

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

LORENA SOARES BEZERRA

**A CARBOXIMETIL-GLUCANA EXERCE AÇÃO ANTI-
HIPERTENSIVA, MODULAÇÃO POSITIVA DA FUNÇÃO VASCULAR
E ATIVIDADE ANTIPLAQUETÁRIA EM RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

JOÃO PESSOA

2021

LORENA SOARES BEZERRA

**A CARBOXIMETIL-GLUCANA EXERCE AÇÃO ANTI-
HIPERTENSIVA, MODULAÇÃO POSITIVA DA FUNÇÃO VASCULAR
E ATIVIDADE ANTIPLAQUETÁRIA EM RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

JOÃO PESSOA

2021

LORENA SOARES BEZERRA

**A CARBOXIMETIL-GLUCANA EXERCE AÇÃO ANTI-
HIPERTENSIVA, MODULAÇÃO POSITIVA DA FUNÇÃO VASCULAR
E ATIVIDADE ANTIPLAQUETÁRIA EM RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção de título de Doutor em Ciências da Nutrição
Área de concentração em Ciências da Nutrição

Orientador: Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras

JOÃO PESSOA

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B574c Bezerra, Lorena Soares.

A Carboximetil-glucana exerce ação anti-hipertensiva, modulação positiva da função vascular e atividade antiplaquetária em ratos espontaneamente hipertensos / Lorena Soares Bezerra. - João Pessoa, 2021.

94 f. : il.

Orientação: Robson Cavalcante Veras.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Hipertensão. 2. Carboximetil-glucana. 3. Beta-D-Glucana. 4. Barorreflexo. 5. Plaquetas. I. Veras, Robson Cavalcante. II. Título.

UFPB/B

CDU 616.12-008.331.1(043)

LORENA SOARES BEZERRA

**A CARBOXIMETIL-GLUCANA EXERCE AÇÃO ANTI-
HIPERTENSIVA, MODULAÇÃO POSITIVA DA FUNÇÃO VASCULAR
E ATIVIDADE ANTIPLAQUETÁRIA EM RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Tese aprovada em 29/10/2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras

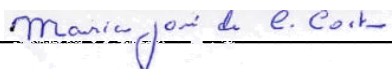
Presidente da Banca Examinadora

(UFPB/Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Ciências Farmacêuticas)

Profa. Dra. Marciane Magnani

Examinadora Interna

(UFPB/Centro de Tecnologia/Departamento de Engenharia de Alimentos)



Profa. Dra. Maria José de Carvalho Costa

Examinadora Interna

(UFPB/Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Nutrição)

Profa. Dra. Natália Tabosa Machado Calzerra

Examinadora Externa

(UFPE/Centro de Biociências/Departamento de Fisiologia e Farmacologia)

Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante Oliveira

Examinadora Externa

(UFPB/Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Fisiologia e Patologia)

Dedico à minha mãe Railda Soares que, mesmo diante de diversas dificuldades, nunca mediu esforços para oferecer a melhor educação que podia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia e fonte da minha coragem e perseverança para enfrentar as dificuldades nessa vida;

Aos meus pais, Railda Soares e Antônio Bezerra, que mesmo de longe sempre me incentivaram e me deram suporte quando precisei, sobretudo minha mãe que me encorajava a continuar quando pensava que não iria conseguir.

À minha irmã, Floriza Soares, pela parceria de sempre e por ser minha inspiração de fé e força, principalmente após o difícil ano de 2020.

À Lidiane França, pelo companheirismo, pelo carinho, pelas palavras de incentivo e por acalmar meu coração quando estava estressada.

À Manuela Freire e sua família, que sempre me acolheram e foram um porto seguro quando morei em João Pessoa. E por toda a disponibilidade em me ajudar em tudo que precisava para a execução da pesquisa, principalmente nos dias de gavagem, e por me motivar a continuar.

Ao Diretor Geral do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) *Campus* Jaguaribe, Izamaro de Araújo, e a Chefe do Departamento de Ensino, Efigênia Alves, por toda compreensão e apoio para a conclusão dessa etapa em minha vida.

À equipe da Coordenação de Assuntos Estudantis, Ernny Coelho, Raquel Nepomuceno, Helyane Cândido e Geisyanne Pereira, pela amizade, pelo incentivo e pelas várias vezes que me davam cobertura e suporte nas minhas ausências para conseguir conduzir os experimentos e executar a pesquisa. Serei sempre grata a todas vocês.

As colaboradoras da cozinha, Regina Pessoa, Elioneide Bessa e Leila Marim, pelas palavras de apoio e por sempre darem o melhor de vocês quando eu precisava estar ausente.

Aos amigos e amigas, que sempre torceram e acreditaram. Agradeço a Suzany Ludmilla e Ayô Camilo, pela acolhida. A Marcos Nascimento, pelo tempo de amizade e por me ensinar tanto.

Ao professor e orientador Dr. Robson Cavalcante Veras, pela confiança depositada, pela oportunidade, pela compreensão e por todos os ensinamentos ao longo desses anos, que foram importantes para minha formação.

Ao professor Dr. Isac Almeida de Medeiros, por disponibilizar toda a infraestrutura do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular para a realização desse trabalho;

À professora Dra. Marciane Magnani, por fornecer a substância utilizada nessa pesquisa, pelas orientações, por toda atenção e disponibilidade, além da relevante contribuição para as publicações dos artigos.

À professora Dra. Tatiana Colombo, do Instituto Federal do Paraná – *Campus Paranavaí*, pelas contribuições e suporte para as publicações dos artigos.

Ao professor Dr. José Luiz de Brito, pelas contribuições e por toda a disponibilidade em me ensinar algumas análises relevantes para a pesquisa.

A todos que fazem parte da equipe do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, que sempre estavam dispostos a ajudar, em especial a Tays Amanda, Júlio César, Arthur Pontes, Mathânia Silva, Ricardo Cartaxo e Fátima Azevedo, pelo apoio e auxílio na execução de alguns protocolos realizados na pesquisa. O suporte de vocês foi imprescindível para conseguir finalizar esse trabalho.

Ao professor Dr. Adriano Francisco, do Departamento de Fisiologia e Patologia da UFPB, pela atenção e disponibilidade para execução de análises importantes nessa pesquisa.

À Roberta Parentoni e José Crispim Duarte, pela paciência e por sempre estarem disponíveis quando precisava dos serviços da Unidade de Produção de Animais do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos/UFPB.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição (PPGCN), pelos ensinamentos e contribuições para minha formação acadêmica.

À coordenação e aos funcionários do PPGCN, pela atenção, compreensão, seriedade e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio a Pesquisa da Paraíba (FAPESQ/PB) e Instituto UFPB de Desenvolvimento da Paraíba (IDEP/UFPB) pelo apoio financeiro e de infraestrutura para o desenvolvimento desse trabalho.

“Não há lugar para sabedoria onde não há paciência”

Santo Agostinho

RESUMO

As β -D-Glucanas de levedura são polissacarídios constituídos por um esqueleto linear central de unidades de glicose ligadas na posição β (1-3) e cadeias laterais unidas por ligações β (1-6). Esses polímeros são importantes modificadores de resposta biológica e possuem diversos efeitos biológicos benéficos a saúde. Por isso, há grande interesse em seus derivados, principalmente na forma carboximetilada, que demonstra ação antioxidante, imunoestimulante, antiplaquetária e moduladora da função vascular. Entretanto, sua ação sobre a função cardiovascular ainda é pouco compreendida, principalmente na hipertensão. Diante disso, o estudo buscou investigar quais os efeitos da Carboximetil-glucana (CMG) da *Saccharomyces cerevisiae* sobre a pressão arterial, função vascular, modulação autonômica, atividade plaquetária e estresse oxidativo em animais espontaneamente hipertensos (SHR). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPB (CEUA 087/2017) Ratos machos SHR e seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) foram distribuídos em grupos (n=8): WKY controle (WKY CT); WKY CMG 60 mg/kg; SHR controle (SHR CT); SHR CMG 20 mg/kg e SHR CMG 60 mg/kg. Os animais foram tratados durante quatro semanas nas doses de 20 e 60 mg/kg por via oral, e os controles receberam solução salina. Ao final do tratamento, foram avaliados o ganho de peso, parâmetros bioquímicos, os níveis pressóricos, a sensibilidade do barorreflexo e a participação do tônus simpático. Em seguida, os animais foram eutanasiados para testes de reatividade vascular, avaliação da agregação plaquetária, análises histológica, morfométrica e da capacidade antioxidante. Os resultados mostraram que o tratamento com CMG reduziu o ganho de peso no grupo SHR CMG 60 mg/kg, alterou o perfil lipídico e a função renal, com redução na ureia. Apenas no grupo SHR CMG 60 mg/kg foi observado redução significativa na pressão arterial média. No entanto, as duas doses testadas promoveram redução na pressão arterial sistólica e diastólica, sem alterar a frequência cardíaca nos grupos SHR, e ainda diminuiu a hipertrofia cardíaca. Foi observado modulação no ganho do barorreflexo, promovendo melhora na resposta dos animais SHR CMG 60 mg/kg, e diminuição na participação do tônus simpático nesse grupo. Quanto à função vascular, foi constatada melhora na resposta vasorrelaxante dependente de endotélio avaliada pela acetilcolina (ACh) nos grupos SHR CMG 20 mg/kg e SHR CMG 60 mg/kg. No vasorrelaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS), observou-se melhora na resposta no grupo WKY CMG 60 mg/kg. Os estudos de agregação plaquetária demonstraram menor agregação plaquetária no grupo SHR CMG 60 mg/Kg em relação ao SHR CT quando induzido por difosfato de adenosina (ADP). As análises de estresse oxidativo mostraram que, apesar de os animais SHR CT apresentarem significativamente maiores níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) comparados aos WKY CT, a CMG não foi capaz de promover a redução de ROS. Esses achados sugerem que a CMG melhora a função vascular de animais SHR, demonstrando ação anti-hipertensiva através do barorreflexo via modulação negativa do tônus simpático, e possui propriedade antiagregante plaquetária. Assim, a CMG se apresenta como potencial estratégia para o manejo da hipertensão arterial.

Palavras-chave: β -D-Glucana, carboximetilglucana, hipertensão, barorreflexo, plaquetas

ABSTRACT

Yeast β -D-Glucans are polysaccharides consisting of a central linear skeleton of glucose units linked at the β (1-3) position and side chains joined by β (1-6) linkages. These polymers are important biological response modifiers and have several biological effects beneficial to health. Therefore, there is great interest in its derivatives, especially in the carboxymethylated form, which demonstrates antioxidant, immunostimulant, antiplatelet, and vascular function modulating action. However, its action on cardiovascular function is still poorly understood, mainly in hypertension. Therefore, this study aimed to investigate the effects of Carboxymethyl-glucan (CMG) from *Saccharomyces cerevisiae* on blood pressure, vascular function, autonomic modulation, platelet aggregation, and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats (SHR). All experimental protocols were approved by the UFPB's Ethics Committee on Animal Use (CEUA 087/2017). Male SHR and their normotensive Wistar Kyoto (WKY) controls were assigned to groups (n=8): WKY control (WKY CT); WKY CMG 60 mg/kg; SHR control (SHR CT); SHR CMG 20 mg/kg and SHR CMG 60 mg/kg. The animals were treated for four weeks at doses of 20 and 60 mg/kg orally, and the controls received saline. At the end of treatment, weight gain, biochemical parameters, blood pressure levels, baroreflex sensitivity, and sympathetic tone participation were evaluated. Then, the animals were euthanized for vascular reactivity tests, platelet aggregation evaluation, histological, morphometric, and antioxidant capacity analyses. The results showed that CMG treatment decreased the weight gain in SHR CMG 60 mg/kg, and changed lipid profile and renal function, with a reduction in urea. Only in the SHR CMG 60 mg/kg group was observed a significant reduction in mean arterial pressure. However, the two doses tested promoted a reduction in systolic and diastolic blood pressure, without changing heart rate in the SHR groups, and also decreased cardiac hypertrophy. Modulation in baroreflex gain was observed, promoting improved response in SHR CMG 60 mg/kg animals, and decreased sympathetic tone involvement in this group. As for vascular function, improvement in the endothelium-dependent vasorelaxant response assessed by acetylcholine (ACh) was verified in SHR CMG 20 mg/kg and SHR CMG 60 mg/kg groups. In the vasorelaxation induced by sodium nitroprusside (SPN), an improved response was observed in the WKY CMG 60 mg/kg animals. Platelet aggregation studies demonstrated lower platelet aggregation in the SHR CMG 60 mg/kg group compared to the SHR CT, when induced by adenosine diphosphate (ADP). Oxidative stress analyses showed that although SHR CT animals had significantly higher levels of reactive oxygen species (ROS) compared to WKY CT, CMG was not able to promote ROS reduction. These findings suggest that CMG improves vascular function in SHR animals, demonstrating antihypertensive action through baroreflex via negative modulation of sympathetic tone, and has platelet antiaggregant property. Thus, CMG presents itself as a potential strategy for the management of arterial hypertension.

Key words: β -D-Glucan, carboxymethyl-glucan, hypertension, baroreflex, platelet

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA TESE

Figura 1 – Visão geral do barorreflexo arterial com suas vias aferentes e eferentes.....	25
Figura 2 – Esquema do Sistema Renina-Angiotensina e os efeitos desencadeados pelas suas vias.....	26
Figura 3 – Vias envolvidas na contração das células musculares lisas.....	28
Figura 4 – Papel das ROS na disfunção endotelial presente na hipertensão.....	30
Figura 5- Componentes da parede celular de leveduras e estrutura da (β1-3) (β1-6) D-Glucana.....	37
Figura 6 – Representação simplificada do efeito imunomodulador de β-D-glucanas.....	39
Figura 7 – Representação estrutural da β-D-Glucana submetida a carboximetilação.....	42
Figura 8 – Divisão dos grupos de animais para os protocolos experimentais.....	48
Figura 9 – Protocolo do tratamento com CMG nos grupos de animais.....	48
Figura 10 – Sistema de cubas de órgãos isolados.....	52
Figura 11 – Protocolo para verificação da viabilidade do órgão e da integridade do endotélio vascular.....	52

FIGURAS DO ARTIGO I

Figure 1: Weight gain percentage during CMG treatment for four week.....	73
Figure 2: Blood pressure levels and heart rate after CMG treatment for four weeks	75
Figure 3: Effect of CMG treatment on baroreflex sensitivity	75
Figure 4: Effect of CMG treatment on sympathetic tone.....	76
Figure 5: Ventricular hypertrophy after CMG treatment for four weeks.....	76

Figure 6: Photomicrograph of a histological section of the myocardium from each group of animals stained in hematoxylin and eosin.....	76
Figure 7: Cardiomyocyte size after CMG treatment for four weeks.....	76

FIGURAS DO ARTIGO II

Figure 1: Concentration-response curve for phenylephrine (PHE, 3×10^{-9} to 3×10^{-5} M) in superior mesenteric artery rings from rats treated with CMG for four weeks.....	84
Figure 2: Concentration-response curve for acetylcholine (ACh, 10^{-10} to 10^{-5} M) in superior mesenteric artery rings from rats treated with CMG for four weeks.....	85
Figure 3: Concentration-response curve for sodium nitroprusside (SPN, 10^{-11} to 3×10^{-7} M) in superior mesenteric artery rings from rats treated with CMG for four weeks.....	86
Figure 4: Effect of CMG treatment for four weeks on platelet aggregation induced by ADP (A) and PMA (B) in rats.....	87
Figure 5: Effect of oral CMG administration for four weeks on ROS production by rat platelets.....	87
Figure 6: Effect of oral CMG administration on ROS production in mesenteric artery of rats.....	88

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA TESE

Tabela 1 - Alterações plaquetárias na hipertensão.....	35
Tabela 2 - Composição da solução HEPES para os protocolos de agregação plaquetária.....	46
Tabela 3 – Composição da solução de Tyrode para artéria mesentérica superior.....	46
Tabela 4 – Composição da solução de PBS.....	46

TABELA DO ARTIGO I

Table 1: Biochemical parameters obtained for each group of animals treated with CMG for four weeks.....	74
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh – Acetilcolina
ADP – Difosfato de adenosina
Ang - Angiotensina
AVC – Acidente vascular cerebral
 $C_6H_{12}O_6$ - Glicose
 $CaCl_2$ - Cloreto de cálcio
CaM - Calmodulina
CAT – Catalase
CMG – Carboximetil-glucana
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
cGMP - Monofosfato cíclico de guanosina
COX - Cicloxagenase
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CR-3 - Receptor do sistema complemento 3
CT – Controle
CVLM - Medula Ventrolateral Caudal
DAG – Diacilglicerol
DC – Débito cardíaco
DCV – Doença cardiovascular
DHE - Di-hidroetídeo
DS – Grau de substituição
ECA – Enzima conversora de angiotensina
 E_{max} – Efeito máximo
EPM - Erro padrão da média
ET1 – Endotelina-1
eNOS – Sintase de óxido nítrico endotelial
FC – Frequência cardíaca
FEN – Fenilefrina
GPCR – Receptor acoplado à proteína G
GPx - Glutathiona peroxidase
GEF – Fator de troca de nucleotídeo guanina
HA – Hipertensão Arterial

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IL – Interleucina

IPeFarm - Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

IP - 1,4,5 trisfosfato de inositol

I.P. - Intraperitoneal

KCl – Cloreto de Potássio

KH₂PO₄ - Fosfato monopotássico

LacCer - lactosil-ceramida

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

MgSO₄ - Sulfato de magnésio

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógenos

MLC – Cadeia leve de miosina

MLCP – Fosfatase da cadeia leve de miosina

MLCK – Cinase da cadeia leve de miosina

NA – Núcleo ambíguo

NaCl - Cloreto de sódio

NF-KB – Fator Nuclear Kappa B

NaHCO - Bicarbonato de sódio

NADPH – Fosfato de dinucleotídio de adenina e nicotinamida

NO – Óxido Nítrico

NCX - Trocador de Na⁺/Ca²⁺

NOX - Dinucleotídio de adenina e nicotinamida reduzido oxidase

NPS – Nitroprussiato de sódio

NTS - Núcleo do trato solitário

NK – Natural *killer*

PA – Pressão arterial

PAM – Pressão arterial média

PAMP - Padrão molecular associado a patógeno

PAS – Pressão arterial sistólica

PAD – Pressão arterial diastólica

pD₂ – Logaritmo negativo na base 10 da concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo

PGI₂ – Prostaciclina

PI3K – Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase

PIP₂ – 4,5 bisfosfato de fosfatidilinositol

PCR – Proteína C-reativa

PMA – Éster de forbol

PPP – Plasma pobre em plaquetas

PRP – Plasma rico em plaquetas

PRR – Receptores de reconhecimento padrão

PKC - Proteína cinase C

PMA – Acetato de forbol miristato

PTP – Proteína tirosina fosfatase

RMN – Ressonância magnética

ROC - Canal de cálcio operado por receptor

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RVLM - Medula Ventrolateral Rostral

RVP – Resistência vascular periférica

sGC – Ciclase de guanilil solúvel

SMOC - Canal de cálcio operado por segundo mensageiro

SNC – Sistema nervoso central

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNS – Sistema nervoso simpático

SNP – Sistema nervoso parassimpático

SOC - Canal de cálcio operado por estoque

SRAA – Sistema renina-angiotensina aldosterona

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

SOD - Superóxido dismutase

TLR – Receptor *Toll-like*

TNF - Fator de necrose tumoral

TxA₂ – Tromboxano A₂

VOC - Canal de cálcio dependente de voltagem tipo L

WKY – Ratos wistar kyoto

2K1C - Dois rins, um clipe

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1	DOENÇAS CARDIOVASCULARES E A INFLUÊNCIA DA HIPERTENSÃO	22
3.1.1	Hipertensão Arterial (HA)	23
3.1.2	Fisiopatologia da HA	27
3.1.3	Ratos Espontaneamente Hipertensos	32
3.2	A FUNÇÃO PLAQUETÁRIA NA HIPERTENSÃO ARTERIAL	33
3.3	β -D-GLUCANAS.....	37
3.4	CARBOXIMETIL-GLUCANA (CMG)	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	TIPO DE ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	45
4.2	ANIMAIS	45
4.3	MATERIAIS	45
4.3.1	Drogas e reagentes.....	45
4.3.2	Soluções nutritivas	46
4.4	OBTENÇÃO DA CMG	47
4.4.1	Avaliação dos Efeitos do Tratamento com CMG.....	47
4.4.1.1	Ensaio Experimental	47
4.4.1.2	Avaliação do peso corporal e parâmetros bioquímicos	49
4.4.1.3	Medida Direta de Pressão Arterial.....	49
4.4.1.4	Teste de sensibilidade do barorreflexo e avaliação da participação do tônus simpático.....	50
4.4.2	Ensaio <i>In Vitro</i>	50

4.4.2.1 Avaliação da hipertrofia ventricular cardíaca e análise histológica e morfométrica dos cardiomiócitos	50
4.4.2.2 Ensaios Farmacológicos de Reatividade Vascular	51
4.4.2.3 Obtenção do Sangue Total e Preparação das Plaquetas Lavadas de Rato	53
4.4.2.4 Medida da Agregação Plaquetária por Transmissão Luminosa.....	53
4.4.2.5 Avaliação da produção de Ânions Superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) em Plaquetas.....	54
4.4.2.6 Avaliação da produção de Ânions Superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) em Artéria Mesentérica	54
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
5 RESULTADOS.....	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICES	69
APÊNDICE A – ARTIGO I.....	70
APÊNDICE B – ARTIGO II	80
ANEXO.....	94

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV), em conjunto, são a principal causa de morte e morbidade no mundo, e o principal contribuinte para a redução na qualidade de vida (ROTH et al., 2020). No Brasil, a situação também não é diferente. Em 2017, foram registradas milhares de mortes por DCV, que representaram 27,3% das ocorrências. Destas, 45% estavam associadas indiretamente a hipertensão arterial (HA), causadas por doença arterial coronária e insuficiência cardíaca, e 13% estavam diretamente relacionadas à HA (BARROSO et al., 2021).

A prevalência de HA, a nível mundial, tem apresentado tendência de aumento devido ao envelhecimento da população e ao aumento da exposição à fatores de risco, relacionados ao estilo de vida, incluindo dietas poucos saudáveis, com alto consumo de sódio e baixa ingestão de potássio, e ausência de atividades físicas (MILLS; STEFANESCU; HE, 2020). Dessa forma, para combater este grande problema tem-se traçado estratégias não-farmacológicas e farmacológicas, visando combater não só as DCV em si, mas também para evitar seus fatores de risco, como a hipertensão, diabetes, obesidade e dislipidemia (BARROSO et al., 2021).

Em pesquisas não-clínicas, modelos animais tem sido usados há anos e os SHR (Ratos Espontaneamente Hipertensos) são bem estabelecidos como modelo genético de hipertensão arterial, que possui características da hipertensão primária em humanos e o seu mecanismo genético está relacionado a alterações vasculares, como disfunção endotelial (LERMAN et al., 2005). Ademais, estudos mostram que neste modelo há aumento do estresse oxidativo, hiperatividade plaquetária e anormalidades no controle da atividade cardíaca pelo sistema nervoso autonômico (BRUSCHI et al., 1985; HOUSTON, 2005; KLIPPEL et al., 2016). Assim, usar este modelo como fonte de pesquisa de novos fármacos ou mesmo nutracêuticos tem sido fundamental na área da farmacologia cardiovascular (LEONG; NG; JAARIN, 2015).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* contém em sua parede celular cerca de 25-30% de β -D-glucana, que é formada, estruturalmente, por uma cadeia central de unidades repetidas de glicose organizada em um esqueleto central com ligações glicosídicas β (1-3) e com cadeias laterais de tamanhos variados, cujas ligações são do tipo β (1-6). Esse polissacarídeo possui efeitos benéficos e é bem conhecido, principalmente, por sua potente propriedade imunoestimulante e como forte antagonista de tumores (AKRAMIEN et al., 2007; BROWN et al., 2003; NAMEDA et al., 2007; OOI; LIU, 2000). No entanto, outras propriedades como antioxidante, antimutagênico (KRIZKOVA et al., 2003; SLAMENŇOVÁ et al., 2003), ativador leucocitário (NAMEDA et al., 2005, 2007), antiagregante (SALUK-JUSZCZAK et al., 2010),

hipocolesterolêmico e hipolipemiante, têm sido relacionadas às β -D-glucanas (CHAN; CHAN; SZE, 2009; CLOETENS et al., 2012).

Outros pontos importantes relacionados ao uso desses polímeros são a massa molar e a hidrosolubilidade, que são aspectos relevantes para sua aplicação clínica (BOHN; BEMILLER, 1995; KIM et al., 2000). Assim, há esforços no sentido de melhorar essas características através de modificações químicas, buscando aumentar o seu potencial de aplicação e, principalmente, melhorar a solubilidade (MANTOVANI et al., 2008). Dentre os derivados solúveis, a Carboximetil-glucana (CMG) obtida a partir da β -(1-3) (1-6) glucana tem sido estudada e demonstrou ação antimutagênica, antigenotóxica, antitumoral e antioxidante (TAO; ZHANG; CHEUNG, 2006; MAGNANI et al., 2009; MAGNANI et al., 2010; MAGNANI et al., 2012; ARAÚJO et al., 2015).

Estudos anteriores indicam ainda que esse derivado carboximetilado exerce influência sobre a função cardiovascular, demonstrando efeito modulador positivo na função vascular, endotelial e cardíaca em ratos saudáveis tratados, e também propriedade antiagregante plaquetária (BEZERRA et al., 2017; VIEIRA et al., 2017). Outro achado revelou que a CMG apresenta atividade anti-hipertensiva em modelo animal de hipertensão renal (CARVALHO-GALVÃO et al., 2018a).

Apesar dessas evidências relatando uma ação cardioprotetora da CMG, a sua bioatividade na hipertensão ainda é pouco explorada, principalmente em animais SHR, uma vez que seu efeito anti-hipertensivo foi constatado apenas em modelo animal de hipertensão renovascular do tipo dois rins, um clipe (2K1C) (CARVALHO-GALVÃO et al., 2018a). Nesse modelo, o aumento na pressão arterial é desencadeado pela maior produção de Ang II, causada pela redução na perfusão renal (DORNAS; SILVA, 2011).

Sabe-se que um único modelo animal é insuficiente para explicar os efeitos anti-hipertensivos de um determinado composto, uma vez que diversas vias estão envolvidas na fisiopatologia da hipertensão. Assim, é importante o uso de alguns modelos, para avaliar de forma mais efetiva os efeitos cardiovasculares envolvidos (LEONG; NG; JAARIN, 2015). Dessa forma, no presente estudo, foi utilizado o modelo animal SHR, em que a hipertensão é de origem genética e se caracteriza pelo aumento da resistência vascular periférica, alterações estruturais no coração, controle do barorreflexo prejudicado e disfunção endotelial. A importância desse modelo tem sido atribuída à similaridade da sua fisiopatologia com a da hipertensão essencial em humanos, que é o tipo mais frequente (DORNAS; SILVA, 2011).

Diante desse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da CMG da *Saccharomyces cerevisiae* sobre a pressão arterial, função vascular, modulação autonômica, atividade plaquetária e estresse oxidativo em animais SHR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da CMG sobre a pressão arterial, a atividade nervosa autonômica, função vascular e plaquetária de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da CMG sobre o peso corporal e parâmetros bioquímicos em ratos SHR e Wistar Kyoto;
- Investigar o efeito da CMG sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos SHR e Wistar Kyoto;
- Verificar o efeito da CMG sobre alterações estruturais em órgão alvo;
- Analisar o efeito da CMG sobre a sensibilidade do barorreflexo e contribuição do tônus simpático em ratos SHR e Wistar Kyoto;
- Aferir a influência do tratamento com CMG sobre a reatividade vascular frente a ação de agonistas vasodilatadores e vasoconstritores nos ratos SHR e Wistar Kyoto;
- Avaliar o efeito da CMG sobre a agregação plaquetária de ratos SHR e Wistar Kyoto;
- Averiguar o potencial antioxidante da CMG em ratos SHR e Wistar Kyoto.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES E A INFLUÊNCIA DA HIPERTENSÃO

As DCV são as principais causas de morte no Brasil e no mundo, determinando aumento da morbidade e incapacidade ajustadas pelos anos de vida. A presença dos fatores de risco clássicos (hipertensão, dislipidemia, obesidade, sedentarismo, tabagismo, diabetes e histórico familiar) aumenta a probabilidade pré-teste de DCV – com ênfase para a doença arterial coronariana (DAC) – e norteia a prevenção primária e secundária. Dessa forma, a identificação dos indivíduos assintomáticos com maior predisposição é crucial para a prevenção efetiva com a correta definição das metas terapêuticas (BARROSO et al., 2021).

No mundo, as DCV foram responsáveis por, aproximadamente, 18 milhões de morte no ano de 2017. Já em 2019, a prevalência dessas patologias atingiu 523 milhões de casos e foi responsável 18,6 milhões de óbitos. Em relação a hipertensão, observa-se aumento na sua prevalência nas últimas três décadas, com 18,6 milhões de casos registrados ano de 2019, sendo a principal causa de 1,16 milhões de mortes (ROTH et al., 2020). No Brasil, semelhante ao cenário mundial, as DCV estão entre as principais causas de morte, representando um percentual de 27,3% dos óbitos ocorridos em 2017. Essas doenças foram responsáveis por 22,6% das mortes prematuras (entre 30 e 69 anos de idade). Inquéritos populacionais mostram que a Hipertensão Arterial (HA) atinge 32,3 % de indivíduos adultos, com prevalência maior entre homens. Ainda observou-se que aumenta conforme a idade avança, chegando a 71,7% em indivíduos acima de 70 anos (BARROSO et al., 2021).

Uma relação positiva direta tem sido observada entre pressão arterial e fatores de risco para DCV em homens e mulheres de todas as idades, raças, grupos étnicos e países. Estudos observacionais apontam que mortes por DCV aumentam progressivamente e linearmente com a Pressão Arterial Sistólica (PAS) acima de 115 mmHg e Pressão Arterial Diastólica (PAD) acima de 75 mmHg. Além disso, existe um risco dobrado de mortalidade por doença cardíaca isquêmica e Acidente Vascular Cerebral (AVC) para cada aumento de 20 mmHg na pressão sistólica ou 10 mmHg na diástolica em indivíduos de 40 a 89 anos de idade (HALL et al., 2012; MILLS; STEFANESCU; HE, 2020).

Tendo em vista que a HA é o principal fator de risco modificável para as DCV, as quais têm grande impacto na saúde, torna-se importante o uso de estratégias farmacológicas que possibilitem reduzir a morbimortalidade associada a estas patologias. Embora, sejam utilizados

fármacos modernos no manejo dos diversos fatores de risco, como os anti-hipertensivos, os hipolipemiantes e antiagregantes plaquetários, o seu uso está associado a efeitos adversos secundários, além de representar um custo considerável para a população que precisa utilizá-los em longo prazo. Neste contexto, é relevante a busca de novos compostos que, em conjunto com as intervenções não-farmacológicas, as quais incluem modificações no estilo de vida, auxiliem no tratamento das DCV e seus fatores de risco (VERMA et al., 2021).

3.1.1 Hipertensão Arterial

A HA é conceituada como uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial, sendo diagnosticada quando há uma PAS ≥ 140 mmHg e PAD ≥ 90 mmHg persistente. Frequentemente, encontra-se associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos alvo e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (MALACHIAS et al., 2016). Na sua patogênese, existem diversos fatores de risco identificados que se encontram relacionados ao seu desenvolvimento, tais como: idade, gênero e etnia, excesso de peso e obesidade, consumo elevado de sal, ingestão de álcool, sedentarismo, fatores socioeconômicos, genética e outros fatores de risco cardiovascular que geralmente se apresentam de forma agregada a predisposição genética e fatores ambientais (BARROSO et al., 2021).

A Pressão Arterial (PA) pode ser definida como a força que o sangue exerce nas paredes dos vasos sanguíneos, com a principal função de fornecer um suprimento sanguíneo adequado para os tecidos, sobretudo para o cérebro e coração (HALL et al., 2012). A manutenção da pressão arterial normal é determinada pelo Débito Cardíaco (DC) e pela Resistência Vascular Periférica (RVP), os quais são regulados por mecanismos complexos que envolvem a participação de fatores neurais, endócrinos e parácrinos (BEEVERS; LIP; BRIEN, 2001; STAUSS, 2007; VERMA et al., 2021).

Desse modo, a regulação da PA é uma função fisiológica complexa que depende de ações integradas dos múltiplos sistemas cardiovascular, renal, neural, endócrino e controle do tecido local, compreendendo, assim, ações do reflexo barorreceptor, sistema renina-angiotensina, resposta vascular miogênica e participação do óxido nítrico endotelial. Nas DCV, alguns desses mecanismos estão comprometidos, contribuindo para o desenvolvimento de HA, AVC ou insuficiência cardíaca (STAUSS, 2007; HALL et al., 2012).

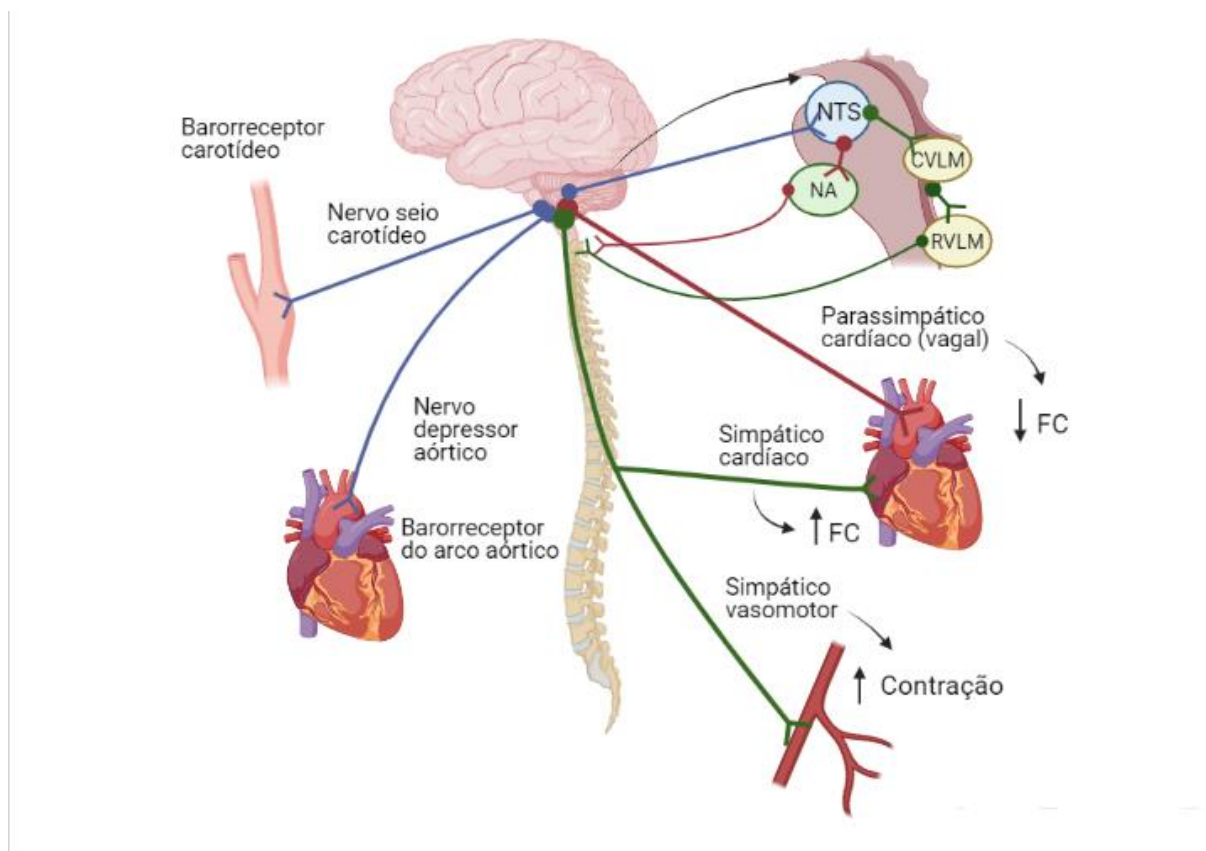
O Sistema Nervoso Central (SNC) possui papel relevante no controle da pressão arterial através do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), o qual exerce ação sobre os níveis pressóricos

regulando o DC e a RVP, que são determinantes da PA, por meio dos nervos simpáticos e parassimpáticos vagais. O sistema parassimpático inerva o coração e pequenos vasos, limitando sua influência ao controle da função cardíaca. Enquanto o simpático se estende pelo coração, vasos sanguíneos, glândulas adrenais e rins, exercendo uma larga influência direta ou indireta no controle da função cardíaca e vascular. Assim, o controle neural da função cardiovascular é efetuado, principalmente, pelo sistema simpático (THOMAS, 2011; DAMPNEY, 2016).

Vários fatores externos podem perturbar a homeostase cardiovascular, como alterações na postura e aumento da atividade muscular esquelética. Assim, os mecanismos que regulam a pressão arterial têm a habilidade de detectar mudanças na pressão e desencadear as ações a curto e a longo prazo necessárias para corrigir e manter a homeostase do sistema cardiovascular. Para o controle a curto prazo, reflexos neurais originados nos barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares são os principais mecanismos envolvidos no ajuste rápido da pressão. Já para controle a longo prazo, o sistema renina-angiotensina é o principal envolvido (GUYTON, 1991; COWLEY, 1992; DAMPNEY et al., 2002).

No controle pressórico de ajuste rápido, o barorreflexo arterial é um sistema de *feedback* negativo, tendo como função tamponar flutuações na PA e é uma chave entre o sistema cardiovascular e o SNA (Figura 1) (SATA et al., 2015). Tal mecanismo é ativado através dos baroreceptores localizados nos seios da artéria carótida e no arco aórtico. Esses sensores, que compõem a via aferente, detectam o estiramento na parede das artérias exercido pela pressão sanguínea e transmitem impulsos nervosos aferentes para o centro integrador no Núcleo do Trato Solitário (NTS) no SNC através do nervo glossofaríngeo e vago. Do NTS, o barorreflexo parassimpático é processado através do núcleo ambíguo via nervo vago em direção ao nó sinoatrial do coração, reduzindo a frequência cardíaca (FC). Já a via do barorreflexo simpático continua do NTS para a Medula Ventrolateral Caudal (CVLM) e em seguida para a Medula Ventrolateral Rostral (RVLM). O fluxo simpático se projeta via neurônios pré motores para a coluna intermediolateral, gerando resposta no coração, aumentando a FC e a contração nos vasos sanguíneos. Dessa forma, o barorreflexo ajusta alterações na PA por meio dos efeitos na FC, DC e na RVP desencadeados por estímulos do SNA simpático e parassimpático (GUYENET, 2006; THOMAS, 2011; WEHRWEIN; JOYNER, 2013; BIAGGIONI, et al., 2019).

Figura 1 – Visão geral do barorreflexo arterial com suas vias aferentes e eferentes



NTS: Núcleo do Trato Solitário; RVLM: Medula Ventrolateral Rostral; CVLM: Medula Ventrolateral Caudal; NA: Núcleo ambíguo
 Fonte: Própria, 2021.

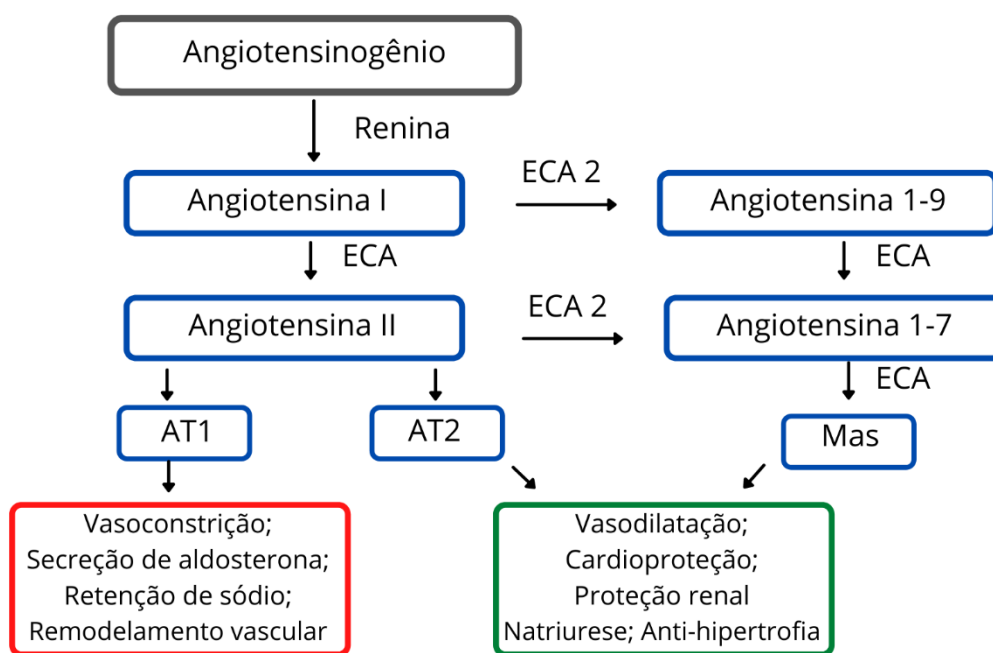
O controle da PA a longo prazo é atribuído ao rim através do Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona (SRAA), o qual é um importante regulador da volemia, atuando através de ajustes na excreção urinária de sódio. Diante de uma redução na pressão de perfusão ou de concentrações de sódio, as células justaglomerulares presentes na parede das arteríolas aferentes são estimuladas a secretar renina. Isso ocorre por estimulação simpática devido ao estiramento dos mecanorreceptores das arteríolas aferentes. A renina liberada converte o angiotensinogênio produzido no fígado em angiotensina I (Ang I), que por sua vez, é convertida pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) em angiotensina II (Ang II), a qual pode atuar de diferentes formas através dos receptores AT1 e AT2 (NAVAR, 2005; SZCZEPANSKA-SADOWSKA; CZARZASTA; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, 2018).

Ao se ligar aos receptores AT1 exerce efeitos biológicos como vasoconstrição, induz a liberação de aldosterona, causando aumento na retenção de sódio e água. Quando se liga aos receptores AT2, a Ang II desencadeia efeitos vasodilatadores. No entanto, a expressão desse

receptor ocorre em baixos níveis no sistema cardiovascular de adultos saudáveis (NAVAR, 2005; ARENDSE et al., 2019).

A ang II também pode ser clivada em angiotensina 1-7, um septapeptídeo, pela isoforma 2 da ECA (ECA2) que se liga ao receptor Mas, desencadeando efeitos opostos a via AT1/Ang II e evidenciando, assim, importante papel patofisiológico dessa enzima (FERREIRA; BADER; SANTOS, 2012). A ECA2 também desempenha papel na conversão de Ang I para Ang 1-9, um peptídeo que reduz efeitos cardiovasculares adversos, como remodelamento, hipertrofia de cardiomiócitos e fibrose em vários modelos animais de hipertensão (ARENDSE et al., 2019; PAZ OCARANZA et al., 2020). Evidências apóiam o conceito de que estes sistemas funcionam para produzir efeitos opostos, sugerindo um papel de contrapeso para os dois eixos na fisiologia e na doença cardiovascular (Figura 2) (SZCZEPANSKA-SADOWSKA; CZARZASTA; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, 2018; PAZ OCARANZA et al., 2020).

Figura 2 – Esquema do Sistema Renina-Angiotensina e os efeitos desencadeados pelas suas vias



ECA: enzima conversora de angiotensina

Fonte: adaptado de Ferreira; Bader; Santos (2012); Arendse et al. (2019)

3.1.2 Fisiopatologia da HA

Tendo em vista que uma série de mecanismos estão envolvidos na regulação e na manutenção da pressão arterial, a ocorrência de algum distúrbio nesses mecanismos pode desencadear a HA. Assim, vários fatores podem contribuir para o aumento dos níveis pressóricos, dentre estes podem ser incluídos a ingestão excessiva de sal, obesidade, resistência a insulina, desbalanço do sistema renina-angiotensina, falha no controle do sistema nervoso simpático, além de fatores genéticos e disfunção endotelial (BEEVERS; LIP; BRIEN, 2001; BROZOVICH et al., 2016).

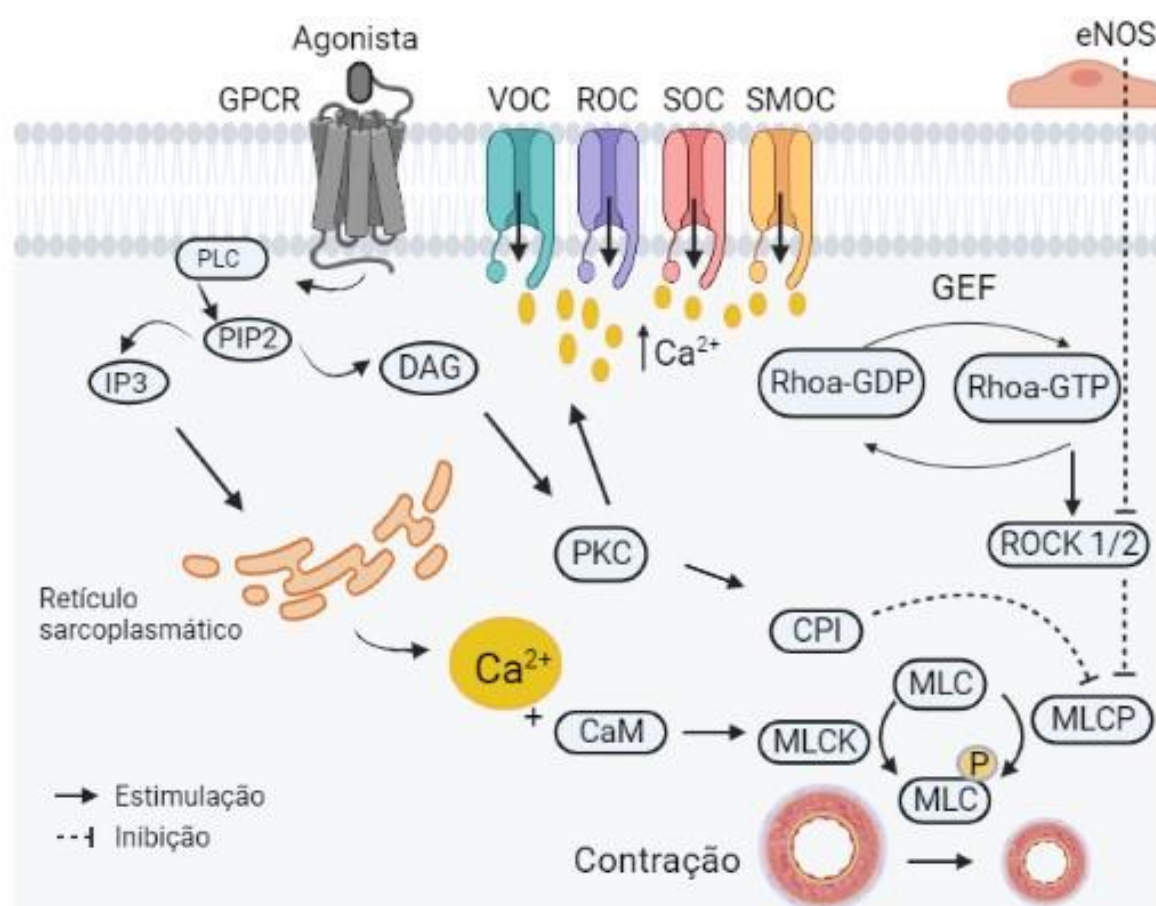
O aumento da resistência vascular periférica é um dos principais fatores envolvidos no desenvolvimento da HA, tendo o envolvimento do remodelamento vascular, que é caracterizado pelo aumento da espessura da parede arterial e redução no lúmen vascular. Considerando que a resistência é inversamente proporcional ao raio para a quarta potência, conforme descrito pela lei de Poiseuille, variações no diâmetro do lúmen vascular influenciam a resistência vascular, assim como a pressão arterial e o dano a órgãos alvos (BEEVERS; LIP; BRIEN, 2001; OPARIL; ZAMAN; CALHOUN, 2003; SCHIFFRIN, 2012).

As células endoteliais saudáveis liberam continuamente vasodilatadores potentes em resposta ao *shear stress* do fluxo sanguíneo, tendo assim a capacidade de reduzir a resistência periférica. No entanto, essa função endotelial pode se encontrar prejudicada, resultando na disfunção endotelial, que é um fator implicado na fisiopatologia de diferentes DCV, incluindo a HA, uma vez que envolve a liberação de fatores vasoconstritores, como tromboxano A₂ (TxA₂), endotelina-1 (ET-1), Ang II e espécies reativas de oxigênio (ROS). Em vasos sanguíneos saudáveis, tais mediadores são moderados pelos fatores vasorrelaxantes, como o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂), fator hiperpolarizante derivado de endotélio (EDHF) e peptídeo natriurético tipo C (BERNATOVA et al., 2009; FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2010; GONZÁLEZ, 2014).

Além do endotélio, as células musculares lisas vasculares possuem também seu relevante papel na regulação da pressão arterial, uma vez que estão envolvidas no mecanismo de contração vascular, sendo assim importantes para determinar as causas da disfunção vascular e da vasconstrição (LIU; KHALIL, 2018). A estimulação dessas células por fatores pró-hipertensivos, como estímulos neuro-humorais (noradrenalina) e agentes vasoativos (Ang II, ET-1, TxA₂) provoca a ativação de vias de sinalização, que irão resultar no aumento dos níveis de cálcio intracelular, evento chave na geração de contração. As principais vias implicadas

nesse processo compreendem a ativação da proteína cinase dependente de cálcio (PKC) e participação da Rho-cinase (Figura 3) (TOUYZ et al., 2018).

Figura 3 – Vias envolvidas na contração das células musculares lisas



GPCR: receptor acoplado a proteína G; PIP2: bifosfato de fosfatidilinositol; IP₃: e 1,4,5 trifosfato de inositol; PKC: proteína cinase C; CaM: calmodulina; MLC: cadeia leve de miosina; MLCK: cinase da cadeia leve de miosina; MLCP: fosfatase da cadeia leve de miosina; FTG: fator de troca de nucleotídeo guanina; VOC: canal de cálcio dependente de voltagem tipo L; ROC: canal de cálcio operado por receptor; SOC: canal de cálcio operado por estoque; SMOC: canal de cálcio operado por segundo mensageiro; NCX: trocador de Na⁺/Ca²⁺

Fonte: Própria, 2021.

Após a ligação do agonista a receptores acoplados à proteína G (GPCR) e ativação da proteína G_{q/11}, a fosfolipase C associada à membrana (PLC) é estimulada e cliva o 4,5 bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP₂), gerando o 1,2 diacilglicerol (DAG) e 1,4,5 trisfosfato de inositol (IP₃). Este se liga ao receptor no retículo sarcoplasmático, provocando a liberação de Ca²⁺ e um aumento transitório na concentração de Ca²⁺ intracelular, que se liga calmodulina (CaM) e fosforila a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), que promove a contração. O DAG age estimulando a PKC que é responsável pelo aumento da condutância iônica dos canais transmembranais de cálcio (do tipo L) e influencia outros canais de cálcio presentes na

membrana (SOC, ROC e SMOC), promovendo influxo e o aumento de cálcio intracelular, que se liga a CaM e fosforila a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), estimulando a interação actina-miosina, que gera força e encurtamento, com consequente contração (TOUYZ et al., 2018).

Essa via da PKC exerce importante papel na sustentação da contração, uma vez que fosforila CPI-17, inibindo CLM fosfatase e, portanto, aumenta a sensibilidade da força do miofilamento ao Ca^{2+} . Também pode fosforilar a calponina (Cap), permitindo que mais actina se ligue à miosina. Além de ativar a cascata de proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK quinase), levando à fosforilação da proteína de ligação à actina caldesmon (CaD) e, consequentemente, à contração (LIU; KHALIL, 2018; TOUYZ et al., 2018).

A RhoA/Rho cinase é também uma via relevante na manutenção da contração vascular, estando envolvida no mecanismo de sensibilização ao Ca^{2+} . Quando ocorre a ligação do agonista ao GPCR, fatores de troca de nucleotídeo guanina (GEF) troca Rho-GDP por Rho – GTP, que ativa a RhoA e estimula suas cinases associadas, que inativam a fosfatase da MLC (MLCP), impedindo assim a desfosforilação da MLC, possibilitando a manutenção da contração. Além disso, são capazes de inibir a sintase do NO endotelial (eNOS), reduzindo a produção de óxido nítrico (NO) e o relaxamento. Ambas as cinases são largamente expressas nas células musculares lisas e endoteliais (NUNES; WEBB, 2020).

Outro fator implicado na patologia da hipertensão é o estresse oxidativo, uma vez que a produção vascular excessiva de ROS provoca redução na biodisponibilidade de NO e da capacidade antioxidante. Assim, essas moléculas podem atuar no controle do tônus vascular e também na função endotelial, estando envolvidas na inflamação, hipertrofia, proliferação, apoptose, angiogênese e fibrose, que em conjunto, são processos importantes na disfunção endotelial e remodelamento vascular associadas a hipertensão. No entanto, todas as células vasculares, incluindo as endoteliais e lisas musculares, produzem ROS e estas também podem ser geradas por enzimas, como a xantina oxidoreductase, sintase de óxido nítrico desacoplada, enzimas respiratórias mitocondriais e fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADPH) oxidase, sendo esta a mais relevante nesse distúrbio cardiovascular (BRIONES; TOUYZ, 2010; LASSÈGUE; GRIENDLING, 2004).

As ROS derivadas da NADPH oxidase e da xantina oxidase causam redução da disponibilidade do NO, agregação plaquetária elevada, inflamação e vasoconstrição mediante aumento da concentração de Ca^{2+} citosólica (GONZÁLEZ, 2014). Ainda, o estresse oxidativo está implicado na deficiência da tetra-hidrobiopterina (BH_4), um cofator essencial da eNOS, que ocasiona produção de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pela eNOS, sendo esta alteração denominada

mecânicas que promovem vasoconstrição, hipertrofia vascular, fibrose, inflamação e calcificação (TOUYZ et al., 2018).

Na fisiopatologia da HA também há envolvimento do sistema nervoso, uma vez que a ativação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) em detrimento do Sistema Nervoso Parassimpático (SNP) está implicada na patogênese dessa condição, desde o seu desenvolvimento inicial até na ocorrência de danos em órgãos alvo, como AVC e falência renal e cardíaca. Há evidências relatando a ativação do SNS em aproximadamente 50% dos pacientes com hipertensão, sobretudo naqueles com hipertensão essencial. No SNC, o fluxo simpático é determinado pelos núcleos e circuitos neurais que envolvem alguns neurotransmissores e neuromoduladores. Os circuitos localizados no tronco cerebral, os quais possuem entradas inibitórias e excitatórias do núcleo supramedular, com atividade dos barorreceptores são considerados fundamentais para o desenvolvimento da HA (HIROOKA, 2015).

Nesse sentido, através de estímulos no coração, nos vasos periféricos e rins que provocam aumento do débito cardíaco, da resistência vascular periférica e da retenção de fluídos, o aumento da atividade nervosa simpática eleva os níveis pressóricos e contribui assim para o desenvolvimento e manutenção dos níveis pressóricos elevados. Os mecanismos envolvidos na maior atividade nervosa simpática são complexos e compreendem a participação das vias do barorreflexo e quimiorreflexo. Além disso, esse desequilíbrio autonômico está associado aos danos nos órgãos alvos relacionados à elevação na pressão arterial, como a hipertrofia ventricular esquerda no coração (BEEVERS; LIP; BRIEN, 2001; OPARIL; ZAMAN; CALHOUN, 2003; PARATI; ESLER, 2012; GRASSI; RAM, 2016).

O barorreflexo auxilia na redução da pressão em níveis normais, sendo assim um relevante mecanismo de regulação. Em indivíduos hipertensos, há uma reinicialização desse reflexo que resulta na supressão da inibição da via simpática após ativação dos nervos barorreceptores aórticos. Isso parece ser mediada, parcialmente, pela ação central da angiotensina II, que ainda amplifica a estimulação simpática por mecanismo periférico. Outras moléculas, como ROS e endotelina, também têm a capacidade de inibir o reflexo barorreceptor e contribuem para uma atividade simpática exagerada (BEEVERS; LIP; BRIEN, 2001; OPARIL; ZAMAN; CALHOUN, 2003; GRASSI; RAM, 2016;).

Além disso, existem evidências que o aumento da geração de ROS no cérebro, mais especificamente no tronco encefálico, contribui para mecanismos neurais de hipertensão em animais hipertensos. No modelo SHR, o estresse oxidativo na medula ventrolateral rostral, localizado no tronco encefálico e que é fundamental para a manutenção do tônus vasomotor basal, possui papel relevante na hipertensão por meio da ativação do SNS. Nessa região do

cérebro, a principal fonte de ROS é a NADPH oxidase (GONZÁLEZ, 2014; HIROOKA, 2015; GRASSI; RAM, 2016). Nesse contexto, o entendimento sobre a participação do SNS na fisiopatologia da hipertensão pode subsidiar o desenvolvimento de estratégias de intervenção terapêutica eficazes para doenças cardiovasculares.

Assim, a compreensão sobre o papel que as principais vias desempenham na fisiopatologia da HA e como elas interagem é essencial tanto para a geração de novas terapias quanto para a sua seleção (ROCHLANI et al., 2017). O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da hipertensão tem sido um processo contínuo, que teve início há 60 anos com a descoberta dos diuréticos tiazídicos. Atualmente, já existem várias drogas anti-hipertensivas no mercado, sendo que as principais classes farmacológicas incluem os beta-bloqueadores, diuréticos, inibidores da ECA, bloqueadores do receptor da angiotensina II, bloqueadores de canais de cálcio. Outras classes compreendem inibidores de renina, antagonista do receptor α -adrenérgico, agentes de atuação central, vasodilatadores de ação direta (LAURENT, 2017).

3.1.3 Ratos Espontaneamente Hipertensos

Em pesquisa que trata acerca do sistema cardiovascular, modelos animais permitem o estudo da DCV nos estágios iniciais, assim como possibilita investigar os mecanismos envolvidos na sua patogênese e efeitos da intervenção farmacológica (DOGGRELL; BROWN, 1998a). Em virtude da alta prevalência da HA e de suas comorbidades, modelos animais experimentais têm sido desenvolvidos. No entanto, o estudo efetivo de uma DCV em particular que encontra-se em processo de desenvolvimento requer o uso do modelo animal mais adequado. Dentre os modelos animais de hipertensão disponíveis, o SHR têm sido comumente utilizados em estudos que investigam efeito antihipertensivo de drogas (DOGGRELL; BROWN, 1998; DORNAS; SILVA, 2011).

Os animais SHR são obtidos a partir do cruzamento entre as linhagens Wistar e Aoki, que apresenta hipertensão. Neste modelo animal, a gênese da patologia ocorre sem intervenção fisiológica, farmacológica ou cirúrgica. No entanto, fatores ambientais afetam o desenvolvimento desse distúrbio. Assim, a relevância desse modelo é atribuída a similaridade da sua fisiopatologia com a da hipertensão essencial em humanos. Nos animais SHR, a PAM é de aproximadamente 180-200 mmHg comparados aos normotensos que apresentam níveis pressóricos em torno de 115-130 mmHg, sendo mantido níveis altos após 12 semanas de idade (DORNAS; SILVA, 2011; PINTÉROVÁ; KUNEŠ; ZICHA, 2011).

Nesse modelo, à medida que o estado hipertensivo se estabelece, ocorre um aumento da resistência vascular periférica e desenvolvimento de alterações estruturais no coração, como hipertrofia (DORNAS; SILVA, 2011). Além disso, têm sido descritas alterações hemostáticas como o aumento da agregabilidade de eritrócitos e da reatividade plaquetária, possivelmente causadas pelo aumento da resistência vascular periférica e por alterações na interação célula endotelial-plaqueta, respectivamente. Assim, nos animais SHR há o desenvolvimento de um estado pró-trombótico (LOMINADZE; JOSHUA; SCHUSCHKE, 1997,1998).

Ademais, o modelo animal SHR também apresenta maior excitação do tônus simpático cardíaco e vascular e redução do tônus parassimpático cardíaco, demonstrando um controle de sensibilidade barorreflexo prejudicado, o qual é um mecanismo importante na regulação da pressão diante de um aumento repentino (KLIPPEL et al., 2016; SATA et al., 2015). Essa hiperatividade simpática observada nesse modelo está relacionada, além da participação de ROS, a uma maior densidade de inervação simpática presente nos SHRs comparados aos normotensos (PINTÉROVÁ; KUNEŠ; ZICHA, 2011).

Em relação a função vascular, há evidências demonstrando que a resposta vasorrelaxante dependente de endotélio é prejudicada nos animais SHRs, envolvendo a vasodilatação mediada por NO, PGI₂ e EDHF. No entanto, alguns achados sugerem que a resposta vasorrelaxante independente de endotélio pode estar aumentada, indicando um aumento compensatório na função do NO no estado hipertensivo, com participação dos canais de Ca²⁺ sensíveis a voltagem nas células musculares lisas vasculares. Porém, outros estudos não demonstram esse mecanismo de compensação. Um dos mecanismos que contribui para essa disfunção na vasodilatação mediada por endotélio, inclui a maior inativação de NO provocada por uma produção excessiva de ânions superóxidos (O₂^{•-}) no endotélio vascular de animais SHR e que está associada a algumas formas de hipertensão (BAUERSACHS et al., 1998; CHANG et al., 2002; LEWIS et al., 2005; JIANG et al., 2016).

3.2 A FUNÇÃO PLAQUETÁRIA NA HIPERTENSÃO ARTERIAL

As plaquetas são células sanguíneas anucleadas com diâmetro entre 2-3 µm e sua síntese ocorre a partir dos megacariócitos na medula óssea. Apresentam em sua estrutura um sistema microtubular, mitocôndrias, glicogênio, grânulos alfa, grânulos densos e lisossômicos e sistema de membranas internas. Esses componentes celulares têm como função primária a hemostasia, porém estão também envolvidas na trombose. Além disso, são células especializadas na defesa

imune inata, atuam como moduladores da resposta inflamatória e estão envolvidas no processo de cicatrização (JURK; KEHREL, 2005; PIERDONÁ, 2011; YADAV; STORRIE, 2017).

Em condições fisiológicas, as plaquetas circulam em estado quiescente, protegidas da ativação precoce por mediadores inibitórios liberados das células endoteliais intactas, tais como o NO, PGI₂ e adenosina (PIERDONÁ, 2011; ZARBOCK; POLANOWSKA-GRABOWSKA; LEY, 2007). A matriz subendotelial é uma superfície altamente reativa para as plaquetas, fazendo com que um processo lesivo possa desencadear reações de ativação. A resposta plaquetária durante a ativação pode ser reconhecida através de vários eventos progressivos e sobrepostos que compreendem: alteração da forma das plaquetas, adesão ao local de injúria, secreção, caracterizada pela liberação do conteúdo presente em seus grânulos e, por fim, a agregação plaquetária (PIERDONÁ, 2011; RANA et., 2019).

O processo secretório é fundamental para a função das plaquetas e compreende a liberação de três tipos de grânulos secretórios: grânulos alfa, lisossômicos e densos. Estes últimos são compostos por agonistas secundários, como difosfato de adenosina (ADP) ou serotonina, que estimulam a atividade plaquetária. O ADP é um proeminente amplificador da ativação inicial das plaquetas através de receptores P2Y. Esse agonista também atua nos receptores P2Y das células endoteliais para liberar prostaciclina e NO provocando, assim, vasodilatação. Porém, em situações patológicas nas quais o endotélio vascular é lesionado ou removido, ele pode agir como vasoconstritor (JURK; KEHREL, 2005; YADAV; STORRIE, 2017).

Outros agonistas da atividade plaquetária são a trombina e o colágeno. Este é responsável pelo início da adesão plaquetária por meio de várias proteínas que atuam como receptores na superfície das plaquetas e aquele é considerado um potente ativador plaquetário, com habilidade de estimular a secreção plaquetária quando não há agregação. A sinalização mediada pela trombina ocorre através de receptores ativados por protease ligados a proteína G (SAVAGE; RUGGERI, 2007). O acetato de forbol miristato (PMA) também é um potente agonista plaquetário atuando como um mimetizador do diacilglicerol (DAG), o qual ativa a PKC que provoca ativação da integrina e secreção dos grânulos (GOEL et al., 2007; ESTEVEZ; DU, 2017).

Quando ativadas, as plaquetas liberam mediadores químicos (ADP, tromboxano A₂ (TXA₂), adrenalina, cálcio, entre outros) que são capazes de modular as funções plaquetárias e as interações entre as plaquetas, células sanguíneas e vasculares (JURK; KEHREL, 2005; PIERDONÁ, 2011; RANA et al., 2019). Assim, a hiperatividade plaquetária parece ser acessória para o desenvolvimento de trombose, aterosclerose, distúrbios cardiovasculares e

cerebrovasculares e está envolvida no processo inflamatório e no câncer. Além disso, essas células também participam da sepse e de processos inflamatórios agudos (SALUK-JUSZCZAK et al., 2010). A hipertensão é relacionada ao aumento da incidência dessas complicações trombóticas arteriais, principalmente está associada ao infarto do miocárdio e AVC isquêmico (GKALIAGKOUSI et al., 2010).

Na HA são observadas algumas alterações na função plaquetária, as quais são importantes para a sustentação de um estado pró-trombótico. Tais alterações encontram-se resumidas na tabela 1. Nessa patologia, há uma maior hiperatividade plaquetária, existindo uma relação linear positiva entre pressão arterial e predisposição para agregação plaquetária. Além disso, em indivíduos hipertensos é observado uma maior agregabilidade plaquetária in vitro para alguns agonistas como ADP, adrenalina e colágeno (EL HAOUARI; ROSADO, 2009). Isso ocorre devido a aspectos vasculares e hemodinâmicos característicos da hipertensão, como a força de cisalhamento aumentada e disfunção endotelial, que estão relacionados a redução na produção de NO e prostaciclina, propiciam a ativação das plaquetas. Também há uma maior sensibilidade e produção endógena de catecolaminas e angiotensina II, as quais induzem agregação e ativação plaquetária (BLANN; NADAR; LIP, 2003; EL HAOUARI; ROSADO, 2009).

Tabela 1 – Alterações plaquetárias na hipertensão

Alterações morfológicas	Aumento do volume
	Mudança na forma
	Aumento do <i>turnover</i>
Alterações bioquímicas	Aumento do cálcio intracelular livre
	Redução nos níveis de calmodulina
	Maior sensibilidade as catecolaminas
	Maior densidade de adrenoceptores
	Redução nos níveis intracelulares de catecolaminas e serotonina
Alterações funcionais	Agregação aumentada para agonistas como ADP e colágeno
	Maior adesão a moléculas como fibrina e vitronectina
	Maior agregação espontânea
	Maior expressão de marcadores de membrana, como P-selectina
	Maior liberação de marcadores solúveis de grânulos

Fonte: adaptado de Blann; Nadar; Lip, 2003.

A ativação plaquetária é considerado um fator relevante envolvido no aumento de risco de complicações trombóticas na patologia da hipertensão, e isso pode ser mediado através de vários mecanismos. Dentre eles, a ativação neuro-humoral desempenha papel importante no processo de ativação plaquetária, uma vez que a atividade nervosa simpática aumentada propicia a liberação de noradrenalina dos terminais nervosos adrenérgicos, aumentando a capacidade de resposta dos receptores. Além disso, o tônus simpático aumentado ativa plaquetas, contribuindo para a hipercoagulabilidade presente na hipertensão. Também a regulação positiva dos α 2-adrenoreceptores na hipertensão essencial ocasiona uma maior sensibilidade a ação agregante das catecolaminas (GKALIAGKOUSI et al., 2010).

Outro fator que também exerce influência na função das plaquetas, são as espécies reativas de oxigênio (ROS), uma vez que evidências crescentes sugerem que essas moléculas, em conjunto com NO, adenosina e PGI₂, podem desempenhar papel relevante na regulação da atividade plaquetária. Isso pode ser observado através de constatações, as quais revelam que a exposição de plaquetas ao peróxido de hidrogênio suportou a ativação plaquetária dependente de ácido araquidônico e colágeno. Também foi demonstrado que o peróxido de hidrogênio possui a capacidade de desencadear a fosforilação de tirosina de β 3, um mecanismo de ativação plaquetária independente, aumentando a agregação. Além disso, o superóxido tem a habilidade de aumentar a ativação de plaquetas induzida por colágeno, ácido araquidônico, trombina e ADP, bem como sequestrar plaquetas e NO derivado do endotélio, reduzindo assim seu efeito inibidor na agregação. Esse mecanismo parece contribuir para as complicações cardiovasculares (KOMOSA et al., 2017).

Nas plaquetas, ROS também são produzidos primariamente pelo complexo enzimático da família NADPH oxidase (NOX), o qual foi inicialmente descrito nos fagócitos. Dentre as isoformas da família NOX descritas nos mamíferos, a NOX2 é expressa nas plaquetas, onde induzem a produção de ânions superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) provocando a ativação plaquetária e também encontram-se envolvidas na geração de fenótipo trombogênico (FUENTES et al., 2018).

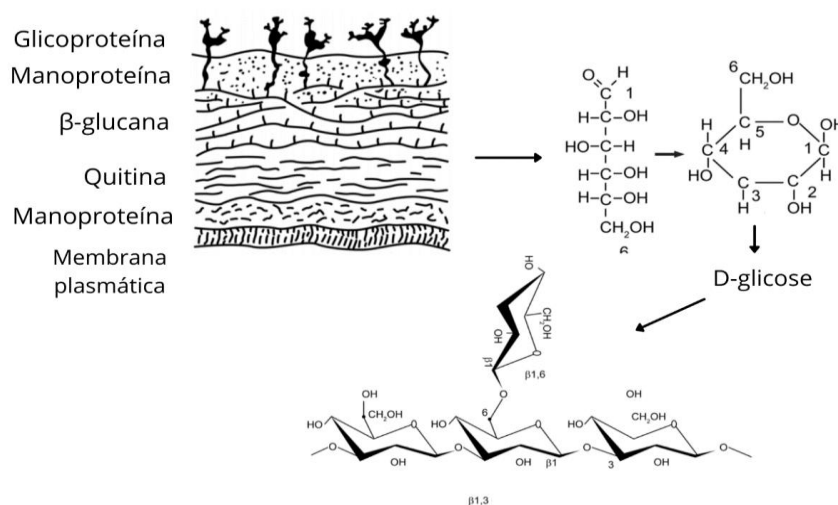
Os agentes antiplaquetários são utilizados para tratar e prevenir trombozes arteriais. Porém, esta classe farmacológica é deficiente de integrantes, sobretudo quando está relacionado a melhora da função endotelial. Dentre os fármacos com ação antiplaquetária, o ácido acetilsalicílico e o clopidogrel são os mais comumente estudados e prescritos. No entanto, apesar dos seus benefícios, há limitações clínicas importantes, como aumento do risco residual de eventos isquêmicos, maiores riscos de sangramento e inibição da agregação variável. Assim,

é importante o desenvolvimento de novos compostos que sejam eficazes e com menores riscos (FINTEL, 2012; MORALES VIDAL; RULAND, 2013; RANA et al., 2019).

3.3 β -D-GLUCANAS

As β -glucanas são polissacarídeos constituídos por monômeros de D-glicose unidas por ligações β glicosídicas, encontrada amplamente na parede celular de diversos microrganismos e plantas, sendo possível sua obtenção de fontes variadas. No entanto, a sua estrutura pode mudar de acordo com a fonte, tais como as β -D-glucanas presentes na parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais (ex.: aveia, cevada), que são semelhantes devido ao tipo de ligação entre as unidades de glicose da cadeia principal (β 1-3), mas se diferenciam pelas ramificações (β 1-6 para leveduras ou β 1-4 para cereais) (MANTOVANI et al., 2008; BAI et al., 2019).

Figura 5 – Componentes da parede celular de leveduras e estrutura da (β 1-3) (β 1-6) D-Glucana



Fonte: adaptado de Chan; Chan; Sze, 2009

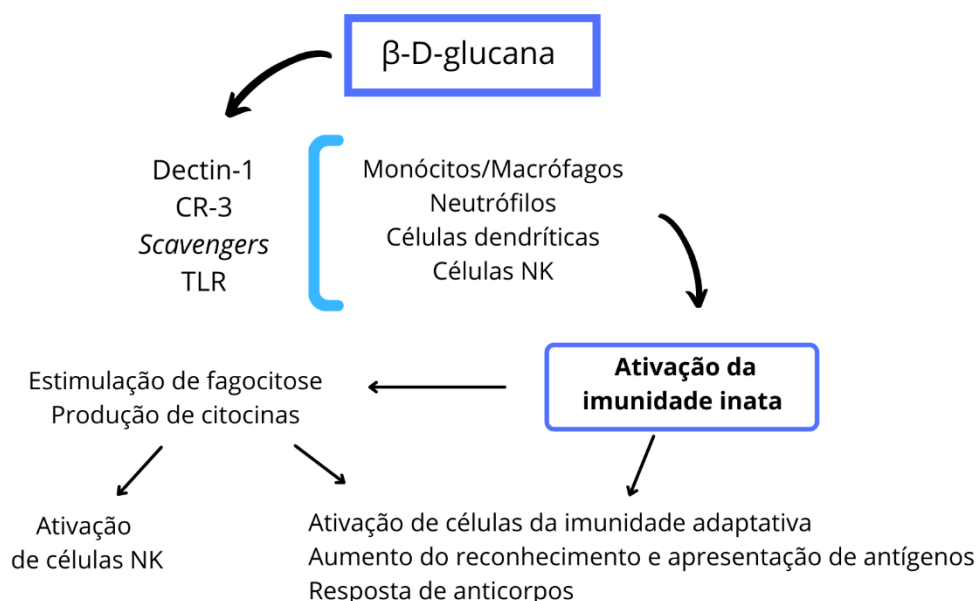
Algumas propriedades benéficas têm sido conferidas as β -D-glucanas e, em virtude disso, diversas aplicações foram encontradas para esse grupo de polissacarídeos. Na indústria de alimentos, são empregadas como um agente espessante e como um ingrediente funcional utilizado na fabricação de produtos nutricionais e saudáveis. Também é aplicada na indústria farmacêutica, sendo introduzida na formulação de produtos farmacêuticos com função de suplementos e no desenvolvimento de cosméticos (BAI et al., 2019b; DU; BIAN; XU, 2014). Estes usos levam em consideração a sua bioatividade, uma vez que diversos efeitos biológicos benéficos como imunomodulação, antitumoral (OOI; LIU, 2000; BROWN et al., 2003;

AKRAMIENE et al., 2007), ativação leucocitária, anti-inflamatório (DU et al., 2015; NAMEDA et al., 2007), antimutagênico, antioxidante (KRIZKOVA et al., 2003; SLAMENŇOVÁ et al., 2003; SALUK-JUSZCZAK; KROLEWSKA; WACHOWICZ, 2010), hipocolesterolêmico, hipoglicêmico (CHAN; CHAN; SZE, 2009; CLOETENS et al., 2012), antiagregante plaquetário e modulador vascular têm sido atribuídos a esse polímero (LOWE et al., 2002; SALUK-JUSZCZAK; KRÓLEWSKA; WACHOWICZ, 2010; BEZERRA et al., 2017).

Embora diversas propriedades tenham sido constatadas, o efeito das β -D-glucanas como imunomodulador é o mais explorado e melhor compreendido, sendo consideradas farmacologicamente como Modificadores de Respostas Biológicas (MRB) por serem capazes de estimular células que compõem o sistema imune (CHAN; CHAN; SZE, 2009; KIM et al., 2000; VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008). Esse polissacarídeo é descrito como um Padrão Molecular Associado a Patógeno (PAMP), que são reconhecidos por Receptores de Reconhecimento Padrão (PRR) presentes na membrana de monócitos, linfócitos, macrófagos, células *Natural Killers* (NK), neutrófilos, eosinófilos (BROWN; GORDON, 2005; GOODRIDGE; WOLF; UNDERHILL, 2009).

Os principais PRRs envolvidos na atividade imunomoduladora das β -D-glucanas são o Dectin-1, o qual é mais bem compreendido; o receptor do sistema complemento 3, CR-3; “Scavengers”, grupo heterogêneo de moléculas; Lactosil – Ceramida, LacCer; e receptor “Toll-like”, TLR. Quando as β -D-glucanas são reconhecidas por esses receptores, respostas imunes como fagocitose, degranulação de neutrófilos, *burst* oxidativo, produção de fatores inflamatórios, de citocinas e quimiocinas são desencadeadas. Os efeitos desses compostos no sistema imune encontram-se resumidos na figura 6 (BROWN et al., 2003; CHAN; CHAN; SZE, 2009; CHEN; SEVIOUR, 2007; LEGENTIL et al., 2015; SIMA; VANNUCCI; VETVICKA, 2018)

Figura 6 – Representação simplificada do efeito imunomodulador de β -D-glucanas



TLR: receptor *toll-like*; NK: natural killer

Fonte: adaptado de Sima; Vannucci; Vetvicka, 2018

Além dessa potente atividade imunomoduladora, evidências indicam ação cardioprotetora das β -D-glucanas de leveduras, demonstrando ação anti-hipercolesterolêmica em humanos (EL KHOURY et al., 2012; NICOLosi et al., 1999), capacidade de reduzir infarto em modelos de isquemia e reperfusão em porcos (AARSAETHER et al., 2012) e habilidade em reduzir o desenvolvimento de aterosclerose em ratos através da diminuição dos níveis sanguíneos de LDL oxidada (AOKI et al., 2015). Ainda, a β -D-glucana da *S. cerevisiae* apresentou efeito hipocolesterolêmico e hipoglicêmico em ratos obesos (ARAÚJO et al., 2017). Mosikanon et al. (2017) também observaram efeito benéfico desse polímero em indivíduos com sobrepeso e obesidade que, após ingestão de 477 mg por oito semanas, apresentaram redução de citocinas pró-inflamatórias, da pressão arterial e circunferência da cintura, sendo estes fortes fatores de risco para DCV.

Pressupõe-se que um dos mecanismos envolvidos no efeito cardioprotetor de β -D-glucanas está relacionado a sua capacidade de modificar o processo de sinalização celular no músculo cardíaco danificado através da ativação de TLR, com inibição da via NF- κ B/My88 e estimulação da ativação da via fosfatidilinositol-3quinase PI3K/Akt, promovendo assim a sobrevivência de cardiomiócitos após dano cardíaco, inibição da apoptose de células cardíacas e modulação da expressão de mediadores inflamatórios. Ainda, em virtude da ação sequestrante de radicais livres demonstrada por esse polissacarídeo, atribui-se um papel protetor devido a

redução do dano oxidativo pós isquemia (AARSAETHER et al., 2011; AARSAETHER et al., 2012; LI et al., 2004).

Com relação à atividade antiagregante, observam-se resultados relacionados à forma linear (β 1-3) da D-Glucana isolada de *S. cerevisiae*, os quais demonstram uma significativa atividade antiplaquetária *in vitro* em diferentes concentrações e de maneira dose-dependente, quando a agregação plaquetária foi induzida por ADP, colágeno e trombina. Esse polímero também demonstrou habilidade de impedir a secreção plaquetária. As autoras atribuem esse efeito a inibição da via do ácido araquidônico e de geração de ânion superóxido, apontando assim para uma atividade antioxidante (SALUK-JUSZCZAK et al., 2010). Quando à forma ramificada, foi observado efeito antiagregante plaquetário da (β 1-3, β 1-6) isolada de *S. cerevisiae* em animais tratados com 20 mg/kg, sendo foi mais efetiva quando a agregação foi estimulada por colágeno (BEZERRA et al., 2017).

Ademais, evidências sugerem que as β -D-glucanas exercem efeito anti-inflamatório importante, sobretudo na regulação de mediadores inflamatórios produzidos por componentes celulares, como as citocinas pró-inflamatórias. Além disso, estão envolvidas na produção de óxido nítrico, de cicloxigenases e lipoxagenases, na inibição do metabolismo de ácido araquidônico e tem ação anti-inflamatória através da sua atividade antiagregante demonstrada em estudos *in vitro* e *in vivo*, uma vez que as plaquetas envolvidas no processo de hemostasia contribuem para processos inflamatórios (CHEN et al., 2013; DU et al., 2015; BEZERRA et al., 2017; AKHAPKINA et al., 2018).

Diante das evidências de diversos efeitos benéficos atribuídos as β -D-glucanas, algumas características desse polissacarídeo, como a massa molar e a hidrossolubilidade, que dependem da ramificação estrutural e de modificações químicas, são consideradas fundamentais para o seu uso clínico. Contudo, existem relatos discordantes acerca da influência da massa molar na eficácia desse polímero. Estudo aponta que as β -D-glucanas mais eficazes clinicamente tem massa molar entre 100 e 200 kDa e com grau de ramificação de 0.2 a 0.5 (BOHN; BEMILLER, 1995). No entanto, El Enshasy e Hatti-Kaul (2013) relatam que β -D-glucanas com massa molar acima de 200 kDa são mais eficazes em virtude da sua afinidade aos receptores das células imunes. Apesar disso, há evidências que a escleroglucana ramificada (β 1-6) com menos de 5 kDa exibe uma potente atividade imunoestimulante, com aumento da produção do TNF- α e a proliferação linfocitária (BIMCZOK et al., 2009) e a lentinana de baixo peso molecular possui uma elevada atividade antitumoral (ZHANG et al., 2005).

As β -D-glucanas do tipo lineares são as mais estudadas e demonstram significativa atividade biológica (JAMOIS; FERRIERES, 2005; CHEN; SEVIOUR, 2007). Por outro lado,

as ramificadas geralmente apresentam uma maior variedade de efeitos biológicos, como também uma maior potência e eficácia farmacológica (EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013a). Há evidências que as mais ativas quanto a atividade imunomoduladora apresentam grau de ramificação entre 20 e 33% (KIM et al., 2000; CHEN; SEVIOUR, 2007; MAGNANI et al., 2012). Outro aspecto importante que corrobora a eficácia das β -D-glucanas ramificadas é a modificação química que permite, no caso de formas carboximetiladas, um aumento da afinidade entre o polissacarídeo e o receptor da célula imune, melhorando a resposta biológica (TAO; ZHANG; CHEUNG, 2006; CHEN; ZHANG; CHEUNG, 2010; EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013).

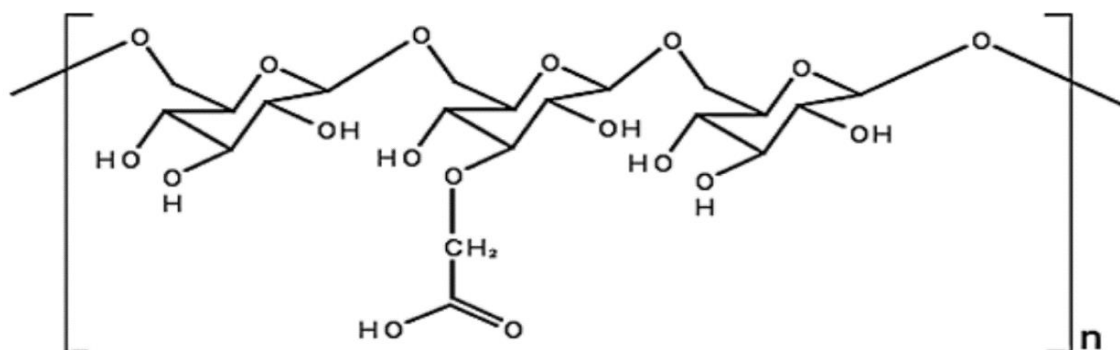
Além de exibir efeitos biológicos positivos com boa potência e eficácia, o uso desses polímeros não apresenta riscos de toxicidade. Com base em estudos toxicológicos, as β -D-glucanas, tanto lineares quanto ramificadas, obtidas de diversas fontes apresentam boa segurança para uso clínico, seja de forma aguda ou crônica, não demonstrando efeitos tóxicos e adversos (FELETTI et al., 1992; JONKER et al., 2010; TÚRMINA et al., 2012; WENG et al., 2011). Evidências reforçam essa segurança também para a forma ramificada (β 1-3, β 1-6) extraído da *S. cerevisiae*, que não demonstrou efeitos adversos ou tóxicos após administração oral de 2, 33,3 ou 100 mg/kg em ratos durante 91 dias seguidos (BABÍČEK et al., 2007). Quanto à forma carboximetilada da *S. cerevisiae* avaliada nesse estudo, não foram observados efeitos genotóxicos ou citotóxicos nas concentrações de 100 e 200 μ g/mL em testes *in vitro* (MAGNANI et al., 2009).

3.4 CARBOXIMETIL-GLUCANA (CMG)

As modificações químicas na estrutura de polissacarídeos são executadas com objetivo de aprimorar as propriedades biológicas e ampliar as aplicações desses polímeros e, desse modo, formas carboximetiladas, fosforiladas, acetiladas e sulfatadas são obtidas. Tais derivados geralmente possuem uma melhor bioatividade, seja antioxidante, antitumoral, anticoagulante e imunomodulatória (EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013; KAGIMURA et al., 2014).

A CMG é um dos derivados solúveis mais estudados, sendo obtido através da substituição de grupos hidroxilas por grupos carboxilas (Figura 7). Esse processo é realizado por meio da suspensão do biopolímero em ácido cloroacético sob condições alcalinas, sendo a derivatização controlada por titulação potenciométrica (MAGNANI et al., 2009).

Figura 7 – Representação estrutural da β -D-Glucana de levedura submetida a carboximetilação.



Fonte: Kagimura et al, 2014

As β -D-glucanas obtidas de diversas origens e que foram submetidas a carboximetilação demonstram propriedades físico-químicas, como a solubilidade, e biológicas melhoradas. Essa modificação também aumenta a eficácia desse polissacarídeo possivelmente pelo aumento da afinidade com o PRR da célula imune através de ligações de hidrogênio e atração eletrostática, melhorando assim a resposta biológica (TAO; ZHANG; CHEUNG, 2006; EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013; KAGIMURA et al., 2014). Ademais, a derivatização facilita e possibilita o uso medicinal de compostos insolúveis através da redução de efeitos adversos, como formação de granulomas, dor e hipersensibilidade associados ao uso parenteral de β -D-glucanas insolúveis (MAGNANI et al., 2009).

Estudos apontam uma potencial atividade antioxidante dos derivados carboximetilados de β -D-glucanas. Babincova et al. (2002) observaram que a CMG da *S. cerevisiae* tem capacidade antioxidante, com atividade sequestrante de radicais livres comparável a outros antioxidantes potentes já bem conhecidos, como tocoferol e manitol. Machová e Bystrický (2013) também mostraram que este derivado possui um efeito antioxidante de maneira dose-dependente. Em indivíduos saudáveis, esse derivado reduziu os níveis de malondialdeído, demonstrando que esse polímero pode ser útil na prevenção do estresse oxidativo (ARAÚJO et al., 2015).

Em estudos *in vitro*, Chen et al. (2014) verificaram que a CMG do *Ganoderma atrum* mostrou ação antioxidante, melhorou a capacidade de fagocitose nos macrófagos e aumentou a secreção do TNF- α , demonstrando atividade imunomodulatória. Tais efeitos foram influenciados pelo peso molecular, bem como pelo grau de substituição na cadeia do polissacarídeo, indicando que o grau de modificação química é relevante para a bioatividade

desses derivados. No presente estudo, a CMG em teste apresenta grau de substituição de 0.8, estando na faixa de 0.56 a 0.89, a qual é considerada ótima para esse tipo de modificação (MAGNANI et al., 2009).

A propriedade antioxidante de derivados carboximetilados também foi constatada por Xu et al. (2009), que observaram ação sequestrante de radicais hidroxil e de peróxido de hidrogênio da CMG oriundo de *Ganoderma lucidum*. Em outro estudo com animais, o derivado carboximetil sulfatado de β -D-glucana obtida do *Poria cocos* foi capaz de inibir o crescimento do tumor sarcoma, sendo observado sinais de necrose e apoptose. Ainda foi verificado aumento da atividade dos fagócitos, sugerindo uma ação imunomodulatória. Os autores presumem que a modificação química melhorou o contato do polissacarídeo com os receptores das células imunes através de ligações de hidrogênio e atração eletrostática, levando a uma forte resposta imunológica, a qual resultou na inibição da proliferação das células cancerígenas (CHEN; ZHANG; CHEUNG, 2010).

A literatura também descreve efeito protetor contra danos no DNA e aumento dos níveis de leucócitos, células sanguíneas, hematócrito e hemoglobina em pacientes com câncer de próstata avançado que receberam CMG de *S. cerevisiae*. (MAGNANI et al., 2010). Esse derivado ainda estimulou células CD4 e CD8 no sangue periférico dos pacientes que carregavam o genótipo CCR5, receptor crucial para respostas imunes, indicando uma interação entre imunomodulação do derivado e o receptor (MAGNANI et al., 2012).

Atualmente, estudos que avaliaram os efeitos da CMG sobre o sistema cardiovascular sugerem efeito cardioprotetor da forma carboximetilada obtida de *S. cerevisiae*. Em estudo prévio, constatou-se, através de testes *in vivo* e *in vitro*, aumento da potência da resposta vascular desencadeada por doador de óxido nítrico, exercendo assim efeito modulador positivo na função vascular em ratos tratados na dose de 20 mg/kg durante 8 dias. Além disso, a CMG demonstrou efeito antiplaquetário em estudos *in vitro* em diferentes concentrações (100 e 300 μ g/mL) e foi eficaz na inibição da agregação plaquetária induzida por ADP e colágeno nos ratos tratados, sem afetar a exposição da P-selectina e com efeito semelhante ao ácido acetilsalicílico, que é considerado um antiplaquetário clássico. Também foi verificado redução nos níveis de interleucina (IL-8), apontando para uma ação anti-inflamatória (BEZERRA et al., 2017).

Já em outra pesquisa, a qual foi pioneira em descrever o mecanismo de ação da CMG, esse polímero apresentou efeito vasorrelaxante dependente de concentração, com possível participação da via NOS/NO/ciclase de guanilil solúvel (sGC), o que possibilitou inferir que esse polímero atua modulando a função vascular através do aumento da produção de NO endotelial, corroborando o estudo anterior. Além disso, esse derivado demonstrou efeito

inotrópico negativo no átrio e redução do transiente de cálcio em cardiomiócitos ventriculares, acompanhado da diminuição da contratilidade em animais tratados com 50 mg/kg durante 21 dias (PAIXÃO VIEIRA et al., 2017).

Além dos efeitos na função cardíaca e vascular supracitados, a CMG parece ter ação sobre fatores considerados relevantes e de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão arterial e aterosclerose, tendo em vista que estudos sugerem ação hipolipemiante e redução do colesterol em ratos submetidos a condições de hiperlipidemia e hipercolesterolemia, ratificando assim o efeito cardioprotetor das formas carboximetiladas (KOROLENKO et al., 2012; PISAREVA et al., 2014; LI et al., 2017).

Em relação ao efeito direto da forma carboximetilada sobre a pressão arterial, estudo recente demonstrou que esse polímero apresentou propriedade anti-hipertensiva em ratos com hipertensão renovascular dois rins, um clipe (2K1C). Foi observado que o tratamento com CMG na dose de 40 mg/Kg ao longo de duas semanas reduziu a pressão arterial, bem como melhorou a sensibilidade do barorreflexo e modulou a atividade simpática. Os autores especulam que esses resultados estão relacionados a capacidade antioxidante desse polímero (CARVALHO-GALVÃO et al., 2018a).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo é caracterizado como experimental, com ensaios farmacológicos e moleculares *in vivo* e *in vitro*. Os protocolos experimentais foram desenvolvidos no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Para a execução da pesquisa, o projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB e aprovada sob protocolo nº 087/2017 (Anexo I).

4.2 ANIMAIS

Para execução dos protocolos foram utilizados animais da linhagem SHR e Wistar Kyoto como normotensos, com idades de 12 semanas e pesando entre 250-300 g. Todos os animais foram provenientes da Unidade de Produção de Animais do IPeFarm - UFPB, onde foram mantidos sob condição controlada de temperatura (21 ± 1 °C), em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e alimentação. Os animais foram acomodados em gaiolas plásticas microisoladoras de dimensão 49x34x16 (CxLxA, em cm), cada uma com no máximo 4 animais. Os procedimentos adotados estavam de acordo com os princípios de manuseio e cuidado com animais de laboratório preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.3 MATERIAIS

4.3.1 Drogas e reagentes

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes substâncias: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl_2), sulfato de magnésio (MgSO_4), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato monopotássico (KH_2PO_4) e HEPES. Durante a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes substâncias: cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN); cloridrato de acetilcolina (ACh); nitroprussiato de sódio (NPS); adenosina difosfato (ADP); éster de forbol (PMA). Todos esses

sais e drogas foram adquiridos na Sigma Aldrich Brasil Ltda (São Paulo-SP, Brasil). A xilazina e cetamina foram adquiridos na Syntec (São Paulo, Brasil) e a heparina na Cristália (São Paulo, Brasil).

4.3.2 Soluções nutritivas

As soluções nutritivas, utilizadas nos protocolos *in vitro*, foram preparadas conforme a composição apresentada nas tabelas abaixo:

Tabela 2 – Composição da solução HEPES para os protocolos de agregação plaquetária

SAIS	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	132,0
KCl	6,0
MgSO ₄	1,0
KH ₂ PO ₄	1,2
HEPES	20,0
Glicose	5,0

Fonte: De Cuyper et al., 2013

Tabela 3 – Composição da solução de Tyrode para artéria mesentérica superior

SAIS	CONCENTRAÇÃO (mmol/L)
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Tanaka et al., 1999

Tabela 4 – Composição da solução de PBS

SAIS	CONCENTRAÇÃO (mmol/L)
NaCl	161,0
NaH ₂ PO ₄	1,8
Na ₂ HPO ₄	15,8

Fonte: Foldvari et al, 1998

4.4 OBTENÇÃO DA CMG

A CMG derivada da *Saccharomyces cerevisie* foi obtida a partir de creme da levedura, conforme descrito por Magnani et al. (2009), através de um processo de obtenção do polímero puro, utilizando sonicação e tratamento enzimático após extração com água quente, seguido da derivatização com ácido monocloroacético. O grau de substituição (DS) foi controlado por meio da titulação potenciométrica com solução de hidróxido de potássio (ŠANDULA et al., 1999). A identidade química e as modificações estruturais foram confirmadas por ressonância magnética (RMN) e análise de infravermelho. A CMG obtida apresenta peso molecular de 220 kDa e DG de 0.80, o que lhe confere maior solubilidade (MAGNANI et al., 2009). O material foi fornecido pelo laboratório de Processos Microbianos em Alimentos e de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal da Paraíba, para ser utilizado durante todo o tratamento.

4.4.1 Avaliação dos Efeitos do Tratamento com CMG

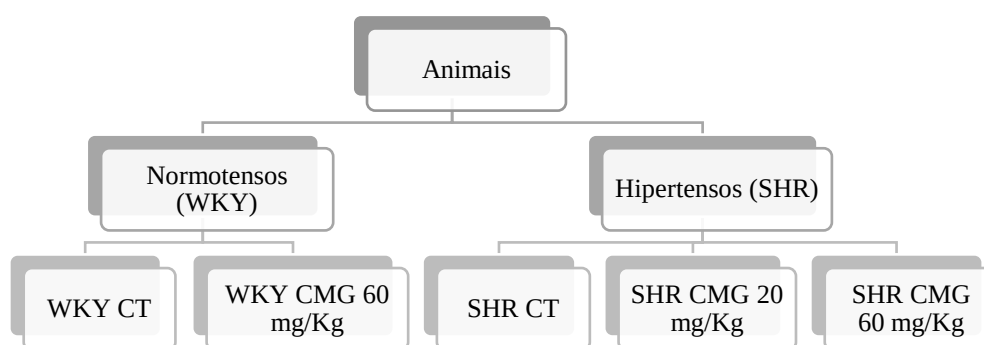
4.4.1.1 Ensaio Experimental

Os animais foram divididos em cinco grupos (n=8; Figura 8). Sendo os SHR distribuídos em três grupos: Controle (SHR CT), grupo tratado com CMG na dose de 20 mg/Kg (SHR CMG 20 mg/kg) e grupo tratado com CMG na dose de 60 mg/Kg (SHR CMG 60 mg/kg). Já os animais Wistar Kyoto (WKY) foram alocados em dois grupos: grupo controle (WKY CT) e grupo tratado com CMG na dose 60 mg/Kg (WKY CMG 60 mg/kg). A administração da substância foi realizada por gavagem (i.g.), uma vez ao dia, sempre nos mesmos horários, durante quatro semanas. Os animais controles de cada grupo receberam solução salina (1 mL/kg) como placebo durante o tratamento.

A dose de 20 mg/kg foi adotada com base em estudo prévio, cujos resultados demonstraram que, nessa dosagem por 8 dias, a administração oral de CMG de levedura foi capaz de modular a função vascular, reduzir a agregação plaquetária e apresentou efeito anti-inflamatório em animais saudáveis (BEZERRA et al., 2017). Já a dose de 60 mg/kg foi estabelecida considerando a modulação da função cardíaca e o efeito vasorrelaxante desse derivado em animais saudáveis tratados na dose de 50 mg/kg por 21 dias, constatados em estudo de Vieira et al, 2019, e a atividade anti-hipertensiva, com modulação do barorreflexo em animais com hipertensão renovascular tratados na dose de 40 mg/kg durante duas semanas

(CARVALHO-GALVÃO et al., 2018a). Essa dose de 60 mg/kg ainda foi utilizada no intuito de avaliar também os efeitos de uma dose maior nos animais normotensos por um maior período de tratamento, uma vez que nos estudos anteriores o tempo de tratamento foi de, no máximo, duas semanas e a maior dose de 50 mg/kg. O protocolo do tratamento está descrito na Figura 9.

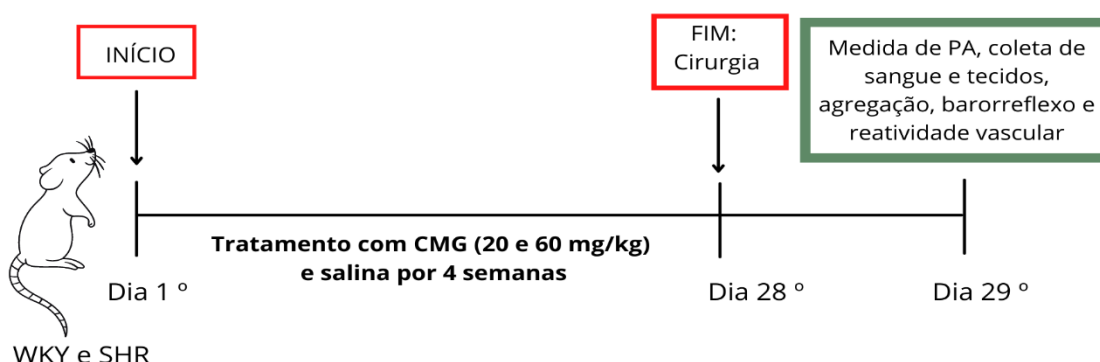
Figura 8 – Divisão dos grupos de animais para os protocolos experimentais



WKY CT: Wistar Kyoto Controle; WKY CMG 60 mg/Kg: ratos Wistar Kyoto tratados com CMG na dose de 60 mg/Kg; SHR CT: SHR Controle; SHR CMG 20 mg/Kg: ratos SHR tratados com CMG na dose de 20 mg/Kg; SHR CMG 60 mg/Kg: ratos SHR tratados com CMG na dose de 60 mg/Kg;

Fonte: Própria, 2021.

Figura 9 – Protocolo do tratamento com CMG nos grupos de animais



Fonte: Própria, 2021.

4.4.1.2 Avaliação do peso corporal e parâmetros bioquímicos

O peso corporal dos animais foi monitorado antes do início do protocolo experimental e ao longo das quatro semanas de tratamento, a cada 3 dias. No final, a avaliação bioquímica foi realizada a partir das amostras do soro coletadas dos animais, submetidos a jejum noturno de 8h, para determinação das concentrações séricas de colesterol total, triglicerídeos, HDL-C, uréia, creatinina e proteína C-reativa (PCR). Foram utilizados kits comerciais (Labtest, Brasil) para este procedimento, como também técnicas de leituras espectroscópicas automatizadas (PANCHAL et al., 2011).

4.4.1.3 Medida Direta de Pressão Arterial

Após quatro semanas de tratamento, os animais foram anestesiados com cetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/Kg) (i.p.), para realizar cirurgia de implantação do cateter de polietileno (PE). Em seguida, uma pequena incisão na região inguinal dos animais foi realizada, com a finalidade de separar a musculatura para localização do feixe vasculonervoso, seguido da dissecação e exposição da artéria femoral. Após isso, o cateter de polietileno, um segmento de PE-10 (4 cm) soldado a um seguimento de PE-50 (16 cm), foi implantado na aorta abdominal via artéria femoral esquerda. Após a inserção e fixação, o cateter foi tunelizado subcutaneamente e exteriorizado através de uma incisão na região cervical posterior do animal. Os animais foram mantidos em repouso por 24h em gaiolas individuais, com acesso à ração e água *ad libitum*. No momento do experimento, com os animais conscientes, foi realizada, inicialmente, a aclimação por um período de, no mínimo, 30 minutos, e em seguida a verificação dos parâmetros cardiovasculares. Foram registradas as ondas de pulso arterial dos animais, bem como a pressão arterial média (PAM), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC). Estes parâmetros foram aferidos pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (*BRPL2, World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA*), acoplado a um sistema de aquisição de dados (*PowerLab, ADInstruments, Unit 13, 22 Lexington Drive, BELLA VISTA, NSW, AUSTRALIA*). A pressão PAM foi calculada ($PAM = 1/3 \text{ máxima} + 2/3 \text{ mínima}$) automaticamente, sendo derivada da PAP, através do software *LabChart* versão 7.0 (*ADInstruments, Austrália*).

4.4.1.4 Teste de sensibilidade do barorreflexo e avaliação da participação do tônus simpático

A estimulação do barorreflexo é realizada através de injeção intravenosa de substâncias vasoconstritora (fenilefrina, agonista α -adrenérgico) e vasodilatadora (nitroprussiato de sódio, doador de óxido nítrico), que produz o aumento ou diminuição da PA respectivamente, e assim aumenta ou diminui a atividade dos barorreceptores arteriais e, reflexamente, induz alterações na FC como bradicardia ou taquicardia barorreflexa, possibilitando avaliar os componentes parassimpático e simpático do barorreflexo cardíaco (MONTEIRO et al., 2012). Desse modo, foi realizado a estimulação do barorreflexo com a administração de FEN (8 μ g/kg) e NPS (25 μ g/kg) para avaliar o efeito da CMG sobre o barorreflexo nos grupos de animais controles e tratados (BOTELHO-ONO et al., 2011). A sensibilidade do barorreflexo foi observada através das alterações reflexas de FC induzidas pelas alterações transitórias da PAM. As mudanças na FC produzidas pela administração das drogas vasoativas foram quantificadas e avaliadas por meio da razão dos valores de mudança da FC e PAM (Δ FC/ Δ PAM) (HEAD; ADAMS, 1992; BRAGA et al., 2008).

A participação do tônus simpático no sistema cardiovascular foi avaliada através da aplicação intravenosa de Hexamethonium (30 mg/kg; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA), um bloqueador gangliônico. O tônus simpático foi determinado pela diferença entre PAM após o bloqueador e a PAM basal (CARVALHO-GALVÃO et al., 2018b).

4.4.2 Ensaios *In Vitro*

4.4.2.1 Avaliação da hipertrofia ventricular cardíaca e análise histológica e morfométrica dos cardiomiócitos

Após o registro dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram anestesiados e eutanasiados, o coração foi removido e limpo em solução de Tyrode. Em seguida, os ventrículos foram isolados, secos e pesados a fim de determinar o índice de massa dos ventrículos (massa dos ventrículos/massa do peso do animal), que permitiu avaliar o grau de hipertrofia ventricular (GALISTEO et al., 2006).

Para os estudos histológicos, o coração foi perfundido em solução de formol a 10% neutro e tamponado e mantido nesta mesma solução durante três dias. Em seguida, foi embebido em cera de parafina. Seções finas (7 μ m) foram cortadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise morfológica (POUDYAL et al., 2012).

A fim de melhorar a análise morfológica e para confirmar hipertrofia cardíaca, foram realizadas as análises morfométricas através do programa KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany). Para o cálculo da área de cada cardiomiócito, um corte histológico de coração corado pela H&E de cada caso foi visualizado através da objetiva de 40× do microscópio Olympus (Toquio, Japão) para a digitalização de 20 regiões aleatórias através da microcâmera Q-Color3. Todo o conjuntivo vascular cardíaco foi excluído da análise utilizando ferramentas do programa. Todos os tipos de pixels dos cardiomiócitos foram selecionados para a criação de uma imagem binária e cálculo da área em μm^2 . Utilizando as mesmas imagens, todas as células musculares cardíacas foram contadas interativamente utilizando o mesmo programa. A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e a definição das condições de morfometria é a descrita por Caliari (1997).

4.4.2.2 Ensaios Farmacológicos de Reatividade Vascular

Para medidas de tensão isométrica, anéis de artéria mesentérica superior isolada dos ratos tratados foram suspensos em cubas de órgãos isolados contendo solução de Tyrode (pH 7.4) a 37°C e aeradas com carbogênio (95 % O_2 : 5 % CO_2), como previamente reportado (TANAKA et al., 1999; VERAS et al., 2013). Os anéis foram estabilizados por uma hora a uma tensão de 0,75g, previamente determinada por experimentos de relação comprimento vs tensão. A contração isométrica foi registrada por um transdutor de força (MLT020, ADInstruments, Austrália) acoplado a um sistema de aquisição (ML870/P com LabChart versão 7.0, ADInstruments, Austrália) (Figura 10) (ALTURA; ALTURA, 1970).

A presença funcional do endotélio foi confirmada pela presença de relaxamento superior a 80% após a adição de Acetilcolina (ACh, 10 μM) em anéis pré-contraídos com fenilefrina (FEN, 10 μM). Anéis com relaxamento inferior foram submetidos à remoção mecânica do endotélio e novamente submetidos ao teste de funcionalidade endotelial citado logo acima. Após a verificação da integridade do órgão e da funcionalidade endotelial (figura 10), foram construídas curvas concentração-resposta para FEN (3×10^{-9} a 3×10^{-5} M), para ACh (10^{-10} a 10^{-5}) e NPS (10^{-11} a 3×10^{-7}). A potência e eficácia do vasorrelaxamento dos agonistas foram avaliadas por meio dos valores de CE_{50} ou pD_2 e E_{max} , respectivamente

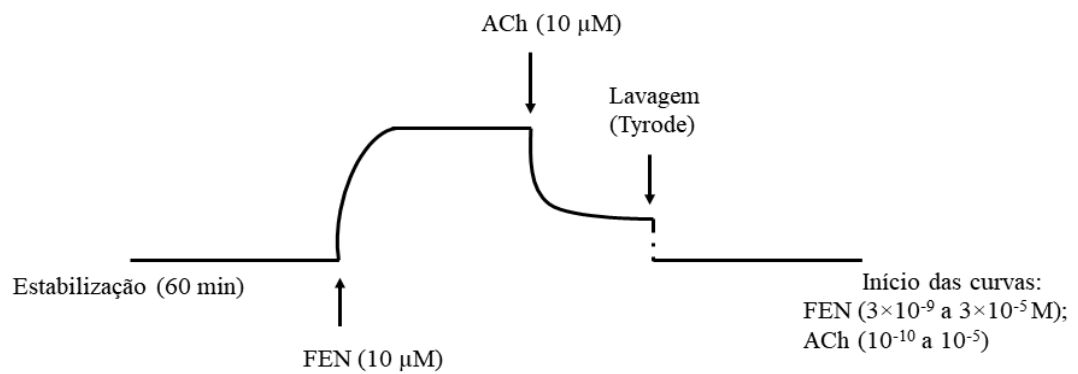
Figura 10 – Sistema de cubas de órgãos isolados



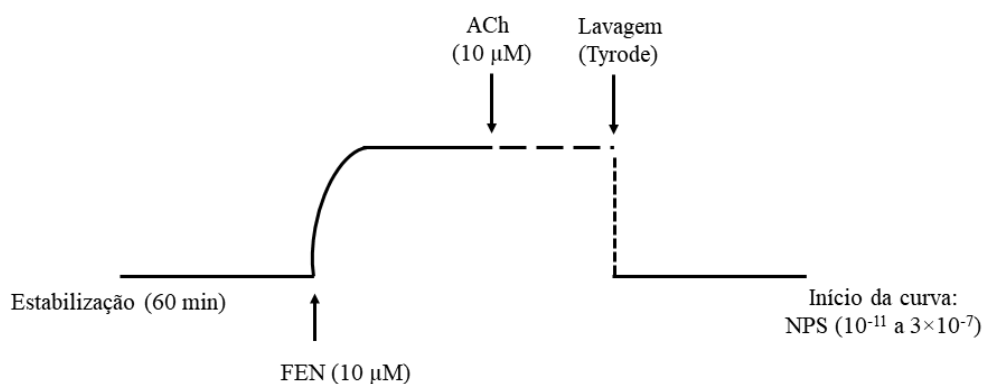
Fonte: Própria, 2021

Figura 11 – Protocolo para verificação da viabilidade do órgão e da integridade do endotélio vascular. A) Com endotélio e B) Sem endotélio funcional

A)



B)



ACH: acetilcolina; FEN: fenilefrina; NPS: nitroprussiato de sódio

Fonte: Própria, 2021.

4.4.2.3 Obtenção do Sangue Total e Preparação das Plaquetas Lavadas de Rato

O sangue foi coletado da veia cava inferior nos ratos anestesiados com cetamina e xilazina (70 mg/kg; 10 mg/kg, i.p), usando seringas estéreis (3 mL) heparinizadas. O sangue obtido foi dividido em duas amostras. A primeira foi depositada em tubo de plástico siliconado, contendo solução HEPES (Tabela 2) com o dobro de seu volume. Em seguida, foi centrifugado a 3000 g por 10 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). Com a outra parte foi obtido o plasma rico em plaquetas (PRP) por centrifugação a 120 g por 15 minutos, sendo ajustado para 5×10^6 plaquetas/mL (SHATTIL; CUNNINGHAM; HOXIE, 1987; DE CUYPER et al., 2013).

4.4.2.4 Medida da Agregação Plaquetária por Transmissão Luminosa

Para avaliar o efeito da CMG sobre a função plaquetária, o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) obtido dos animais foi incubado a 37 °C durante 5 minutos no agregômetro (AgreGO, Qualitem, São Paulo, Brasil), com agitação contínua a 1000 rpm e, então, estimulado com ADP (10 µM) ou Éster de Forbol (PMA, 100 ng/mL) (YONEDA et al., 2004; HUANG et al., 2007). As mudanças na transmissão da luz foram registradas por 15 minutos e a agregação máxima foi estimada. O grau de agregação foi expresso como uma porcentagem da transmissão máxima de

luz obtida na amostra em comparação aos valores basais, os quais foram obtidos pela transmissão gerada no Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) (YONEDA et al., 2004).

4.4.2.5 Avaliação da produção de Ânions Superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) em Plaquetas

A fim de analisar o efeito antioxidante da CMG em plaquetas, o PRP foi ajustado para 5×10^6 plaquetas/mL. Em seguida, incubado com di-hidroetídeo (DHE) ($10 \mu M$) durante 30 minutos a $37^\circ C$, no escuro (VARA; CAMPANELLA; PULA, 2013). Depois as amostras foram levadas ao citômetro FACS Canto-II (BD) equipado com laser de argônio com $15 mW$ e $\lambda = 488 nm$ para realização da leitura, seguido da análise no software DIVA 6.0 (BD, Santa Mônica, CA, EUA). Foram adquiridos 10.000 eventos, com exclusão de restos celulares, definidos pelo *threshold* do FSC (*Forward scatter*), e os sinais de fluorescência foram captados no canal FITC (FL1; comprimento de onda: $515-545 nm$). As mudanças na fluorescência (F_1) foram normalizadas com a fluorescência obtida na amostra sem DHE (F_0) e expressas como F_1/F_0 .

4.4.2.6 Avaliação da produção de Ânions Superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) em Artéria Mesentérica

Para determinar a produção *in situ* de $O_2^{\bullet-}$ nas artérias mesentéricas dos animais dos grupos controle e tratados, os tecidos foram coletados e, após limpeza, congelados em nitrogênio líquido, sendo conservados a $-80^\circ C$ até a realização das análises. Os cortes nos tecidos foram realizados por meio de criostato (Cryostat Leiza, Nussloc, Alemanha), para obter secções transversais com $10 \mu m$ de espessura. Para a realização da medida de $O_2^{\bullet-}$, as lâminas com os cortes de tecido foram lavadas com solução salina fosfato tamponada (PBS, Tabela 4). Em seguida foram incubadas com $10 \mu M$ da sonda di-hidroetídeo (DHE), por um período de 30 min a $37^\circ C$, em câmara úmida, ao abrigo da luz (GROBE et al., 2006; WOJTLA et al., 2014). Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS para remoção do excesso de sonda fluorescente, e levado imediatamente ao microscópio de fluorescência.

A intensidade da fluorescência foi capturada em microscópio (NIKON Eclipse Ti-E, NIKON, Japão). O processamento das amostras e obtenção das imagens dos grupos foi realizado em paralelo utilizando as mesmas configurações do laser. A intensidade de fluorescência foi determinada utilizando o software NIS Elements versão 4.02. As mudanças na fluorescência (F_1) foram normalizadas com a fluorescência obtida no grupo controle normotenso (F_0) e expressas como F_1/F_0 .

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) ou DP (desvio padrão). Os valores do logaritmo (Log) negativo em cuja concentração se tem 50% do $E_{\max}$ (pD_2) para as curvas concentração-resposta foram obtidos através de regressões não-lineares. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando teste t de Student para comparar dois grupos e análise de variância (ANOVA) *one way* para comparações entre três grupos, seguido do pós-teste de Tukey, com a significância atribuída se $p < 0,05$. O software utilizado foi o Graphad Prism v. 8.0 (San Diego, EUA).

5 RESULTADOS

Os resultados desta tese estão apresentados na forma de dois artigos originais, disponibilizados nos apêndices A e B.

O artigo apresentado no apêndice A (*Carboxymethyl-glucan from Saccharomyces cerevisiae reduces blood pressure and improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats*) teve como objetivo investigar o efeito da administração oral da CMG em modelo animal SHR e WKY. Nesse estudo, os resultados mostraram, pela primeira vez, que esse composto possui atividade anti-hipertensiva em animais SHR tratados na dose de 60 mg/kg, bem como apresentaram melhora da sensibilidade do barorreflexo, com redução na participação do tônus simpático. A administração oral da CMG, em ambas as doses testadas (20 e 60 mg/kg), também atenuou a hipertrofia ventricular e cardíaca detectada nos animais hipertensos. Além disso, a CMG reduziu ganho de peso somente no grupo SHR CMG 60 mg/kg e alterou o perfil lipídico, causando aumento nos níveis de colesterol total, tanto no grupo WKY quanto nos SHR tratados. Apesar disso, não foi observado alteração nos níveis de triglicerídeos e HDL-colesterol. Ainda, verificou-se redução da creatinina somente no grupo SHR CMG 60 mg/kg.

O outro artigo, apresentado no apêndice B (*Yeast carboxymethyl-glucan improves endothelial function and inhibits platelet aggregation in spontaneously hypertensive rats*) aborda os efeitos da CMG sobre a função vascular e plaquetária em animais SHR. Além disso, foram também estudados ratos normotensos, com a dose de 60 mg/kg, uma vez que estudos anteriores reportam efeitos benéficos para doses mais baixas. Assim, os resultados desse estudo revelaram que o derivado carboximetilado reduziu a resposta contrátil no grupo WKY CMG 60 mg/kg e ainda melhorou a resposta vasorrelaxante independente de endotélio. No animais hipertensos, foi constatado que o tratamento com CMG melhorou a resposta vasorrelaxante dependente de endotélio em ambas as doses avaliadas (20 e 60 mg/kg), sugerindo uma atenuação da disfunção endotelial característica do modelo animal SHR. Também, a CMG inibiu a agregação plaquetária estimulada por ADP no grupo SHR CMG 60 mg/kg. Nesse estudo, apesar de se verificar maior produção de ânions superóxidos nos vasos dos grupos SHR, observou-se que esse derivado não foi capaz de reduzir o estresse oxidativo presente nesses animais.

REFERÊNCIAS

- AARSAETHER, E. et al. Inhibition of NF- κ B activation by β -glucan is not associated with protection from global ischemia-reperfusion injury in pigs. **Journal of Surgical Research**, v. 171, n. 1, p. 58–65, 2011.
- AARSAETHER, E. et al. Oral β -glucan reduces infarction size and improves regional contractile function in a porcine ischaemia/reperfusion model. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 41, n. 4, p. 919–925, 2012.
- AKHAPKINA, I. G. et al. Effects of the Linear Fragments of Beta-(1 $\rightarrow$ 3)-Glucans on Cytokine Production in vitro. **Biochemistry (Moscow)**, v. 83, n. 8, p. 1002–1006, 2018.
- AKRAMIENE, D. et al. Effects of beta-glucans on the immune system. **Medicina-Lithuania**, v. 43, n. 8, p. 597–606, 2007.
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on druginduced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, p. 1698-1705, 1970
- ARAUJO, V. B. S. et al. Oral Intake of Carboxymethyl-Glucan (CM-G) from Yeast (*Saccharomyces uvarum*) Reduces Malondialdehyde Levels in Healthy Men. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 8, p. 14950–14958, 2015.
- ARAÚJO, T. V. et al. Effects of beta-glucans ingestion (*Saccharomyces cerevisiae*) on metabolism of rats receiving high-fat diet. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 101, n. 2, p. 349–358, 2017.
- ARENDSE, L. B. et al. Novel Therapeutic Approaches Targeting the Renin-Angiotensin System and Associated Peptides in Hypertension and Heart Failure. **Pharmacological Reviews**, v. 71, n. 4, p. 539–570, 2019.
- BABÍČEK, K. et al. Toxicological assessment of a particulate yeast (1,3/1,6)- β -d-glucan in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1719–1730, 2007.
- BABINCOVA, M. et al. Antioxidant Properties of Carboxymethyl Glucan: Comparative Analysis. **Journal of Medicinal Food**, v. 5, n. 2, p. 79–83, 2002.
- BAI, J. et al. Physiological functionalities and mechanisms of β -glucans. **Trends in Food Science and Technology**, v. 88, n. 2, p. 57–66, 2019.
- BARROSO, W. K. S. et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial–2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, n. 3, p. 516–658, 2021.
- BAUERSACHS, J. et al. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: Changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. **Cardiovascular Research**, v. 37, n. 3, p. 772–779, 1998.

BEEVERS, G.; LIP, G. Y. H.; BRIEN, E. O. Pathophysiology of hypertension Cardiac output and peripheral resistance Renin-angiotensin system Autonomic nervous system. **Journal of Hypertension**, v. 322, n. 4, p. 912–916, 2001.

BEHULIAK, M. et al. Ca^{2+} sensitization and Ca^{2+} entry in the control of blood pressure and adrenergic vasoconstriction in conscious Wistar–Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 31, n. 10, p. 2025–2035, 2013.

BERNATOVA, I. et al. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: focus on methodological aspects. **Journal of Hypertension**, v. 27, n.1, p. 27–31, 2009.

BEZERRA, L. S. et al. Modulation of vascular function and anti-aggregation effect induced by (1→3) (1→6)-beta-d-glucan of *Saccharomyces cerevisiae* and its carboxymethylated derivative in rats. **Pharmacological reports:PR**, v. 69, n.3, p. 448–455, 2017.

BEZERRA, L. S. et al. Carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* reduces blood pressure and improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. **Food & Function**, v. 12, n. 18, p. 8552–8560, 2021.

BIAGGIONI, I. et al. Blood pressure management in afferent baroreflex failure: JACC review topic of the week. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 74, n. 23, p. 2939–2947, 2019.

BIMCZOK, D. et al. Short chain regioselectively hydrolyzed scleroglucans induce maturation of porcine dendritic cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 2, p. 321–331, 2009.

BLANN, A. D.; NADAR, S.; LIP, G. Y. H. Pharmacological modulation of platelet function in hypertension. **Hypertension**, v. 42, n. 1, p. 1–7, 2003.

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1→3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, n. 1, p. 3–14, 1995.

BOTELHO-ONO, M. S. et al. Acute superoxide scavenging restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 159, n. 1, p. 38–44, 2011.

BRAGA, V. A. et al. 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**, v. 295, n. 4, p. 30, 2008.

BRIONES, A. M.; TOUYZ, R. M. Oxidative stress and hypertension: Current concepts. **Current Hypertension Reports**, v. 12, n. 2, p. 135–142, 2010.

BROWN, G. D. et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1119–1124, 2003.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition of fungal β -glucans. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 471–479, 2005.

BROZOVICH, F. V. et al. Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 2, p. 476–532, 2016.

BRUSCHI, G. et al. Cytoplasmic free $[Ca^{2+}]$ is increased in the platelets of spontaneously hypertensive rats and essential hypertensive patients. **Clinic Science (London)**, v. 68, p. 179–184, 1985.

CALIARI, M. V. Princípios de Morfometria Digital: KS300 Para Iniciantes. Belo Horizonte: Editora UFMG, 1997.

CARVALHO-GALVÃO, A. et al. A newly isolated carboxymethyl-glucan (CM-G) restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n.5, p. 1–8, 2018a.

CARVALHO-GALVÃO, A. et al. Central administration of TRV027 improves baroreflex sensitivity and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. **Clinical Science**, v. 132, n. 14, p. 1513–1527, 2018b.

CHAN, G. C.-F.; CHAN, W. K.; SZE, D. M.-Y. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2009.

CHANG, H. R. et al. Nitric oxide in mesenteric vascular reactivity: A comparison between rats with normotension and hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 4, p. 275–280, 2002.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal β -(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-glucans. **Mycological research**, v. 111, n. 6, p. 635–652, 2007.

CHEN, X.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Immunopotential and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan from *Poria cocos*. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 4, p. 398–405, 2010.

CHEN, Y. et al. 1,3- β -Glucan affects the balance of Th1/Th2 cytokines by promoting secretion of anti-inflammatory cytokines in vitro. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p. 708–712, 2013.

CHEN, Y. et al. Acetylation and carboxymethylation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. **Food Chemistry**, v. 156, n. 0, p. 279–288, 2014.

CLOETENS, L. et al. Role of dietary beta-glucans in the prevention of the metabolic syndrome. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 8, p. 444–458, 2012.

CONCEIÇÃO-VERTAMATTI, A. G. et al. History of vascular reactivity models and their involvement in hypertension pathogenesis. **Vasa**, v. 46, n. 6, p. 431–439, 2017.

COWLEY, A. W. Long-term control of arterial blood pressure, **Physiological Reviews**, v. 72, n. 1, p. 231-300, 1992.

ARAÚJO, V. B. et al. Oral intake of carboxymethyl-glucan (CM-G) from yeast (*Saccharomyces uvarum*) reduces malondialdehyde levels in healthy men. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14950–14958, 2015.

DAMPNEY, R. A. L. et al. Central Mechanisms Underlying Short- And Long-Term Regulation Of The Cardiovascular System. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 4, p. 261–268, 2002.

DAMPNEY, R. A. L. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. **Advances in Physiology Education**, v. 40, n. 3, p. 283–296, 2016.

DE CUYPER, I. M. et al. A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay. **Blood**, v. 121, n. 10, p. 70-80, 2013.

DIKALOV, S.; GRIENDLING, K. K.; HARRISON, D. G. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. **Hypertension**, v. 49, n. 4, p. 717–727, 2007.

DOGGRELL, S. A.; BROWN, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. **Cardiovascular Research**, v. 39, n. 1, p. 89–105, 1998.

DORNAS, W. C.; SILVA, M. E. Animal models for the study of arterial hypertension. **Journal of Biosciences**, v. 36, n. 4, p. 731–737, 2011.

DU, B. et al. An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. **Trends in Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 49–59, 2015.

DU, B.; BIAN, Z.; XU, B. Skin Health Promotion Effects of Natural Beta-Glucan Derived from Cereals and Microorganisms: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 2, p. 159–166, 2014.

EL ENSHASY, H. A.; HATTI-KAUL, R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 12, p. 668–677, 2013.

EL HAOUARI, M.; ROSADO, J. A. Platelet function in hypertension. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 42, n. 1, p. 38–43, 2009.

EL KHOURY, D. et al. Beta glucan: Health benefits in obesity and metabolic syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v.12, n. 1, p. 1-28, 2012.

ESTEVEZ, B.; DU, X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. **Physiology**, v. 32, n. 2, p. 162–177, 2017.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: Possible roles in pathogenesis and as treatment targets. **Current Hypertension Reports**, v. 12, n. 4, p. 267–275, 2010.

FELETTI, F. et al. Chronic toxicity study on a new glucan extracted from *Candida albicans* in rats. **Arzneimittel-Forschung**, v. 42, n. 11, p. 1363—1367, 1992.

FERREIRA, A. J.; BADER, M.; SANTOS, R. A. S. Therapeutic targeting of the angiotensin-converting enzyme 2/Angiotensin-(1-7)/Mas cascade in the reninangiotensin system: A patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 22, n. 5, p. 567–574, 2012.

FINTEL, D. . Oral antiplatelet therapy for atherothrombotic disease: Overview of current and emerging treatment options. **Vascular Health and Risk Management**, v. 8, n. 1, p. 77–89, 2012.

FUENTES, E. et al. NADPH oxidase 2 (NOX2): A key target of oxidative stress-mediated platelet activation and thrombosis. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 28, n. 7, p. 429–434, 2018.

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

GIROUARD, H.; DE CHAMPLAIN, J. Acute and chronic effects of free radicals on α 1-adrenergic-induced vasoconstriction in mesenteric beds of spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 23, n. 4, 2005.

GKALIAGKOUSI, E. et al. Platelet activation in essential hypertension: Implications for antiplatelet treatment. **American Journal of Hypertension**, v. 23, n. 3, p. 229–236, 2010.

GOEL, G. et al. Phorbol esters: Structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, v. 26, n. 4, p. 279–288, 2007.

GONZÁLEZ, J. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. **World Journal of Cardiology**, v. 6, n. 6, p. 353, 2014.

GOODRIDGE, H. S.; WOLF, A. J.; UNDERHILL, D. M. Beta-glucan recognition by the innate immune system. **Immunological reviews**, v. 230, n. 1, p. 38–50, 2009.

GRASSI, G.; RAM, V. S. Evidence for a critical role of the sympathetic nervous system in hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 10, n. 5, p. 457–466, 2016.

GROBE, A. C. et al. Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, n. 6, p.1069–1077, 2006.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335–346, 2006.

GUYTON, A. C. Blood pressure control - Special role of the kidneys and body fluids. **Science**, v. 252, n. 5014, p. 1813–1816, 1991.

HALL, J. E. et al. Hypertension: Physiology and pathophysiology. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 4, p. 2393–2442, 2012.

HEAD, G. A.; ADAMS, M.A. Characterization of the baroreceptor heart rate reflex during development in spontaneously hypertensive rats. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 19, n. 8, p. 587-597, 1992

HIROOKA, Y. Importance of Neural Arc for Baroreflex Resetting in Hypertension. **Circulation Journal**, v. 79, n. 3, p. 510–512, 2015.

HOUSTON, M. C. Nutraceuticals, Vitamins, Antioxidants, and Minerals in the Prevention and Treatment of Hypertension. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 47, n. 6, p. 396–449, 2005.

HUANG, J. et al. Cinnamaldehyde reduction of platelet aggregation and thrombosis in rodents. **Thrombosis Research**, v. 119, n. 3, p. 337–342, 2007.

JAMOIS, F.; FERRIERES, V. Glucan-like synthetic oligosaccharides: iterative synthesis of linear oligo-b-(1, 3)-glucans and immunostimulatory effects. **Glycobiology**, v. 15, n.4, p. 393–407, 2005.

JIANG, J. et al. Differential contribution of endothelium-derived relaxing factors to vascular reactivity in conduit and resistance arteries from normotensive and hypertensive rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 38, n. 4, p. 393–398, 2016.

JONKER, D. et al. 28-Day oral toxicity study in rats with high purity barley beta-glucan (GlucagelTM). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 422–428, 2010.

JURK, K.; KEHREL, B. E. Platelets: physiology and biochemistry. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 31, n. 04, p. 381–392, 2005.

KAGIMURA, F. Y. et al. Biological activities of derivatized d-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, n. 1, p. 588–598, 2014.

KIM, Y. T. et al. Structural characterization of beta-D-(1 → 3, 1 → 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. **Carbohydrate research**, v. 328, n. 3, p. 331–341, 2000.

KLIPPEL, B. F. et al. Effects of kefir on the cardiac autonomic tones and baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. 6, p. 1-12, 2016.

KOMOSA, A. et al. Platelets redox balance assessment: Current evidence and methodological considerations. **Vascular Pharmacology**, v. 93, n. 95, p. 6–13, 2017.

KOROLENKO, T. A. et al. Influence of atorvastatin and carboxymethylated glucan on the serum lipoprotein profile and MMP activity of mice with lipemia induced by poloxamer 407. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 90, n. 2, p. 141–153, 2012.

KRIZKOVA, L. et al. Fungal beta-(1-3)-D-glucan derivatives exhibit high antioxidative and antimutagenic activity in vitro. **Anticancer research**, v. 23, n. 3, p. 2751–2756, 2003.

- LASSÈGUE, B.; GRIENDLING, K. K. Reactive oxygen species in hypertension: An update. **American Journal of Hypertension**, v. 17, n. 9, p. 852–860, 2004.
- LAURENT, S. Antihypertensive drugs. **Pharmacological Research**, v. 124, n.1, p. 116–125, 2017.
- LEGENTIL, L. et al. Molecular interactions of β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucans with their receptors. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 9745–9766, 2015.
- LEONG, X.-F.; NG, C.-Y.; JAARIN, K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 528-537, 2015.
- LERMAN, L. O. et al. Animal models of hypertension: An overview. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 146, n. 3, p. 160–173, 2005.
- LEWIS, S. J. et al. Role of voltage-sensitive calcium-channels in nitric oxide-mediated vasodilation in Spontaneously Hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 528, n. 3, p. 144–149, 2005.
- LI, C. et al. Modulating Toll-like receptor mediated signaling by (1 $\rightarrow$ 3)- β -D- glucan rapidly induces cardioprotection. **Cardiovascular Research**, v. 61, n. 3, p. 538–547, 2004.
- LI, Y. et al. Carboxymethylation of polysaccharide from *Morchella angusticeps* Peck enhances its cholesterol-lowering activity in rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 172, p. 85–92, 2017.
- LIU, Z.; KHALIL, R. A. Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 153, p. 91–122, 2018.
- LOMINADZE, D.; JOSHUA, I. G.; SCHUSCHKE, D. A. In vivo platelet thrombus formation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. **American journal of hypertension**, v. 10, n. 10, p. 1140–1146, 1997.
- LOMINADZE, D.; JOSHUA, I. G.; SCHUSCHKE, D. A. Increased erythrocyte aggregation in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, v. 11, n. 7, p. 784–789, 1998.
- LOWE, E. P. et al. Human vascular endothelial cells express pattern recognition receptors for fungal glucans which stimulates nuclear factor kappaB activation and interleukin 8 production. Winner of the Best Paper Award from the Gold Medal Forum. **The American surgeon**, v. 68, n. 6, p. 508, 2002.
- MACHOVÁ, E.; BYSTRICKÝ, S. Antioxidant capacities of mannans and glucans are related to their susceptibility of free radical degradation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, n. 1, p. 308–311, 2013.

- MAGNANI, M. et al. Optimized methodology for extraction of (1-3) (1-6) β -d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 658–665, 2009.
- MAGNANI, M. et al. Protective effect of carboxymethyl-glucan (CM-G) against DNA damage in patients with advanced prostate cancer. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, p. 131-135, 2011.
- MAGNANI, M. et al. Effects of carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the peripheral blood cells of patients with advanced prostate cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 1, n. 5, p. 859-862, 2010.
- MAGNANI, M. et al. Analysis of peripheral T cells and the CC chemokine receptor (CCR5) delta32 polymorphism in prostate cancer patients treated with carboxymethyl-glucan (CM-G). **Natural Product Research**, v. 26, n. 10, p. 945-951, 2012.
- MALACHIAS, M. V. B. et al. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 1 - Concept, Epidemiology and Primary Prevention. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, p. 75-78, 2016.
- MANTOVANI, M. S. et al. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 658, n. 3, p. 154–161, 2008.
- MCNICOL, A.; ISRAELS, S. J. Platelet Dense Granules: Structure, Function and Implications for Haemostasis. **Thrombosis Research**, v. 95, n. 1, p. 1–18, 1999.
- MILLS, K. T.; STEFANESCU, A.; HE, J. The global epidemiology of hypertension. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n. 4, p. 223–237, 2020.
- MONTEIRO, M. M. et al. Quercetin improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12997–13008, 2012.
- MONTEZANO, A. C. et al. Oxidative stress and human hypertension: Vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, n. 5, p. 631–641, 2015.
- MORALES VIDAL, S. G.; RULAND, S. Platelet antiaggregants in stroke prevention. **Neurologic Clinics**, v. 31, n. 3, p. 633–657, 2013.
- MOSIKANON, K. et al. Yeast β -Glucan Modulates Inflammation and Waist Circumference in Overweight and Obese Subjects. **Journal of Dietary Supplements**, v. 14, n. 2, p. 173–185, 2017.
- NAMEDA, S. et al. Effect of Nitric Oxide on β -Glucan/Indomethacin-Induced Septic Shock. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 7, p. 1254–1258, 2005.
- NAMEDA, S. et al. Antibiotics protect against septic shock in mice administered beta-glucan and indomethacin. **Microbiology and immunology**, v. 51, n. 9, p. 851–859, 2007.

NAVAR, L. G. The role of the kidneys in hypertension. **Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)**, v. 7, n. 9, p. 542–549, 2005.

NICOLOSI, R. et al. Plasma lipid changes after supplementation with β -glucan fiber from yeast. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 2, p. 208–212, 1999.

NUNES, K. P.; WEBB, R. C. New insights into RhoA/Rho-kinase signaling: a key regulator of vascular contraction. **Small GTPases**, v. 00, n. 00, p. 1–12, 2020.

OOI, V. E. C.; LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 715–729, 2000.

OPARIL, S.; ZAMAN, M. A.; CALHOUN, D. A. Review Pathogenesis of Hypertension. **Annals of Internal Medicine**, v. 139, n. 9, p. 761–776, 2003.

PAIXÃO VIEIRA, R. L. et al. P44 Carboxymethyl-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* induces vasodilation mediated by the NOS/NO/SCG pathway and negative inotropic effects in rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 139, n. 2017, p. 140–141, 2017.

PANCHAL, S. K. et al. High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 57, n. 5, p. 611–624, 2011.

PARATI, G.; ESLER, M. The human sympathetic nervous system: Its relevance in hypertension and heart failure. **European Heart Journal**, v. 33, n. 9, p. 1058–1066, 2012.

PAZ OCARANZA, M. et al. Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 17, n. 2, p. 116–129, 2020.

PIERDONÁ, T. M. **Avaliação das atividades antiagregante plaquetária e anticoagulante em estudo de bioprospecção de *Opercutina macrocarpa* (L.) Urb. (Jalapa) em plasma humano: determinação do mecanismo de ação**. Dissertação de mestrado em Farmacologia. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2011.

PINTÉROVÁ, M.; KUNEŠ, J.; ZICHA, J. Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. **Physiological Research**, v. 60, n. 3, p. 381–402, 2011.

PISAREVA, E. E. et al. Role of Changes in Serum Chitotriosidase Activity in Mice under Conditions of Hyperlipidemia and Lipid-Lowering Effect of Carboxymethylated (1-3)- β -D-Glycan. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 157, n. 5, p. 555–559, 2014.

POUDYAL, H. et al. Lipid redistribution by alpha-linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 2, p. 153–162, 2012.

PRÉCOMA, D. B. et al. Updated cardiovascular prevention guideline of the Brazilian society of cardiology – 2019. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. 4, p. 787–891, 2019.

QIN, F.; AACHMANN, F. L.; CHRISTENSEN, B. E. Chain length distribution and aggregation of branched (1→3)- β -d-glucans from *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 1092–1099, 2012.

RANA, Akshita et al. Shear-dependent platelet aggregation: mechanisms and therapeutic opportunities. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 6, n. 1, p. 141, 2019

ROCHLANI, Y. et al. Are two drugs better than one? A review of combination therapies for hypertension. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 18, n. 4, p. 377–386, 2017.

ROTH, G. A. et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 76, n. 25, p. 2982–3021, 2020.

SALUK-JUSZCZAK, J.; KROLEWSKA, K.; WACHOWICZ, B. beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as a blood platelet antioxidant. **Platelets**, v. 21, n. 6, p. 451–459, 2010.

SALUK-JUSZCZAK, J.; KRÓLEWSKA, K.; WACHOWICZ, B. Response of blood platelets to β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. **Platelets**, v. 21, n. 1, p. 37–43, 2010.

SANDOO, A. et al. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v. 4, n. 1, p. 302–312, 2015.

ŠANDULA, J. et al. Microbial (1→3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate polymers**, v. 38, n. 3, p. 247–253, 1999.

SATA, Y. et al. Predominant Role of Neural Arc in Sympathetic Baroreflex Resetting of Spontaneously Hypertensive Rats. **Circulation Journal**, v. 79, n. 3, p. 592–599, 2015.

SAVAGE, B.; RUGGERI, Z. M. Platelet thrombus formation in flowing blood. **Platelets**, v. 2, n. 1, p. 359–367, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, S. B.C. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n.1, p. 1–51, 2010.

SCHIFFRIN, E. L. Vascular remodeling in hypertension: Mechanisms and treatment. **Hypertension**, v. 59, n. 2, p. 367–374, 2012.

SHATTIL, S. J.; CUNNINGHAM, M.; HOXIE, J. A. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. **Blood**, v. 70, n. 1, p. 307–315, 1987.

SHEU, J. R. et al. In vivo antithrombotic effect of triflavin, an Arg –Gly –Asp containing peptide on platelet plug formation in mesenteric microvessels of mice. **Thrombosis Haemostasis**, v. 72, n. 1, p. 617– 621., 1994.

SHIN, J. Y. et al. Structural and biological study of carboxymethylated *Phellinus linteus* polysaccharides. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3368–3372, 2007.

SIMA, P.; VANNUCCI, L.; VETVICKA, V. β -glucans and cholesterol (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 4, p. 1799–1808, 2018.

SLAMENŇOVÁ, D. et al. Protective effects of fungal (1→3)- β -d-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Letters**, v. 198, n. 2, p. 153–160, 2003.

STAUSS, H. M. Identification of blood pressure control mechanisms by power spectral analysis. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 4, p. 362–368, 2007.

SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E.; CZARZASTA, K.; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, A. Dysregulation of the Renin-Angiotensin System and the Vasopressinergic System Interactions in Cardiovascular Disorders. **Current Hypertension Reports**, v. 20, n. 3, 2018.

TANAKA, Y. et al. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric. **British Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 8, p. 1602–1608, 1999.

TAO, Y.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 13, p. 2261–2269, 2006.

THOMAS, G. D. Neural control of the circulation. **Advances in Physiology Education**, v. 35, n. 1, p. 28–32, 2011.

TOUYZ, R. M. et al. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 114, n. 4, p. 529–539, 2018.

TÚRMINA, J. A. et al. Toxicological Assessment of β -(1-6)-Glucan (Lasiodiplodan) in Mice during a 28-Day Feeding Study by Gavage. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14298–14309, 2012.

VARA, D.; CAMPANELLA, M.; PULA, G. The novel NOX inhibitor 2-acetylphenothiazine impairs collagen-dependent thrombus formation in a GPVI-dependent manner. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, n. 1, p. 212–224, 2013.

VERAS, R. C. et al. Participation of Nitric Oxide Pathway in the Relaxation Response Induced by E-cinnamaldehyde Oxime in Superior Mesenteric Artery Isolated From Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 58–66, 2013.

VERMA, T. et al. Plants Used as Antihypertensive. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 11, n. 2, p. 155–184, 2021.

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. **Physiology & Behavior**, v. 94, n. 2, p. 276–284, 2008.

WEHRWEIN, E. A.; JOYNER, M. J. Regulation of blood pressure by the arterial baroreflex and autonomic nervous system. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 117, p. 89–102, 2013.

WENG, B. B. C. et al. Toxicological and immunomodulatory assessments of botryosphaeran (β -glucan) produced by *Botryosphaeria rhodina* RCYU 30101. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 910–916, 2011.

WOJTALA, A. et al. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. **Methods in Enzymology**, v. 542, n.1, p. 243–262, 2014.

XU, J. et al. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 2, p. 227–234, 2009.

YADAV, S.; STORRIE, B. The cellular basis of platelet secretion: emerging structure/function relationships. **Platelets**, v. 28, n. 2, p. 108-118, 2017.

YONEDA, K. et al. Identification of the active metabolite of ticlopidine from rat in vitro metabolites. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 3, p. 551–557, 2004.

ZARBOCK, A.; POLANOWSKA-GRABOWSKA, R. K.; LEY, K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. **Blood Reviews**, v. 21, n. 2, p. 99–111, 2007.

ZHANG, L. et al. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 8, p. 1515–1521, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO I

CARBOXYMETHYL-GLUCAN FROM *Saccharomyces cerevisiae* REDUCES BLOOD PRESSURE AND IMPROVES BAROREFLEX SENSITIVITY IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Publicado no periódico Food & Function

ISSN: 2042-6496

FI: 5.396

QUALIS: A2 na área de Nutrição
(2013-2016)



Cite this: DOI: 10.1039/d1fo01079d

Carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* reduces blood pressure and improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats

Lorena Soares Bezerra,^a Marciane Magnani,^{ib} *^{a,b} Tatiana Colombo Pimentel,^c Francisca Manuela de Souza Freire,^d Tays Amanda Felisberto da Silva,^e Ricardo Cartaxo Ramalho,^d Adriano Francisco Alves,^f José Luiz de Brito Alves,^a Isac Almeida de Medeiros^e and Robson Cavalcante Veras^{a,d}

Carboxymethyl-glucan (CMG) is a derivative of β -D-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*. This polymer presents improved physicochemical properties and shows health benefits, such as immunomodulation, antioxidant, anti-inflammatory, anti-tumor, and antiplatelet activities, and improved vascular function. However, studies concerning the effect of administration of CMG on the cardiovascular parameters, mainly in the field of hypertension, are scarce. This study aimed to investigate the effect of administration of CMG in spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive rats (WKY) models. Normotensive and hypertensive animals received CMG at doses of 20 mg kg⁻¹ and 60 mg kg⁻¹ for four weeks. Then, weight gain, lipid profile, renal function, blood pressure, cardiac hypertrophy, baroreflex sensitivity, and sympathetic tone were evaluated. Oral administration of CMG influenced weight gain and cholesterol levels, and significantly reduced urea in the hypertensive animals. It decreased blood pressure levels and cardiac hypertrophy, improved baroreflex response, and reduced the influence of sympathetic tone. The results demonstrate the antihypertensive effect of CMG through improvement in baroreflex sensitivity via sympathetic tone modulation.

Received 8th April 2021

Accepted 25th July 2021

DOI: 10.1039/d1fo01079d

rsc.li/food-function

1. Introduction

Saccharomyces cerevisiae is the largest source of β -D-glucans among the yeasts. β -D-Glucans are chemically characterized by a linear central backbone of glucose residues linked via β -(1–3) linkages, and glucose side-chains of various sizes linked through β -(1–6) linkages.¹ This polysaccharide has been used to treat cancer in Japanese traditional medicine for decades, mainly due to its potent immunomodulatory role and anti-cancer activity.^{2,3} Furthermore, it has demonstrated other health benefits, such as anti-inflammatory, anti-mutagenic, hypocholesterolemic, anti-hypertensive, hypoglycemic and

antioxidant properties. Therefore, there is a great interest in expanding its use as a functional ingredient in the development of health foods and pharmaceutical products.^{2,4–11}

The nutritional and health benefits of β -D-glucans are related to the physicochemical properties of this polymer.^{11,12} Carboxymethyl-Glucan (CMG) is a carboxymethylated form and is considered an alternative as a therapeutic agent with greater potency or effectiveness. Its lower molar mass ensures greater solubility in water, while its higher degree of branching increases the affinity for cell receptors and, consequently, improves the biological response.^{13–15} Another relevant aspect for its use is that, despite not proved yet for CMG, soluble derivatives of β -D-glucans had demonstrated the ability to translocate from the gastrointestinal wall into the systemic circulation when orally administered.¹⁶

Some health benefits of CMG have already been reported. In healthy humans, CMG acted as adjuvant in preventing oxidative stress,¹⁷ while in patients with advanced prostate cancer, it exhibited a protective effect against DNA damage after oral administration.¹⁸ The administration of 20 mg kg⁻¹ dose for 8 days modulated vascular function, reduced platelet aggregation, and showed an anti-inflammatory effect in

^aPost-Graduate Program in Nutritional Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba (Universidade Federal da Paraíba – UFPB), Brazil.
E-mail: magnani2@gmail.com

^bDepartment of Food Engineering, Federal University of Paraíba (UFPB), Brazil

^cFederal Institute of Paraíba (IFPB), Campus Paranavai, Brazil

^dDepartment of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, UFPB, Brazil

^ePost-Graduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Health Sciences Center, UFPB, Brazil

^fDepartment of Physiology and Pathology, Laboratory of Pathology, Health Sciences Center, UFPB, Brazil

healthy rats.¹⁵ Antihypertensive activity in rats with renovascular hypertension have been reported after consumption of 40 mg kg⁻¹ for 2 weeks.¹⁹ The administration of 50 mg kg⁻¹ for 21 days showed vasorelaxant effect and modulation of cardiac function in animals.²⁰ In this way, most studies consider short periods of administration (2–3 weeks) and up to 50 mg kg⁻¹ dose. In these studies, the increase in arterial pressure has a renal origin and is triggered by increased renin and angiotensin II synthesis caused by reduced renal perfusion.²¹ In our study, we used spontaneously hypertensive rat (SHR) model, in which hypertension is genetic and presents similarities with essential hypertension in humans. This approach has been widely used to investigate the effects of antihypertensive agents.^{21–23} In these animals, the establishment of hypertension increases the peripheral vascular resistance, promotes structural changes, impairs baroreflex control, and promotes endothelial dysfunction.²³ Furthermore, cardiovascular changes are typically observed. We also used longer administration times (4 weeks) and 20 mg kg⁻¹ and 60 mg kg⁻¹ doses for SHR model, which has not been evaluated so far. In the case of normotensives rats (WKY), only 60 mg kg⁻¹ were used, as previous studies have already reported beneficial effects for lower doses. CMG is available in the pharmaceutical market and consumed in Asia; however, the magnitude of the effects of its administration on the cardiovascular system have not been properly observed, mainly in hypertensive models. Therefore, this study aimed to investigate the effect of oral administration of CMG in WKY and SHR animal model.

2. Material and methods

2.1 Materials

Phenylephrine hydrochloride (Phe), sodium nitroprusside (NPS), and hexamethonium (Hexa) were obtained from Sigma-Aldrich Brazil Ltda (São Paulo, Brazil). Xylazine and ketamine were purchased from Syntec (São Paulo, Brazil), and sodium heparin from Cristália (São Paulo, Brazil).

2.2 Obtaining CMG and animals

CMG was obtained from *S. cerevisiae* yeast cream (discarded at breweries) according to the procedures described by Magnani *et al.*¹⁴ and Bezerra *et al.*¹⁵ using sonication and enzymatic treatment, followed by derivatization with monochloroacetic acid. The identity of the obtained CMG was confirmed by nuclear magnetic resonance spectroscopy and infrared analysis. The obtained CMG had molecular weight of 220 kDa, and substitution degree of 0.8, which is considered optimum for a methylated derivative and indicates a great solubility.¹⁴

To perform the experimental protocols, SHR (hypertensives) and Wistar Kyoto (WKY) rats (normotensives) from the Animal Production Unit at the Drugs and Medicines Research Institute (IPEFarm/UFPB) were used. The animals were 12 weeks old and weighed from 250 to 300 g. All the animals were kept under controlled temperature conditions (21 ± 1 °C), in a

12-hour light–dark cycle with free access to water and food. The experiments were conducted according to federal law no. 11794/08, which establishes procedures for scientific use of laboratory animals, and the study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals under protocol no. 087/2017.

The animals were divided into five groups of eight animals each. Two normotensive groups: WKY CT (placebo) and WKY treated with CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹ (WKY CMG 60 mg kg⁻¹); and three hypertensive groups: SHR CT (placebo), the group treated with CMG at a dose of 20 mg kg⁻¹ (SHR CMG 20 mg kg⁻¹), and the group treated with CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹ (SHR CMG 60 mg kg⁻¹). The administration was performed by gavage (i.g.) once a day in the morning for four weeks. Saline was used as a placebo.

2.3 Evaluation of weight gain and biochemical parameters

The weight of animals was monitored before and during the four weeks of treatment, every three days. At the end of the experimental period and after 12 h of fasting, the animals were anesthetized with ketamine (70 mg kg⁻¹) and xylazine (10 mg kg⁻¹) and blood was collected from the inferior vena cava using sterile heparinized syringes. The blood samples were then centrifuged at 2000 rpm at a temperature of 4 °C for 15 min to obtain the serum. Serum concentrations of total cholesterol, triglycerides, high lipoprotein cholesterol (HDL-C), urea, creatinine, and c-reactive protein (CRP) were performed through automated spectroscopic readings using commercial kits (Labtest, Brazil).²⁴

2.4 Blood pressure and heart rate measurement

After four weeks of treatment, the rats were anesthetized with ketamine and xylazine (70 and 10 mg kg⁻¹, i.p., respectively) to insert polyethylene catheters in the femoral vein and artery for respective drug injection and arterial pressure recordings. The catheters were tunneled through the back of the neck and afterward the animals underwent a period of surgical recovery for 24 h. After this period, arterial pressure (AP) and heart rate (HR) measurements were recorded in the conscious rats using a pressure transducer coupled to an acquisition system (PowerLab, ADInstruments, Unit 13, 22 Lexington Drive, BELLA VISTA, NSW, AUSTRALIA), connected to PC running LabChart 7.0. The AP was recorded for 40–60 min under baseline conditions, in order to stabilize the cardiovascular parameters, and the values of systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), mean arterial pressure (MAP) and HR were calculated by selection of 10 min for each animal.

2.5 Baroreflex sensitivity test and assessment of sympathetic tone

After the four weeks of treatment, blood pressure and HR baseline were recorded for 60 min, and baroreflex sensitivity was evaluated using vasoactive drugs. Phenylephrine (Phe, 8 µg kg⁻¹), an alpha 1-agonist, and sodium nitroprusside (25 µg kg⁻¹), a NO donor, were administered in an intravenous bolus

injection to each group, as previously reported.²⁵ Baroreflex sensitivity was observed through reflex HR changes induced by transient changes in MAP. The changes in HR produced by the administration of the vasoactive drugs were quantified and evaluated using the ratio of changes in HR and MAP values ($\Delta\text{HR}/\Delta\text{MAP}$).²⁶ The values of changes (Δ) of each animal from the groups studied were obtained by the difference between HR and MAP after intravenous application of each vasoactive agonist and HR and MAP baseline.

The influence of sympathetic tone in the cardiovascular system was assessed in the studied groups after the treatment period through intravenous application of hexamethonium (30 mg kg^{-1}), which acts as a ganglionic blocker. Sympathetic tone was determined as the difference between MAP after intravenous blocker application and baseline MAP.²⁷ Data were analyzed with the use of LabChart 7 software (ADInstruments, Australia).

2.6 Evaluation of cardiac hypertrophy and histological analysis

To assess cardiac hypertrophy, the animal's hearts were removed and cleaned in physiological solution. Afterwards, the ventricles were isolated, dried, and weighed to determine the ventricle mass index, which is the ratio of ventricle mass (mg) to the animal's weight (g). This index allows assessing the degree of ventricular hypertrophy.²⁸

For histological study, the heart was perfused in a neutral 10% buffered formaldehyde solution and kept in this solution for three days; then soaked in paraffin wax. Sections were cut ($7 \mu\text{m}$) and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for morphological analysis.²⁹

To confirm cardiac hypertrophy, cardiomyocyte morphometry was performed using KS300 program contained in the Carl Zeiss image analyzer (Oberkochen, Germany). To calculate the area of each cardiomyocyte, an H&E-stained histological section of heart from each case was viewed through the $40\times$ objective of Olympus microscope (Tokyo, Japan) to scan 20 random regions using the Q-Color3 micro camera. All cardiac vascular connective tissue was excluded from the analysis using program tools. All pixel types of cardiomyocytes were selected for binary image creation and the area calculated in μm^2 . Using the same images, all cardiac muscle cells were counted interactively using the same program. The methodology employed for microscopic imaging, image segmentation, and morphometric conditions definition was described by Caliri.³⁰

2.7 Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM). For statistical comparisons of the data, one-way ANOVA followed by Tukey's post-test were used. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software @. Inc., La Jolla, CA, USA), and differences were considered significant at $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Evaluation of weight gain and biochemical parameters

In the first two weeks of treatment, there was no significant difference in weight gain for the studied groups (Fig. 1, $p > 0.05$). From the third week onwards, the WKY CT group presented a lower weight gain percentage ($7.13 \pm 0.89\%$) than the SHR CT group ($12.61 \pm 1.75\%$, $p < 0.05$), until the fourth week (WKY CT: $12.06 \pm 2.02\%$; and SHR CT: $16.34 \pm 0.79\%$, $p < 0.05$). The WKY CMG 60 mg kg^{-1} animals presented similar weight gain percentage ($12.46 \pm 2.58\%$) than the WKY CT group ($12.06 \pm 2.02\%$). For the SHR CMG 60 mg kg^{-1} group, a lower percentage weight gain was observed ($8.8 \pm 1.1\%$) compared to the SHR CT group ($12.61 \pm 1.75\%$, $p < 0.05$).

The biochemical analysis for each group shown in Table 1 reveals that treatment with CMG changed the lipid profiles of the treated groups. Total cholesterol increased significantly as compared to the respective controls ($p < 0.05$). However, there was no significant change in HDL-cholesterol or triglyceride levels ($p > 0.05$). For renal function, a significant reduction in urea was observed in the SHR CMG 60 mg kg^{-1} group compared to the SHR CT group ($p < 0.05$). There was no significant variation in CRP and creatinine values ($p > 0.05$).

3.2 Effect of CMG on blood pressure and heart rate

The SHR CT animals presented significantly higher blood pressure levels (MAP = 193.3 ± 5.9 ; SBP = 236.3 ± 11.2 ; and DBP = $173.4 \pm 7.9 \text{ mmHg}$) when compared to the WKY CT group (MAP = 120.9 ± 13.4 ; SBP = 147.5 ± 7.8 ; and DBP = $101.5 \pm 10.1 \text{ mmHg}$), respectively (Fig. 2A, B and C, $p < 0.05$). However, for HR there was no significant difference (SHR CT: 321.1 ± 24.0 ; WKY CT: $321.7 \pm 27.6 \text{ bpm}$, Fig. 2D, $p > 0.05$). CMG administration did not change these parameters in the WKY CMG 60 mg kg^{-1} group (MAP: 118 ± 7.0 ; SBP: 147.9 ± 5.7 ; DBP: $106.0 \pm 10.7 \text{ mmHg}$; and HR: $319.4 \pm 20.2 \text{ bpm}$) compared to the WKY CT ($p > 0.05$). In the SHR CMG 20 mg kg^{-1}

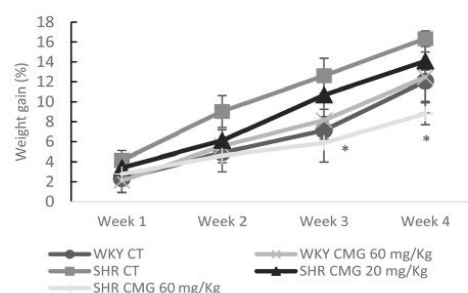


Fig. 1 Weight gain percentage during CMG treatment for four weeks. WKY CT: Wistar Kyoto control; WKY CMG 60 mg kg^{-1} : Wistar Kyoto + CMG at dose of 60 mg kg^{-1} ; SHR CT: SHR control; SHR CMG 20 mg kg^{-1} : SHR + CMG at dose of 20 mg kg^{-1} ; SHR CMG 60 mg kg^{-1} : SHR + CMG at dose of 60 mg kg^{-1} . Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs. SHR CT.

Table 1 Biochemical parameters obtained for each group of animals treated with CMG for four weeks

Parameters	WKY CT	WKY CMG 60 mg kg ⁻¹	SHR CT	SHR CMG 20 mg kg ⁻¹	SHR CMG 60 mg kg ⁻¹
Total cholesterol (mg dL ⁻¹)	64.3 ± 1.7	72.5 ± 1.9 [#]	48.7 ± 1.9	63.0 ± 6.3*	66.7 ± 2.7*
HDL-cholesterol (mg dL ⁻¹)	37.1 ± 2.7	38.6 ± 3.6	41.9 ± 5.5	46.0 ± 5.0	42.6 ± 4.9
Triglycerides (mg dL ⁻¹)	132.5 ± 12.5	158.2 ± 16.4	125.2 ± 9.5	113.8 ± 10.4	97.0 ± 18.2
Creatinine (μmol L ⁻¹)	0.38 ± 0.06	0.43 ± 0.03	0.49 ± 0.03	0.50 ± 0.02	0.45 ± 0.02
Urea (mg dL ⁻¹)	39.1 ± 1.5	38.1 ± 1.7	48.2 ± 1.1	50.7 ± 6.7	30.5 ± 1.3*
CRP (mg L ⁻¹)	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.26 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.01

WKY CT: Wistar Kyoto control; WKY CMG 60 mg kg⁻¹: Wistar Kyoto + CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹; SHR CT: SHR control; SHR CMG 20 mg kg⁻¹: SHR + CMG at a dose of 20 mg kg⁻¹; SHR CMG 60 mg kg⁻¹: SHR + CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹. Data are expressed as mean ± SEM. [#]*p* < 0.05 vs. WKY CT; **p* < 0.05 vs. SHR CT.

group, CMG administration did not change the MAP or HR (180.1 ± 18.8 mmHg; 340.0 ± 31.1 bpm, Fig. 2A and D), but a significant reduction was observed in the levels of SBP and DBP (respectively 211.7 ± 22.8; and 160.3 ± 18.0 mmHg, *p* < 0.05, Fig. 2B and C) in relation to the SHR CT. In the SHR CMG 60 mg kg⁻¹ group, there was a reduction in blood pressure levels – MAP, SBP, and DBP (respectively 167.9 ± 12.1; 210.2 ± 16.7; and 143.5 ± 9.2 mmHg, *p* < 0.05, Fig. 2A, B, and C), with no change in HR (346.8 ± 12.8 bpm, Fig. 2D, *p* > 0.05).

3.3 Effect of CMG treatment on baroreflex sensitivity and sympathetic tone

The records reveal changes in the MAP levels and HR in response to the classic agonists employed to activate baroreflex (Fig. 3A). The SHR CMG 20 mg kg⁻¹ group presented no significant change in MAP (Fig. 2A); therefore, the group was not included in the baroreflex sensitivity test. In normotensive animals, oral CMG administration did not alter baroreflex gain, as observed by comparing WKY CMG 60 mg kg⁻¹ (−2.29 ± 1.7 bpm mmHg⁻¹) to the WKT CT group (−2.22 ± 0.87 bpm mmHg⁻¹, *p* > 0.05). In the SHR group treated at a dose of 60 mg kg⁻¹, an improvement in baroreflex gain was observed in comparison to the SHR CT group (−2.72 ± 0.92 vs. −1.17 ± 0.72 bpm mmHg⁻¹, *p* < 0.05).

In assessing the influence of sympathetic tone through hexametonium effect (Fig. 4A and B), the SHR CT group presented a significantly higher ΔMAP than the normotensive control (−70.08 ± 10.4 vs. −19.77 ± 6.9 mmHg, *p* < 0.05). When SHR animals were treated at a dose of 60 mg kg⁻¹ (−54.5 ± 11.0 mmHg, *p* < 0.05), ΔMAP significantly decreased as compared to the SHR CT.

3.4 Effect of CMG treatment on cardiac hypertrophy

As demonstrated in Fig. 5, the animals in the SHR CT group (3.60 ± 0.09 mg g⁻¹, *p* < 0.05) presented a significant increase in ventricular mass (index) when compared to WKY CT (3.15 ± 0.06 mg g⁻¹). Treatment with CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹ did not alter ventricular mass in the WKY group (3.02 ± 0.18 mg g⁻¹) as compared to the WKY CT (*p* > 0.05). On the other hand, in SHR groups treated at different doses (SHR CMG 20 mg kg⁻¹: 3.00 ± 0.05 mg g⁻¹; and SHR CMG 60 mg kg⁻¹: 3.28 ± 0.01 mg g⁻¹, *p* < 0.05), significant attenuation in the index compared to the SHR CT was verified.

Histological analysis of the heart revealed standard histological compatibility for the WKY CT and WKY CMG 60 mg kg⁻¹ groups (Fig. 6A and B). In the SHR CT group, it was observed that the cardiomyocytes presented an increase in cytoplasmic volume and cell size, characteristic of cardiac hypertrophy, with the presence of dilated blood vessels (with blood inside) and distancing between fibers (Fig. 6C). In SHR animals treated at a dose of 20 mg kg⁻¹, we observed that the cardiac tissue did not show signs of hypertrophy, consistent with the descriptions of the WKY CT and WKY CMG 60 mg kg⁻¹ animals (Fig. 6D). In the SHR CMG 60 mg kg⁻¹ group, it was found that the cardiomyocytes presented standard histological compatibility, however with the presence of distancing between fibers, and dilated blood vessels, with blood inside, this being indicative of a mild inflammatory process (Fig. 6E).

The cardiomyocytes morphometry (Fig. 7) shows that there were no changes in cardiomyocytes size of WKY CMG 60 mg kg⁻¹ animals (26.7 ± 0.58 μm²) in relation to the WKY CT group (26.1 ± 0.84 μm²). However, a significant difference was observed in cardiomyocytes of SHR CT animals (38.9 ± 0.73 μm², *p* < 0.05), which showed larger size compared to the WKY CT (26.1 ± 0.84 μm²). In the SHR CMG 20 mg kg⁻¹ (26.4 ± 0.89 μm², *p* < 0.05) and SHR CMG 60 mg kg⁻¹ groups (25.8 ± 0.73 μm², *p* < 0.05), significantly smaller cardiomyocytes were observed compared to SHR CT (38.9 ± 0.73 μm²), with no difference between doses (*p* > 0.05).

4. Discussion

The results presented in this study reinforce the cardioprotective role of CMG already evidenced in our previous studies. However, here we demonstrate, for the first time, its effects on blood pressure in an SHR animal model, with the following findings: antihypertensive activity involving improved baroreflex response, and modulation in sympathetic tone and renal function. Further, SHR presented reduced damages to the target organ.

CMG has been considered as a strategy in prevention of risk factors for cardiovascular diseases, other than hypertension, given the evidence of reduced triglycerides and cholesterol in mice with acute dyslipidemia that received CMG.^{31,32} The treatment with this polysaccharide both in normotensive

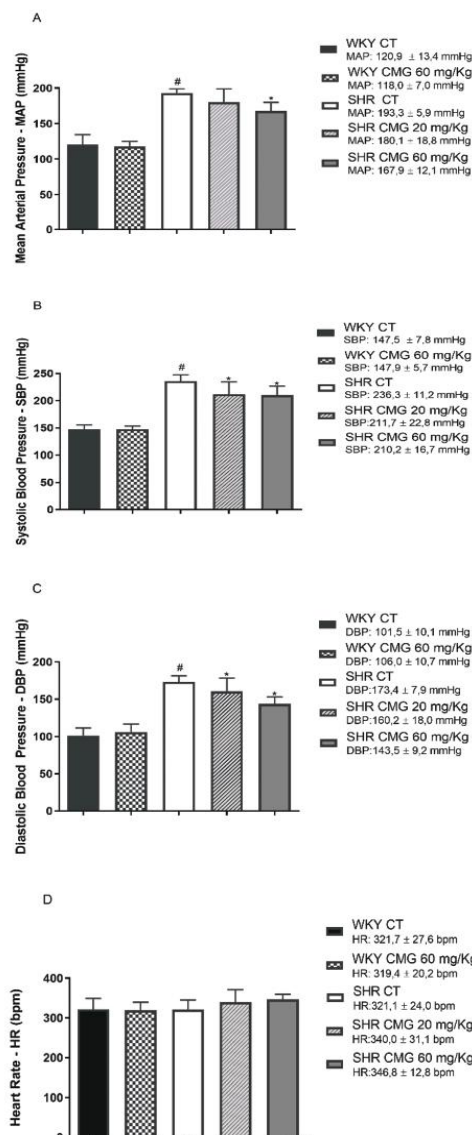


Fig. 2 Blood pressure levels and heart rate after CMG treatment for four weeks. (A) Mean arterial pressure, (B) systolic blood pressure, (C) diastolic blood pressure and (D) heart rate. WKY CT: Wistar Kyoto control; WKY CMG 60 mg kg⁻¹; Wistar Kyoto + CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹; SHR CT: SHR control; SHR CMG 20 mg kg⁻¹; SHR + CMG at a dose of 20 mg kg⁻¹; SHR CMG 60 mg kg⁻¹; SHR + CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹. Data are expressed as mean ± SEM. #*p* < 0.05 vs. WKY CT; **p* < 0.05 vs. SHR CT.

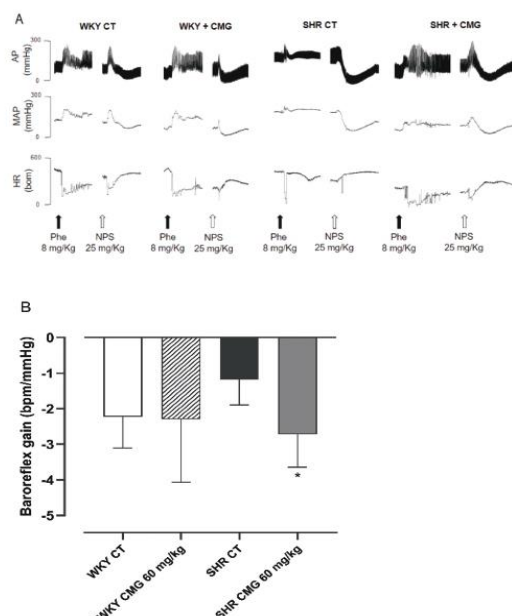


Fig. 3 Effect of CMG treatment on baroreflex sensitivity. (A) Representative original traces illustrating AP, MAP and HR in response to Phenylephrine (Phe) and sodium nitroprusside (NPS); (B) effect of oral administration with CMG on the baroreflex gain of each group. WKY CT: Wistar Kyoto control; WKY CMG 60 mg kg⁻¹; Wistar Kyoto + CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹; SHR CT: SHR control; SHR CMG 20 mg kg⁻¹; SHR + CMG at a dose of 20 mg kg⁻¹; SHR CMG 60 mg kg⁻¹; SHR + CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹. Data are expressed as mean ± SEM. #*p* < 0.05 vs. WKY CT; **p* < 0.05 vs. SHR CT.

and hypertensive animals points to an opposite effect in this study, with an increase in cholesterol levels. However, no significant changes in triglyceride or HDL-cholesterol parameters between groups were demonstrated.

According to evidences of the role of β -D-glucans in satiety and appetite reduction, as well as in weight and adiposity reduction,^{9,33} CMG seems to interfere in weight gain, with reduction only in SHR treated at a dose of 60 mg kg⁻¹.

CMG also influenced SHR renal function, showing a reduction in urea. In SHR animals, there is an increase in the infiltration of immune cells in the kidneys and over-activation of the NF- κ B pathway; both are implicated in the development of hypertension.³⁴ β -D-Glucans have biological effect of immunomodulation, which has been extensively investigated in the literature. It was demonstrated that CMG has immunostimulant and enhanced hematopoiesis activities in patients with prostate cancer.³⁵ Therefore, it is plausible that this is a possible mechanism involved in this effect.

It was observed that CMG, only at a dose of 60 mg kg⁻¹, reduced MAP in SHR animals, as well as SBP and DBP, without

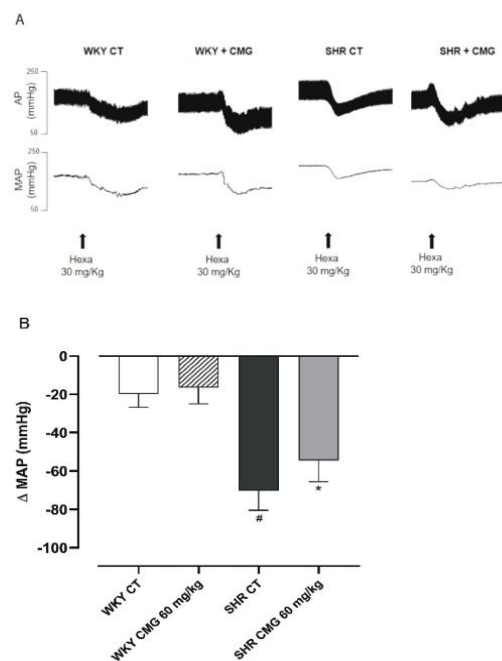


Fig. 4 Effect of CMG treatment on sympathetic tone. (A) Original representative traces of AP and MAP in response to hexamethonium for each group of animals; (B) analysis of MAP delta change after four weeks of treatment. WKY CT: Wistar Kyoto control; WKY CMG 60 mg kg⁻¹; Wistar Kyoto + CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹; SHR CT: SHR control; SHR CMG 20 mg kg⁻¹; SHR + CMG at a dose of 20 mg kg⁻¹; SHR CMG 60 mg kg⁻¹; SHR + CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹. Data are expressed as mean ± SEM. [#]*p* < 0.05 vs. WKY CT; ^{*}*p* < 0.05 vs. SHR CT.

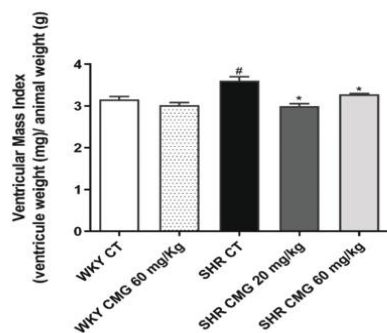


Fig. 5 Ventricular hypertrophy after CMG treatment for four weeks. WKY CT: Wistar Kyoto control; WKY CMG 60 mg kg⁻¹; Wistar Kyoto + CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹; SHR CT: SHR control; SHR CMG 20 mg kg⁻¹; SHR + CMG at a dose of 20 mg kg⁻¹; SHR CMG 60 mg kg⁻¹; SHR + CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹. Data are expressed as mean ± SEM. [#]*p* < 0.05 vs. WKY CT; ^{*}*p* < 0.05 vs. SHR CT.

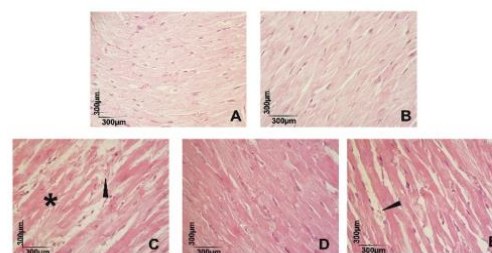


Fig. 6 Photomicrograph of a histological section of the myocardium from each group of animals stained in hematoxylin and eosin. (A) WKY CT; (B) WKY CMG 60 mg kg⁻¹; (C) SHR CT; (D) SHR CMG 20 mg kg⁻¹; (E) SHR CMG 60 mg kg⁻¹. The images were analyzed using a 40x objective. The asterisk indicates cardiac hypertrophy; the arrowhead indicates the presence of dilated vessels, with blood inside and the distance between the muscle fibers. WKY CT: Wistar Kyoto control; WKY CMG 60 mg kg⁻¹; Wistar Kyoto + CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹; SHR CT: SHR control; SHR CMG 20 mg kg⁻¹; SHR + CMG at a dose of 20 mg kg⁻¹; SHR CMG 60 mg kg⁻¹; SHR + CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹.

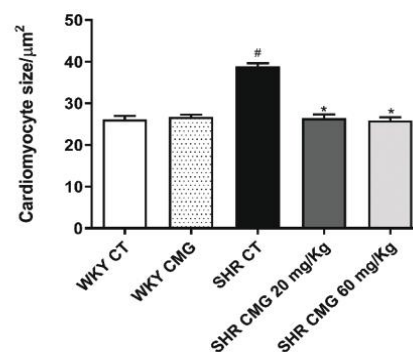


Fig. 7 Cardiomyocyte size after CMG treatment for four weeks. WKY CT: Wistar Kyoto control; WKY CMG 60 mg kg⁻¹; Wistar Kyoto + CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹; SHR CT: SHR control; SHR CMG 20 mg kg⁻¹; SHR + CMG at a dose of 20 mg kg⁻¹; SHR CMG 60 mg kg⁻¹; SHR + CMG at a dose of 60 mg kg⁻¹. Data are expressed as mean ± SEM (20 cells of each animal from each group). [#]*p* < 0.05 vs. WKY CT; ^{*}*p* < 0.05 vs. SHR CT.

affecting blood pressure levels in the normotensive group. Doses of 20 mg kg⁻¹ reduced SBP and DBP, and a trend of reduction in MAP was observed. The lack of significance in MAP may be attributed to the high standard deviation of the data. Also, there were no changes in HR for the evaluated groups, suggesting a potential activity of CMG at the vascular level. Furthermore, it was found that one of the mechanisms involved in its antihypertensive effect is the improvement in sensitivity through baroreflex gain.

The baroreflex mechanism exerts relevant role in regulating blood pressure, promoting adjustments in blood pressure in

the short term through baroreceptors present in the aortic arch and in the carotid sinus, which detect pressure variations. Therefore, it is a key between the cardiovascular and autonomic nervous systems, since adjustments are mediated by reciprocal modulation between the sympathetic and parasympathetic nervous systems.^{36,37} To investigate baroreflex sensitivity, responses generated by intravenous administration of Phe and NPS were verified, making it possible to, respectively, evaluate the parasympathetic and sympathetic components. After this, we observed that CMG improved baroreflex sensitivity in the SHR at a dose of 60 mg kg⁻¹, without promoting changes in the normotensive animals treated with the same dose. This finding corroborates the role of this derivative in protecting cardiovascular system, especially in pathological conditions, as observed in SHR model.

There is substantial evidence reporting impaired baroreflex sensitivity control in SHR animal model, since they present augmented cardiac and vascular sympathetic tone excitement, and reduced cardiac parasympathetic tone.^{21,36,38} This imbalance in the autonomic nervous system, involving parasympathetic and sympathetic pathways is related to the higher densities of sympathetic innervation found in SHR.²³

Taken this into account, we sought to understand the influence of sympathetic tone at the peripheral level, thus a greater contribution from the sympathetic nervous system in the SHR control group was observed. However, when the hypertensive animals were subjected to CMG treatment at a dose of 60 mg kg⁻¹, it reduced sympathetic tone participation. Thus, CMG possibly improves baroreflex sensitivity gain through the modulation of sympathetic tone. This finding is consistent with a previous study that describes the action of CMG in restoring baroreflex control *via* sympathetic tone in animals with renovascular hypertension when treated at a dose of 40 mg kg⁻¹ for two weeks. The authors speculate that this effect may be related to the strong sequestering capacity of reactive oxygen species induced by this glucan.¹⁹ Indeed, this derivative shows antioxidant effect, with free radical scavenging activity similar to others potent antioxidants, such as tocopherol and mannitol,³⁹ and can reduce malondialdehyde levels in healthy individuals, thus preventing oxidative stress.¹⁷

Such evidence indicates a possible antioxidant action of CMG in baroreflex function of treated SHR animals. There are reports of the reactive oxygen species involvement in the development of hypertension in this animal model, which is characterized by increased levels of angiotensin II, that stimulates the production of superoxide anions *via* NADPH oxidase activation.⁴⁰ Guimaraes *et al.*⁴¹ demonstrated that inhibition of this enzyme and elimination of superoxide anions improves baroreflex sensitivity in SHR rats, suggesting that antioxidant therapy has beneficial effects on hypertension. However, studies are needed to verify the antioxidant role of CMG in this context. In addition, the antihypertensive action of this derivative may also be related to endothelial dysfunction, which was not investigated in this study, but there are findings suggesting that oral administration of CMG (20 mg kg⁻¹) for eight days potentiated the vascular response to oxide nitric in rats.¹⁵

Structural alterations, mainly in organs and vessels, are commonly associated to hypertension, such as cardiac hypertrophy, which is generally considered a compensation mechanism against increased workload of the heart.⁴² This alteration develops at around 12 weeks of age in SHR and involves increasing oxidative stress, myocyte contractility, an increased action potential, and remodeling of the cardiac contraction-excitation coupling system, which leads to an increased calcium transient.^{42–44} There is relevant evidences showing that CMG can act in cardiac function through negative inotropic effect on the atrium and reduced calcium transient in ventricular cardiomyocytes accompanied by decreased contractility in rats that received 50 mg kg⁻¹ of this derivative.²⁰ Thus, the reduced cardiac damage in SHR animals observed in this study might be linked to this action promoted by CMG and could be observed in the histological analyses (Fig. 6) and cardiomyocyte size (Fig. 7). In the SHR CMG 20 mg kg⁻¹ group, although no decrease in MAP levels was observed, the effect on cardiac hypertrophy might be related to the significant reduction in systolic pressure.

Although, there are reports in the literature of anti-inflammatory properties attributed to β -D-glucans^{10,33,45–47} and it is shown that CMG had the ability to modulate inflammatory cytokines through the reduction of interleukin-8 in animals treated (20 mg kg⁻¹) for eight days,¹⁵ histological analysis revealed a mild inflammatory process in the cardiomyocytes of the SHR CMG 60 mg kg⁻¹ group. However, this was not observed at the 20 mg kg⁻¹ dose and for the normotensive animals, and c-reactive protein levels were lower in SHR treated with CMG, although significant differences were not observed.

5. Conclusions

In summary, CMG has shown beneficial effects on hypertension, promoting reduced blood pressure, and as a consequence, decreased cardiac hypertrophy. This antihypertensive property involves improving baroreflex sensitivity *via* modulation of sympathetic tone, and with possible modulation of the renal function. Thus, this polysaccharide may play an important role as an adjuvant in management of essential hypertension. However, further studies are needed to clarify the understanding of the mechanisms involved in these findings.

Author contributions

Conceptualization and formal analysis, L. S. B. and R. C. V.; investigation, L. S. B., F. M. S. F., T. A. F. S., A. F. A. and R. C. R.; methodology and visualization, L. S. B., M. M. and R. C. V.; writing – original draft and writing – review and editing, L. S. B., R. C. V., I. A. M., T. C. P. and M. M. All authors contributed to and approved the final manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (Coordination for the Improvement of Higher Education– CAPES), the National Council for Scientific and Technologic Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq), Paraíba State Research Support Foundation (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba – FAPESQ/PB), and the Paraíba Development Institute (Instituto de Desenvolvimento da Paraíba – IDEP-PB) for the technical and infrastructure support needed to conduct this study.

References

- 1 A. Ahmad, B. Munir, M. Abrar, S. Bashir, M. Adnan and T. Tabassum, Perspective of β -glucan as functional ingredient for food industry, *J. Nutr. Food Sci.*, 2012, **2**, 133–139.
- 2 D. Akramiene, A. Kondrotas, J. Didziapetriene and E. Kevelaitis, Effects of β -glucans on the immune system, *Medicina*, 2007, **43**, 597–606.
- 3 M. Novak and V. Vetricka, Beta-glucans, history and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action, *J. Immunotoxicol.*, 2008, **5**, 47–57.
- 4 V. E. C. Ooi and F. Liu, Immunomodulation and anticancer activity of polysaccharide-protein complexes, *Curr. Med. Chem.*, 2000, **7**, 715–729.
- 5 G. D. Brown, J. Herre, D. L. Williams, J. A. Willment, A. S. Marshall and S. Gordon, Dectin-1 Mediates the Biological Effects of β -Glucans, *J. Exp. Med.*, 2003, **197**, 1119–1124.
- 6 D. Slameňová, J. Lábaj, L. Križková, G. Kogan, J. Šandula, N. Bresgen and P. Eckl, Protective effects of fungal (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells, *Cancer Lett.*, 2003, **198**, 153–160.
- 7 G. C. F. Chan, W. K. Chan and D. M. Y. Sze, The effects of β -glucan on human immune and cancer cells, *J. Hematol. Oncol.*, 2009, **2**, 25–36.
- 8 J. Saluk-Juszczak, K. Krolewska and B. Wachowicz, Response of blood platelets to β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*, *Platelets*, 2010, **21**, 37–43.
- 9 L. Cloetens, M. Ulmuis, A. Johansson-Persson, B. Åkesson and G. Önnings, Role of dietary beta-glucans in the prevention of the metabolic syndrome, *Nutr. Rev.*, 2012, **70**, 444–458.
- 10 B. Du, C. Lin, Z. Bian and B. Xu, An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans, *Trends Food Sci. Technol.*, 2015, **41**, 49–59.
- 11 J. Bai, Y. Ren, Y. Li, M. Fan, H. Qian, L. Wang, G. Wu, H. Zhang, X. Qi, M. Xu and Z. Rao, Physiological functionalities and mechanisms of β -glucan, *Trends Food Sci. Technol.*, 2019, **88**, 57–66.
- 12 F. Y. Kagimura, M. A. A. Cunha, A. M. Barbosa, R. F. H. Dekker and C. R. M. Malfatti, Biological activities of derivatized D-glucans: a review, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2014, **72**, 588–598.
- 13 Y. Tao, L. Zhang and P. C. K. Cheung, Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, 2006, **341**, 2261–2269.
- 14 M. Magnani, C. M. Calliari, F. C. M. Junior, M. P. Mori, I. M. S. Cólus and R. J. H. Castro-Gomez, Optimized methodology for extraction of (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative, *Carbohydr. Polym.*, 2009, **78**, 658–665.
- 15 L. S. Bezerra, M. Magnani, R. J. H. Castro-Gomez, H. C. Cavalcante, T. A. F. da Silva, R. L. P. Vieira, I. A. Medeiros and R. C. Veras, Modulation of vascular function and anti-aggregation effect induced by (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan of *Saccharomyces cerevisiae* and its carboxymethylated derivative in rats, *Pharmacol. Rep.*, 2017, **69**, 448–455.
- 16 P. J. Rice, E. L. Adams, T. Ozment-Skelton, A. J. Gonzalez, M. P. Goldman, B. E. Lockhart, L. A. Barker, K. F. Breuel, W. K. Deponti, J. H. Kalbfleisch, H. E. Ensley, G. D. Brown, S. Gordon and D. L. Williams, Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005, **314**, 1079–1086.
- 17 V. B. S. Araújo, A. N. F. Melo, N. T. Souza, V. M. B. Silva, R. H. Castro-Gomez, A. S. Silva, E. L. Souza and M. Magnani, Oral intake of carboxymethyl-glucan (CM-G) from yeast (*Saccharomyces uvarum*) reduces malondialdehyde levels in healthy men, *Molecules*, 2015, **20**, 14950–14958.
- 18 M. Magnani, R. J. H. Castro-Gomez, M. P. Mori, H. Kuasne, E. P. Gregorio, F. J. Libos and I. M. S. Colus, Protective effect of carboxymethyl-glucan (CM-G) against DNA damage in patients with advanced prostate cancer, *Genet. Mol. Biol.*, 2011, **34**, 131–135.
- 19 A. Carvalho-Galvão, D. D. A. Gadelha, J. L. d. B. Alves, B. A. Khan, R. J. H. Castro-Gomez, J. C. Cruz, M. Magnani and V. A. Braga, A newly isolated carboxymethyl-glucan (CM-G) restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats, *Front. Physiol.*, 2018, **9**, 1–8.
- 20 R. L. Paixão Vieira, L. S. Bezerra, M. Magnani, E. R. M. Gomes, A. M. Barbosa, N. T. Machado-Calzerra, P. M. P. Maciel, M. P. Assis, T. A. F. Silva, R. C. Veras and I. A. Medeiros, P44 Carboxymethyl-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* induces vasodilation mediated by the NOS/NO/SCG pathway and negative inotropic effects in rats, *Biochem. Pharmacol.*, 2017, **139**, 140–141.
- 21 W. C. Dornas and M. E. Silva, Animal models for the study of arterial hypertension, *J. Biosci.*, 2011, **36**, 731–737.
- 22 M. K. Bazil, C. Krulan and R. L. Webb, Telemetric monitoring of cardiovascular parameters in conscious spontaneously hypertensive rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1993, **22**, 897–905.
- 23 M. Pintérová, J. Kuneš and J. Zicha, Altered neural and vascular mechanisms in hypertension, *Physiol. Res.*, 2011, **60**, 381–402.

- 24 J. Suliburska, P. Bogdański and Z. Krejpcio, Evaluation of nutritional and biochemical parameters in spontaneously hypertensive rats following antihypertensive treatment, *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 2014, **13**, 103–110.
- 25 M. S. Botelho-Ono, H. V. Pina, K. H. Sousa, F. C. Nunes, I. A. Medeiros and V. A. Braga, Acute superoxide scavenging restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats, *Auton. Neurosci.*, 2011, **159**, 38–44.
- 26 V. A. Braga, M. A. Burmeister, R. V. Sharma and R. L. Davisson, Cardiovascular responses to peripheral chemoreflex activation and comparison of different methods to evaluate baroreflex gain in conscious mice using telemetry, *Am. J. Physiol.*, 2008, **295**, 1168–1174.
- 27 A. Carvalho-Galvão, B. Ogunlade, J. Xu, C. R. A. Silva-Alves, L. G. Mendes-Júnior, D. D. Guimarães, J. C. Cruz, T. M. Queiroz, C. M. Balarini, V. A. Braga, C. M. Filipeanu, E. Lazartigues and M. S. França-Silva, Central administration of TRV027 improves baroreflex sensitivity and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats, *Clin. Sci.*, 2018, **132**, 1513–1527.
- 28 M. Sánchez, M. Galisteo, R. Vera, I. C. Villar, A. Zarzuelo, J. Tamargo, F. Pérez-Vizcaino and J. Duarte, Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats, *J. Hypertens.*, 2006, **24**, 75–84.
- 29 H. Poudyal, S. K. Panchal, J. Waanders, L. Ward and L. Brown, Lipid redistribution by α -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats, *J. Nutr. Biochem.*, 2012, **23**, 153–162.
- 30 M. V. Caliar, *Princípios de Morfometria Digital: KS 300 para iniciantes*, Editora UFMG, 1997, vol. 1, pp. 1–149.
- 31 T. A. Korolenko, F. V. Tuzikov, M. S. Cherkanova, T. P. Johnston, N. A. Tuzikova, V. M. Loginova, E. E. Filjushina and V. I. Kaledin, Influence of atorvastatin and carboxymethylated glucan on the serum lipoprotein profile and MMP activity of mice with lipemia induced by poloxamer 407, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2012, **90**, 141–153.
- 32 E. E. Pisareva, I. A. Goncharova, F. V. Tuzikov, N. V. Goncharova, E. Makhova and T. A. Korolenko, Role of Changes in Serum Chitotriosidase Activity in Mice under Conditions of Hyperlipidemia and Lipid-Lowering Effect of Carboxymethylated (1-3)- β -D-Glycan, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2014, **157**, 555–559.
- 33 K. Mosikanon, D. Arthan, A. Kettawan, R. Tungtrongchitr and P. Prangthip, Yeast β -Glucan Modulates Inflammation and Waist Circumference in Overweight and Obese Subjects, *J. Diet. Suppl.*, 2017, **14**, 173–185.
- 34 B. Rodríguez-Iturbe, Y. Quiroz, A. Ferrebuz, G. Parra and N. D. Vaziri, Evolution of renal interstitial inflammation and NF- κ B activation in spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Nephrol.*, 2004, **24**, 587–594.
- 35 M. Magnani, R. H. Castro-Gomez, M. N. Aoki, E. P. Gregório, F. Libos and M. A. E. Watanabe, Effects of carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the peripheral blood cells of patients with advanced prostate cancer, *Exp. Ther. Med.*, 2010, **1**, 859–862.
- 36 Y. Sata, T. Kawada, S. Shimizu, A. Kamiya, T. Akiyama and M. Sugimachi, Predominant Role of Neural Arc in Sympathetic Baroreflex Resetting of Spontaneously Hypertensive Rats, *Circ. J.*, 2015, **79**, 592–599.
- 37 A. E. Pickering, A. E. Simms and J. F. R. Paton, Dominant role of aortic baroreceptors in the cardiac baroreflex of the rat in situ, *Auton. Neurosci.*, 2008, **142**, 32–39.
- 38 B. F. Klippel, L. B. Duemke, M. A. Leal, A. G. F. Friques, E. M. Dantas, R. F. Dalvi, A. L. Gava, T. M. C. Pereira, T. U. Andrade, S. S. Meyrelles, B. P. Campagnaro and E. C. Vasquez, Effects of Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats, *Front. Physiol.*, 2016, **7**, 211–222.
- 39 M. Babincova, Z. Bacova, E. Machova and G. Kogan, Antioxidant properties of carboxymethyl glucan: comparative analysis, *J. Med. Food*, 2002, **5**, 79–83.
- 40 J. Carillon, C. Rugale, J. M. Rouanet, J. P. Cristol, D. Lacan and B. Jover, Endogenous antioxidant defense induction by melon superoxide dismutase reduces cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2014, **65**, 602–609.
- 41 D. D. Guimaraes, C. C. Carvalho and V. A. Braga, Scavenging of NADPH oxidase-derived superoxide anions improves depressed baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2012, **39**, 373–378.
- 42 S. A. Doggrel and L. Brown, Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure, *Cardiovasc. Res.*, 1998, **39**, 89–105.
- 43 M. C. Álvarez, C. Caldiz, J. C. Fantinelli, C. D. Garcarena, G. M. Console, G. E. C. Cingolani and S. M. Mosca, Is cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats the cause or the consequence of oxidative stress?, *Hypertens. Res.*, 2008, **31**, 1465–1476.
- 44 Y. Chen-Izu, L. Chen, T. Bányász, S. L. McCulle, B. Norton, S. M. Scharf, A. Agarwal, A. Patwardhan, L. T. Izu and C. W. Balke, Hypertension-induced remodeling of cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes occurs prior to hypertrophy development, *Am. J. Physiol.*, 2007, **293**, 3301–3310.
- 45 C. S. Engstad, R. E. Engstad, J. O. Olsen and B. Østerud, The effect of soluble β -1, 3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood, *Int. Immunopharmacol.*, 2002, **2**, 1585–1597.
- 46 H. Huang, G. R. Ostroff, C. K. Lee, J. P. Wang, C. A. Specht and S. M. Levitz, Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by beta-glucans and Toll-Like receptor agonists, *Infect. Immun.*, 2009, **77**, 1774–1781.
- 47 I. G. Akhapkina, A. B. Antropova, E. A. Akhmatov and T. M. Zheltikova, Effects of the Linear Fragments of Beta-(1 $\rightarrow$ 3)-Glucans on Cytokine Production in vitro, *Biochemistry*, 2018, **83**, 1002–1006.

APÊNDICE B – ARTIGO II

**YEAST CARBOXYMETHYL-GLUCAN IMPROVES ENDOTHELIAL FUNCTION AND
INHIBITS PLATELET AGGREGATION IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS**

Periódico: Food & Function

ISSN: 2042-6496

FI: 5.396

QUALIS: A2 na área de Nutrição
(2013-2016)

YEAST CARBOXYMETHYL-GLUCAN IMPROVES ENDOTHELIAL FUNCTION AND INHIBITS PLATELET AGGREGATION IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Lorena Soares Bezerra^a, Marciane Magnani^{a,b}, Tatiana Colombo Pimentel^c, Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira^d, Francisca Manuela de Souza Freire^d, Arthur José Pontes Oliveira de Almeida^e, Mathania Silva de Almeida Rezende^f, Islânia Giselia Albuquerque Gonçalves^d, Isac Almeida de Medeiros^{d,f}, Robson Cavalcante Veras^{a,d*}

Carboxymethyl-glucan is a semi-synthetic derivative of β -D-glucan, a polysaccharide widely found in several natural sources, such as yeast, fungi, and cereals. This compound has beneficial effects on health and is considered an important immunomodulator. However, studies exploring carboxymethyl-glucan bioactivity in cardiovascular health remain lacking, mainly in hypertension. Thus, this study sought to expand understanding of the effects of carboxymethyl-glucan on vascular and platelet functions in a hypertensive animal model. Spontaneously hypertensive rats and their normotensive Wistar-Kyoto controls were assigned to five groups: control, carboxymethyl-glucan (60 mg/kg), control spontaneously hypertensive rats, spontaneously hypertensive rats carboxymethyl-glucan (20 mg/kg), and spontaneously hypertensive rats carboxymethyl-glucan (60 mg/kg). Animals were treated for four weeks with carboxymethyl-glucan at doses of 20 and 60 mg/kg orally, and control rats received saline as a placebo. At the end of treatment, vascular reactivity, platelet aggregation, and reactive oxygen species production were evaluated. The results showed that carboxymethyl-glucan improved vascular function and reduced platelet aggregation, mainly at 60 mg/kg dose. However, despite these effects, there was no reduction in levels of reactive oxygen species. These findings suggested that carboxymethyl-glucan modulates endothelial function. It also acts as a platelet antiaggregant, which is an interesting resource for managing hypertension and its thrombotic complications.

1 Introduction

β -glucans are polysaccharides found widely in nature. The chemical structure consists of a central chain of D-glucose monomers linked *via* β (1 $\rightarrow$ 3) linkages and branches of various sizes linked through β (1 $\rightarrow$ 6) linkages. These polymers can be obtained from multiple sources, such as yeast, fungi, and cereals (oats and barley)^{1,2}. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall contains approximately 30% β -glucans and is considered an important source of this polysaccharide³.

There is currently considerable interest in yeast β -glucans due to their ability to interact with the immune system, demonstrating a robust immunomodulatory effect. Furthermore, this polymer has been demonstrated anti-mutagenic, anti-genotoxic, anti-tumor, anti-inflammatory, antioxidant, hypolipemic, and hypocholesterolemic actions⁴⁻⁸. The semi-synthetic derivatives of β -glucans have improved technological properties and demonstrate higher bioactivity than natural compounds and low toxicity. For example, carboxymethyl-glucan (CMG) is a water-soluble derivative of β (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) glucan⁹⁻¹¹.

CMG has demonstrated significant protective effects on human health, including anti-oxidant, anti-mutagenic, anti-genotoxic, and anti-cancer effects¹²⁻¹⁶. Other authors have identified that this derivative also modulates the sympathetic vascular activity, improving the baroreflex response in rats with renovascular hypertension treated at a dose of 40 mg/kg for two weeks, thereby exerting an antihypertensive effect¹⁷. Recently, we also observed the antihypertensive properties of CMG (60 mg/kg) in spontaneously hypertensive rats (SHR) animals, which involved improvement to the baroreflex. In addition, this derivative interfered with weight gain, lipid profile, and renal function and promoted reduction in cardiac hypertrophy¹⁸.

We also observed that CMG shows interesting biological effects on the cardiovascular system, such as anti-inflammatory effects, platelet antiaggregant properties, positive modulatory action on vascular function, and action on cardiac function, exhibiting a negative inotropic effect. The antiaggregant activity of CMG was found *in vitro* at different concentrations (100 and 300 μ g/mL) and in healthy animals treated with 20 mg/kg for 8 days. In these animals, ADP-induced aggregation inhibition and improved vasorelaxant response induced by nitric oxide donor were found. In a second study, we observed that animals treated with CMG at 50 mg/kg dose for 21 days showed contractile response attenuation and endothelium-mediated relaxation improvement^{19,20}.

Such findings indicate the potential of this derivative as a strategy for the prevention and control of cardiovascular diseases. However, as far as the authors know, no previous study administered CMG to SHR and evaluated vascular modulation and platelet aggregation. SHR model hypertension is genetic and shows similarities with essential hypertension in humans¹⁸. Elevation in blood pressure, if untreated, increases the risk of the onset of cardiovascular diseases and damage to target organs. In the hypertensive condition, there is an increase in peripheral vascular resistance due to impaired regulation of vessel tone. Therefore, vasorelaxation is an important function in controlling this disorder, as it can promote reductions in vascular resistance. Furthermore, there is also increased platelet aggregation in hypertension, which is a risk factor for the occurrence of thrombotic complications^{21,22}.

Most of the studies consider short administration periods (2–3 weeks) and lower than 50 mg/kg dose. In this way, it is needed to evaluate more extended periods of administration and higher doses. Therefore, and considering that

CMG is still little explored regarding its bioactivity in the cardiovascular system, especially in the hypertension field, this study aimed to broaden understanding of the effects of this carboxymethylated derivative on vascular and platelet function in SHR. In this way, CMG (20 or 60 mg/kg) was administered to SHR for 4 weeks, and the effects on vascular and platelet functions were evaluated. In addition, normotensives rats were also studied, and 60 mg/kg doses were administered, as previous studies have already reported beneficial effects for lower doses.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

Phenylephrine hydrochloride (PHE), acetylcholine hydrochloride (ACh), sodium nitroprusside (SPN), sodium bicarbonate (NaHCO_3), sodium chloride (NaCl), sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4), disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), calcium chloride (CaCl_2), potassium chloride (KCl), magnesium sulfate (MgSO_4), monopotassium phosphate (KH_2PO_4), glucose, adenosine diphosphate (ADP), phorbol ester (PMA), and dihydroetidium (DHE) were obtained from Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, Brazil). Xylazine and ketamine were purchased from Syntec (São Paulo, Brazil), and sodium heparin was obtained from Cristália (São Paulo, Brazil).

2.2 Obtaining CMG

CMG was extracted from discarded cream from a brewery. The cream, containing the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, was subjected to enzymatic processes and sonication for extraction, followed by derivatization with monochloroacetic acid. CMG had a degree of substitution of 0.8 and a molecular weight of 220 kDa. The methodologies used followed those described by Magnani et al.¹¹ and Bezerra et al.¹⁹.

2.3 Animals and CMG oral administration

All experimental protocols were performed following Federal Law n°. 11794/08, which establishes procedures for the scientific use of laboratory animals. Furthermore, this study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of Federal University of Paraíba (UFPB) under protocol n°. 087/2017.

The experiments were performed with male SHR and Wistar Kyoto (WKY) rats provided by the Animal Production Unit of the Institute for Research in Drugs and Medicines of UFPB (IPeFarM). These animals were kept under controlled temperature conditions ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), in a 12-hour light-dark cycle, with free access to water and food.

The WKY animals were divided into two groups ($n = 8$) for the experimental protocol: a control group (WKY CT) and a cohort treated with CMG at a dose of 60 mg/kg (WKY CMG 60 mg/kg). The SHR group was divided into three groups ($n = 8$): a control group (SHR CT), a cohort treated with CMG at a dose of 20 mg/kg (SHR CMG 20 mg/kg), and a group treated with CMG at a dose of 60 mg/kg (SHR CMG 60 mg/kg). CMG was administered by gavage (i.g.) once a day, starting at 12 weeks of age and continuing for four weeks. Animals in the control groups received saline solution (1 mL/kg) as a placebo during treatment.

2.4 Obtaining whole blood and preparing platelets from animals

After the treatment period, blood was collected from the inferior vena cava in rats anesthetized using ketamine and xylazine (70 mg/kg; 10 mg/kg, respectively, intraperitoneally [ip]) with heparinized sterile syringes (3 mL). The obtained blood was divided into two samples. The first was placed in a silicone-lined plastic tube containing HEPES solution (132 mM NaCl; 6 mM KCl; 1 mM MgSO_4 ; 1.2 mM KH_2PO_4 ; 5 mM Glucose; and 20 mM HEPES, pH 7.4) with approximately twice its volume. Next, this sample was centrifuged at 2300 g for 10 min to obtain platelet-poor plasma (PPP). Platelet-rich plasma (PRP) was obtained from the other sample by centrifugation at 120 g for 15 min and adjusted to 2×10^7 platelets/mL^{23,24}.

2.5 Evaluation of CMG treatment effect on vascular reactivity

After collection of blood samples, the animals were euthanized through an incision in their ventral region, and the superior mesenteric artery was identified, removed, and immediately placed in Tyrode's solution (158.3 mM NaCl; 4 mM KCl; 2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1.08 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 5.6 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$; 10 mM; NaHCO_3 ; 0.42 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; pH 7.4) at 4°C for dissection and sectioning of the vessels into rings (2-3 mm length)²⁵. Each ring was immersed in tanks (10 mL) and vertically suspended with a platinum rod, fixed to a force transducer (MLT020, ADInstruments, Australia). The tissues were maintained in Tyrode's solution at 37°C and aerated with a mixture of 95% O_2 and 5% CO_2 (carbogen; White Martins, Brazil). The rings were stabilized for 60 min at a basal tension of 0.75 g. Isometric tension measurements were recorded using a force transducer (MLT020, ADInstruments) coupled to an acquisition system (ML870/P with LabChart v.7.0, ADInstruments).

The functional presence of the endothelium was confirmed by the existence of greater than 80% relaxation after the addition of acetylcholine (ACh, 10 μ M) in rings pre-contracted with PHE (10 μ M). Rings with less relaxation were subjected to mechanical removal of the endothelium and endothelial functionality testing. Pre-contracted rings with < 10% relaxation were considered to have no functional endothelium. After the second check of organ integrity, concentration-response curves were constructed for PHE (3×10^{-9} to 3×10^{-5} M), ACh (10^{-10} to 10^{-5} M), and SPN (10^{-11} to 3×10^{-7} M).

2.6 Evaluation of CMG effects on platelet aggregation by light transmission

After four weeks of treatment, to evaluate the effects of CMG on platelet function, PRP was incubated at 37°C for 5 min in an aggregometer (AgreGO, Qualitem, São Paulo, Brazil) with continuous agitation at 1,000 rpm and then stimulated with ADP (10 μ M) or phorbol ester (PMA, 100 ng/mL) ^{26,27}. Changes in light transmission were recorded for 15 min, and maximal aggregation was estimated. The percentage of platelet aggregation was expressed as the maximum transmission of light in the sample. Baseline aggregation values were determined using a PPP sample ²⁷.

2.7 Evaluation of CMG treatment on superoxide anion (O₂^{•-}) production

At the end of the experimental period, the effect of CMG on oxidative stress was measured through the production of superoxide anions (O₂^{•-}) in both platelets and mesenteric artery rings. The PRP obtained from the animals was adjusted to 5×10^6 platelets/mL to perform this analysis in platelets. This material was then incubated with DHE (10 μ M) for 30 min at 37°C ²⁸. After that, the samples underwent cell sorting using a FACS Canto-II cytometer (BD) equipped with a 15 mW argon laser at $\lambda = 488$ nm, followed by analysis using DIVA software (v. 6.0; BD, Santa Monica, CA, USA). 10,000 events were acquired with the exclusion of cell remnants, which were defined by the forward scatter (FSC) threshold, and fluorescence signals were captured in the following wavelength ranges: 515-545 nm for channel 1 (FL1). Changes in fluorescence (F1) were normalized to the fluorescence obtained from samples treated with HEPES solution alone (F0) and expressed as F1/F0.

DHE was also used to determine the production of O₂^{•-} in rings of the superior mesenteric artery, which were collected and, after cleaning, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C. Subsequently, tissue sections (10 μ m) were made using a cryostat. The slides were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and then incubated with 10 μ M DHE for 30 min at 37°C in the dark ^{29,30}. After the incubation, the sections were again washed with PBS solution (161.0 mM NaCl; 1.8 mM NaH₂PO₄; 15.8 mM Na₂HPO₄) to remove the excess fluorescent probe and immediately imaged using a fluorescence microscope (NIKON Eclipse Ti-E, NIKON, Japan) for analysis. Sample processing and group images were performed in parallel using the same laser settings. Fluorescence intensity was determined using NIS Elements v.4.02. Changes in fluorescence (F1) were normalized to the fluorescence obtained in the normotensive control group and expressed as F1/F0.

2.9 Statistical Analysis

Results were expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM), and statistical comparisons were made using Student's t test for comparisons of two groups or one-way Analysis of Variance (ANOVA) for comparisons of three or more groups, and both were followed by Tukey's post hoc test. The concentration that induced 50% of the maximum effect (Emax) was determined from the concentration-response curves through non-linear regression. The negative logarithm (log) of these concentrations (pD2) *versus* the corresponding response was plotted for a variable slope sigmoidal model using GraphPad Prism 8.0® (San Diego, USA) software. Results were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Effect of oral CMG administration on vascular reactivity

Vascular reactivity was analyzed based on maximum effect (Emax) and potency (pD2) values for the different agonists employed (PHE, ACh, and SPN). In the concentration-response curve for PHE, SHR CT (Emax = 122.3% $\pm$ 8.9%; pD2 = 5.4 $\pm$ 0.3 M, $p < 0.05$) showed significantly greater contractile response, without affecting pD2, compared to the WKK CT group (Emax = 100.0% $\pm$ 4.1%; pD2 = 6.3 $\pm$ 0.16 M) (Fig. 1A). In the WKY CMG 60 mg/kg group (Emax = 73.9% $\pm$ 9.2%; pD2 = 5.4 $\pm$ 1.0 M, $p < 0.05$), CMG treatment significantly reduced Emax, without modifying the potency in relation to its control group (Emax = 100.0% $\pm$ 4.1%; pD2 = 6.3 $\pm$ 0.16 M) (Fig. 1B). When evaluated in hypertensive groups, CMG did not cause significant changes in Emax and pD2 of the SHR CMG 20 mg/kg group (Emax = 74.6% $\pm$ 12.0%; pD2 = 5.7 $\pm$ 0.49 M) and SHR CMG 60 mg/kg (Emax = 85.2 $\pm$ 4.8%; pD2 = 5.5 $\pm$ 0.25 M) compared to SHR CT (Emax = 100.0 $\pm$ 7.3%; pD2 = 5.6 $\pm$ 0.30 M, $p > 0.05$) (Fig. 1C).

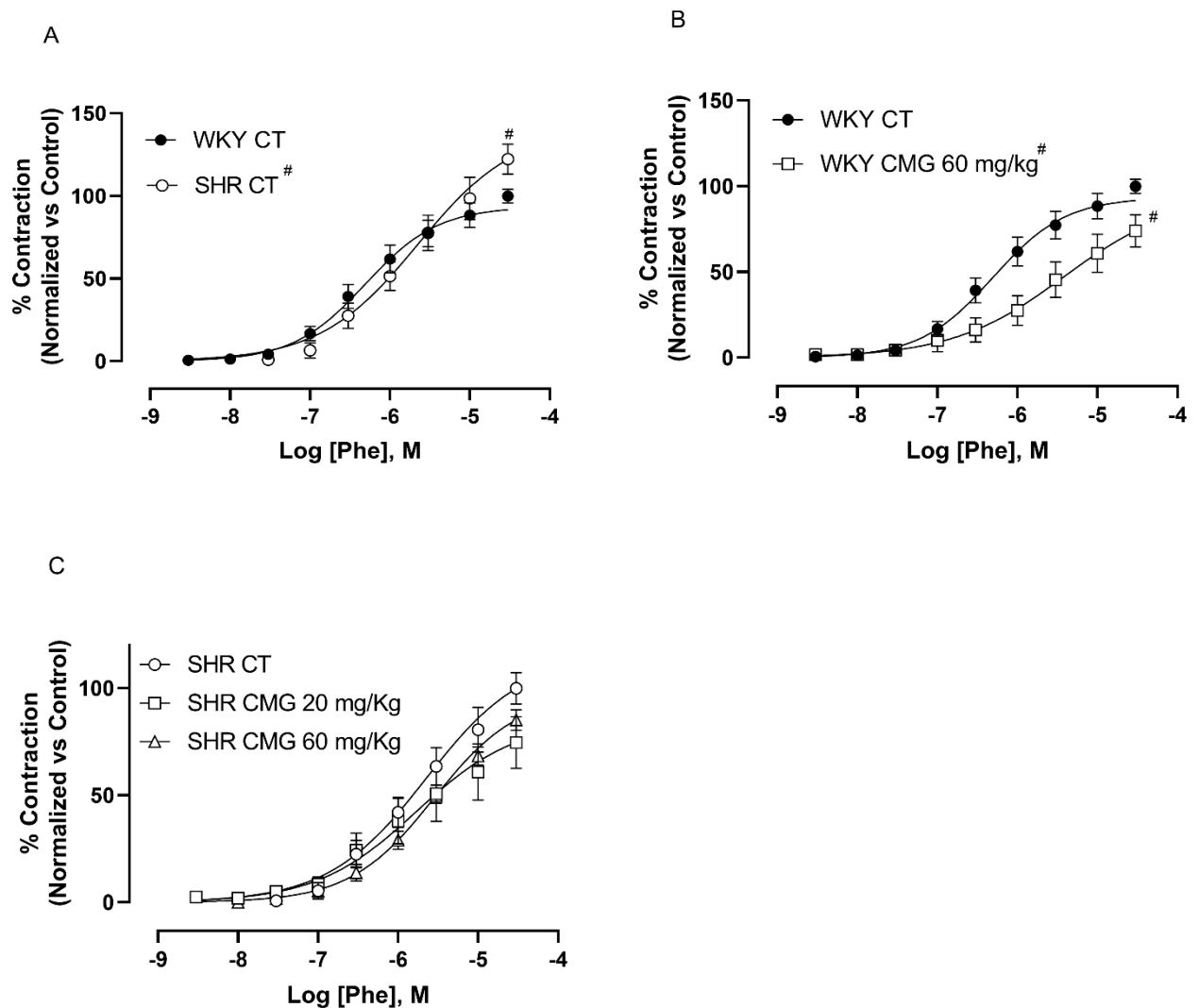


Figure 1: Concentration-response curve for phenylephrine (PHE, 3×10^{-9} to 3×10^{-5} M) in superior mesenteric artery rings from rats treated with CMG for four weeks. A) Control groups; B) WKY groups; C) SHR groups. WKY CT: Wistar Kyoto control; WKY CMG 60 mg/kg: Wistar Kyoto + CMG at a dose of 60 mg/kg; SHR CT: SHR control; SHR CMG 20 mg/kg: SHR + CMG at a dose of 20 mg/kg; SHR CMG 60 mg/kg: SHR + CMG at a dose of 60 mg/kg. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n=8).

In rings with functional endothelium pre-contracted with PHE and subjected to vasorelaxation induced by cumulative and increasing concentrations of ACh, there was a significant reduction in Emax of SHR CT animals ($E_{max} = 69.6 \pm 5.8\%$; $pD_2 = 7.1 \pm 0.70$ M, $p < 0.05$) compared to WKY CT ($E_{max} = 100.0 \pm 3.6\%$; $pD_2 = 7.0 \pm 0.48$ M), without changes in potency (Fig. 2A). In the WKY-treated animals ($E_{max} = 97.8 \pm 8.4\%$; $pD_2 = 7.7 \pm 0.85$ M), CMG did not significantly alter Emax and pD_2 compared to its control ($E_{max} = 100.0 \pm 3.6\%$; $pD_2 = 7.0 \pm 0.48$ M, $p < 0.05$) (Fig 2B). In hypertensive animals (Fig. 2C), CMG treatment increased Emax in both SHR CMG 20 mg/kg ($E_{max} = 163.6 \pm 9.7\%$; $pD_2 = 7.1 \pm 0.40$ M, $p < 0.05$) and SHR CMG 60 mg/kg ($E_{max} = 163.1 \pm 7.4\%$; $pD_2 = 6.9 \pm 0.43$ M, $p < 0.05$), with no difference between the doses tested, compared to SHR CT ($E_{max} = 100.0 \pm 8.4\%$; $pD_2 = 7.1 \pm 0.70$ M). There was no significant difference in potency between the groups.

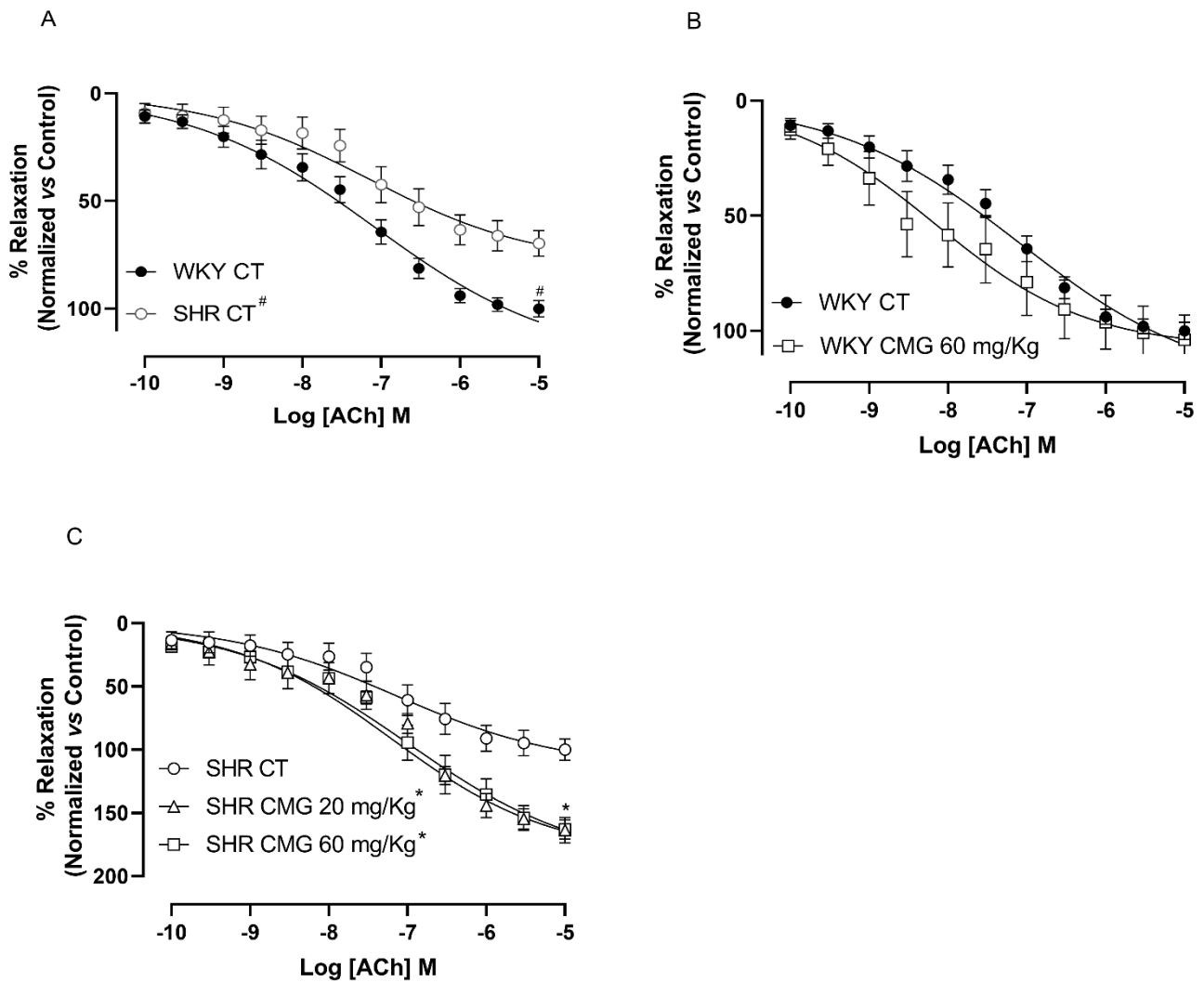


Figure 2: Concentration-response curve for acetylcholine (ACh, 10^{-10} to 10^{-5} M) in superior mesenteric artery rings from rats treated with CMG for four weeks. A) Control groups; B) WKY groups; C) SHR groups. WKY CT: Wistar-Kyoto control; WKY CMG 60 mg/kg: Wistar Kyoto + CMG at a dose of 60 mg/kg; SHR CT: SHR control; SHR CMG 20 mg/kg: SHR + CMG at a dose of 20 mg/kg; SHR CMG 60 mg/kg: SHR + CMG at a dose of 60 mg/kg. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). # $p < 0.05$ vs WKY CT; * $p < 0.05$ vs SHR CT

When vasorelaxant responses were induced by cumulative and increasing concentrations of SPN in rings without functional endothelium pre-contracted with PHE, no difference was observed between WKY CT ($E_{max} = 100.0 \pm 3.1\%$; $pD_2 = 8.0 \pm 0.48$ M) and SHR CT groups ($E_{max} = 104.4 \pm 5.2\%$; $pD_2 = 7.0 \pm 1.4$ M, $p < 0.05$) (Fig. 3A). However, the animals in the WKY CMG 60 mg/kg group ($E_{max} = 133.1 \pm 8.5\%$; $pD_2 = 7.7 \pm 0.76$ M, $p < 0.05$) showed significantly higher E_{max} than the WKY CT group ($E_{max} = 100.0 \pm 3.1\%$; $pD_2 = 8.0 \pm 0.48$ M, $p < 0.05$) (Fig. 3B). In hypertensive animals (Fig. 3B), although an increase in E_{max} and pD_2 was observed, CMG treatment did not significantly alter these parameters in SHR CMG 20 mg/kg ($E_{max} = 125.7 \pm 11.1\%$; $pD_2 = 8.0 \pm 2.6$ M) and SHR CMG 60 mg/kg ($E_{max} = 125.4 \pm 10.6\%$; $pD_2 = 7.8 \pm 0.98$ M) in relation to SHR CT ($E_{max} = 100.0 \pm 5.0\%$; $pD_2 = 6.9 \pm 1.5$ M, $p > 0.05$).

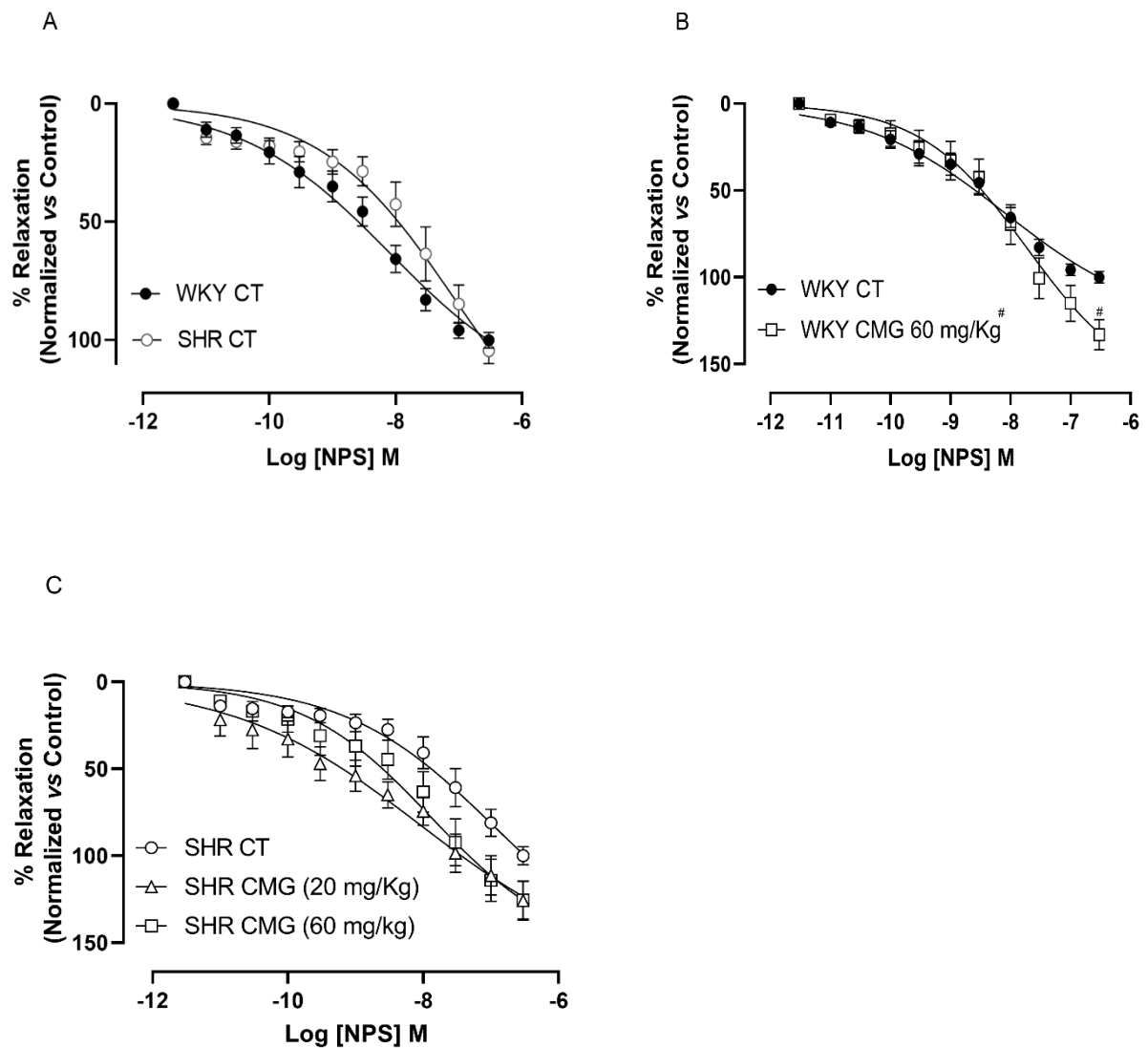


Figure 3: Concentration-response curve for sodium nitroprusside (SPN, 10^{-11} to 3×10^{-7} M) in superior mesenteric artery rings from rats treated with CMG for four weeks. A) Control groups; B) WKY groups; C) SHR groups. WKY CT: Wistar-Kyoto control; WKY CMG 60 mg/kg: Wistar Kyoto + CMG at a dose of 60 mg/kg; SHR CT: SHR control; SHR CMG 20 mg/kg: SHR + CMG at a dose of 20 mg/kg; SHR CMG 60 mg/kg: SHR + CMG at a dose of 60 mg/kg. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). #p < 0.05 vs WKY CT.

3.2 Effect of oral CMG administration on platelet aggregation

In evaluating the effect of CMG on platelet function observed through ADP-induced aggregation (Fig. 4A), it was found increased platelet aggregation in SHR CT group ($79.1 \pm 2.3\%$, $p < 0.05$) in relation to WKY CT ($60.6 \pm 2.7\%$, $p < 0.05$). The WKY CMG 60 mg/kg ($63.3 \pm 1.5\%$) treatment did not interfere with aggregation compared to the WKY CT group ($60.6 \pm 2.7\%$, $p > 0.05$). On the other hand, in SHR animals, there was a significant reduction in aggregation in the SHR CMG 60 mg/kg group ($43.6 \pm 6.3\%$, $p < 0.05$) compared to SHR CT animals ($79.1 \pm 2.3\%$). In SHR CMG 20 mg/kg animals ($70.2 \pm 3.9\%$), no inhibition of aggregation was observed in compared to the SHR CT ($p > 0.05$). When aggregation was induced with PMA (Fig. 4B), SHR CT animals ($85.3 \pm 2.9\%$, $p < 0.05$) were found to have significantly higher levels of platelet aggregation compared to WKY CT ($64.3 \pm 5.5\%$). However, there was no significant difference in animal groups subjected to CMG treatment, both normotensive and hypertensive ($p > 0.05$).

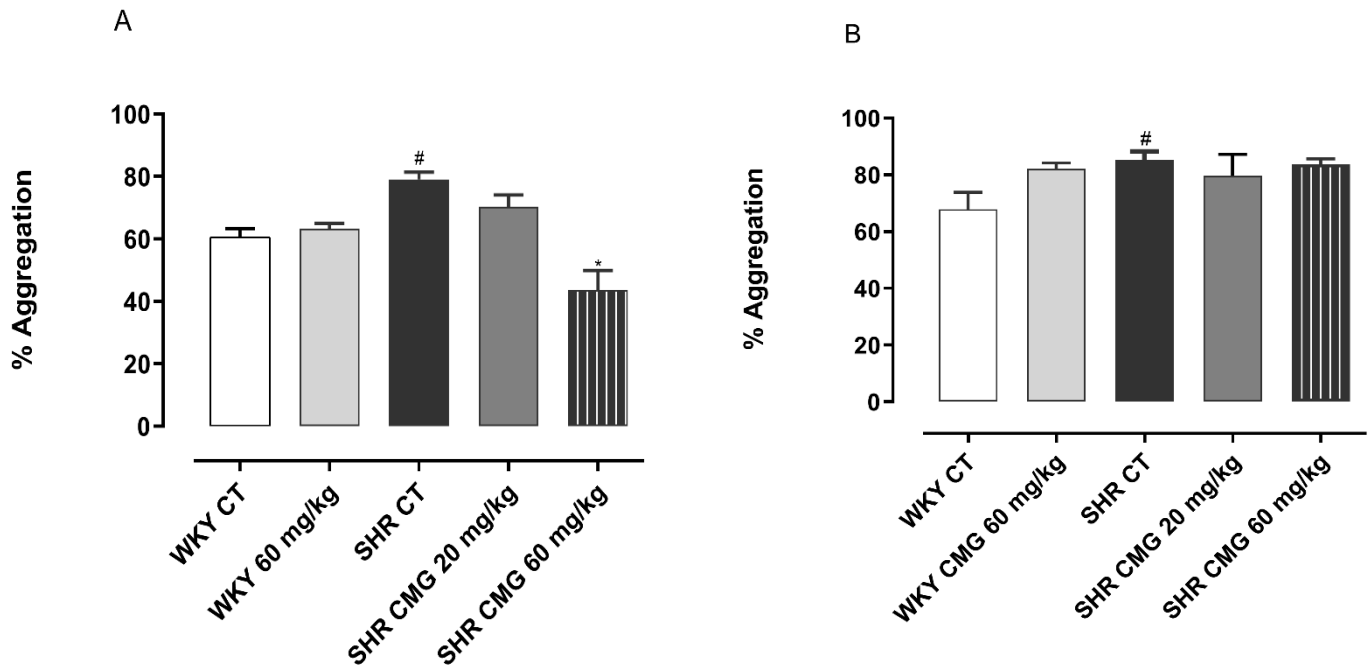


Figure 4: Effect of CMG treatment for four weeks on platelet aggregation induced by ADP (A) and PMA (B) in rats. WKY CT: Wistar Kyoto control; WKY CMG 60 mg/kg: Wistar Kyoto + CMG at a dose of 60 mg/kg; SHR CT: SHR control; SHR CMG 20 mg/kg: SHR + CMG at a dose of 20 mg/kg; SHR CMG 60 mg/kg: SHR + CMG at a dose of 60 mg/kg. Data are expressed as means $\pm$ SEM (n=8). [#] $p < 0.05$ vs WKY CT; ^{*} $p < 0.05$ vs SHR CT

3.3 Effect of oral CMG administration on oxidative stress

Initially, ROS production in platelets was evaluated, and it was found that treatment with CMG did not promote changes in superoxide anion levels in rat plasma (Fig. 5, $p > 0.05$).

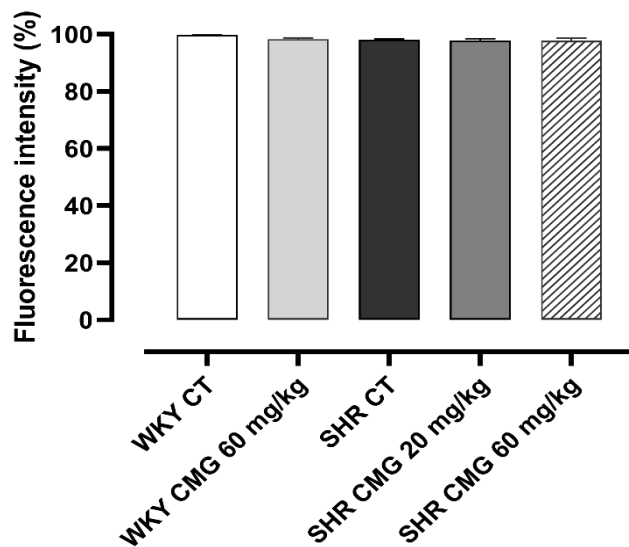
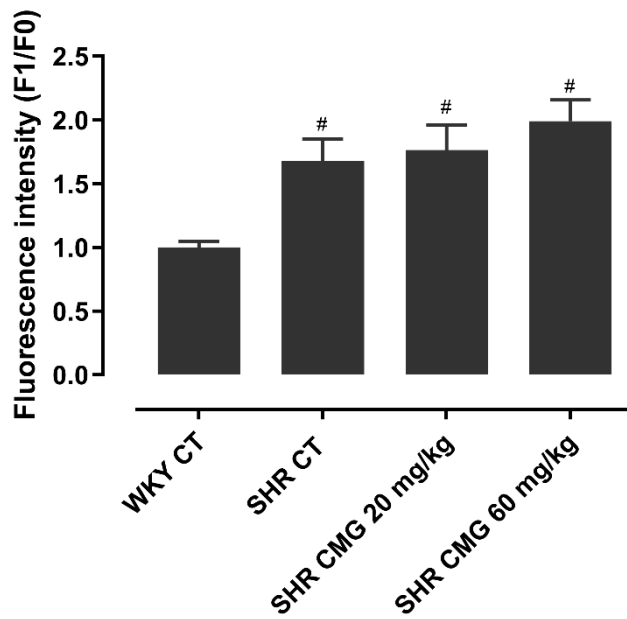


Figure 5: Effect of oral CMG administration for four weeks on ROS production by rat platelets. WKY CT: Wistar Kyoto control; WKY CMG 60 mg/kg: Wistar Kyoto + CMG at a dose of 60 mg/kg; SHR CT: SHR control; SHR CMG 20 mg/kg: SHR + CMG at a dose of 20 mg/kg; SHR CMG 60 mg/kg: SHR + CMG at a dose of 60 mg/kg. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n=8).

When fluorescence levels in the superior mesenteric artery were measured by producing $O_2^{\bullet-}$ -labeled DHE (Fig. 6), SHR CT group (1.6 ± 0.17 , $p < 0.05$), as well as SHR CMG 20 mg/kg (1.7 ± 0.19 , $p < 0.05$) and SHR CMG 60 mg/kg (1.9 ± 0.16 , $p < 0.05$) showed significantly higher fluorescence intensity compared to WKY CT (1.0 ± 0.04). However, in hypertensive groups treated at doses of 20 mg/kg (1.7 ± 0.19) and 60 mg/kg (1.9 ± 0.16), no significant reduction in fluorescence levels was observed in relation to SHR CT (1.6 ± 0.17 , $p > 0.05$).

A



B

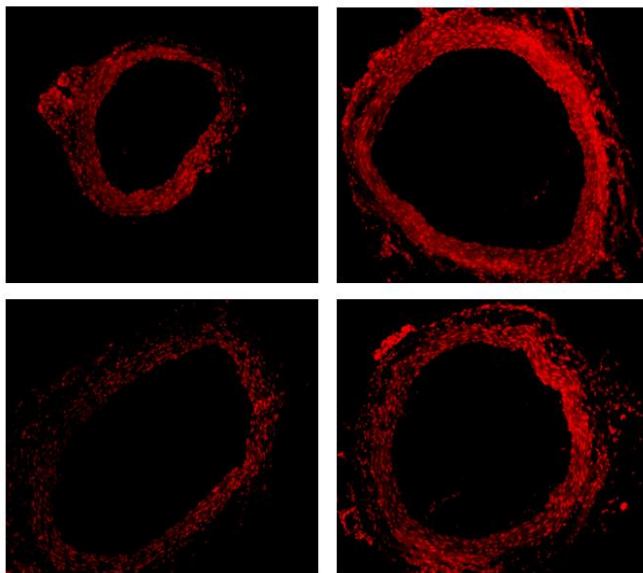


Figure 6: Effect of oral CMG administration on ROS production in mesenteric artery of rats. A) Basal fluorescence intensity in cross sections of the mesenteric artery of the different groups; B) Representative images of basal fluorescence intensity emitted by DHE probe in mesenteric artery cross-sections ($10 \mu\text{m}$) at the end of treatment ($10\times$ objective). WKY CT: Wistar Kyoto control; WKY CMG 60 mg/kg: Wistar Kyoto + CMG at a dose of 60 mg/kg; SHR CT: SHR control; SHR CMG 20 mg/kg: SHR + CMG at a dose of 20 mg/kg; SHR CMG 60 mg/kg: SHR + CMG at a dose of 60 mg/kg. Data are expressed as mean values of percentage basal fluorescence in relation to CT $\pm$ SEM ($n = 6$). # $p < 0.05$ vs WKY CT

4. Discussion

The findings presented in this study suggested the action of CMG on vascular and platelet function, reinforcing previous evidence verified in our laboratory, which indicates cardiovascular system protection exhibited by this derivative^{12,13}. However, the present study is the first to identify its bioactivity in vascular modulation and platelet aggregation in SHRs.

Healthy vascular endothelium releases potent vasodilators such as nitric oxide (NO), prostacyclin, and endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF) in response to adjustments in vascular tone, thereby influencing peripheral vascular resistance. The endothelial function may be impaired in several cardiovascular diseases, resulting in endothelial dysfunction, characterized by impaired endothelial vasodilator responses and pro-inflammatory and pro-thrombotic states^{31,32}.

SHR animals are well-established models of cardiovascular alterations²¹. In this way, evidence shows that these animals present vascular function-related complications inherent to hypertension, such as increased peripheral vascular resistance, endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries, and structural changes in organs and vessels^{31,33,34}. Taking this into account, we sought to evaluate the effects of CMG treatment in this animal model by simulating vascular responses induced by PHE, an α -adrenergic agonist, ACh, a muscarinic receptor cholinergic agonist, and an NO donor, SPN.

Our results demonstrated that CMG exerted no influence on contractile responses elicited by α -adrenergic agonists in SHR CT group, which showed hypercontractility in smooth muscle when compared to WKY CT (Fig. 1A). On the other hand, this derivative reduced the contraction in the normotensive group treated (Fig. 1B). This finding is consistent with a previous study developed by Vieira et al.¹³, that showed reduced PHE potency in the aorta of healthy animals pre-treated (50 mg/kg) with this polymer for 21 days. However, another study found no interference by CMG on the contractile responses of animals treated with 20 mg/kg for 8 days¹².

Nevertheless, this study's absence of CMG effects on vascular contraction in hypertensive conditions may be related to a greater adrenergic response in SHR animals. Evidence in the literature suggests that in the SHR model, there is a greater α -adrenergic reactivity in the aorta and resistance arteries, which occurs due to a higher number of receptors or greater affinity and elevated production of inositol phosphate. In addition, structural changes in vessels and endothelial dysfunction may increase adrenergic response³⁵. Another finding links this increase in adrenergic vascular contraction to increased calcium influx through L-type voltage-dependent calcium channels, with substantially increased sensitization in SHRs compared to WKY rats³⁶.

For evaluation of ACh-induced vasorelaxation, CMG, at both doses tested, was able to modulate endothelium-dependent vasodilator responses by increasing ACh efficacy and thus promoted the improvement of vascular function in SHR animals, whose endothelium-mediated vasorelaxant responses are impaired compared to WKY normotensive animals³⁴. Such alteration that characterizes the presence of endothelial dysfunction was observed in SHR animals used in this study, as shown figure in 2A. However, this finding is contrary to that of a previous study that verified that carboxymethylated derivative (20 mg/kg) was unable to improve ACh-mediated vasomotor control in the aorta of healthy animals treated for 8 days¹⁹.

On the other hand, the CMG effect on SHR vasorelaxation response may be related to its ability to modulate vascular function through increases in endothelial NO levels, involving the participation of the NOS/NO/cGS pathway, as previously reported²⁰. However, in addition to NO, other vasodilators may be involved in this effect since prostacyclin, and endothelium-derived hyperpolarizing, factors also participate in endothelium-dependent vasodilation, mainly in resistant arteries³⁴. Thus, further analysis investigating the involvement of these mediators is relevant to identify the pathways implicated in the amelioration of endothelial dysfunction caused by this polymer in hypertension.

Although the role of CMG in the regulation of endothelium-mediated vascular tone and the mechanisms involved are still not well understood, findings in the literature corroborate the ability of β -glucans to modulate endothelial function. In humans, Lowe et al.³⁷ suggested that there are pattern recognition receptors for this polysaccharide in endothelial cells, such as two distinct receptors for complement receptor 3 (CR3), thus indicating a possible involvement of other pathways.

Regarding the action of CMG in vasodilatation induced by NO donor, a previous study demonstrated that this derivative potentiated vasorelaxation, improving responses to NO in rats treated with 20 mg/kg, which may be beneficial for the cardiovascular system¹⁹. Although no similar effect was found in SHR animals, suggesting that the relaxant machinery of vascular smooth muscle remained functionally unchanged, in this study, we observed improvement in endothelium-independent vasorelaxant responses in normotensive animals. This result corroborates the action of carboxymethylated derivatives in improving NO bioavailability in vessels. Furthermore, another study reinforces this association between CMG and NO, demonstrating increased NO synthesis caused by this derivative in bronchoalveolar cells, inducing this synthesis in a dose-dependent manner³⁸.

These results related to CMG activity on vascular function led us to infer that this derivative can modulate endothelium-mediated vasomotor control in SHR animals and thus promote decreased peripheral vascular resistance, which can lead to a reduction in blood pressure. Furthermore, in WKY animals, this compound also has benefits, positively influencing NO-dependent responses in blood vessels.

This property may be implicated in the anti-hypertensive effects observed in a recent study of SHR animals treated with CMG (60 mg/kg) for 4 weeks, involving improvement in baroreflex sensitivity and less contribution to sympathetic tone. Moreover, a reduction in the heart, a target organ, was observed through a decrease in cardiac hypertrophy¹⁸. This finding is consistent with a previous study conducted by Carvalho-Galvão et al.¹⁷, who verified a reduction in blood pressure in renovascular hypertensive animals treated with CMG (40 mg/kg) for two weeks through improvement in baroreflex responses. These evidences indicate that this derivative can act as a cardioprotective agent.

Oxidative stress is one of the mechanisms implicated in hypertension development, as ROS influence on vascular homeostasis. ROS, mainly derived from NADPH oxidase, cause reduced NO availability in the endothelium, leading to endothelial dysfunction that manifests itself through elevated platelet aggregation, inflammation, and vasoconstriction³⁹. In an animal model of SHR, ROS is one of the agents responsible for endothelium-dependent vasorelaxation dysfunction through increased generation of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) that inactivates NO^{34,40}.

Higher $O_2^{\bullet-}$ concentrations were observed only in SHR vessels compared to WKY control rats in the present study. However, no difference was found in the hypertensive groups treated with CMG. This result may be due to the choice of methodology employed in which DHE fluoride was used. Although it is considered the most specific for $O_2^{\bullet-}$ detection, it presents some limitations that can interfere with results, such as non-specific oxidation by peroxynitrite (ONOO⁻), hydroxyl radicals (-OH), and cytochrome C³⁰. In addition, other factors can influence ROS measurements since ROS production can be highly localized, and thus many assays will not be able to detect all subcellular and extracellular locations⁴¹. Despite this, the antioxidant action of CMG is already described in the current literature, with strong evidence suggesting that this carboxymethylated form may be a natural antioxidant strategy, with similar effects to tocopherol and mannitol^{15,42}. Furthermore, CMG (50 mg/kg) prevents oxidative stress in healthy individuals by reducing malondialdehyde levels after 30 days⁴³. Thus, further studies involving CMG are relevant to analyzing more oxidative stress parameters to better understand its antioxidant role, particularly in hypertension.

In addition to the maintenance of vascular health, there are other factors relevant for cardiovascular system protection, such as platelet aggregation¹⁹, which is involved in the pro-thrombotic state generally present in hypertension. This occurs due to increased shear forces and endothelial dysfunction that cause diminished NO bioactivity and prostacyclin levels, leading to platelet activation. There is also a greater sensitivity and endogenous production of catecholamines and angiotensin II, which induce aggregation and platelet activation^{22,44}. In SHR animal models, there is some increased erythrocyte aggregability and platelet reactivity, possibly caused by increased peripheral vascular resistance and changes in endothelial cell-platelet interactions, respectively⁴⁵⁻⁴⁷. In fact, in the present study, control SHR animals presented more significant aggregation than the normotensive control when induced by ADP and PMA, thus pointing to platelet hyperactivity.

Previous evidence reports β -glucan antiaggregant property, initially described as a linear form obtained from *Saccharomyces cerevisiae* that reduced platelet aggregation induced by ADP, collagen, and thrombin at different concentrations. It also showed antioxidant action on platelets, which was not identified in this study^{48,49}. Nevertheless, CMG has already revealed antiplatelet activity in treated animals (20 mg/kg) and *in vitro* at different concentrations (100 and 300 μ g/mL), in which aggregation was stimulated by collagen and ADP, showing greater selectivity for the latter and with an effect similar to acetylsalicylic acid, which is a classic antiplatelet agent commonly used in the treatment of cardiovascular diseases¹⁹. In the current study, we also observed a reduction in ADP-induced aggregation in the SHR CMG 60 mg/kg group, indicating that carboxymethylated derivative attenuates platelet hyperactivity, thus reducing the possibility of thrombotic events associated with hypertension.

In this way, CMG may interfere with ADP affinity for its receptors (P2Y, P2Y1, and P2Y12), which, when activated, triggers a signaling cascade that results in the release of intracellular calcium stores and protein kinase C (PKC) activation, which leads to the secretion of platelet granules and activation of the fibrinogen receptor, GP IIb/IIIa, involved in platelet aggregate formation^{19,50}.

5. Conclusions

These findings show that CMG can improve endothelium-mediated vasorelaxant responses in hypertensive animals, consequently demonstrating attenuation of endothelial dysfunction. Moreover, CMG exhibits platelet antiaggregant properties. Thus, this synthetic derivative is an alternative agent for cardiovascular disease control, with potential applications in hypertension management and possible thrombotic complications. Nevertheless, further studies are required to clarify the mechanisms involved in these findings.

Author Contributions

Formal analysis, L.S.B. and R.C.R.; implementation of experiments and data collection, L.S.B., J.C.P.L.O., F.M.S.F., A.J.P.O.A., M.S.A.R.; analysis and interpretation of data, L.S.B. and R.C.V.; writing the manuscript, critical revision of content and data interpretation, L.S.B, R.C.V., M.M., T.C.P., I.A.M. and I.G.A.G. All the authors have contributed to and approved the final manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We sincerely thank the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (Coordination for the Improvement of Higher Education– CAPES), the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq), Paraíba State Research Support Foundation (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba – FAPESQ/PB), and the Paraíba Development Institute (Instituto de Desenvolvimento da Paraíba – IDEP-PB), for the financial, technical, and infrastructure support needed to conduct this study.

References

- 1 M. S. Mantovani, M. F. Bellini, J. P. F. Angeli, R. J. Oliveira, A. F. Silva and L. R. Ribeiro, β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutat. Res. Mutat. Res.*, 2008, **658**, 154–161.
- 2 J. Bai, Y. Ren, Y. Li, M. Fan, H. Qian, L. Wang, G. Wu, H. Zhang, X. Qi, M. Xu and Z. Rao, Physiological functionalities and mechanisms of β -glucans, *Trends Food Sci. Technol.*, 2019, **88**, 57–66.
- 3 F. Qin, F. L. Aachmann and B. E. Christensen, Chain length distribution and aggregation of branched (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-glucans from *Saccharomyces cerevisiae*, *Carbohydr. Polym.*, 2012, **90**, 1092–1099.
- 4 E. E. Pisareva, I. A. Goncharova, F. V. Tuzikov, N. V. Goncharova, E. Makhova and T. A. Korolenko, Role of Changes in Serum Chitotriosidase Activity in Mice under Conditions of Hyperlipidemia and Lipid-Lowering Effect of Carboxymethylated (1-3)- β -D-Glycan, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2014, **157**, 555–559.
- 5 T. A. Korolenko, F. V. Tuzikov, M. S. Cherkanova, T. P. Johnston, N. A. Tuzikova, V. M. Loginova, E. E. Filjushina and V. I. Kaledin, Influence of atorvastatin and carboxymethylated glucan on the serum lipoprotein profile and MMP activity of mice with lipemia induced by poloxamer 407, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2012, **90**, 141–153.
- 6 Y. Li, Y. Yuan, L. Lei, F. Li, Y. Zhang, J. Chen, G. Zhao, S. Wu, R. Yin and J. Ming, Carboxymethylation of polysaccharide from *Morchella angusticeps* Peck enhances its cholesterol-lowering activity in rats, *Carbohydr. Polym.*, 2017, **172**, 85–92.
- 7 X. Chen, L. Zhang and P. C. K. Cheung, Immunopotential and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan from *Poria cocos*, *Int. Immunopharmacol.*, 2010, **10**, 398–405.
- 8 T. V. Araújo, E. F. Andrade, R. V. Lobato, D. R. Orlando, N. F. Gomes, R. V. Sousa, M. G. Zangeronimo and L. J. Pereira, Effects of beta-glucans ingestion (*Saccharomyces cerevisiae*) on metabolism of rats receiving high-fat diet, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 2017, **101**, 349–358.
- 9 F. Y. Kagimura, M. A. Cunha, A. M. Barbosa, R. F. Dekker and C. R. Malfatti, Biological activities of derivatized d-glucans: A review, *Int J Biol Macromol*, 2014, **72c**, 588–598.
- 10 H. A. El Enshasy and R. Hatti-Kaul, Mushroom immunomodulators: Unique molecules with unlimited applications, *Trends Biotechnol.*, 2013, **31**, 668–677.
- 11 M. Magnani, C. M. Calliari, F. C. M. Junior, M. P. Mori, I. M. S. Cólus and R. J. H. Castro-Gomez, Optimized methodology for extraction of (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative, *Carbohydr. Polym.*, 2009, **78**, 658–665.
- 12 V. B. S. Araujo, A. N. F. Melo, N. T. de Souza, V. M. B. da Silva, R. H. Castro-Gomez, A. S. Silva, E. L. Souza and M. Magnani, Oral Intake of Carboxymethyl-Glucan (CM-G) from Yeast (*Saccharomyces uvarum*) Reduces Malondialdehyde Levels in Healthy Men, *Molecules*, 2015, **20**, 14950–14958.
- 13 M. Magnani, R. H. Castro-Gomez, M. N. Aoki, E. P. Gregório, F. Libos and M. A. E. Watanabe, Effects of carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the peripheral blood cells of patients with advanced prostate cancer, *Exp. Ther. Med.*, 2010, **1**, 859–862.
- 14 M. Magnani, J. H. Castro-Gomez, M. P. Mori, H. Kuasne, E. P. Gregorio, F. J. Libos and I. M. S. Colus, Protective effect

- of carboxymethyl-glucan (CM-G) against DNA damage in patients with advanced prostate cancer, *Genet. Mol. Biol.*, 2011, **34**, 131-135.
- 15 M. Babincova, Z. Bacova, E. Machova and G. Kogan, Antioxidant Properties of Carboxymethyl Glucan: Comparative Analysis, *J. Med. Food*, 2002, **5**, 79–83.
 - 16 D. Slameňová, J. Lábaj, L. Křížková, G. Kogan, J. Šandula, N. Bresgen and P. Eckl, Protective effects of fungal (1→3)-β-d-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cell, *Cancer Lett.*, 2003, **198**, 153–160.
 - 17 A. Carvalho-Galvão, D. D. A. Gadelha, J. L. d. B. Alves, B. A. Khan, R. J. H. Castro-Gomez, J. C. Cruz, M. Magnani and V. A. Braga, newly isolated carboxymethyl-glucan (CM-G) restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats, *Front. Physiol.*, 2018, **9**, 1–8.
 - 18 L. S. Bezerra, M. Magnani, T. C. Pimentel, F. M. S. Freire, T. A. F. Silva, R. C. Ramalho, A. F. Alves, J. L. B. Alves, I. A. Medeiros and R. C. Veras, Carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* reduces blood pressure and improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats *Food Funct.*, 2021.
 - 19 L. S. Bezerra, M. Magnani, R. J. H. Castro-Gomez, H. C. Cavalcante, T. A. F. Silva, R. L. P. Vieira, I. A. Medeiros and R. C. Veras, 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, *Pharmacol. Rep.*, 2017, **69**, 448–455.
 - 20 R. L. Paixão Vieira, L. S. Bezerra, M. Magnani, E. R. M. Gomes, A. M. Barbosa, N. T. Machado-Calzerra, P. M. P. Maciel, M. P. Assis, T. A. F. Silva, R. C. Veras and I. A. Medeiros, P44 Carboxymethyl-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* induces vasodilation mediated by the NOS/NO/SCG pathway and negative inotropic effects in rats, *Biochem. Pharmacol.*, 2017, **139**, 140–141.
 - 21 A. G. Conceição-Vertamatti, F. Borghi, F. Canova and D. M. Grassi-Kassisse, History of vascular reactivity models and their involvement in hypertension pathogenesis, *Vasa*, 2017, **46**, 431–439.
 - 22 M. El Haouari and J. A. Rosado, Platelet function in hypertension, *Blood Cells, Mol. Dis.*, 2009, **42**, 38–43.
 - 23 I. M. De Cuyper, M. Meinders, E. van de Vijver, D. Korte, L. Porcelijn, M. Haas, J. A. Eble, K. Seeger, S. Rutella, D. Pagliara, T. W. Kuijpers, A. J. Verhoeven, T. K. Berg and L. Gutierrez, A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay, *Blood*, 2013, **121**, 70-80.
 - 24 S. J. Shattil, M. Cunningham and J. A. Hoxie, Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry, *Blood*, 1987, **70**, 307–315.
 - 25 R. C. Veras, K. G. Rodrigues, M. C. Alustau, I. G. A. Araújo, A. L. B. Barros, R. J. Alves, L. S. Nakao, V. A. Braga, D. F. Silva and I. A. Medeiros, Participation of Nitric Oxide Pathway in the Relaxation Response Induced by E-cinnamaldehyde Oxime in Superior Mesenteric Artery Isolated From Rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2013, **62**, 58-66.
 - 26 J. Huang, S. Wang, L. Xiaoxing, X. Yanhua and S. Xinyou, Cinnamaldehyde reduction of platelet aggregation and thrombosis in rodents, *Thromb. Res.*, 2007, **119**, 337–342.
 - 27 K. Yoneda, R. Iwamura, H. Kishi, Y. Mizukami, K. Mogami and S. Kobayashi, Identification of the active metabolite of ticlopidine from rat in vitro metabolites, *Br. J. Pharmacol.*, 2004, **142**, 551–557.
 - 28 D. Vara, M. Campanella and G. Pula, The novel NOX inhibitor 2-acetylphenothiazine impairs collagen-dependent thrombus formation in a GPVI-dependent manner, *Br. J. Pharmacol.*, 2013, **168**, 212–224.
 - 29 A. C. Grobe, S. M. Wells, E. Benavidez, P. Oishi, A. Azakie, J. R. Fineman and S. M. Black, Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase, *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, 2006, **290**, 1069–1077.
 - 30 A. Wojtala, M. Bonora, D. Malinska, P. Pinton, J. Duszynski and M. R. Wieckowski, Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry, *Methods Enzymol.*, 2014, **542**, 243–262.
 - 31 I. Bernatova, M. V. Conde, J. Kopincova, M. C. González, A. Puzserova and S. M. Arribas, Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: focus on methodological aspects, *J. Hypertens.*, 2009, **27**, 27-31.
 - 32 A. Sandoo, J. J. C. V. V. Zanten, G. S. Metsios, D. Carroll and G. D. Kitas, The endothelium and its role in regulating vascular tone, *Open Cardiovasc. Med. J.*, 2015, **4**, 302–312.
 - 33 W. C. Dornas and M. E. Silva, Animal models for the study of arterial hypertension, *J. Biosci.*, 2011, **36**, 731–737.
 - 34 J. Jiang, J. P. Zheng, Y. Li, Z. Gan, Y. Jiang, D. Huang, H. Li, Z. Liu and Y. Ke, Differential contribution of endothelium-derived relaxing factors to vascular reactivity in conduit and resistance arteries from normotensive and hypertensive rats, *Clin. Exp. Hypertens.*, 2016, **38**, 393–398.
 - 35 H. Girouard and J. de Champlain, Acute and chronic effects of free radicals on α1-adrenergic-induced vasoconstriction in mesenteric beds of spontaneously hypertensive rats, *J. Hypertens.*, 2005, **23**, 807-814.
 - 36 M. Behuliak, M. Pintérová, M. Bencze, M. Petrová, S. Líšková, P. Karen, J. Kuneš, I. Vanecková and J. Zicha, Ca²⁺ sensitization and Ca²⁺ entry in the control of blood pressure and adrenergic vasoconstriction in conscious Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats, *J. Hypertens.*, 2013, **31**, 2025–2035.
 - 37 E. P. Lowe, D. Wei, P. J. Rice, C. Li, J. Kalbfleisch, I. W. Browder and D. L. Williams, Human vascular endothelial cells express pattern recognition receptors for fungal glucans which stimulates nuclear factor (kappa)B activation and interleukin 8 production, *Am. Surg.*, 2002, **68**, 508.

- 38 J. Y. Shin, S. Lee, I. Y. Bae, S. H. Yoo and H. G. Lee, Structural and biological study of carboxymethylated Phellinus linteus polysaccharides, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 3368–3372.
- 39 J. González, N. Valls, R. Brito and R. Rodrigo, Essential hypertension and oxidative stress: New insights, *World J. Cardiol.*, 2014, **6**, 353.
- 40 H. R. Chang, R. P. Lee, C. Y. Wu and H. I. Chen, Nitric oxide in mesenteric vascular reactivity: A comparison between rats with normotension and hypertension, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2002, **29**, 275–280.
- 41 S. Dikalov, K. K. Griendling and D. G. Harrison, Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies, *Hypertension*, 2007, **49**, 717–727.
- 42 E. Machová and S. Bystrický, Antioxidant capacities of mannans and glucans are related to their susceptibility of free radical degradation, *J. Biol. Macromol.*, 2013, **61**, 308–311.
- 43 V. B. S. Araújo, A. N. F. Melo, N. T. Souza, V. M. B. Silva, R. H. Castro-Gomez, A. S. Silva, E. L. Souza and M. Magnani, Oral intake of carboxymethyl-glucan (CM-G) from yeast (*Saccharomyces uvarum*) reduces malondialdehyde levels in healthy men, *Molecules*, 2015, **20**, 14950–14958.
- 44 E. Gkaliagkousi, G. Passacuale, S. Douma, C. Zamboulis and A. Ferro, Platelet activation in essential hypertension: implications for antiplatelet treatment, *Am. J. Hypertens.*, 2010, **23**, 229–236.
- 45 S. A. Doggrell and L. Brown, Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure, *Cardiovasc. Res.*, 1998, **39**, 89–105.
- 46 D. Lominadze, I. G. Joshua and D. A. Schuschke, Increased erythrocyte aggregation in spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Hypertens.*, 1998, **11**, 784–789.
- 47 D. Lominadze, I. G. Joshua and D. A. Schuschke, In vivo platelet thrombus formation in microvessels of spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Hypertens.*, 1997, **10**, 1140–1146.
- 48 J. Saluk-Juszczak, K. Krolewska and B. Wachowicz, Response of blood platelets to β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*, *Platelets*, 2010, **21**, 37–43.
- 49 J. Saluk-Juszczak, K. Krolewska and B. Wachowicz, Beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as a blood platelet antioxidant, *Platelets*, 2010, **21**, 451–459.
- 50 D. . Fintel, Oral antiplatelet therapy for atherothrombotic disease: Overview of current and emerging treatment options, *Vasc. Health Risk Manag.*, 2012, **8**, 77–89.

ANEXO

Anexo 1 – Certidão emitida pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPB



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
GABINETE DA VICE-REITORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Efeito da carboximetilglucana de levedura sobre a função vascular e plaquetária de ratos espontaneamente hipertensos”** protocolo nº **087/2017** sob a responsabilidade do pesquisador **Dr. Robson Cavalcante Veras** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 24/08/2017.

Vigência do Projeto	2017 - 2020
Espécie/linhagem	Ratos SHR e WKY
Número de animais	116 animais (56 SHR e 56 WKY)
Idade/peso	10 semanas/ 250 - 300 g
Sexo	Machos
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB