso estudo observamos, ainda, que o ácido sináptico foi capaz de reduzir a hiperatividade simpática dos animais hipertensos. Já é bem relatado na literatura, por nosso grupo de pesquisa e outros, que a hiperatividade simpática está relacionada ao aumento do estresse oxidativo em regiões centrais do controle autonômico cardiovascular como, por exemplo, o eixo SFO-PVN-RVLM; e que ela pode estar associada a um prejuízo na função do barorreflexo (KISHE, T, 2013; GIROUARD et al, 2004; BOTELHO-ONO et al., 2011; GUIMARÃES; CARVALHO; BRAGA, 2012)

O reflexo barorreceptor desempenha um papel crucial no controle a curto prazo da PA. Dessa forma, a perda da sensibilidade do barorreflexo, observada em animais SHR, faz com que, por exemplo, a pressão arterial permaneça em níveis altos para o funcionamento do organismo. O tratamento crônico com o ácido sináptico foi capaz de melhorar a sensibilidade barorreflexa, provavelmente, por melhorar a atividade parassimpática, já que não houve diferença significativa na análise do componente simpático deste reflexo. Nosso estudo foi o primeiro a avaliar os efeitos do AS no barorreflexo e, embora não seja possível determinar o mecanismo preciso pelo qual ele exerce esse efeito, estudos do nosso laboratório relatam que o tratamento com antioxidantes melhora a sensibilidade do barorreflexo em diferentes modelos de hipertensão, pois, como dito anteriormente, um dos mecanismos envolvidos na patogênese da HAS é o aumento do estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é uma condição na qual há uma redução da atividade do sistema antioxidante e/ou um aumento das espécies oxidantes. As EROs são produzidas em regiões distintas dentro da célula, desde organelas como a

mitocôndria ao citosol. Enzimas como ciclooxigenases, lipoxigenases, xantina oxidase e NADPH oxidase participam da geração de EROs. Essas espécies participam como mediadores em processos como crescimento celular, diferenciação celular, adesão e apoptose, porém, quando produzidas em excesso, como é relatado na fisiopatologia da hipertensão, podem causar danos celulares, agindo diretamente em alvos como os lipídeos da membrana plasmática ou servindo como intermediários em vias de sinalização celular (RODRIGO et al., 2013; DROGE, 2002). Uma das formas de avaliar o estresse oxidativo é o teste TBARS, que consiste na dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Uma dessas substâncias é o malondialdeído, um dos produtos finais da peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica não enzimática ocorre quando as EROs oxidam os constituintes lipídicos da membrana, principalmente, os ácidos graxos poli-insaturados como os ácidos araquidônico, linoleico e eicosanapentainoico. Quando as EROs atacam os ácidos graxos poli-insaturados, ocorre a desprotonação da ligação dupla com consequente ligação do oxigênio, formando, assim, o radical hidroperóxido lipídico. Esse radical pode formar diversos produtos ao reagir com ácidos graxos de pelo menos 3 ligações duplas; como o ácido araquidônico, para o malondialdeído (GUERAUD, 2010; ANGELOVA et al., 2021)

No presente estudo, observamos que o tratamento com ácido sináptico foi capaz de diminuir o estresse oxidativo sérico dos animais SHR, medido através do teste TBARS. Nosso dado corroborou, em partes, o estudo de Silabamrasam et al (2014), no qual o ácido sináptico foi capaz de diminuir o estresse oxidativo do coração e aorta de ratos hipertensos L-NNAME.

Considerando que substâncias antioxidantes são capazes de melhorar o funcionamento do barorreflexo e reduzir a pressão arterial, via redução do estresse oxidativo periférico e central (QUEIROZ et al, 2012; MONTEIRO et al., 2012), os dados obtidos nos permitem concluir que o efeito antioxidante apresentado pelo AS é o responsável, pelo menos em parte, pela ação anti-hipertensiva do composto, bem como pela melhora da disfunção do barorreflexo e disautonomia presente em ratos espontaneamente hipertenso.

O desenvolvimento de abordagens *in silico* age como um “filtro químico”, direcionando a compostos mais prováveis de sucesso por meio de suas

características farmacocinéticas e de cálculos sobre suas propriedades moleculares e atividade biológica. Os descritores moleculares e as prováveis propriedades do ácido sináptico foram analisados e observamos que o AS obedeceu os parâmetros de Lipinski, estando na faixa aceitável. Conferindo, assim, a essa molácula uma absorção intestinal notável e boa biodisponibilidade oral teórica; critérios positivos no que se refere a continuidade do estudo com el

Foi prevista a probabilidade do AS ter alvos moleculares como receptores acoplados à proteína G, moduladores de canais iônicos, inibidores de cinase, ligação de receptores nucleares, inibidores de protease e enzimáticos. Isso pode ajudar a entender seus efeitos biológicos, bem como toxicológicos.

O AS apresentou provável capacidade de ser ligante de receptor nuclear o que corrobora os dados de Singh, h; Singh, t; Singh, r, (2020), que mostrou o AS como um possível agonista do PPAR gama

Além disso, nosso estudo demonstrou que o AS apresenta possível modulação em canais iônicos o que corrobora os dados de Yoon et al (2007), os quais demonstraram que o AS apresenta atividade ansiolítica, provavelmente, sendo um agonista dos receptores GABA_A.

Na avaliação teórica da Absorção do AS, o AS mostrou uma probabilidade alta, e isso o enquadra aos compostos bem absorvidos por via oral a partir do intestino. Nossos dados corroboraram, em parte, o estudo de Kern et al que identificaram uma concentração de 40nM do ácido sináptico no plasma de humanos, após o consumo de cereais não processados. Eles sugeriram, também, que o AS é melhor absorvido no intestino delgado.

O AS apresentou Caco-2 positivo com uma possível boa permeabilidade (UDHWANI et al., 2019; GHANNAY ET AL., 2020). Estudos realizados por Konoshi et al (2005) e Wolfram et al (1995) mostraram que os ácidos hidroxicinâmicos, possivelmente, ultrapassam as células Caco-2 por um receptor de ácido monocarboxílico

A análise de absorção mostrou também que o AS teoricamente não se enquadra como substrato da glicoproteína P (P-gp). Nossos dados diferem dos encontrados no estudo de Raish et al (2019), que mostraram que o AS, provavelmente, reduz a absorção da carbamazepina por inibir a glicoproteína P

As isoformas do complexo citocromo P450 (CYP2C19, 2C9, 2D6, 1A2 e 3A4) desempenham este papel vital na bioativação/metabolização de fármacos.

Entre eles, o CYP3A4, que interage com mais da metade de todos os fármacos utilizados clinicamente, e o CYP2C9, que está envolvido no metabolismo dos AINEs (anti-inflamatórios não esteroidais) e moléculas fracamente ácidas RAUNIO et al., 2015; GHANNAY et al., 2020).

O AS não foi classificado como substrato nem inibidor da isoformas estudadas, porém Raish (2019) mostrou que o AS, possivelmente diminui a expressão da isoforma CYP2C11 e CYP3A2.

O termo “*toxicidade in silico*” refere-se a experimentos computacionais, cálculos matemáticos ou análise científica de dados de substâncias químicas através de ferramentas computacionais, que os analise e faça a predição de uma possível atividade toxicológica. A agência de proteção ambiental dos Estados Unidos da América (Environmental Protection Agency, EPA) define toxicidade *in silico* como “a integração da computação e tecnologia da informação com biologia molecular para melhorar a priorização de requerimentos e predizer o potencial de risco de compostos químicos” (KAVLOCK et al., 2008)

Em relação a toxicidade *in silico*, o ácido sináptico revelou-se não tóxico (toxicidade AMES); mostrou-se não ser cancerígeno (agentes cancerígenos); revelou não ser tóxico (toxicidade oral aguda) estando na categoria III, que inclui compostos com DL50 valores superiores a 500 mg/kg e inferior a 5.000 mg/kg, e por fim não ser cancerígeno.

Além disso, o ácido sináptico apresentou algumas atividade farmacológicas no estudo *in silico*. Sobretudo anti-inflamatória, que corrobora o estudo de Yun et al 2008, no qual eles demonstram que o ácido sináptico foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α , MPO e MDA; vasodilatadora e como possível antagonista dos canais para Ca²⁺. Logo, estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para provar as predições do presente estudo *in silico*.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Diante do que foi apresentado é possível afirmar que o ácido sináptico, administrado oralmente durante 14 dias, exerce ação anti-hipertensiva no modelo de ratos espontaneamente hipertensos. Ainda, o ácido sináptico melhorou a modulação autonômica cardiovascular e restaurou a sensibilidade do barorreflexo. Esses efeitos, provavelmente estão relacionados com a diminuição do estresse oxidativo sérico observado após o tratamento com o composto.

Além disso, os dados do estudo *in silico* mostram que o ácido sináptico tem capacidade teórica de interagir com alvos moleculares, GPCRS, canais iônicos etc, que são importantes nas vias de sinalização celular envolvidas no sistema cardiovascular; e possíveis outras atividades farmacológicas nesse sistema. O ácido sináptico também mostrou, teoricamente, atender os requisitos farmacocinéticos importantes para um medicamento.

Dessa forma, os resultados obtidos ampliam nosso conhecimento sobre o papel do ácido sináptico no sistema cardiovascular e justifica o seu potencial na busca de alternativas terapêuticas para o tratamento da hipertensão. São necessárias mais pesquisas destinadas a aprofundar os mecanismos pelos quais o ácido sináptico promove os efeitos observados; sobretudo em relação a sua atividade em regiões centrais do controle da PA, como o eixo SFO-PVN-RVLM, bem como seus efeitos na toxicidade aguda e farmacocinética em animais, para, caso justificado, prosseguir com ensaios clínicos com indivíduos hipertensos.

REFERÊNCIAS

- AGUNLOYE, Odunayo Michael et al. Cardio-protective and antioxidant properties of caffeic acid and chlorogenic acid: Mechanistic role of angiotensin converting enzyme, cholinesterase and arginase activities in cyclosporine induced hypertensive rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 450-458, 2019.
- ALAM, Md et al. Anti-hypertensive effect of cereal antioxidant ferulic acid and its mechanism of action. **Frontiers in nutrition**, v. 6, p. 121, 2019.
- ANGELOVA, Plamena R., NOEMI Esteras, and ANDREY Y. Abramov. "Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: finding ways for prevention." **Medicinal Research Reviews** 41, no. 2 (2021): 770-784.
- BENARROCH, Eduardo E. Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. **Clinical Autonomic Research**, v. 15, n. 4, p. 254-263, 2005.
- BHULLAR, K.S., LASSALLE-CLAUX, G., TOUAIBIA, M. and RUPASINGHE, H.V., 2014. Antihypertensive effect of caffeic acid and its analogs through dual renin–angiotensin–aldosterone system inhibition. **European Journal of Pharmacology**, 730, pp.125-132.
- BOTELHO-ONO, M. S. et al. Acute superoxide scavenging restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 159, n. 1-2, p. 38–44, 20 jan. 2011.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial; **Cardiovascular reflexes and arterial hypertension**. Rev. bras. hipertens, v. 8, n. 1, p. 30–40, mar. 2001.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial; **Cardiovascular reflexes and arterial hypertension**. Rev. bras. hipertens, v. 8, n. 1, p. 30–40, mar. 2001.
- CAMPOS, Ruy R. Oxidative stress in the brain and arterial hypertension. **Hypertension Research**, v. 32, n. 12, p. 1047-1048, 2009.
- DAMPNEY, Roger A. et al. Regulation of sympathetic vasomotor activity by the hypothalamic paraventricular nucleus in normotensive and hypertensive states. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 315, n. 5, p. H1200-H1214, 2018.
- DAMPNEY, Roger AL. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. **Advances in physiology education**, v. 40, n. 3, p. 283-296, 2016.

- DE MELLO, Walmor C. Local renin angiotensin aldosterone systems and cardiovascular diseases. **Medical Clinics**, v. 101, n. 1, p. 117-127, 2017.
- DICKHOUT, J.G. AND LEE, R.M., 1998. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 274(3), pp.H794-H800.
- DROGE, Wulf. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.
- DUPONT, A.G. and LÉGAT, L., 2020. GABA is a mediator of brain AT 1 and AT 2 receptor-mediated blood pressure responses. **Hypertension Research**, 43(10), pp.995-1005.
- FAZAN JR, R., SILVA, V.J.D. AND SALGADO, H.C., 2001. Modelos de hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, 8(1), pp.19-29.
- GIROUARD, H. et al. Treatment by n-acetylcysteine and melatonin increases cardiac baroreflex and improves antioxidant reserve. **American journal of hypertension**, v. 17, n. 10, p. 947–954, out. 2004.
- GUÉRAUD, Françoise et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. **Free radical research**, v. 44, n. 10, p. 1098-1124, 2010.
- GUYENET, Patrice G. et al. Rostral ventrolateral medulla and hypertension. **Hypertension**, v. 72, n. 3, p. 559-566, 2018.
- GUYENET, Patrice G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335-346, 2006.
- GUYENET, Patrice G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335-346, 2006.
- KASS, David A. Ventricular arterial stiffening: integrating the pathophysiology. **Hypertension**, v. 46, n. 1, p. 185-193, 2005.
- KIKUZAKI, Hiroe et al. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 7, p. 2161-2168, 2002.
- KISHI, T., 2013. Regulation of the sympathetic nervous system by nitric oxide and oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla: 2012 Academic Conference Award from the Japanese Society of Hypertension. **Hypertension Research**, 36(10), pp.845-851.
- KROON, P.A. and WILLIAMSON, G., 1999. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 79(3), pp.355-361.

LANFRANCHI, P. A.; SOMERS, V. K. Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, n. 4, p. R815-R826, 10 jan. 2002.

LATARO, Renata M. et al. Acetylcholinesterase inhibition attenuates the development of hypertension and inflammation in spontaneously hypertensive rats. **American journal of hypertension**, v. 28, n. 10, p. 1201-1208.

MANCIA, Giuseppe; GRASSI, Guido. The autonomic nervous system and hypertension. **Circulation research**, v. 114, n. 11, p. 1804-1814, 2014.

MASSON, G.S., NAIR, A.R., SILVA SOARES, P.P., MICHELINI, L.C. and FRANCIS, J., 2015. Aerobic training normalizes autonomic dysfunction, HMGB1 content, microglia activation and inflammation in hypothalamic paraventricular nucleus of SHR. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 309(7), pp.H1115-H1122.

MILLER, Amanda J.; ARNOLD, Amy C. The renin–angiotensin system in cardiovascular autonomic control: recent developments and clinical implications. **Clinical Autonomic Research**, v. 29, n. 2, p. 231-243, 2019.

MONTEIRO, Matheus MO et al. Quercetin improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12997-13008, 2012.

OHSAKI, Y., SHIRAKAWA, H., KOSEKI, T. and KOMAI, M., 2008. Novel effects of a single administration of ferulic acid on the regulation of blood pressure and the hepatic lipid metabolic profile in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Journal of agricultural and food chemistry**, 56(8), pp.2825-2830.

PARAMASHIVAM, S. K. et al. In silico pharmacokinetic and molecular docking studies of small molecules derived from Indigofera aspalathoides Vahl targeting receptor tyrosine kinases. **Bioinformation**, v. 11, n. 2, p. 73, 2015.

PILOWSKY, Paul M.; GOODCHILD, Ann K. Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 years on. **Journal of hypertension**, v. 20, n. 9, p. 1675-1688, 2002.

QUEIROZ, T.M., GUIMARÃES, D.D., MENDES-JUNIOR, L.G. AND BRAGA, V.A., 2012. A-lipoic acid reduces hypertension and increases baroreflex sensitivity IN RENOVAstular hypertensive rats. **Molecules**, 17(11), pp.13357-13367.

QUEIROZ, Thyago Moreira; MONTEIRO, Matheus Morais; BRAGA, Valdir Andrade. Angiotensin-II-derived reactive oxygen species on baroreflex sensitivity during hypertension: new perspectives. **Frontiers in physiology**, v. 4, p. 105, 2013.

RAISH, Mohammad et al. Effects of sinapic acid on hepatic cytochrome P450 3A2, 2C11, and intestinal P-glycoprotein on the pharmacokinetics of oral carbamazepine in rats: Potential food/herb-drug interaction. **Epilepsy research**, v. 153, p. 14-18, 2019.

Razzaghi-Asl N, Garrido J, Khazraei H, Borges F and Firuzi O, Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure–activity relationships. **Curr Med Chem** 20:4436–4450 (2013).

RAZZAGHI-ASL, N. et al. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 36, p. 4436-4450, 2013.

RICE-EVANS, Catherine A.; MILLER, Nicholas J.; PAGANGA, George. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RODRIGO, Ramón et al. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. **Disease markers**, v. 35, n. 6, p. 773-790, 2013.

SHAHIDI, F. and CHANDRASEKARA, A., 2010. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. **Phytochemistry Reviews**, 9(1), pp.147-170.

SILAMBARASAN, T., MANIVANNAN, J., KRISHNA PRIYA, M., SUGANYA, N., CHATTERJEE, S. and RAJA, B., 2014. Sinapic acid prevents hypertension and cardiovascular remodeling in pharmacological model of nitric oxide inhibited rats. **PLoS One**, 9(12), p.e115682.

SILVA, D. A. da. **Screening de produtos naturais com potencialidade para tratamento de doenças ocasionadas por helicobacter pylori: um estudo in vitro e in silico**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

SUZUKI, A., KAGAWA, D., FUJII, A., OCHIAI, R., TOKIMITSU, I. and SAITO, I., 2002. Short-and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **American journal of hypertension**, 15(4), pp.351-357.

SUZUKI, A., YAMAMOTO, N., JOKURA, H., YAMAMOTO, M., FUJII, A., TOKIMITSU, I. and SAITO, I., 2006. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Journal of hypertension**, 24(6), pp.1065-1073.

VEERMAN, Derk P. et al. Circadian profile of systemic hemodynamics. **Hypertension**, v. 26, n. 1, p. 55-59, 1995.

WU, Chia-Hua et al. Renin-angiotensin system and cardiovascular functions. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 38, n. 7, p. e108-e116, 2018.

ZENG, Wei-Zheng et al. PIEZOs mediate neuronal sensing of blood pressure and the baroreceptor reflex. **Science**, v. 362, n. 6413, p. 464-467.

ANEXO A – Certificado de Comissão de Ética no uso de animais



**Universidade
Federal da
Paraíba**

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO ÁCIDO SINÁPICO SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS HIPERTENSOS E NORMOTENSOS - ABORDAGENS IN VIVO E IN VITRO", protocolada sob o CEUA nº 3701150420 (ID 001037), sob a responsabilidade de **Maria do Socorro França Falcão** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 08/05/2020.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECTS INDUCED BY SINAPIC ACID ON THE CARDIOVASCULAR SYSTEM OF HYPERTENSIVE AND NORMOTENSE RATS - IN VIVO AND IN VITRO APPROACHES", utilizing 34 Heterogenics rats (34 males), 96 Isogenic rats (96 males), protocol number CEUA 3701150420 (ID 001037), under the responsibility of **Maria do Socorro França Falcão** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/08/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2020** a **02/2021** Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM	sexos:	Machos	idade:	11 a 12 semanas	N:	34
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	250 a 300 g		
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar						
Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM	sexos:	Machos	idade:	11 a 12 semanas	N:	48
Espécie:	Ratos isogênicos			Peso:	200 a 300 g		
Linhagem:	Rattus Norvegicus - SHR						
Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM	sexos:	Machos	idade:	11 a 12 semanas	N:	48
Espécie:	Ratos isogênicos			Peso:	200 a 300 g		
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar Kyoto						

Local do experimento: Os procedimentos experimentais apresentados no referido projeto serão realizados no Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial do Centro de Biotecnologia da UFPB, bem como na sala de experimentação em animais hipertensos do biotério Prof. Dr. Thomas George. O laboratório dispõe de todos os equipamentos e reagentes necessários para o desenvolvimento do projeto.

João Pessoa, 08 de maio de 2020

Jailane de Souza Aquino

Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Carlos A. A. Clemente

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba