

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE PESQUISA EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

TAYS AMANDA FELISBERTO GONÇALVES

PAPEL MODULADOR DO CARVACROL SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS
ENDOTELIAIS – INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS REGENERATIVO EM NÍVEL
MOLECULAR

João Pessoa
2023

TAYS AMANDA FELISBERTO GONÇALVES

**PAPEL MODULADOR DO CARVACROL SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS
ENDOTELIAIS – INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS REGENERATIVO EM
NÍVEL MOLECULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

João Pessoa

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

G635p Gonçalves, Tays Amanda Felisberto.

Papel modulador do carvacrol sobre células
progenitoras endoteliais - investigação de mecanismos
regenerativo em nível molecular / Tays Amanda
Felisberto Gonçalves. - João Pessoa, 2023.
191 f. : il.

Orientação: Isac Almeida de Medeiros.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais - Monoterpeno. 2. Monoterpeno -
Carvacrol. 3. Hipertensão - Carvacrol. 4. Estresse
oxidativo. 5. Disfunção endotelial. I. Medeiros, Isac
Almeida de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)

TAYS AMANDA FELISBERTO GONÇALVES

**PAPEL MODULADOR DO CARVACROL SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS
ENDOTELIAIS – INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS REGENERATIVO EM
NÍVEL MOLECULAR**

Aprovada em 28 / 07 /2023.

Banca examinadora



Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador



Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Externo

Documento assinado digitalmente



THYAGO MOREIRA DE QUEIROZ
Data: 19/09/2023 09:51:59-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz
(Universidade Federal de Pernambuco)
Examinador Externo



Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna



Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Goncalves
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno

Dedicatória

Este trabalho é dedicado às pessoas mais importantes da minha vida:

Aos meus pais, Rosa de Lourdes e Francisco de Assis, que na sua forma humilde e simples de serem, me proporcionaram a melhor educação que poderia ter, e sempre estiveram ao meu lado dando força para crescer profissionalmente.

Ao meu querido esposo, Julio Gonçalves, que apesar de todas as dificuldades enfrentadas, sempre permanece ao meu lado.

Ao meu sogro Manuel Rodrigues (*in memória*) e a todas as vítimas de COVID-19.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A Deus, que segurou pela mão durante essa trajetória, me fortalecendo diante todas as dificuldades enfrentadas, que enxugou minhas lágrimas nos momentos oportunos e me trouxe esperança de dias melhores.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) pelo suporte técnico através do Portal Periódicos e pelo suporte financeiro para a realização da pesquisa.

À UFPB – Universidade Federal da Paraíba, pelo suporte estrutural e financeiro para a realização da pesquisa.

Aos meus irmãos, tios, sogros e cunhadas que sempre estão ao meu lado me ajudando em todas as etapas da minha vida, cada um contribuindo de sua maneira para que pudéssemos vencer.

Aos meus sobrinhos Jady, Teo, Isaac, Antonela e Joseph por serem a alegria da minha vida e por tornarem os meus dias mais leves com a alegria existentes neles.

Ao Prof. Isac Almeida de Medeiros, meu orientador, pela confiança, incentivo e conhecimento transmitidos. Agradeço por não me ensinar apenas a ciência, mas por me tornar uma pessoa e profissional melhor.

Ao meu primeiro orientador, Prof. Robson Cavalcante, que sempre se mostra disponível, sendo professor, amigo e acima de tudo meu consolo quando preciso. Serei eternamente grata a todas as nossas fases compartilhadas e por me apoiar e me mostrar a verdade.

À minha dupla de laboratório, Viviane Lima, pelo apoio incondicional, inclusive nos momentos mais complicados, pela atenção e carinho e por estar sempre disponível a ajudar e servir.

À Arthur Pontes, por se aventurar na realização das infindáveis padronizações procurando executar os protocolos experimentais com perfeição, pela parceria e discussões científicas para fazermos o melhor sempre.

À Ana Caroline e Alinne Villar, pelo apoio experimental e espiritual, por enxugar umas as lágrimas das outras, pelas viagens para buscar animais, pelas madrugadas no laboratório, por todo apoio e carinho nos momentos que precisei.

Aos alunos de iniciação científica Thais Trajano, Evellyn Myllena, Adhonias Correia e Maria Eduarda, por todo carinho a dedicação ao longo do desenvolvimento deste trabalho, me auxiliando de maneira incomparável nos experimentos. Agradeço por tonar os experimentos mais divertidos e por muitas vezes serem meus pés e mãos.

Aos amigos de laboratório: Islania Giselia, Fátima Azevedo, Javanir Frederico, Julio César, Mathania Rezende, Larisse Virgulino, Guilherme, Hayaly, Mariana, Mylena.

À Fabiola Furtado e Maria do Carmo, grandes amigas sempre estão dispostas a me ajudar, independentemente da situação e estão sempre ao meu lado em todos os momentos.

À família do Centro Profissional Tecnológico – Escola Técnica de Saúde, em especial: Maria Soraya, João Felipe, Ana Carolina, Gabriela, Ronaldo Sarmiento, Andreia, Claudenice, Renata, Ana Luiza, Patrícia pelo apoio constante e amizade, pela companhia sempre descontraída, por me acolherem sem preconceitos e estigmas, por despertarem em mim a paixão pela profissão de professor e por saber que posso contar com vocês.

Aos meus queridos amigos Antônio e Daniele que sempre ouviram minhas angústias e me aconselharam a como seguir em frente, estando sempre dispostos a me ajudar e me acolher em sua casa para compartilhar a nossa vida.

Às minhas queridas amigas Daniele Idalino e Airlla Lana, por todo companheirismo, carinho, disposição e alegria transmitida.

As queridas amigas Elaine Borges, Keylla Gabriela, Rayane, Lidiane, Tyciane, Katyucia, Josenilda que são o meu refúgio para a diversão, me ligando ao mundo e fazendo com que eu aproveite mais a vida. Agradeço a amizade e força dada a cada conquista.

À Raowny, meu amigo de turma de doutorado, por ter dividido comigo as aflições e frustrações do doutorado e fazer isso se tornar mais leve.

Aos colegas de trabalho Rayanne Nascimento, Rafael, César, Daniele, Alesson e Romero por tornarem meus dias mais leves.

Às Lulus, Jéssica Rocha, Jessyca Pinheiro, Nathalia, Layane, Thais Roberta, Ruanna e Wanessa Juliany, amigas da graduação, que permaneceram presentes em minha vida e meu coração.

A José Crispim Duarte (CRISPA) que com sabedoria conduz o biotério sempre com alegria e disponibilidade a ajudar, mas principalmente pela amizade.

Aos professores do programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos do CCS/UFPB.

Aos funcionários Lindeberg, Luís Cordeiro, Adriano Cordeiro, Roberta, Graça e Mônica Rodrigues pelo exemplo de dedicação.

À Coordenação, funcionários e a todos os professores do programa de pós-graduação pela dedicação e empenho com que conduzem este programa.

Aos professores Éneas Ricardo, Eurica Adelia, Margareth Diniz, Juan Carlos, Sandra Mascarenhas e Thyago Queiroz por terem aceitado a participar da banca examinadora e contribuir com este trabalho.

“Seja forte e corajoso”
(Josué 1:9)

Resumo

GONÇALVES, T. A. F. **Papel modulador do carvacrol sobre células progenitoras endoteliais – investigação de mecanismos regenerativo em nível molecular**. 2023. 211 f. Tese de Doutorado (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) PgPNSB/CCS/UFPB. 2023.

Resumo

Carvacrol é um monoterpeno fenólico que apresenta uma diversidade de atividades biológicas, destacando-se sua capacidade antioxidante e anti-hipertensiva. No entanto, há poucas evidências demonstrando sua influência na regeneração vascular. No presente estudo, avaliou-se a possível modulação de carvacrol no reparo endotelial induzido por células progenitoras endoteliais (EPC). Para os ensaios *in vitro*, EPC foram isoladas da medula óssea de ratos Wistar e cultivadas por sete dias em meio basal de endotélio. As células cultivadas foram divididas em quatro grupos experimentais: controle (CTL), angiotensina II 1 μ M (ANG), carvacrol 0,1 μ M (CTL-CAR) e angiotensina 1 μ M tratado com carvacrol 0,1 μ M (ANG-CAR). Todas as substâncias foram incubadas por 24 horas para a realização dos protocolos experimentais. A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio de MTT. A perfil de modulação do carvacrol sobre as EPC foi avaliada através da detecção das espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), teste de adesão e migração celular, e avaliação da expressão da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e Nrf2. Para os ensaios *in vivo*, os animais foram divididos em cinco grupos: controle normotenso *Wistar Kyoto* (WKY-CTL) e hipertenso (SHR-CTL); e hipertensos tratados com carvacrol 50 mg/kg (SHR-C50), carvacrol 100 mg/kg (SHR-C100) ou resveratrol (SHR-RE10). Todos os ratos foram tratados por via intragástrica, uma vez ao dia, durante quatro semanas. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo CEUA-UFPB nº 2171120320. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida semanalmente a partir do manguito da cauda. EPC foram isoladas da medula óssea e da circulação periférica, e quantificadas por citometria de fluxo. A funcionalidade do EPC foi avaliada após o cultivo por quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC), avaliação de eNOS, detecção intracelular de ROS e avaliação da senescência. A artéria mesentérica superior foi isolada para avaliar a quantificação de ROS, CD34 e CD31. O tratamento do grupo ANG-CAR reduziu o estresse oxidativo e melhorou a adesão e migração de EPC. O aumento da performance da EPC envolve o aumento da expressão de eNOS, com consequente aumento de produção de NO. Ademais, foi observado o aumento da expressão de SOD, CAT e Nrf2 em EPC tratadas com o carvacrol. O tratamento com carvacrol induziu a migração de EPC, aumentou a formação de UFC, expressão e atividade de eNOS, além de reduzir ROS e senescência. Além disso, carvacrol reduziu ROS vasculares e aumentou a expressão de CD31 e CD34. Este estudo mostrou que o tratamento com carvacrol melhora a funcionalidade da EPC, contribuindo para a redução da disfunção endotelial.

Palavras-chave: Carvacrol. Monoterpeno. Hipertensão. Estresse Oxidativo. Disfunção endotelial.

Abstract

GONÇALVES, T. A. F. **Modulating role of carvacrol on endothelial progenitor cells – investigation of regenerative mechanisms at the molecular level.** 2023. 210 f. Tese de Doutorado (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) PgPNSB/CCS/UFPB. 2023.

ABSTRACT

Carvacrol is a phenolic monoterpene with diverse biological activities, highlighting its antioxidant and antihypertensive capacity. However, there is little evidence demonstrating its influence on vascular regeneration. The present study evaluated the possible modulation of carvacrol in endothelial repair induced by endothelial progenitor cells (EPC). For in vitro assays, EPC was isolated from the bone marrow of Wistar rats and cultured for seven days in an endothelial basal medium. The cultured cells were divided into four experimental groups: control (CTL), 1 μ M angiotensin II (ANG), 0.1 μ M carvacrol (CTL-CAR), and 1 μ M angiotensin treated with 0.1 μ M carvacrol (ANG-CAR). All substances were incubated for 24 hours to carry out the experimental protocols. Cytotoxicity was assessed using the MTT assay. The modulation profile of carvacrol on EPC was evaluated through the detection of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), cell adhesion and migration tests, and evaluation of the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and Nrf2. For the in vivo tests, the animals were divided into five groups: Wistar Kyoto normotensive control (WKY-CTL) and hypertensive control (SHR-CTL); and hypertensive patients treated with carvacrol 50 mg/kg (SHR-C50), carvacrol 100 mg/kg (SHR-C100) or resveratrol (SHR-RE10). All rats were treated intragastrically, once a day, for four weeks. The experimental protocols were approved by CEUA-UFPB nº 2171120320. Systolic blood pressure (SBP) was measured weekly from the tail cuff. EPC was isolated from bone marrow and peripheral circulation and quantified by flow cytometry. EPC functionality was assessed after cultivation by quantification of colony forming units (CFU), assessment of eNOS, intracellular detection of ROS, and assessment of senescence. The superior mesenteric artery was isolated to evaluate the quantification of ROS, CD34, and CD31. Treatment of the ANG-CAR group reduced oxidative stress and improved EPC adhesion and migration. Increased EPC performance involves increased expression of eNOS, with a consequent increase in NO production. Furthermore, an increase in the expression of SOD, CAT, and Nrf2 was observed in EPC treated with carvacrol. Carvacrol treatment induced EPC migration, increased CFU formation, eNOS expression and activity, and reduced ROS and senescence. Furthermore, carvacrol reduced vascular ROS and increased the expression of CD31 and CD34. This study showed that treatment with carvacrol improves EPC functionality, contributing to the reduction of endothelial dysfunction.

Key-words: Carvacrol. Monoterpene. Hypertension. Oxidative Stress. Endothelial dysfunction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de tráfego mediadas por VEGF-A após a ativação do VEGFR-2.	32
Figura 2 - Desenho esquemático dos mecanismos de relaxamento derivados do endotélio.....	33
Figura 3 - Origem e diferenciação das células progenitoras endoteliais	36
Figura 4 - Sinalização do NO na mobilização, proliferação e vasculogênese induzida por EPC.....	39
Figura 5 - Papel das EPC no reparo endotelial	40
Figura 6 - Representação esquemática do efeito do estresse oxidativo sobre as EPC.....	47
Figura 7 - Plantas que possuem carvacrol em seu óleo essencial.....	50
Figura 8 – Estrutura do carvacrol.	50
Figura 9 - Delineamento experimental da avaliação do efeito do carvacrol in vitro.	61
Figura 10 - Processo de extração e cultivo de EPC da medula óssea.....	62
Figura 11 - Esquema dos grupos de ratos utilizados para a investigação do efeito de carvacrol a regeneração vascular.	67
Figura 12 - Delineamento experimental do tratamento	68
Figura 13 - Estratégia representativa do <i>gating</i> de citometria de fluxo.....	71
Figura 14 - Viabilidade celular de EPC tratadas com ANG II utilizando o ensaio de MTT.....	77
Figura 15 - Intensidade de fluorescência emitida por DHE nas diferentes concentrações de ANG II.	81
Figura 16 - Viabilidade celular de EPC tratadas com carvacrol utilizando o ensaio de MTT.....	79
Figura 17 - Efeito do carvacrol sobre a produção de ânions superóxido em EPC	82
Figura 18 - Efeito do carvacrol sobre a produção de ânions superóxido em EPC	83
Figura 19 - Avaliação da habilidade de adesão de EPC na presença de Carvacrol.	84
Figura 20 - Avaliação do efeito de carvacrol sobre a migração de EPC.	85
Figura 21 - Avaliação da expressão da eNOS após incubação com carvacrol	87
Figura 22 - Avaliação na produção de NO induzida por carvacrol em EPC	88
Figura 23 - Efeito do carvacrol em EPC sobre a expressão de SOD	89

Figura 24 - Efeito do carvacrol em EPC sobre a expressão de SOD	90
Figura 25 - Efeito do carvacrol sobre a expressão de Nrf2 em EPC isolada de ratos	91
Figura 26 - Medida da PAS (mmHg) e FC (bpm) em relação início e final de tratamento dos diferentes grupos experimentais.....	93
Figura 27 - Quantificação e caracterização por citometria de fluxo de EPC isoladas da medula óssea de animais tratados.....	95
Figura 28 - Quantificação e caracterização por citometria de fluxo de EPC isoladas do sangue periférico de animais tratados.....	97
Figura 29 - Caracterização da população de EPC isoladas da medula óssea e circulação periférica após cultivo celular de sete dias.....	98
Figura 30 - Número de unidades formadoras de colônias após sete dias de cultivo celular.....	99
Figura 31 - Avaliação da expressão de eNOS total e eNOS fosforilada em EPC cultivadas por 7 dias isoladas da medula óssea.	100
Figura 32 - Avaliação da expressão de eNOS total e eNOS fosforilada em EPC cultivadas por 7 dias isoladas da circulação periférica.....	102
Figura 33 - Efeito do tratamento com carvacrol na produção de ROS nos diferentes grupos experimentais.	103
Figura 34 - Efeito do tratamento com carvacrol na produção de ROS nos diferentes grupos experimentais.	104
Figura 35 - Efeito do tratamento com carvacrol na senescência celular em EPC nos diferentes grupos experimentais.	105
Figura 36 - Efeito do tratamento com carvacrol na senescência celular em EPC nos diferentes grupos experimentais.	106
Figura 37 - Medida da intensidade de fluorescência basal da sonda DHE em cortes transversais artéria mesentérica superior isolada de rato dos diferentes grupos experimentais após tratamento de quatro semanas.....	108
Figura 38 - Medida da intensidade de fluorescência de CD34 em cortes transversais artéria mesentérica superior isolada de rato dos diferentes grupos experimentais após tratamento de quatro semanas.....	110

Figura 39 - Medida da intensidade de fluorescência de CD31 em cortes transversais artéria mesentérica superior isolada de rato dos diferentes grupos experimentais após tratamento de quatro semanas.....	112
---	-----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Composição da solução salina fisiológica.	59
Quadro 2 – Composição da solução PBS	59
Quadro 3 – Composição da solução PBS/EDTA.....	59
Quadro 4 – Medida de PAS (mmHg) e FC (BPM) em relação ao início e final do tratamento dos diferentes grupos experimentais.....	94

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

2-OHET+ – 2-hidroxietídio

7-AAD – 7-amino-actinomicina

ABTS - 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid

AC – Ciclase de Adenilil

ACh – Acetilcolina

Akt – Proteína Cinase B

ANG 1-7 – Angiotensina 1-7

ANG II – Angiotensina II

ANG-CAR – Angiotensina 1 μM + Carvacrol 0,1 μM

APC – Aloficocianina

AT1R – Receptor tipo 1 de Angiotensina II

ATP – Trifosfato de Adenosina

BH₄ – Tetra-hidrobiopterina

BMP4 – Proteína Morfogenética Óssea 4

BSA – Albumina Sérica Bovina

C₁₂FDG - 5-dodecanoilaminofluoresceína Di- β -D-galactopiranósido

CACs – Células Angiogênicas Circulatórias

CaM – Calmodulina

cAMP – Monofosfato de adenosina cíclico

CAT – Catalase

Cav – Canais de Ca²⁺ Dependente de Voltagem

CEUA – Comissão de Ética de Uso de Animais

CFU-EC - Células Endoteliais da Unidade Formadora de Colônias

cGMP – Monofosfato de Guanosina Cíclico

CML – Células Musculares Lisas

CMLV – Células de Músculo Liso Vascular

COX – Ciclooxigenase

CTL – Controle

CTL-CAR – Carvacrol 0,1 μM

CXCR4 – Receptor de Quimiocina 4

CXCR7 – Receptor de Quimiocina 7
DAC – Doenças Arterial Coronariana
DAF-2 – 4,5-Diaminofluoresceína
DAG – Diacilglicerol
DCV – Doenças Cardiovasculares
DHE – Di-hidroetídio
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy
ECA2 – Enzima Conversora da Angiotensina 2
ECE – Estimulação por Campo Elétrico
ECFCs – Células Formadoras de Colônias Endoteliais
EDCF – Fatores Contraturantes Derivados do Endotélio
EDHF – Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
eNOS – Sintase do Óxido Nítrico Endotelial
EOCs – Células de Crescimento Endotelial
EPC – Células Progenitoras Endotelial
EPO – Eritropoetina
ERK – Proteína Regulada por Sinais Extracelulares
ET-1 – Endotelina-1
EV – Vesícula Extracelular
FAK – Cinase de Adesão Focal
FC – Frequência cardíaca
FGF-2 – Fator de Crescimento de Fibroblastos 2
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
FSC - *forward scatter*
G-CSF – Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos
GPCR – Receptor Acoplado à Proteína G
GTP – Trifosfato de Guanosina
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HA – Hipertensão Arterial
HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

hEGF - Fator de crescimento epidérmico humano

hFGF-b - Fator de crescimento básico de fibroblasto humano

HSC – Células-tronco Hematopoiéticas

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

ICAM – Molécula de Adesão Intercelular-1

IGF – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

IL-1 β – Interleucina-1 Beta

IL-8 – Interleucina-8

IP₃ – 1,2,4-trisfosfato de Inositol

IPeFarm – Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

Jak – Janus Cinase

KCa2.3 – Canais para Potássio Ativados por Cálcio de Pequena Condutância

KCa3.1 – Canais de Potássio Ativados por Cálcio de Intermediária Condutância

Kir – Canais Retificadores de Potássio

Kv – Canais para Potássio Operados por Voltagem

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – Proteína Ativada por Mitógeno

MDA – Malonaldeído

MEK – Cinase da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno

MLC – Cadeia Leve da Miosina

MLCK – Cinase da Cadeia Leve da Miosina

MLCP – Fosfatase da Cadeia Leve da Miosina

MMP-9 – Matriz de Metaloproteinase-9

MR – Receptor de Mineralocorticoide

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NADPH – Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida Reduzido

NFAT – Fator Nuclear de Células T Ativadas

NO – Óxido Nítrico

NOS – Sintase de Óxido Nítrico

Nrf-2 – Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2

O₂^{•-} – Ânion Superóxido

OCT – Meio Ótimo de Temperatura de Corte

ONOO⁻ – Peroxinitrito

Oxi-LDL - Lipoproteína de baixa densidade oxidada

PA – Pressão Arterial

PAD – Pressão Arterial Diastólica

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PBS – Solução Tampão Fosfato

PE – Ficoeritrina

PE – Polietileno

PerCPCy5-5 - PerCP-Cyanine5.5

PGH₂ – Prostaglandina H₂

PGI₂ – Prostaciclina

PgPNSB – Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

PI3K – Fosfatidilinositol 3-cinase

PIP2 – Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

PIP3 – Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato

PKG – Proteína Cinase G

PLC – Fosfolipase C

PLC γ – Fosfolipase C gama

ROC – Canais Operados por Receptor

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RTK – Receptor de Tirosina Cinase

SBF – Soro bovino fetal

SDF-1 – Fator Derivado de Células Estromais -1

sGC – Ciclase de Guanilil Solúvel

SGL-1 – Ligante-1 da Glicoproteína P-selectina

SHR – Ratos Espontaneamente Hipertensos

SHR-C100 – Ratos Espontaneamente Hipertensos Tratados com 100 mg/kg de Carvacrol

SHR-C50 – Ratos Espontaneamente Hipertensos Tratados com 50 mg/kg de Carvacrol

SHR-CTL – Ratos Espontaneamente Hipertensos controle

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SOC – Canais Operados por Estoques

SOD – Superóxido Dismutase

SRAA – Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

SSC – *side scatter*

TGF – fator de Crescimento Tumoral

TGF- β 1 – Fator de Crescimento Transformante Beta-1

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRPC – Receptor TRP Clássico

TRPM – Receptor TRP Melastatinas

TRPs – Canais Potenciais Receptores Transientes

TRPV – Receptor TRP Vaniloide

TxA₂ – Tromboxano A₂

UFAL – Universidade Federal do Alagoas

UFC – Unidade formadora de colônia

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGFR-2 – Receptor do Fator de Crescimento Endoteliais Vascular Tipo 2

vwF – Fator von Willebrand

WKY – Ratos *Wistar Kyoto*

WKY-CTL – Ratos *Wistar Kyoto* Controle Normotenso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REFERENCIAL TEÓRICO	30
	2.1 Endotélio Vascular e suas funções.....	30
	2.2 Caracterização de Células Progenitoras Endoteliais (EPC)	35
	2.3 Mobilização, diferenciação e <i>homing</i> das EPC.....	38
	2.4 Reparo endotelial e ação parácrina das EPC.....	40
	2.5 Potencial regenerativo das EPC nas doenças cardiovasculares.	42
	2.6 EPC e papel sobre a hipertensão arterial	44
	2.7 Carvacrol.....	49
3	OBJETIVOS	55
	3.2 Objetivo Geral	55
	3.3 Objetivos específicos.....	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
	4.2 Tipo de estudo e considerações éticas	57
	4.3 Animais	57
	4.4 Substâncias e reagentes	57
	4.5 Obtenção e preparação das soluções de carvacrol	58
	4.6 Soluções nutritivas e meios de cultura	59
	4.7 Avaliação dos efeitos do Carvacrol sobre a modulação de EPC e células endoteliais <i>in vitro</i>	60

4.8	Avaliação dos efeitos do tratamento com Carvacrol sobre a modulação o de EPC.....	66
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
5	RESULTADOS	77
5.2	Avaliação da modulação do carvacrol em EPC cultivadas	77
5.3	AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM O CARVACROL SOBRE A MODULAÇÃO DE EPC	92
6	DISCUSSÃO	114
7	CONCLUSÃO.....	125
8	PERSPECTIVA	127
	REFERÊNCIAS.....	129
	APÊNDICE A – CARVACROL IMPROVES VASCULAR FUNCTION IN HYPERTENSIVE ANIMALS BY MODULATING ENDOTHELIAL PROGENITOR CELL.....	147
	APÊNDICE B – 5-ISOPROPYL-S-METHYLPHENOL ENHANCES PENILE FUNCTION IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS.....	161
	ANEXO A – CERTIDÃO DE APROVAÇÃO DA CEUA.....	182
	ANEXO B – ARTIGOS COMPLETOS PULICADOS EM PERIÓDICOS ENTRE 2018 E 2023.....	183

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, várias evidências têm demonstrado a existência de uma via inovadora para a realização do reparo endotelial *in vivo* e *in vitro*, no qual envolve células provenientes da medula óssea, denominadas de células progenitoras endoteliais (EPC) (BIANCONI et al., 2018). EPC foram estudadas pela primeira vez por Asahara em 1997, cuja caracterização foi determinada a partir do isolamento de EPC do sangue periférico e da medula óssea utilizando marcadores de células-tronco hematopoiéticas CD34 e de células endoteliais como receptor do fator de crescimento endotelial vascular tipo 2 (VEGFR-2) (ASAHARA et al., 1997). Em seus estudos iniciais, Asahara propôs que EPC isoladas de sangue periférico seriam uma terapia promissora para a regeneração vascular para pacientes com doenças cardiovasculares (ASAHARA et al., 1997; ASAHARA et al., 1999).

Em condições normais, a maioria das EPC permanecem na medula óssea relativamente inativadas em contato com as células estromais. Em resposta a uma lesão através da ação de fatores quimiotáticos, EPC são liberadas da medula óssea e mobilizadas para o tecido lesado, incorporando-se diretamente nas estruturas dos vasos danificados, recuperando uma disfunção (PETERS, 2018; LI, J. et al., 2021). Entretanto, quando ocorre a redução do percentual de EPC ou sua função encontra-se prejudicada, a capacidade angiogênica e sua função de reparo endotelial são enfraquecidas, diminuindo a sua capacidade de regeneração e assim potencializando a lesão vascular (PEYTER et al., 2021).

Uma série de estudos experimentais e clínicos tem sido realizado no contexto da hipertensão arterial, demonstrando uma redução significativa da funcionalidade, capacidade proliferativa (SUZUKI et al., 2014) e número de EPC circulantes (DE CAVANAGH et al., 2014; BUDZYN;GRYSZCZYNSKA; et al., 2019; ZHANG, G. et al., 2020). Os mecanismos patológicos que envolvem a disfunção das EPC na hipertensão arterial são bastantes complexos e incluem aumento da resposta simpática, superativação do sistema renina-angiotensina, processos inflamatórios e anormalidades do sistema oxidante e antioxidante, o que carrega no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (LUO et al., 2016).

Um dos principais mecanismos que vem sendo propostos para a disfunção das EPC na revascularização envolve o aumento do estresse oxidativo em animais e

pacientes hipertensos. Esse mecanismo é explicado devido a uma ativação crônica do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), que pode levar a supra regulação da NADPH oxidase pela angiotensina II (ANG II), levando a um aumento sustentado de espécies reativas de oxigênio (ROS) e depleção do sistema antioxidante, que acarreta numa alteração funcional devido a uma senescência acelerada das EPC (VAN ZONNEVELD et al., 2006).

Desta forma, o estudo de substâncias antioxidantes que tenham a possibilidade de reverter esses efeitos são de suma importância devido a gravidade desta condição clínica. Além disso, destaca-se cada vez mais a pesquisa com produtos naturais direcionadas a descoberta de protótipos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que estejam direcionados a prevenção e/ou tratamento de doenças cardiovasculares, como hipertensão.

Atualmente, existe um grande interesse sobre a pesquisa com óleos essenciais de diferentes fontes vegetais com potencial atividade antioxidante. Comumente, óleos essenciais e seus constituintes têm sido relatados como promissores no desenvolvimento de agentes terapêuticos aplicados a doenças cardiovasculares (DE ANDRADE et al., 2017).

Neste contexto, evidencia-se carvacrol, um monoterpene aromático encontrado em óleos essenciais de diferentes plantas, apresentando uma ampla atividade biológica, incluindo atividade antioxidante (NAZIROGLU, 2022) e sobre o sistema cardiovascular (PEIXOTO-NEVES et al., 2010; DANTAS et al., 2015; COSTA et al., 2021).

A capacidade antioxidante do carvacrol está relacionada com a redução da ação de fatores oxidantes e inflamatórios (EL-SAYED et al., 2015; OLMEZTURK KARAKURT et al., 2022), aumento dos níveis de enzimas antioxidantes e ativação da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) (CHEN et al., 2017b) e minimização a senescência celular (DANTAS et al., 2022; EL-FAR et al., 2022). Além disso, o carvacrol promoveu a angiogênese de células mesenquimais humanas modulando a diferenciação destas células (MATLUOBI et al., 2018).

Entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais o carvacrol reduz a pressão arterial não está completamente elucidado. Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar se o carvacrol reduz a pressão arterial de animais espontaneamente hipertensos por uma modulação das células progenitoras endoteliais.

Referencial teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Endotélio Vascular e suas funções

Vasos sanguíneos integram e interconectam todos os órgãos, fornecem nutrientes e oxigênio para o corpo e removem metabólitos dos tecidos (NAITO et al., 2020). Estruturalmente, a vasculatura é formada por múltiplas camadas: uma camada de células endoteliais que revestem internamente os vasos; células mesenquimais subjacentes que a cercam, também conhecidas como pericitos em pequenos vasos; células musculares lisas (CML) em vasos de maior diâmetro (LOH;ANG, 2023); e a camada mais externa, também chamada de adventícia, que consiste em fibroblastos, fibras de colágeno e nervos perivasculares (OAK et al., 2018).

Células endoteliais, denominadas de endotélio vascular, constituem aproximadamente 1,5% da massa corporal total e representam a primeira barreira para moléculas e patógenos circulantes na corrente sanguínea (HENNIGS et al., 2021). A depender do leito vascular, estas células endoteliais apresentam uma grande heterogeneidade fenotípica que está relacionada com funções distintas e específicas do tecido (MARZIANO et al., 2021).

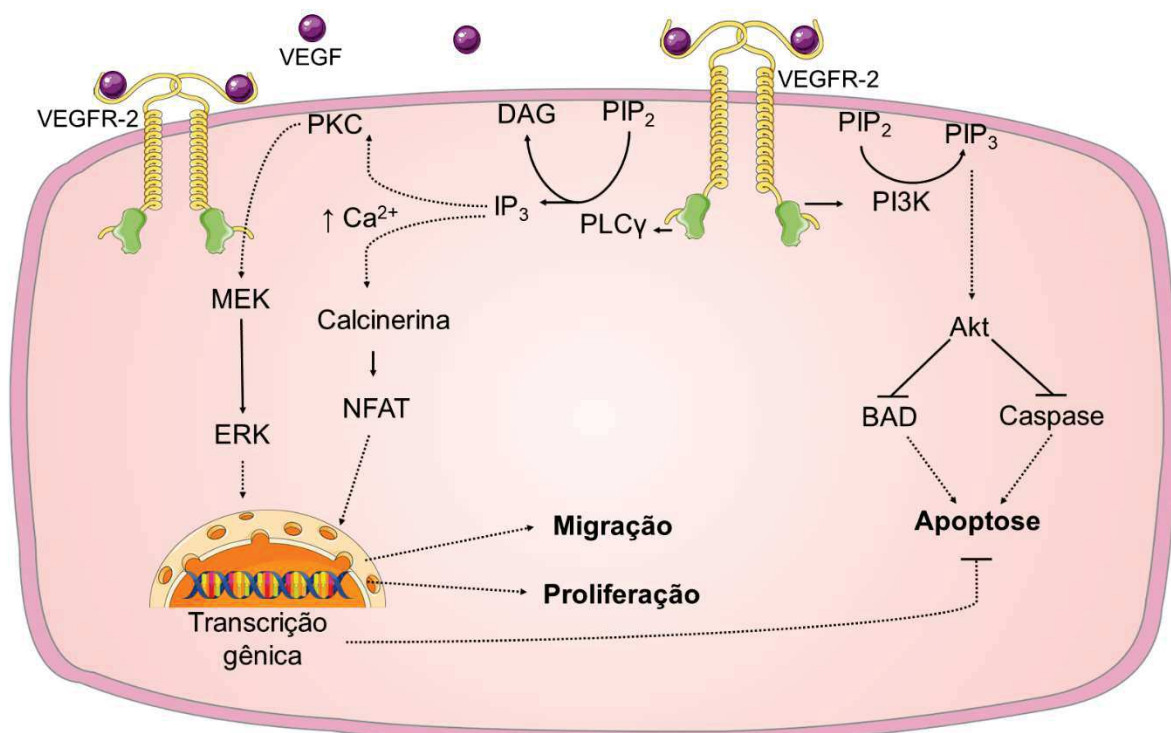
Uma das principais funções do endotélio vascular é a regulação da permeabilidade vascular, que ocorre a partir do extravasamento de fluidos, solutos, proteínas e células (CLAEISSON-WELSH et al., 2021; HENNIGS et al., 2021). Nos capilares existe uma área de superfície mais expansiva devido à troca de oxigênio, dióxido de carbono e metabólitos entre o sangue e tecidos. Por outro lado, nas artérias e arteríolas, essa barreira é relativamente limitada. Já nas vênulas as células endoteliais são altamente permeáveis a fluidos, soluto e proteínas (URBANCZYK et al., 2022).

O endotélio vascular também desempenha um papel importante no controle da hemostasia, ao controlar os sítios de ligação para fatores anticoagulantes e pró coagulantes na superfície celular, inclusive quando a integridade da camada é rompida (RAJENDRAN et al., 2013; MEDINA-LEYTE et al., 2021). Muitos desses efeitos são mediados por mudanças na geração e liberação do óxido nítrico (NO), em resposta a estímulos hemodinâmicos exercidos na superfície luminal das células endoteliais, a partir fluxo sanguíneo e tensão cíclica da parede vascular, conhecido como estresse de cisalhamento (shear stress) (FLEMING, 2010).

Entre outros processos amplamente regulados pelo endotélio está angiogênese, processo de geração de novos vasos a partir de vasos pré-existent, com objetivo de manter o suprimento de oxigênio e nutrientes para os tecidos (REN, 2015; POTENTE;CARMELIET, 2017). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos principais fatores de crescimento promotor da angiogênese fisiológica, por induzir a permeabilidade, proliferação, migração e formação de tubos a partir do receptor VEGF tipo 2 (VEGFR-2), um receptor pertencente à família de receptores de tirosina cinase (RTK) (LIN et al., 2018; PULKKINEN et al., 2021).

A interação entre o VEGF e VEGFR-2 na membrana plasmática das células endoteliais induz a dimerização e autofosforilação do receptor, o que leva ao recrutamento de proteínas adaptadoras citoplasmáticas para iniciar vias de sinalização que levam a numerosos alvos moleculares (FUKAI;USHIO-FUKAI, 2020; LJOKI et al., 2022). Estes incluem a ativação de fosfolipase C gama (PLC γ) e proteína cinase regulada por sinais extracelulares (ERK1/2), que induz a transcrição de genes para promover proliferação e estimulação da cinase de adesão focal (FAK), migração celular e ativação de fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K)/ proteína cinase B (AKT), para mediar a sobrevivência celular (Figura 1). Ademais, a sinalização do VEGFR-2 também promove a reorganização do citoesqueleto de actina mediada pela proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) p38 e ativação de sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) (PEACH et al., 2018).

Figura 1 - Vias de tráfego mediadas por VEGF-A após a ativação do VEGFR-2.



PKC: Proteína Cinase C; **DAG:** Diacilglicerol; **PIP₂:** Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; **PIP₃:** Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato; **IP₃:** Inositol-1,2,4-trisfosfato; **PI3K:** Fosfatidilinositol 3-cinase; **AKT:** Proteína Cinase B; **MEK:** Cinase da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (cinase da MAPK; MAPKK ou MAP2K); **ERK:** Proteína Cinase Regulada por Sinais Extracelulares; **NFAT:** Fator Nuclear de Células T Ativadas; **p38 MAPK:** Proteína Cinase Ativada por Mitógeno.

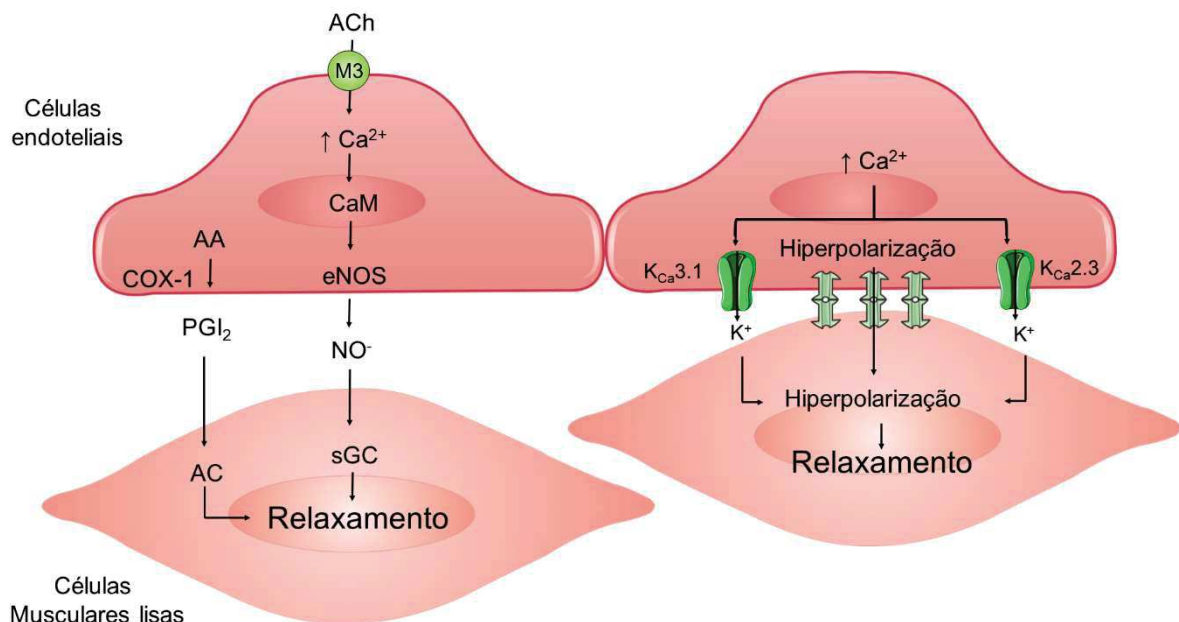
Fonte: Gonçalves, 2023.

Embora a angiogênese seja um processo importante para a manutenção da função de órgãos e tecidos este processo deve apresentar alto controle e coordenação da proliferação, migração e diferenciação das células endoteliais, uma vez que a desregulação deste processo é responsável por anormalidades patológicas, como má-formação arteriovenosa ou ainda um angiogênese excessiva (LEE et al., 2022).

O endotélio também atua de forma significativa na regulação do tônus vascular, em resposta ao estresse mecânico e moléculas sinalizadoras, o que leva a uma transdução de sinal para outras camadas da parede vascular (HENNIGS et al., 2021; HOWE et al., 2022). Fatores vasoconstritores e vasorrelaxantes, produzidos e liberados pelas células endoteliais, regulam o tônus das CML (BALCILAR et al., 2017; GODO; SHIMOKAWA, 2017). A dilatação dependente do endotélio é mediada principalmente por três vasodilatadores: óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e fator

hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (RODRIGO;HERBERT, 2018) (Figura 2).

Figura 2 - Desenho esquemático dos mecanismos de relaxamento derivados do endotélio.



Mecanismos de relaxamento induzidos pelos fatores relaxantes derivados do endotélio (EDFR). A ativação do receptor muscarínico M3 de ACh induz o aumento de cálcio intracelular e ao se ligar com a CaM ativa a eNOS produzindo o NO, que ativa a cGC nas CML causando relaxamento. A prostaciclina é formada a partir dos metabolitos do ácido araquidônico pela ação da enzima COX, uma vez formada ativa o receptor IP nas CML que ativa a AC aumentando a formação de cAMP induzindo relaxamento. O aumento do cálcio intracelular libera fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio que são conduzidos para as CML mediando o relaxamento. **ACh:** acetilcolina; **CaM:** calmodulina; **COX:** cicloxigenase; **eNOS:** sintase de óxido nítrico endotelial; **NO:** óxido nítrico; **sGC:** ciclase de guanilil solúvel; **PGI_2 :** prostaciclina; **AC:** Adenilil ciclase; **cAMP:** monofosfato cíclico de adenosina; **$\text{KCa}_{2.3}$:** canais de potássio ativados por cálcio de pequena condutância; **$\text{KCa}_{3.1}$:** canais de potássio ativados por cálcio de intermediária condutância.

Fonte: Gonçalves, 2023.

O NO produzido no endotélio é um poderoso vasodilatador (Figura 2) e atua como molécula sinalizadora ao ativar a ciclase de guanilil solúvel (sGs), que leva à formação do 3,5-monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) com consequente ativação da proteína cinase G (PKG). Esta cinase promove a recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático, expulsão de cálcio da célula e a abertura de canais de potássio ativados por cálcio, o que leva à diminuição de cálcio intracelular e impede a fosforilação da cadeia leve de miosina e induz o relaxamento das CMLV (ZHAO et al., 2015).

A PGI_2 é um eicosanoide produzido de forma constitutiva pelo endotélio, que favorece a dilatação das CMLV a partir da ativação da ciclase de adenilil (AC), o qual

leva à formação de 3,5-adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e ativação da proteína cinase A (PKA), o que reduz o cálcio intracelular (KRÜGER-GENGE et al., 2019).

O EDHF é um conjunto de agentes, incluindo o fluxo de K^+ por seus canais, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e produtos de epoxidação (ácidos epoxieicosatrienóicos, EETs) do ácido araquidônico (RODRIGO;HERBERT, 2018). Este fator exerce grande influência vasodilatadora em artérias de resistência e, por isso, é um importante modulador da pressão arterial (PA) (GARLAND;DORA, 2017). O relaxamento induzido pelo EDHF envolve a ativação de canais de potássio ativados por cálcio de pequena ($K_{Ca2.3}$) e intermediária ($K_{Ca3.1}$) condutância, que leva à ativação de canais retificadores de K^+ (K_{ir}) e da Na^+/K^+ -ATPase. Tais eventos gera uma corrente de hiperpolarização que se espalha através das junções mioendoteliais e leva à vasodilatação (KRÜGER-GENGE et al., 2019).

Por outro lado, vários fatores produzidos pelo endotélio induzem a vasoconstrição. Os fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs) incluem: angiotensina II (ANG II), tromboxano A_2 (TxA_2), endotelina-1 (ET-1), prostaglandina H_2 (PGH_2) e as espécies reativas de oxigênio (ROS) (BALCILAR et al., 2017). A contração induzida por ANG II, TxA_2 , ET-1, e PGH_2 é mediada por ativação dos seus diferentes receptores nas CMLV, que leva à ativação da fosfolipase C (PLC), e resulta na formação de trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). Estes segundos mensageiros promovem o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular e a ligação do Ca^{2+} com a calmodulina, que ativa a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK) e resulta na contração das CMLV (DE MELLO, 2016; BALCILAR et al., 2017).

O tônus vascular desempenha um importante papel na regulação e manutenção da PA. Desta forma, perturbações na sinalização nas CMLV e a função alterada das células endoteliais influenciam a reatividade e o tônus vascular, o que está associado a anormalidades na PA (TOUZY et al., 2018).

Lesões físicas e bioquímicas são exemplos de fatores que podem levar a danos nas células endoteliais, o que torna estas células incapazes de manter a homeostase vascular, um processo conhecido como disfunção endotelial (QIU et al., 2018). Anormalidades do endotélio vascular é um dos principais contribuintes para as doenças cardiovasculares como hipertensão, aterosclerose, obesidade e diabetes (SUN et al., 2020). Desta forma, a manutenção da integridade desta camada de células é fundamental para manter a função da vasculatura (PENG et al., 2019;

WENCESLAU et al., 2021). Neste contexto, alguns estudos têm relatado a importância das células progenitoras endoteliais (EPC) como reguladoras centrais da regeneração vascular, angiogênese e re-endotelização, facilitando o reparo vascular (COSTA;PASQUINELLI, 2022; YAN et al., 2022).

2.2 Caracterização de Células Progenitoras Endoteliais (EPC)

Na fase embrionária, a formação dos vasos sanguíneos inicia a partir de células precursoras mesodérmicas, denominadas angioblastos, que se diferenciam em células endoteliais e se agregam para gerar uma rede vascular primitiva. Esse processo, designado de vasculogênese, é mediado pelo fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), proteína morfogenética óssea 4 (BMP4) e VEGF (NAITO et al., 2020). Após a formação do plexo vascular inicial, os vasos sanguíneos se expandem a partir da proliferação de vasos sanguíneos pré-existentes, ou seja, pela angiogênese (POTENTE;MAKINEN, 2017).

Em contraste com o crescimento ativo dos vasos no embrião, os vasos adultos são quiescentes. Entretanto, quando indivíduo apresenta uma lesão endotelial que interrompe as características normais modulatórias sobre a vasculatura, como na aterosclerose, diabetes e hipertensão, sinais angiogênicos são liberados para promover o processo de autorreparo com objetivo de manter a função protetora do endotélio na parede do vaso (WANG et al., 2022).

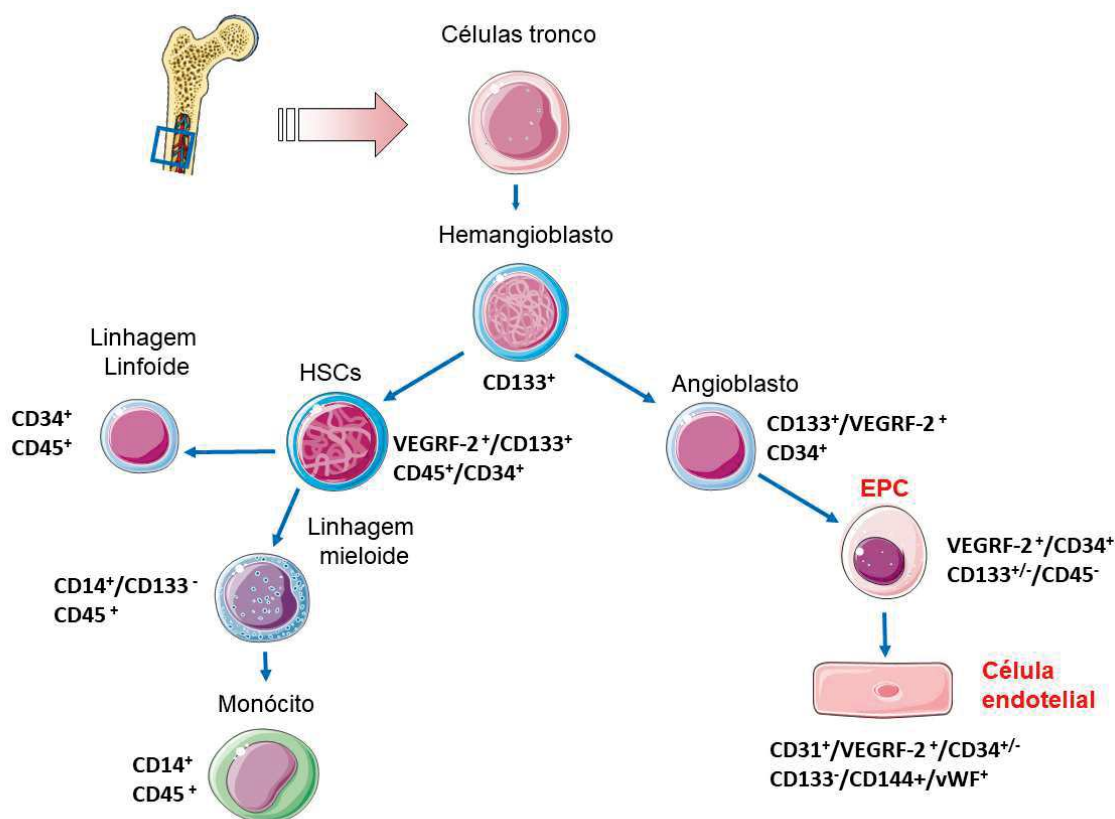
Inicialmente pensava-se que o reparo vascular no indivíduo adulto era realizado exclusivamente pela angiogênese (MARCOLA;RODRIGUES, 2015) ou mesmo por células endoteliais adjacentes que se dividiam e corrigiam a lesão (ZAMPETAKI et al., 2008). Entretanto, células mononucleares portadoras dos marcadores CD34 e VEGFR2 do sangue periférico de adultos foram isoladas e foi observada que contribuem para a revascularização do tecido isquêmico (ASAHARA et al., 1997). Em um estudo subsequente, demonstrou-se que as células progenitoras derivadas da medula óssea, nomeadas como EPC, desempenham um papel essencial nos mecanismos de neovascularização pós-natal (ASAHARA et al., 1999). Apesar de serem uma população heterogênea, elas apresentam propriedades e funções

semelhantes, como: proliferação e diferenciação *in vitro* em células endoteliais (ZAMPETAKI et al., 2008).

Várias evidências sugerem que EPC são capazes de exercer efeitos funcionais nas artérias, capilares e veias, o que inclui a manutenção da camada endotelial, homeostase vascular, participação da regeneração vascular e neovascularização (URBICH;DIMMELER, 2004). A partir destas observações ficou convencionado que o reparo de vasos sanguíneos no indivíduo adulto sofre grande influência das EPC (POTENTE;MAKINEN, 2017).

Atualmente a busca por marcadores tem se intensificando e EPCs com três marcadores associados possuem propriedades vasculogênicas: CD133, CD34 e VEGFR-2, também conhecido como receptor de inserção de cinase (KDR, Flk-1 ou CD309) (HEINISCH et al., 2022) (Figura 3).

Figura 3 - Origem e diferenciação das células progenitoras endoteliais



Hemangioblastos derivados de células-tronco pluripotentes podem se diferenciar em HSCs e angioblastos. HSCs dão origem a células sanguíneas, como monócitos e linfócitos. Os angioblastos dão origem à linhagem de células endoteliais. **HSC**: Células-tronco hematopoiéticas; **EPC**: Célula progenitora endotelial; **VEGFR-2**: Receptor do fator de crescimento endotelial vascular tipo 2; **vWF**: fator von Willebrand.

Fonte: Gonçalves, 2023.

À medida que essas células se diferenciam perdem a expressão de CD133 e marcadores de superfície CD34 e VEGFR-2 emergem gradualmente (SANDHU et al., 2017). CD34 é considerado um marcador de superfície celular encontrado em células-tronco imaturas (RADU et al., 2023), e VEGFR-2 apresenta expressão aumentada em células de origem endotelial (KUTIKHIN et al., 2018). Outros marcadores coexpressos na superfície das EPC caracterizam seu potencial endotelial incluem o fator de von Willebrand (vWF), CD31, CD144 (KUTIKHIN et al., 2018).

Populações de EPC em cultura *in vitro* são definidas em duas populações diferentes: EPC precoces e tardias (KUTIKHIN et al., 2018).

As EPC precoces são denominadas células angiogênicas circulatórias (CACs) ou células endoteliais da unidade formadora de colônias (CFU-EC) e crescem em cultura celular de 4 a 7 dias. Elas apresentam uma capacidade limitada de proliferação e induzem a angiogênese a partir da secreção de fatores quimiotáticos e se comunicam com células endoteliais maduras por organelas microtubulares. Desta forma, essas EPC são denominadas de células hematopoiéticas com atividade pro-angiogênica (WANG et al., 2022) e expressam alguns marcadores de superfície com características de células progenitoras no estágio inicial de crescimento, que incluem CD34, CD31, VEGFR-2 e CD133 (YAN et al., 2022).

Em contraste, as EPC de crescimento tardio, também denominadas células de crescimento endotelial (EOCs) ou células formadoras de colônias endoteliais (ECFCs), crescem em cultura de 14 a 21 dias, apresentam uma alta capacidade proliferativa, podem incorporar diretamente no endotélio de vasos recém-formados e formar estruturas tubulares quando fundidos em cultura com células endoteliais vasculares umbilicais humanas (OZKOK;YILDIZ, 2018). Além disso, elas secretam citocinas e produzem NO para manter seu crescimento e funcionamento adequado. Os marcadores fenotípicos para as EPC tardias incluem CD31, vWF e CD146 (YAN et al., 2023).

Na circulação periférica, o número de EPC circulantes é bastante baixo, entre 5 a 40 células/mm³, e apresentam os marcadores de superfície CD34, CD133, VEGFR-2, que podem definir diferentes populações (KIEWISZ et al., 2016). As células CD34⁻/CD133⁺/VEGFR-2⁺ são as precursoras de CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ e apresentam maior potencial na reparação vascular. A subpopulação CD34⁺/CD133⁻

/VEGFR-2⁺ são consideradas como EPCs tardias e estão relacionadas como células endoteliais maduras, coexpressando a eNOS (FRIEDRICH et al., 2006).

2.3 Mobilização, diferenciação e *homing* das EPC

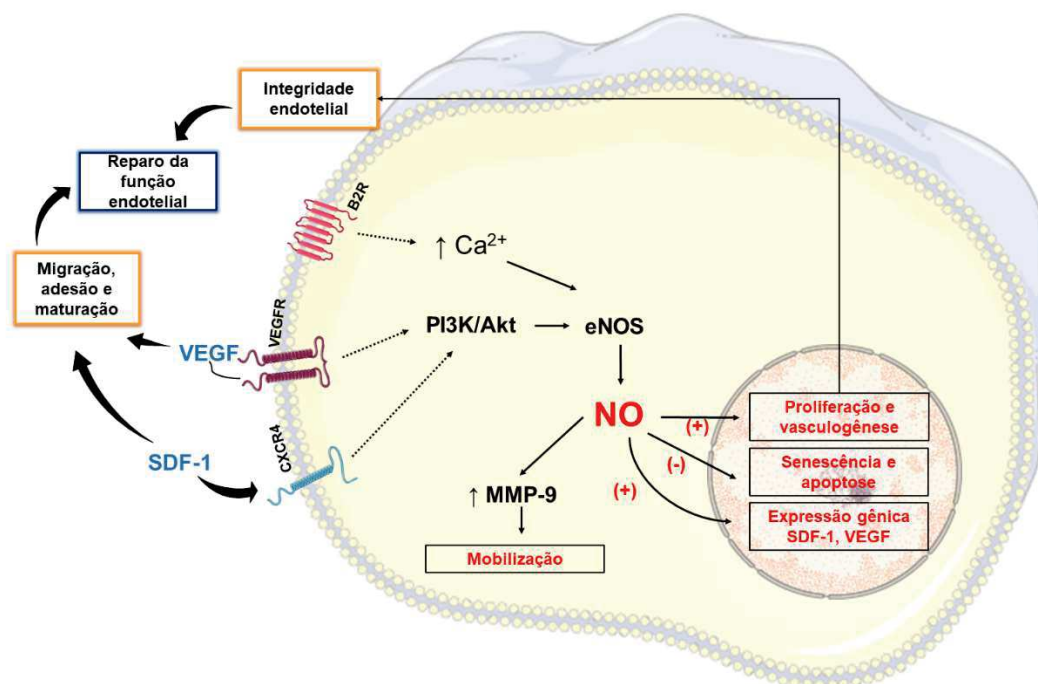
Em condições normais, a maioria das EPC da medula óssea permanecem em estado de quiescência em contato com as células estromais, em um microambiente com baixa tensão de oxigênio e altos níveis de moléculas quimioatraentes (NOVA-LAMPERTI et al., 2016). A permanência dessas células neste microambiente é dependente de integrinas que ligam as células progenitoras à células do estroma na medula óssea (LI, J.-H. et al., 2021). Em resposta ao estresse isquêmico e lesões endoteliais, é desencadeado uma sequência de ações complexas, como mobilização, proliferação, adesão, migração transendotelial, e secreção de citocinas angiogênicas para induzir a revascularização e originar novos vasos sanguíneos (YAN et al., 2022).

O processo de mobilização é iniciado por secreção do fator induzível por hipóxia-1 (HIF-1), que aumenta a produção e liberação de citocinas mobilizadoras, como o fator derivado de células estromais-1 (SDF-1), VEGF e fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) pelo tecido lesionado (CANJUGA et al., 2022).

Alguns estudos com modelos de infarto têm evidenciado que a interação SDF-1 e seu receptor CXCR4 está envolvida no recrutamento de células progenitoras da medula óssea para o tecido lesionado (LI et al., 2009). A expressão da eNOS nas células progenitoras, a qual sofre uma imensa variabilidade em consonância com a diferenciação celular (LIU et al., 2007) influencia a expressão do SDF-1 e estão altamente relacionadas com a migração das células progenitoras para o miocárdio isquêmico.

A fixação destas citocinas em seus receptores na membrana celular das EPC, culmina na ativação da via PI3K/ Akt/ eNOS e, conseqüentemente, induz o aumento da produção de NO (WILS et al., 2017), principal molécula reguladora da liberação de EPC da medula óssea por meio da ativação da matriz de metaloproteinase-9 (MMP-9) (Figura 4). A membrana das EPC, expressa o receptor c-kit, que são ativados pelo ligante sKitL, molécula ativada pelas MMP-9. Essa interação gera uma cascata de sinalização que leva ao efluxo das EPC da medula óssea (TILLING et al., 2009).

Figura 4 - Sinalização do NO na mobilização, proliferação e vasculogênese induzida por EPC



eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; **NO**: óxido nítrico; **SDF-1**: fator derivado de células estromais - 1; **CXCR4**: receptor de quimiocina 4 ; **B2R**: Receptor de bradicinina 2; **VEGF**: fator de crescimento endotelial vascular; **VEGFR-2**: receptor do fator de crescimento endotelial vascular tipo 2 **PI3K**: Fosfatidilinositol 3-cinase; **AKT**: Proteína Cinase B; **MMP-9**: matriz de metaloproteinase-9.

O aumento da produção do NO também promove a migração de EPC da medula óssea por estimular a síntese de fatores quimiotáticos com o SDF-1 e VEGF, o que ocorre de forma independente da via sGC/cGMP. A modulação de fatores de transcrição via nitrosilação ou alteração do estado redox da células parecem afetar a transcrição gênica das EPC e seu processo de migração e diferenciação (BONAFE et al., 2015).

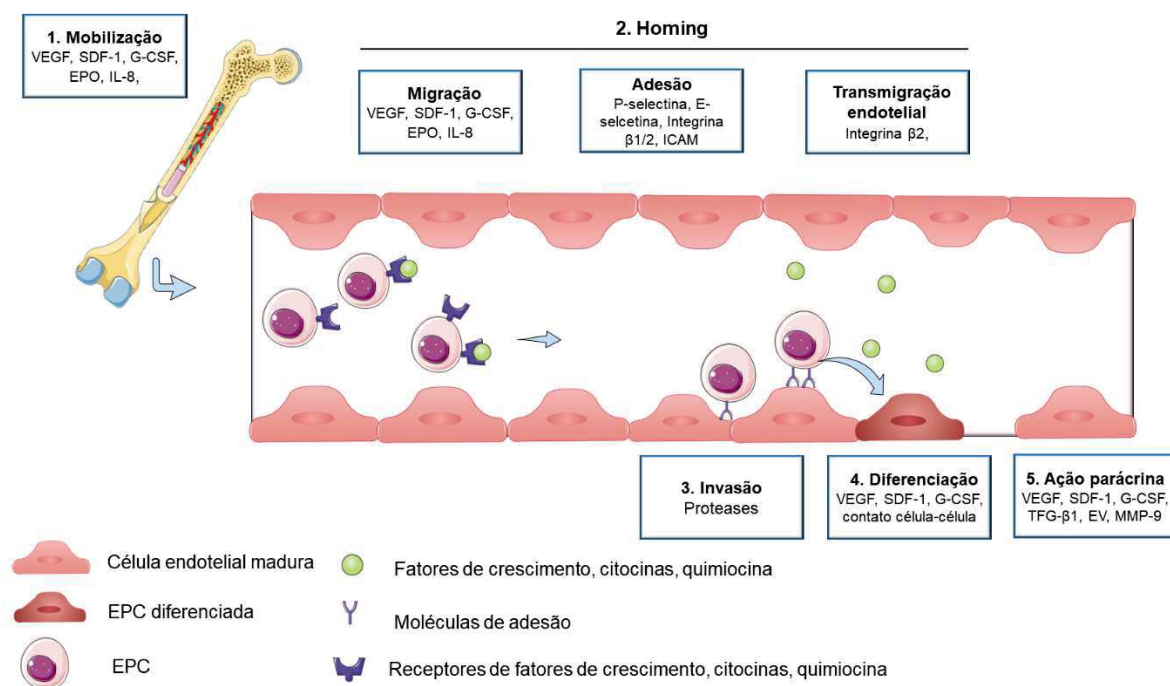
A mobilização e direcionamento das EPC são influenciadas por fatores físicos como estrutura vascular e taxa de fluxo sanguíneo (BAYRAKTUTAN, 2019). Além disso, a expressão endotelial de moléculas de adesão como P-selectina e E-selectina, desempenham um importante papel na adesão e migração das EPC. Essas moléculas interagem com o ligante-1 da glicoproteína P-selectina (SGL-1), presente na membrana das EPC, e medeiam incorporação das células progenitoras no endotélio isquêmico (CANJUGA et al., 2022). Além disso, o CD34 é um ligante da E-selectina, e a ligação fornece um mediador para o contato célula a célula. A adesão adicional

das EPC, ainda pode ocorrer através da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e receptores das integrinas $\beta 1$ e $\beta 2$, a parir da regulação positiva de E-selectina, uma vez que a produção de ICAM-1 depende principalmente da presença de E-selectina (LI, J.-H. et al., 2021).

2.4 Reparo endotelial e ação parácrina das EPC

A integridade da camada endotelial dos vasos sanguíneos depende do equilíbrio entre dano e reparo endotelial. Uma lesão estrutural e funcional irreversível nesta camada leva ao desenvolvimento de doença na parede vascular. O sinal de lesão mobiliza as EPC da medula óssea para a circulação periférica e, subsequentemente, atrai as células progenitoras para os locais de desnudamento endotelial. Após a adesão celular, as células então proliferam e se diferenciam em células endoteliais maduras (Figura 5) (LI, J.-H. et al., 2021).

Figura 5 - Papel das EPC no reparo endotelial



A hipóxia tecidual leva à mobilização de EPC da medula óssea para o sangue periférico. Após a estimulação quimioatrativa, essas células são atraídas para a zona de isquemia em um processo chamado homing, elas invadem o tecido perivascular e se diferenciam em células endoteliais maduras ou células musculares lisas. **TGF**: fator de crescimento tumoral, **eNOS**: óxido nítrico sintase endotelial, **G-CSF**: fator estimulante de colônias de granulócitos, **SDF-1**: fator derivado de células estromais -1, **VEGF**: fator de crescimento endotelial vascular, **EPO**: eritropoetina, **IL-8**: interleucina 8, **ICAM**: molécula de adesão intercelular-1, **EV**: vesícula extracelular, **MMP-9**: matriz de metaloproteinase-9.

Fonte: Gonçalves, 2023.

Vários estudos mostraram que EPC do sangue periférico podem induzir a renovação das células endoteliais, por meio da diferenciação em células endoteliais maduras funcionais (NAITO et al., 2012; PATEL et al., 2017; WAKABAYASHI et al., 2018). Já foi demonstrado que o transplante de EPC pode ser usado como uma estratégia terapêutica para a revascularização em camundongos imunodeficientes (KALKA et al., 2000).

Níveis crescentes de EPC na circulação periférica e em áreas isquêmicas estão correlacionados à restauração e recuperação do tecido após a lesão (MARTI-FABREGAS et al., 2013; TSAI et al., 2014; ZHAO et al., 2019). Em vista disso, estudos clínicos revelam que os altos níveis de EPC não apenas diminuem a ocorrência de eventos vasculares, mas também promovem a neovascularização isquêmica e a recuperação funcional após lesão isquêmica (HEISS et al., 2005; LI, Y.; CHANG, S.; et al., 2018).

Cui e colaboradores (2011) administraram por via intravenosa EPC marcadas com proteína fluorescente verde (GFP-EPC) em modelos de ratos com disfunção endotelial induzida por ligadura da artéria carótida esquerda. Nesses animais, GFP-EPC foram detectados no local do endotélio danificado, participando do processo de reendotelização e reduzindo a hiperplasia neointimal. Desta forma, as EPC demonstram ter um papel ativo no reparo tecidual (CUI et al., 2011). Ademais, estudos demonstraram que EPC transfundidas *in vivo* podem promover a proliferação de células endoteliais, reendotelizar vasos sanguíneos e inibir a hiperplasia das CML pela secreção de VEGF, TGF- β 1, IGF-1 e outras citocinas adjacentes (WANG et al., 2021).

Neste sentido, muitos experimentos mostraram que EPC secretam citocinas e fatores de crescimento, incluindo VEGF, fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), G-CSF, fator de crescimento transformante beta-1 (TGF- β 1), vesículas extracelulares (EV) e matriz extracelular, o que fornece para o tecido lesionado um microambiente favorável para a mobilização adicional de EPC, além de promover a sobrevivência das células residentes, garantido a regeneração vascular (WANG et al., 2021).

A produção parácrina de EPC pode ser dividida em três tipos: o primeiro é por secreção de VEGF, SDF-1, G-CSF e outras citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas que, em conjunto, promovem a angiogênese, proliferação de células endoteliais e migração de EPC; o segundo ocorre por conexão das células endoteliais

por meio de um nanotubo, para a transmissão de mensagens; o terceiro tipo envolve a secreção de EV, incluindo corpos apoptóticos, microvesículas e exossomos que envolve a comunicação intercelular em condições fisiológicas e patológicas (YAN et al., 2023). Desta forma, a secreção parácrina de EPC parece ser um dos principais mecanismos para promover a revascularização, uma vez que a liberação dos fatores pró-angiogênico promove o recrutamento de EPC com capacidade regenerativa e células endoteliais saudáveis, o que permite a reconstrução da rede vascular (MEDINA et al., 2017; PERROTTA et al., 2020).

EPC não estão apenas envolvidas na neovascularização fisiológica, mas também apresenta um papel importante na regeneração tecidual sob várias condições fisiopatológicas, como na hiperlipidemia (ROSSI et al., 2013; LI, T.-B. et al., 2018), doença arterial coronariana (TAGAWA et al., 2015), acidente vascular cerebral (RAKKAR et al., 2020) e hipertensão (FERNANDES, Tiago et al., 2012; YU et al., 2019). Entretanto, nessas condições, as funções das EPC geralmente são prejudicadas, o que compromete seu papel na manutenção da integridade endotelial e homeostase vascular (PENG et al., 2015a).

2.5 Potencial regenerativo das EPC nas doenças cardiovasculares

Doenças cardiovasculares (DCV) representam a principal causa de morte em todo o mundo. Apesar de várias estratégias para ampliar as formas de diagnóstico e tratamento, estima-se que a cerca de 22 milhões de mortes serão ocasionadas por DCV no ano de 2030 (PERROTTA et al., 2020). Além disso, à medida que a expectativa de vida aumenta, prevê-se o aumento da prevalência e da complexidade dessas condições. A etiologia e a progressão da DCV são multifatoriais, por variar desde a genética até fatores externos, como estilo de vida, diabetes, obesidade, hipertensão e hipercolesterolemia (MORRONE et al., 2021).

A contagem e função de EPC são amplamente afetadas nas DCV, visto que a disfunção endotelial é um fator determinante para o risco cardiovascular (MUDYANADZO, 2018). Em pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM), as contagens de EPC são significativamente superiores quando comparados aos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) estável (SAMMAN TAHHAN et al., 2018). Essa divergência é explicada devido a uma alteração na intensidade de mobilização das EPC dos diferentes estágios. Alguns minutos após a ocorrência do

IAM existe uma intensa mobilização de EPC, que atinge o pico após vários dias e se normaliza em 60 dias (MASSA et al., 2005).

Em indivíduos com síndrome coronariana aguda, EPC parecem ter um efeito ambivalente por promover a integridade endotelial e induzir a angiogênese promovendo o crescimento da placa (RIPA et al., 2007; HRISTOV;WEBER, 2008; PADFIELD et al., 2013).

Além disso, a lipoproteína de baixa densidade oxidada (Oxi-LDL) também induz a senescência da EPC, o que prejudica a sua função e revascularização (IMANISHI et al., 2008). No diabetes, defeitos quantitativos e comprometimento funcional de células-tronco foram amplamente relatados (GUR et al., 2010; BEREZIN, 2017; XU et al., 2018). No geral, a forte associação de EPC com fatores de risco cardiovasculares está de acordo com o conceito emergente de que as EPC podem ser consideradas como novos biomarcadores que refletem a integridade e a capacidade de reparo do endotélio (MUDYANADZO, 2018).

Neste sentido, nos últimos anos o potencial regenerativo das EPC nas DCV tem sido amplamente utilizado em estudos pré-clínicos e clínicos por meio de diferentes abordagens, incluindo *Stent* de captura de EPC, a injeção autóloga e mobilização farmacológica (BIANCONI et al., 2018).

Stent de captura EPC é um dispositivo de aço inoxidável com um revestimento intermediário de polissacarídeo covalentemente, acoplado com anticorpos CD34 anti-humanos. Após a sua implantação no vaso lesionado, EPC circulantes são atraídas em virtude da presença do anticorpo CD34, entra em diferenciação celular e contribui para formação de um novo vaso sanguíneo (QIU et al., 2018). Ensaios clínicos randomizados realizados com os *Stents* de captura de EPC mostraram que eles eram seguros e não houve evidência de aumento do risco de doença cardíaca após a vigilância do mercado (CHONG et al., 2016).

Em um modelo de rato de isquemia miocárdica, a infusão intravenosa de EPC isoladas da circulação periférica expandido *ex vivo* viabilizou a neovascularização miocárdica, que contribui para a estabilidade da função ventricular (Kawamoto et al., 2001). Resultados conflitantes foram encontrados em diferentes ensaios clínicos, com alguns estudos relatando uma melhora precoce significativa, mas modesta, na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (Huikuri et al., 2008, Meyer et al., 2006, Schächinger et al., 2006, Strauer et al., 2001), enquanto outros falharam em encontrar um efeito

benéfico significativo na função cardíaca (Beitnes et al., 2011, Janssens et al., 2006, Tendera et al. , 2009).

Losordo e colaboradores mostraram que pacientes com angina refratária que receberam injeções intramiocárdicas de células CD34⁺ derivadas da circulação periférica, tiveram menos episódios de angina e maior tolerância ao exercício em comparação com aqueles que receberam placebo (Losordo et al., 2011). Uma meta-análise de vinte e oito ensaios clínicos randomizados explorou os efeitos da terapia celular EPC na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, tamanho do infarto e reações adversas em pacientes com infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST. A terapia celular melhorou a fração de ejeção do VE em 12 meses em 3,15% (Li et al., 2016).

Apesar de muitas evidências apontarem o transplante de EPC como uma terapia promissora, estudos clínicos demonstram baixa taxa de migração e baixa retenção de EPC circulantes para promover a angiogênese, o que limita a utilização desta terapia. Assim, novas estratégias são necessárias para permitir o tratamento eficiente com EPC (CANJUGA et al., 2022), o que inclui terapia genética, injeções locais fatores mobilizadores ou mobilização farmacológica (BIANCONI et al., 2018; QIU et al., 2018).

A abordagem da mobilização farmacológica de EPC é uma opção terapêutica prontamente transferível para a prática clínica por várias razões, tais como: redução de manipulação de células; segurança dos agentes/procedimentos mobilizadores propostos; e potencial para tratar locais inacessíveis (BIANCONI et al., 2018). Neste sentido, várias pesquisas têm buscado substâncias capazes de melhorar a funcionalidade das EPC para induzir o reparo endotelial, sobretudo na hipertensão.

2.6 Células progenitoras endoteliais e papel sobre a hipertensão arterial

Hipertensão arterial (HA) é uma condição clínica multifatorial de grande prevalência mundial, que contribui de forma direta ou indireta para 45% das mortes por DCV associadas a condições cardíacas e 51% das mortes associadas a doenças cerebrovasculares. Esta condição clínica é caracterizada pela elevação sustentada da pressão arterial sistólica (PAS) ≥ 140 mmHg e pressão arterial diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg (BARROSO et al., 2021).

Hipertensão primária ou essencial é caracterizada por não apresentar uma causa identificável para a elevação da pressão arterial, enquanto que a hipertensão secundária ou adquirida é causada por uma condição identificável, como por exemplo, doença renal crônica, diabetes mellitus, anemia, hipotireoidismo, entre outras (TAN;THAKUR, 2020). A hipertensão essencial corresponde a 95% dos casos e constitui sério ônus para a saúde pública, uma vez que não apresenta uma cura definitiva e está associada a complicações cardiovasculares a longo prazo (MANCIA, 2015).

Devido à natureza complexa e multifatorial da hipertensão, vários mecanismos vêm sendo propostos para explicar a patogênese e os danos associados aos órgãos-alvos (LUO et al., 2016). Entre eles, uma hipótese amplamente aceita envolve as alterações estruturais e funcionais do endotélio vascular, que é um dos principais componentes envolvidos na lesão subclínica dos órgãos-alvo e na progressão de aterosclerose na hipertensão (GKALIAGKOUSI et al., 2015). Além disso, estudos têm demonstrado que os níveis de EPC circulantes se encontram reduzidos em pacientes hipertensos, além de ser observada uma disfunção destas células, que leva ao reparo do dano endotelial inadequado (ZUBCEVIC et al., 2014).

Vários estudos básicos e clínicos com EPC têm sido realizados no contexto da hipertensão arterial. Em um estudo de Coorte envolvendo 45 pacientes com doença arterial crônica, foi sugerido que hipertensos crônicos apresentavam um comprometimento mais acentuado na função das EPC (VASA et al., 2001). Posteriormente, não apenas a funcionalidade das EPC foi demonstrada como também foi observado que o número de colônias de EPC *in vitro* era significativamente menor em pacientes com hipertensão quando comparados a pacientes normotensos (SUZUKI et al., 2014).

Ademais, diversos estudos comprovaram que a hipertensão também se relaciona com a alteração nos níveis circulantes e expressão de genes (PIRRO et al., 2007; COPPOLINO et al., 2008; HUANG, P.-H. et al., 2010; DE CAVANAGH et al., 2014). No entanto, alguns estudos demonstraram uma relação inversa com o número de EPC circulantes, apresentando um aumento nos níveis de pacientes com hipertensão arterial (PIRRO et al., 2007; SHANTSILA et al., 2011). Essas inconsistências são explicadas em grande parte pela natureza heterogênea do

desenho experimental dos estudos, realizando a quantificação em pacientes com estágios diferentes de hipertensão (LUO et al., 2016).

Nos estágios iniciais da hipertensão, a disfunção endotelial generalizada leva ao aumento da mobilização de EPC, com consequente aumento dos níveis de EPC circulantes. No entanto, devido ao aumento do estresse oxidativo, característica da HA, as EPC passam a ter uma baixa capacidade proliferativa e iniciam um processo acelerado de senescência. À medida que a HA progride, torna-se mais acentuada a disfunção das EPC, que agrava ainda mais a disfunção endotelial. Este processo pode levar a um aumento transitório nos níveis de EPC circulantes, que leva à depleção das reservas de EPC na medula óssea. Assim, esse declínio severo da atividade das EPC exacerba a desregulação endotelial, o que desencadeia múltiplos danos finais e maiores chances de resultados cardiovasculares adversos (LUO et al., 2016).

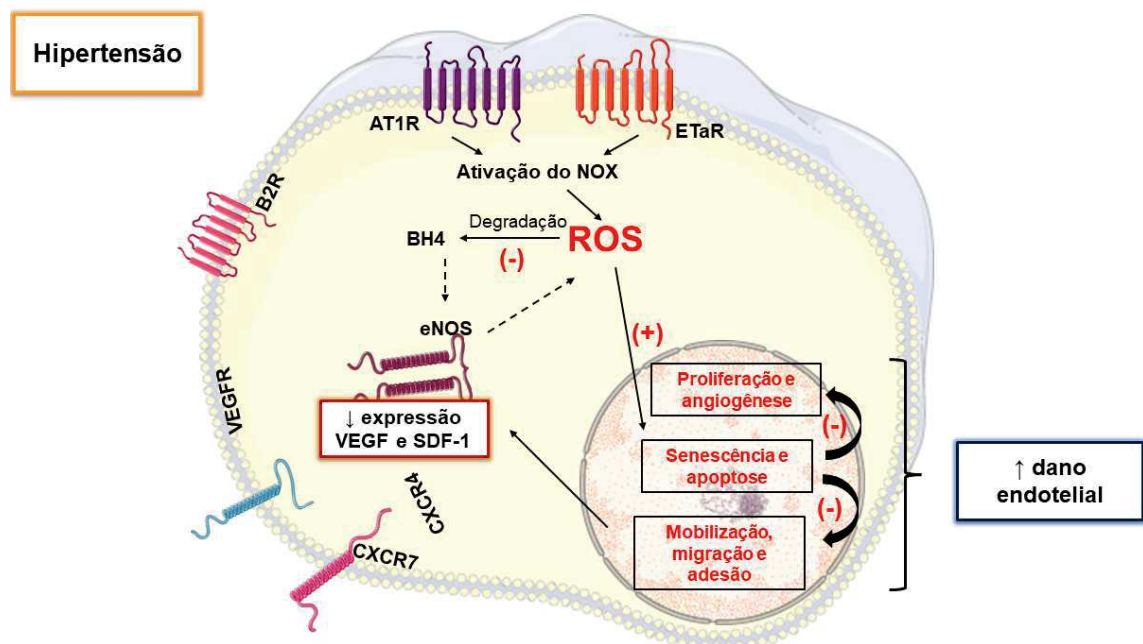
Além da alteração do número de células circulantes, a hipertensão apresenta uma relação com o tempo de vida células das EPC. Em pacientes com hipertensão essencial ou em ratos espontaneamente hipertensos, o número de EPC senescentes circulantes aumentou significativamente em relação aos controles normotensos (ZHOU et al., 2010). De maneira semelhante foi observado que a senescência das EPC estava relacionada a função endotelial prejudicada em pacientes hipertensos e pré-hipertensos. Isto sugere que a disfunção das EPC tem valor preditivo para o desenvolvimento da hipertensão (GIANNOTTI et al., 2010).

Os mecanismos moleculares que envolvem a disfunção das EPC na HA estão intimamente relacionados com o aumento estresse oxidativo (BRIONES;TOUYZ, 2010). Durante o desenvolvimento do quadro hipertensivo, há um desequilíbrio entre os mecanismos pró-oxidante e antioxidante, o qual resulta em aumento na geração de ROS (GODO;SHIMOKAWA, 2017). Esta elevação ocorre devido à ativação da enzima NADPH-oxidase, cuja a principal função é catalisar a reação da síntese de ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), além da redução de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase e catalase (CAT) (BRETON-ROMERO;LAMAS, 2014).

Além disso, há uma diminuição na biodisponibilidade de NO, ocasionada devido à redução da expressão e/ou desacoplamento da sintase de óxido nítrico (NOS),(VANHOUTTE et al., 2017), ou em virtude de sua interação com $O_2^{\bullet-}$, resultando na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) (AGARWAL et al., 2006). O $ONOO^-$

e $O_2^{\bullet-}$ podem causar danos às mitocôndrias, que pode contribuir para a morte celular necrótica e apoptótica do endotélio, e favorecer um desnudamento desta camada e redução adicional NO disponível (KHAN et al., 2001). Ademais, promove a senescência celular, apoptose e diversos efeitos prejudiciais as EPC, o que reduz a mobilização, migração e adesão dessas células por reduzir a expressão de fatores quimiotático que atuam neste processo, intensificando o dano endotelial (LIU et al., 2013b) (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática do efeito do estresse oxidativo sobre as EPC.



AT1R: Receptor Tipo I da Angiotensina II; **NOX:** NADPH oxidase; **BH4:** Tetra-hidrobiopterina; **ROS:** Espécies Reativas de Oxigênio; **eNOS:** Síntase do Óxido Nítrico Endotelial; **CXCR7:** receptor de quimiocina 7; **CXCR4:** receptor de quimiocina 4 ; **B2R:** Receptor de bradicinina tipo 2.

Fonte: Gonçalves, 2023.

A redução dos níveis de NO é um dos principais fatores da disfunção de EPC, pois a síntese desta molécula se relaciona com a melhora da migração, proliferação e angiogênese das EPC (Figura 5). O aprimoramento das funções das EPC está relacionado com a regulação positiva na expressão de vários fatores de angiogênese, como VEGF e SDF-1, e de seus receptores. A interação desses fatores com seus respectivos alvos intervém a quimiotaxia das EPC aos locais de ruptura endotelial e forma um ciclo de *feedback* positivo do reparo endotelial. Esse evento fortalece ainda mais as funções angiogênicas de EPC e aumenta o tempo de vida útil das células por

meio da ativação de vias da janus cinase 2 (JAK-2), proteína cinase ativada por mitógeno p38 (MAPK p38) e da fosfoinositol 3-cinase (PI3K) (LIU et al., 2013a).

O sistema nervoso autônomo (SNA) desempenha um papel essencial na mobilização de EPC a partir da medula óssea (ZUBCEVIC et al., 2011). O sistema parassimpático está relacionado com o estímulo da mobilização de EPC, enquanto o sistema simpático reduz a mobilização destas. Portanto, como a HA é caracterizada pela superatividade simpática e subatividade parassimpática, ocorre a regulação negativa da mobilização e adesão das EPC jovens e tardias. Há também uma correlação entre a contagem de EPC cultivadas e a extensão da dilatação mediada pelo fluxo braquial, sugerindo que as alterações da EPC podem estar associadas a danos na função vascular (DE CAVANAGH et al., 2014). Em contrapartida com o sistema simpático, de forma interessante, foi relatado que as EPC tardias expressam receptores nicotínicos de acetilcolina, cuja ativação se relaciona com a modulação positiva da atividade da EPC (YU et al., 2011).

EPC expressam em sua membrana celular receptores de angiotensina II (AT1R) e de aldosterona (MR), ambos componentes do SRA (ENDTMANN et al., 2011; THUM et al., 2011). Ao ocorrer a ativação desses receptores, uma cascata de sinalização intracelular é desencadeada e leva à ativação da NADPH-oxidase. Tal evento gera o aumento da produção de ROS e diminuição de NO, o que induz o processo de apoptose e senescência celular, resultado na disfunção da EPC (FU et al., 2018). Em contrapartida, a enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2), que catalisa a formação da ANG II em angiotensina 1-7 (ANG 1-7), vem demonstrando melhorar os efeitos protetores das EPC sobre as lesões das células endoteliais (WANG et al., 2020).

Estresse de cisalhamento é um forte indutor do fator de necrose tumoral α (TNF- α), além de outros fatores pró-coagulantes ou pró-inflamatórios pelas células endoteliais. Por sua vez, o TNF- α apresenta um papel prejudicial na diferenciação, mobilização e funcionalidade das EPC, por regular negativamente a expressão do VEGFR-2, SDF-1 e de isoformas de NOS (RODRÍGUEZ-CARRIO et al., 2018). Outro potencial regulador na fisiologia das EPC são as micropartículas endoteliais, fragmentos complexos lançados a partir de células endoteliais que estão em apoptose ou ativadas por vários estímulos, como inflamação (DIGNAT-GEORGE;BOULANGER, 2011). As micropartículas endoteliais estão associadas ao

aumento da inflamação, processo de coagulação e alteram a homeostase endotelial vascular, bem como ocorre uma redução no número de EPC circulante, o que compromete a função vascular (ZHANG, G. et al., 2020).

Terapias antioxidantes têm sido relatadas eficazes em minimizar o dano cardiovascular, por aprimorarem o reparo dano endotelial mediado pelas EPC (MATSUMURA et al., 2009; SUZUKI et al., 2014; KATAKAWA et al., 2016). Desta forma, o estudo de substâncias antioxidantes que tenham a possibilidade de reverter esses efeitos são de suma importância devido a gravidade desta condição clínica. Neste contexto, destaca-se o carvacrol, um agente anti-hipertensivo que possui propriedade antioxidante, alvo de estudo do nosso grupo de pesquisa.

2.7 Carvacrol

Os produtos naturais desempenharam um papel importante na descoberta de medicamentos e constituem a base para o desenvolvimento de grande parte dos medicamentos (CHOPRA;DHINGRA, 2021). Mais de 80 das 371 substâncias farmacêuticas incluídas na Nona Edição da Farmacopeia Internacional (Ph. Int.) são produtos naturais ou derivados de produtos naturais (ZREIKAT et al., 2014) (ORGANIZATION, 2006).

Na antiguidade, os produtos naturais foram descobertos por erros e tentativas. Entretanto ao longo dos anos com o conhecimento acumulado sobre as atividades das plantas, informações valiosas são fornecidas para o desenvolvimento de novos medicamentos (NEWMAN;CRAGG, 2016). Os antigos documentos escritos originários do norte da África, Índia e China mostraram o registro mais antigo de práticas clínicas. Essas práticas clínicas foram acumuladas e escritas como enciclopédias de drogas em todo o mundo com civilizações antigas, como “*Ebers Papyrus*” do Egito, “*De Materia Medica*” da Grécia, “*Shen Nong Ben Cao*” da China, relatando diferentes ervas e formulações como medicamentos (ABDEL-RAZEK et al., 2020). Essa herança de sabedoria e experiência antigas inspirou a descoberta de drogas modernas. A descoberta dos efeitos terapêuticos dos produtos naturais invocou o isolamento de compostos ativos (ZHANG, L. et al., 2020).

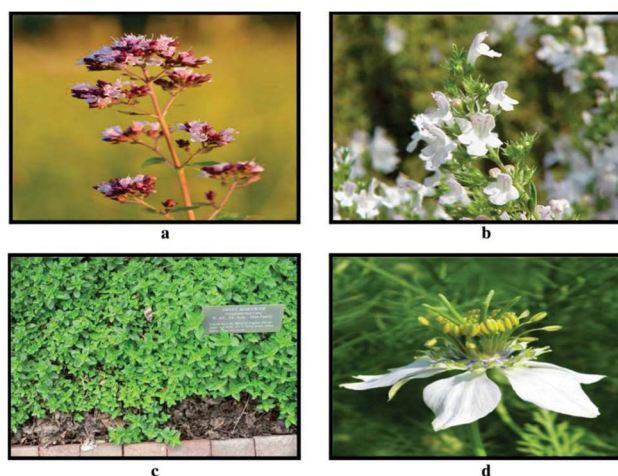
Atualmente, existe um grande interesse sobre a pesquisa em óleos essenciais de diferentes fontes vegetais com potencial atividade antioxidante. Comumente, óleos

essenciais têm sido relatados como promissores no desenvolvimento de agentes terapêuticos aplicados a doenças cardiovasculares (DE ANDRADE et al., 2017).

Os principais constituintes dos óleos essenciais são os terpenos (DE CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ et al., 2013; QUINTANS et al., 2019). De acordo com a regra do isopreno desenvolvida por Wallach, os terpenos são constituídos por unidades isoprênicas (cinco carbonos) e, moléculas que possuem duas dessas unidades (dez carbonos) em sua estrutura, são classificados como monoterpenos (KOZIOŁ et al., 2014; HILLIER;LATHE, 2019).

O carvacrol, um monoterpenóide fenólico encontrado em óleos essenciais de *Origanum dictamnus* (dittany de creta), *Origanum vulgare* (orégano) , *Origanum majorana* (manjerona), *Thymbra capitata* (orégano espanhol), *Thymus vulgaris* e *Thymus zygis* (tomilho), *Thymus serpyllum* (tomilho banco), *Satureja montana* (salgado de inverno) e *Nigella sativa* (Figura 7) (SHARIFI-RAD et al., 2018; SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015).

Figura 7 - Plantas que possuem carvacrol em seu óleo essencial.

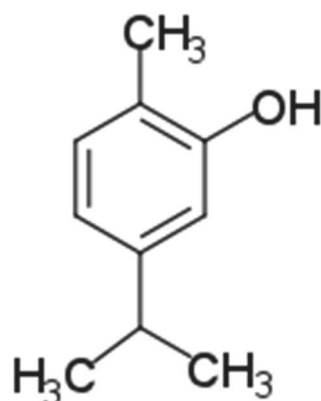


Plantas que possuem carvacrol na composição do seu óleo essencial. a) *Origanum vulgare* (óregano), b) *Satureja montana* (salgado de inverno), c) *Origanum majorana* (manjerona), d) *Nigella sativa*.

Fonte: RAJPUT et al., 2018.

O carvacrol, 5-Isopropil-2-metilfenol, possui fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$ e peso de 150,22 g/mol (Figura 8), característica pungente e odor aromático. Apresenta-se em forma líquida de coloração amarelo claro, cuja densidade é de 0,977 g/mL (20 °C). Seu ponto de fusão é de 2 °C e seu ponto de ebulição é de 234 – 236 °C. Apresenta solubilidade máxima em água de 0,11 g/L⁻¹ (SAMARGHANDIAN et al., 2016).

Figura 8 – Estrutura do carvacrol.



Fonte: Gonçalves, 2023.

Quanto as informações sobre toxicologia, já foi relatado que a DL_{50} em ratos é de 810 mg/kg de peso corporal quando administrado por via oral (HAGAN *et al.*, 1967; SUNTRES, COCCIMIGLIO, ALIPOUR, 2015). O carvacrol mostrou uma atividade fraca nos estudos de mutagenicidade. Além disso, no estudo do metabolismo, mostrou ser excretado na urina pós 24 horas inalterado ou como conjugados de glucoronideo e sulfato (VINCENZI *et al.*, 2004).

Este monoterpreno tem se destacado por apresentar diversas atividades farmacológicas, incluindo atividade antifúngica (CHAVAN; TUPE, 2014) e antibacteriana (NOSTRO *et al.*, 2007; DU *et al.*, 2008), antiviral (GILLING *et al.*, 2014), antioxidante (EL-SAYED *et al.*, 2015; SAMARGHANDIAN *et al.*, 2016), anti-inflamatória (FACHINI-QUEIROZ *et al.*, 2012) e anticarcinogênica (YIN *et al.*, 2012).

A capacidade antioxidante do carvacrol pode ser explicada pela capacidade de doação de hidrogênio, capacidade de inibir a produção de ROS e possuir propriedade de eliminação de radicais ABTS (ácido 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) e DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy). Sarmarghandian e colaboradores mostraram que o carvacrol pode ser uma ferramenta preventiva para o estresse oxidativo no fígado envelhecido, restaurando a deficiência de SOD e, conseqüentemente, diminuindo os níveis de MDA (SAMARGHANDIAN *et al.*, 2016).

Em cardiomiócitos, o carvacrol também foi capaz de induzir proteção antioxidante por aumentar os níveis de SOD e CAT e diminuir o malonaldeído (MDA), o que pode estar implicado no efeito antiapoptótico revelado por Chen e grupo na modelagem de isquemia/reperfusão miocárdica em ratos (CHEN *et al.*, 2017a). Em modelo de stresse oxidativo induzido por lipopolisacarideo (LPS) o carvacrol

demostrou reverter o dano oxidativo o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) regulando de forma positiva a expressão de enzimas antioxidantes (NAEEM et al., 2021).

Em nível vascular, o carvacrol proporciona um efeito protetor contra a vasculopatia induzida pela diabetes, revertendo as alterações morfológicas aórticas, evidenciadas por um aumento da espessura na camada média-intimal e um aumento do número de camadas de CML vascular (LIU et al., 2020). Além disso, o carvacrol atenua a inflamação vascular induzida pelo diabetes através da regulação negativa da sinalização de TLR4/Nf-kB *in vitro* e *in vivo*. O nível sérico de citocinas inflamatórias como Tnf- α , IL-8 e interleucina-1 Beta (IL-1 β) também foi regulado em ratos tratados com carvacrol (ZHAO et al., 2020)(ZHAO et al., 2020).

O carvacrol foi descrito como um agonista/antagonista de diferentes canais iônicos e receptores de potencial transitório (TRP) e canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav) (ALMANAITYTE et al., 2020). Essas ações explicam, pelo menos em parte, a hipotensão e a bradicardia induzidas pelo carvacrol. Nesse contexto, Dantas e colaboradores demonstraram que o carvacrol é capaz de induzir hipotensão tanto por bradicardia quanto por vasodilatação periférica, mecanismo pelo qual envolve, pelo menos em parte, a inibição do influxo de Ca²⁺ pelos canais Cav e TRP (DANTAS et al., 2015). Além disso, o carvacrol também ativa canais de potássio (Kv) operados por voltagem para vasodilatação, e os bloqueios desses canais reduzem significativamente a potência do carvacrol e os índices de eficácia na aorta de ratos (TESTAI et al., 2016).

Além disso, o carvacrol demonstrou inibir a formação de placas de ateroma (LEE et al., 2015), aumenta os níveis de enzimas antioxidantes e a ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em modelo de isquemia e reperfusão (CHEN et al., 2017a) e reduz a senescência celular em modelo de envelhecimento induzido por d-galactose (DANTAS et al., 2022) . Ademais, o carvacrol instigou a angiogênese de células mesenquimais humanas por meio da diferenciação dessas células *in vitro* (MATLUOBI et al., 2018).

Estudos preliminares realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento com o carvacrol por quatro semanas foi capaz de melhorar a pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), como também melhorou a reatividade vascular e reduziu o estresse oxidativo (GONÇALVES, 2018).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.2 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do carvacrol na modulação de células progenitoras endoteliais e na regeneração endotelial, através de estudos *in vitro* e *in vivo*.

3.3 Objetivos específicos

Avaliar o efeito do carvacrol sobre as EPC em modelo de estresse oxidativo induzido por ANG em relação a:

- Viabilidade, citotoxicidade e proliferação celular.
- Estresse oxidativo.
- Adesão celular.
- Modulação da via eNOS/NO.
- Síntese de fatores antioxidantes.

Avaliar o efeito do carvacrol sobre o tratamento de animais hipertensos quanto a:

- Pressão arterial sistólica e frequência cardíaca.
- Produção, mobilização e reparo endotelial mediado pelas EPC.
- Função das EPC.
- Modulação do estresse oxidativo e senescência celular.
- As alterações histopatológicas em artéria mesentérica superior.

Materiais e métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2 Tipo de estudo e considerações éticas

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) e no Biotério do Laboratório de Ensaio Pré-Clínico em Envelhecimento localizado no Instituto Paraibano de Envelhecimento ambos situados na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa. Tratou-se de um estudo experimental com ensaios farmacológicos e moleculares utilizando técnicas *in vivo* e *in vitro*. Para operacionalização da pesquisa, o projeto foi submetido à análise para apreciação e julgamento pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB sendo aprovado sob número de parecer 2171120320.

4.3 Animais

Os protocolos foram desenvolvidos utilizando *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar pesando de 250-300g, para os experimentos *in vitro*, e Wistar Kyoto e Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) com 11 semanas de idade, para os experimentos *in vivo*. Os animais foram provenientes da Unidade de Produção Animal do IPerFarm/UFPB e do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Todos os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Ensaio Pré-Clínico em Envelhecimento/UFPB, sob condições controladas de temperatura do ar (21 ± 1 °C) e umidade relativa (40-60%), em um ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração (Nuvilab CR1®, Nuvital S.A., Curitiba, PR). Os animais foram acomodados em gaiolas plásticas micro-isoladoras de dimensão 497x341x265 (CxLxA, em mm), cada uma com no máximo 4 ratos.

4.4 Substâncias e reagentes

Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes substâncias: soro fetal bovino (SFB), 4'6-diamino-2-phenylidolo dihydrochloride (DAPI) obtidos da Cultilab® Interprise instrumentos analíticos LTDA (Recife, Brasil). Acetato de angiotensina II humana (ANG II), fibronectina obtida de plasma bovino,

gelatina 2%, dimetil sulfóxido (DMSO), solução estabilizadora de penicilina/estreptozotocina, solução de Tripsina 0,5% EDTA, Cremofor®, meio 199, dihidroetídio (DHE), albumina sérica bovina (BSA), selante fluoroshield com DAPI, *Ficoll®-Paque PLUS density gradient media* (Cytiva® life sciences), todos obtidos da Sigma-Aldrich® Brasil Ltda (São Paulo - SP, Brasil). O Cloridrato de xilazina foi obtido da Ceva (Paulínia-SP, Brasil) e cloridrato de cetamina obtido da Syntec (Hortolândia-SP, Brasil). Heparina sódica suína (Hepamax-s®) obtida da Blau Farmacêutica S.A. (Cotia - SP, Brasil). O resveratrol foi obtido da AJ Comercio Farmacêutico LTDA (João Pessoa-PB, Brasil).

Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix, Anti-malonaldeído monoclonal, Anti-catalase policlonal, Anti-SOD1 policlonal, todos obtidos da Life Tech Brasil Com Ind Prod Bio LTDA. Anti-eNOS PE 33/eNOS, Anti-eNOS (PS1177), anti-CD31 FITC, obtidos da Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda. Corante 7-aminoactinomycin (7-AAD), 4,5-Diaminofluoresceína (DAF-2) anti-CD34 e anti-VEGFR-2 e anti-CD133 obtidos da Cultilab® Interprise instrumentos analíticos LTDA (Recife, Brasil).

4.5 Obtenção e preparação das soluções de carvacrol

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) utilizado foi obtido da Sigma-Aldrich Brasil LTDA, com 98% de pureza, referência: 282197-10G, fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$, massa molecular de 150,217 g/mol e densidade 0,98 g/mL.

Para os testes *in vitro* o Carvacrol foi solubilizado em 100% DMSO e diluído em solução salina fisiológica (PBS) de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental. As concentrações de DMSO em solução nunca excederam 0,01%.

Para os testes *in vivo* foi preparada uma emulsão de carvacrol solubilizando-o em cremophor®, que foi utilizada como solução estoque. As concentrações utilizadas para o tratamento dos diferentes grupos experimentais, foram obtidas a partir da diluição da solução estoque em solução salina até a obtenção das concentrações necessárias, com uso máximo de 24 horas. A concentração do adjuvante na administração não excedeu 0,03%.

4.6 Soluções nutritivas e meios de cultura

O preparo das soluções fisiológicas foi realizado a partir da utilização das seguintes substâncias: cloreto de sódio (NaCl), obtido da Dinâmica Química Contemporânea LDTA (Indaiatuba-SP, Brasil), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) sal dissódico, obtido Química Moderna Indústria e Comércio (Baurueri – SP, Brasil), fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$) e fosfato de sódio bifásico (Na_2HPO_4), todos provenientes da VETEC (Rio de Janeiro - RJ, Brasil). As soluções fisiológicas utilizadas para a realização dos experimentos tiveram o pH ajustado entre 7,2-7,4. Nos quadros a seguir estão discriminadas as suas composições.

Quadro 1 - Composição da solução salina fisiológica.

Substância	Concentração (mmol/L)
NaCl	161,0

Quadro 2 - Composição da solução PBS

Substância	Concentração (mmol/L)
NaCl	161,0
NaH_2PO_4	1,8
Na_2HPO_4	15,8

Fonte: (FOLDVARI et al., 1998)

Quadro 3 - Composição da solução PBS/EDTA.

Substância	Concentração (mmol/L)
NaCl	161,0
NaH_2PO_4	1,8
Na_2HPO_4	15,8
EDTA	0,5

Fonte: (FONG et al., 2017)

Para os ensaios de cultivo celular foi utilizado o Meio EGM™-2 BulleKit™, obtidos da Lonza® do Brasil Especialidades Químicas LDTA e meio 199 obtido da

Sigma-Aldrich® Brasil Ltda (São Paulo - SP, Brasil). Os meios de cultura utilizados tiveram o pH ajustado entre 7,2-7,4 e após o preparo sob condições estéreis foram mantidos entre 0 e 4°C e somente retirados no momento de cada experimento. A seguir estão discriminadas as suas composições:

Meio EGMTM-2 BulleKitTM: meio EBMTM-2 suplementado com fator de crescimento epidérmico humano (hEGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento básico de fibroblasto humano (hFGF-b), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), hidrocortisona, gentamicina e anfotericina, soro fetal bovino 2%, ácido ascórbico e heparina, obtidos da Lonza® (Walkersville Inc. Walkersville, MD, USA).

Meio 199: Meio 199 com sais de Hanks', bicarbonato de sódio e glicose.

4.7 Avaliação dos efeitos do Carvacrol sobre a modulação de EPC e células endoteliais *in vitro*

4.7.1 Delineamento dos experimentos *in vitro*

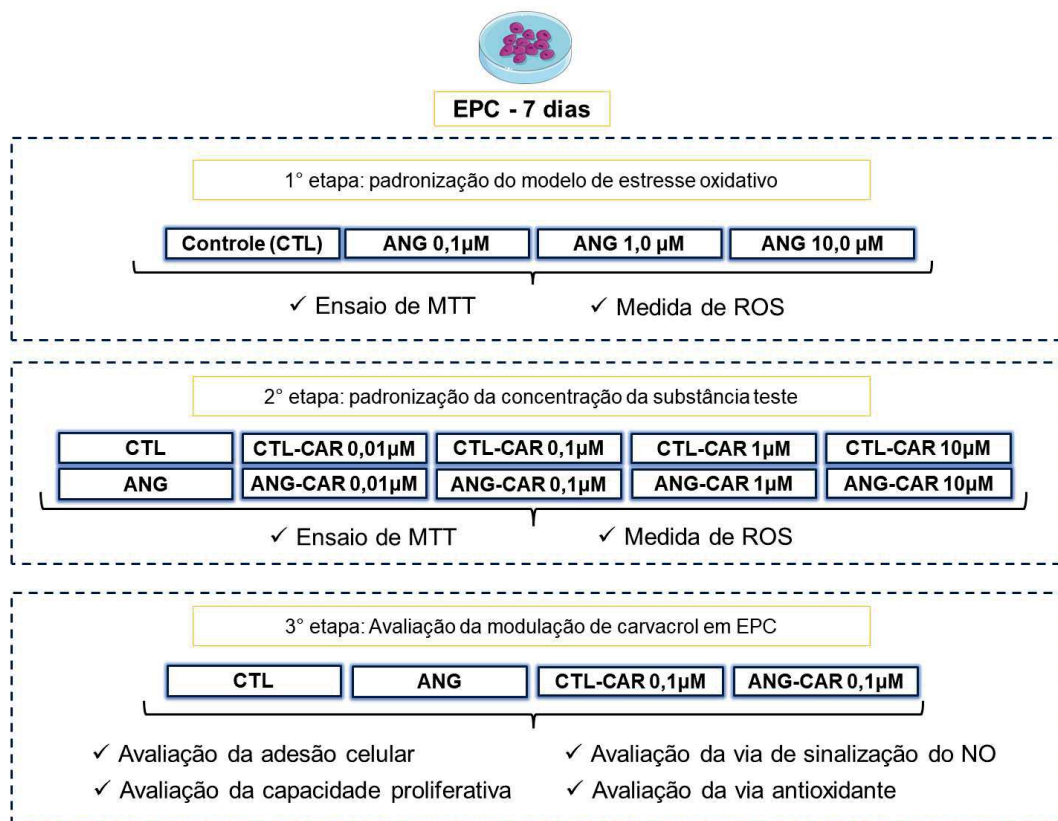
Para o desenvolvimento deste estudo utilizamos como modelo de estresse oxidativo a ANGII, um potente indutor da sinalização oxidativa. O modelo celular adotado inclui EPC jovens (sete dias de cultivo celular). Os protocolos experimentais propostos foram divididos em três etapas:

1ª etapa: consistiu na padronização do modelo experimental devido à ausência de uma concentração padrão de ANG II na literatura neste tipo celular, tendo como critério para a definição o efeito de diferentes concentrações da ANG II (0,1, 1,0 e 10µM) sobre a viabilidade celular e formação de ROS intracelular.

2ª etapa: Avaliação da viabilidade celular e estresse oxidativo nos seguintes grupos experimentais: CTL (veículo); ANG (1 µM), CTL-CAR 0,01 µM, CTL-CAR 0,1 µM, CTL-CAR 1 µM, CTL-CAR 10 µM, ANG-CAR 0,01 µM, ANG-CAR 0,1 µM, ANG-CAR 1 µM, ANG-CAR 10 µM.

3ª etapa: avaliação dos efeitos do carvacrol sobre a função das EPC, foram dispostos os seguintes grupos experimentais: grupo 1: controle (CTL), grupo 2: angiotensina 1 µM (ANG), grupo 3: carvacrol 0,1µM (CTL-CAR); grupo 4: angiotensina 1 µM + carvacrol 0,1µM (ANG-CAR) (Figura 9).

Figura 9 - Delineamento experimental da avaliação do efeito do carvacrol in vitro.

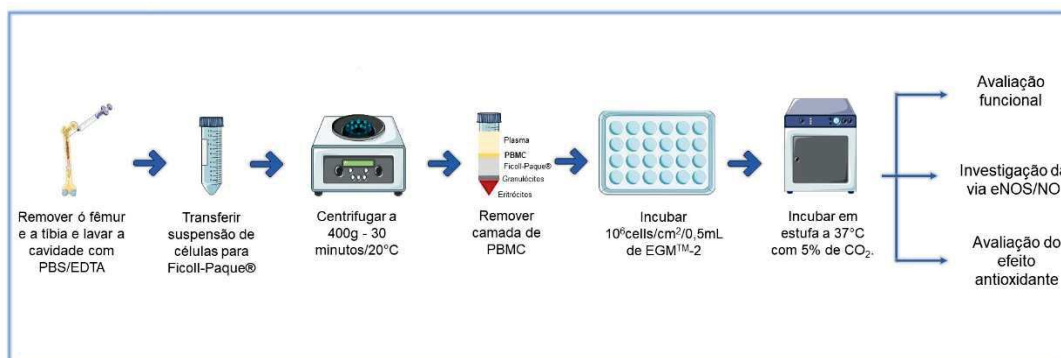


Fonte: GONÇALVES, 2023.

4.7.2 Isolamento e cultivo de EPC derivadas da medula óssea

As células mononucleares foram extraídas da medula óssea de ratos Wistar (CHEN et al., 2020). Após a eutanásia do animal, o fêmur e a tíbia foram separados e dissecados e as epífises foram abertas permitindo a perfusão da medula com 10mL de PBS/EDTA (Figura 2). O aspirado de medula óssea foi coletado em um tubo cônico e as células foram centrifugadas a 600 x g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 10 ml de meio 199 e adicionado em uma solução de *Ficoll®-Paque PLUS density gradient media* (Cytiva® life sciences, Uppsala, Suécia), na proporção 1:1, e centrifugados a 400 x g por 30 min a 21° C (Figura 10).

Figura 10 - Processo de extração e cultivo de EPC da medula óssea.



Fonte: GONÇALVES, 2023.

Após a centrifugação diferencial, aspirou-se a camada de células mononucleares, que foi transferida para um tubo cônico, ao qual foi acrescentado 10 mL de PBS/EDTA e fez-se uma nova centrifugação a 400 x g por 10 min a 4° C. Em seguida, removeu-se o líquido sobrenadante e acrescentou-se 10 mL de PBS/EDTA e procedeu-se uma nova centrifugação. Este processo foi repetido por mais uma vez e, ao seu final, células viáveis foram transferidas para placa de 24 poços, previamente tratadas com fibronectina (1µg/mL), na proporção de 10⁶/1 cm²/0,5mL de meio EBM™-2, suplementado com hEGF, VEGF, hFGF-b, IGF-1, hidrocortisona, gentamicina e anfotericina, soro fetal bovino 2%, ácido ascórbico e heparina (Lonza, USA) e mantidos em incubadora de cultivo celular com 5% de CO₂ a 37°C e umidade relativa de 90%.

Após 72 horas as células não aderentes foram descartadas, procedendo-se a troca do meio de cultivo a cada dois dias até completar os 7 dias de cultivo celular, quando se procedeu os ensaios experimentais. A caracterização das EPC foi realizada através da marcação de CD34⁺/VEGFR-2⁺.

4.7.3 Avaliação de viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular foi realizada por meio do ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), um método colorimétrico que mede indiretamente a viabilidade celular. O MTT é um sal tetrazólico o qual é convertido por células viáveis com metabolismo ativo em produto de formazan de cor púrpura. O produto formazan do tetrazólio MTT acumula-se como um precipitado insolúvel no interior das células, além de se depositar próximo à superfície celular e

no meio de cultura. Desta forma, o formazan deve ser solubilizado antes de registrar as leituras de absorbância por espectrofotometria. Quando as células se encontram inviables, a capacidade de converter MTT em formazan é perdida, sendo um marcador útil e conveniente apenas para células viáveis (RISS et al., 2016).

As células foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de 4×10^4 /poço por 24 horas. As células foram tratadas com ANG II nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10 μ M e/ou com o carvacrol foi incubado nas concentrações de 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 μ M e mantidas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C por mais 24 horas. Em seguida foi adicionado 10 μ L da solução de MTT (5mg/mL; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e as células foram incubadas por mais 3 horas. Os sobrenadantes foram descartados e 100 μ L de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais de formazan. A absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro (*iMark™ Microplate Absorbance Reader*, Heiwajima, Ota-ku, TO, JPN), no comprimento de onda de 490 nm. A viabilidade das células foi calculada de todos os outros grupos, por comparação com o número de células do grupo controle (células não tratadas). Os experimentos foram realizados em triplicata de 3 ns independentes.

4.7.4 Avaliação da formação de ROS intracelular

A sonda DHE é amplamente utilizada para detecção do ânion superóxido presente no citosol, devido à sua capacidade de difusão passiva para o interior das células e alta reatividade. No interior da célula, o DHE é oxidado pelo ânion superóxido, formando um produto intermediário, o 2-hidroxi-etídio (2-OHEt⁺), o qual intercala com o DNA e leva à exibição de uma fluorescência vermelha. O 2-hidroxi-etídio é excitado em 500 nm e tem um espectro de emissão a 580 nm (WOJTALA et al., 2014).

Após semear as células em placas de 24 poços a uma densidade de 4×10^4 /poço em 400 μ L de meio de cultivo celular a ANG II foi incubada nas concentrações de 0.1, 1.0 e 10 μ M ou o carvacrol foi incubado nas diferentes concentrações (0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 5,0 e 10,0 μ M) na presença e ausência de ANG II por 24 horas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37° C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e carregadas com 10 μ M de DHE, durante 40 minutos a 37°C em estufa ao abrigo da luz. Ao final da incubação com DHE, as células foram lavadas

com PBS e realizada a leitura no citômetro FACS Canto-II (BD, Santa Mônica, CA, EUA), sendo considerado para análise 10.000 eventos. Os dados foram expressos como percentual de fluorescência, normalizados pela fluorescência emitida pelo grupo controle. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7.5 Avaliação da adesão celular

Para o teste de adesão celular realizamos a contagem do número de células aderidas, através da coloração celular com hematoxilina e eosina (LI, C. et al., 2021). Inicialmente placas de 24 poços foram revestidas com fibronectina (1mg/mL) diluída com DMEM/F12 durante a noite a 4° C. Após 24 horas de incubação com as substâncias teste (veículo, ANG 1µM, CAR 0,1µM) as EPC foram tratadas com solução de tripsina (0,25%)/ EDTA (0,02%) e inoculadas na placa de 24 poços (4 x 10⁴ células/mL), onde foram cultivadas por 1 h. Passando esse período, as EPC foram lavadas com PBS para remover as células não aderidas. As células aderidas foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 10 min, seguido da lavagem das células com PBS. O número de células aderentes foi contado ao microscópio através da análise de 5 campos. Os dados foram expressos em razão do percentual de células aderidas em função do número total de células semeadas.

4.7.6 Ensaio de mobilização celular

O ensaio de proliferação celular foi realizado pelo método de cicatrização de ferida adaptado do método descrito por Li e colaboradores (LI et al., 2017). As EPC foram incubadas conforme os grupos experimentais descritos no item 4.6.1 (CTL, ANG, CTL-CAR, ANG-CAR) por 24 horas em incubadora de CO₂ (5%) umidificada (90%) a 37°C. Após 24 horas o meio foi removido e procedeu-se um arranhão linear utilizando uma ponta de pipeta de 10 µl. Em seguida as células foram lavadas com PBS duas vezes e posteriormente foram incubadas com EBM-2 livre de soro. As imagens foram tiradas utilizando microscópio de luz invertido (*Advanced inverted fluorescent Microscope: Nikon Eclipse TE 2000-S, Nikon®*) nos tempos de 0 e 24 horas em uma ampliação de 40x. O tamanho da ferida foi medido em 3 poços por grupo e analisados no software ImageJ versão 1.50i.

4.7.7 Avaliação da expressão de eNOS

Para avaliação da expressão da sintase de óxido nítrico endotelial total (eNOS), foi utilizado a técnica de citometria de fluxo conforme descrito por Radziwon-Balicka (RADZIWON-BALICKA et al., 2017). Após a incubação dos diferentes grupos experimentais (CTL, ANG, CTL-CAR, ANG-CAR), as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, durante 20 minutos à 37 °C e ao final lavadas três vezes com PBS. Em seguida, realizou-se o procedimento de permeabilização com triton-x100 0,1%, por 15 minutos à 37 °C. Ao final do tempo, as células foram novamente lavadas com PBS, e então foi adicionado uma solução de bloqueio, que consistiu em PBS e BSA 5%, durante duas horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as EPC foram ressuspensas e incubadas com anticorpo conjugado anti-eNOS (1:50; Bdbiosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) durante 1h em temperatura ambiente. As amostras foram lavadas com PBS e analisadas no citômetro FACS Canto-II (BD, Santa Mônica, CA, EUA), sendo considerado para análise 10.000 eventos.

4.7.8 Ensaio da produção de NO

A sonda DAF-2 é um fluoróforo comumente utilizado para a detectar a concentração plasmática de NO. O DAF-2DA ao atravessar a membrana plasmática é hidrolidado por esterases citoplasmáticas, formando o composto não fluorescente DAF-2. Na presença do NO, o DAF-2 é convertido em em triazol fluoresceína (DAF-2T), sendo a forma fluorescente, que pode ser observado em um filtro de 480nm e um filtro de emissão de 515nm (VALLE et al., 2019).

Após 24 horas de incubação com carvacrol e ou/angiotensina, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 1h com a sonda DAF-2 1µM (Thermofisher, Waltham, MA, USA) a 37°C e 5% CO₂. O excesso da sonda foi removido com PBS e tripsinizadas e ressuspensas em PBS contendo 3% de SBF. As amostras foram analisadas no citômetro FACS Canto-II (BD, Santa Mônica, CA, EUA), sendo considerado para análise 10.000 eventos.

4.7.9 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada através da expressão da superóxido dismutase, catalase e do fator Nrf2 foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. As EPC foram semeadas em placas de 24 poços previamente revestidas fibronectina na proporção de 1×10^5 /células por poço e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com as diferentes substâncias, de acordo com os grupos experimentais descritos no item 4.6.1 (CTL, ANG, CTL-CAR, ANG-CAR) e novamente incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas.

Após o período de incubação o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS por três vezes e posteriormente fixadas com paraformaldeído a 4% por 10 minutos a 37°C. As células foram lavadas três vezes com PBS, permeabilizadas com triton X-100 (0,1%) e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, as células foram novamente lavadas com PBS e em sequência incubadas com a solução de bloqueio contendo 2% de BSA a temperatura ambiente por 60 minutos. Ao final do tempo, foi adicionado os anticorpos primários anti-SOD (5µg/mL, Invitrogen™, Waltham, MA, USA), anti-CAT (5µg/mL, Invitrogen™, Waltham, MA, USA) ou anticorpo policlonal Nrf2 (1:100, Invitrogen™, Waltham, MA, USA) previamente diluído em 0,1% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Procede-se a lavagem das células por três vezes com PBS e posteriormente foram incubadas com Alexa Fluor 633-conjugated anti-rabbit IgG (1:100, Invitrogen™ Waltham, MA, USA) a temperatura ambiente por 45 minutos. Por fim, as células foram lavadas com PBS e analisadas no citômetro FACS Canto-II (BD, Santa Mônica, CA, EUA), sendo considerado para análise 10.000 eventos.

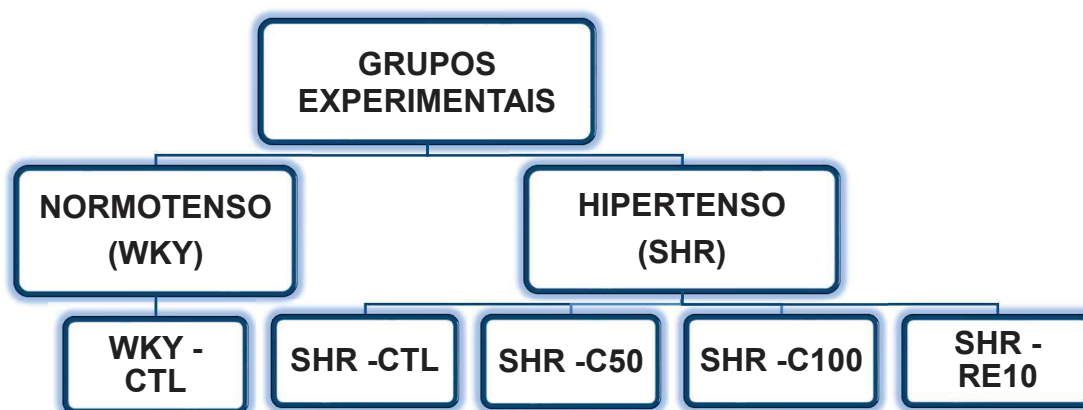
4.8 Avaliação dos efeitos do tratamento com Carvacrol sobre a modulação o de EPC

4.8.1 Delineamento experimental

Para verificar o efeito do carvacrol sobre a modulação da regeneração vascular, foi utilizado como modelo animais espontaneamente hipertensos (SHR), modelo que apresenta alterações morfológicas nos vasos, caracterizado e padronizado na literatura para estudo associados a hipertensão arterial. Para o desenvolvimento deste estudo os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais: controle normotenso (WKY-CTL), controle hipertenso (SHR-CTL), hipertenso tratado com

carvacrol na dose de 50 mg/kg (SHR-C50), hipertenso tratado com carvacrol na dose de 100 mg/kg (SHR-C100), hipertenso tratado com resveratrol na dose de 10mg/kg (SHR-RE10), como no esquema abaixo.

Figura 11 - Esquema dos grupos de ratos utilizados para a investigação do efeito de carvacrol a regeneração vascular.



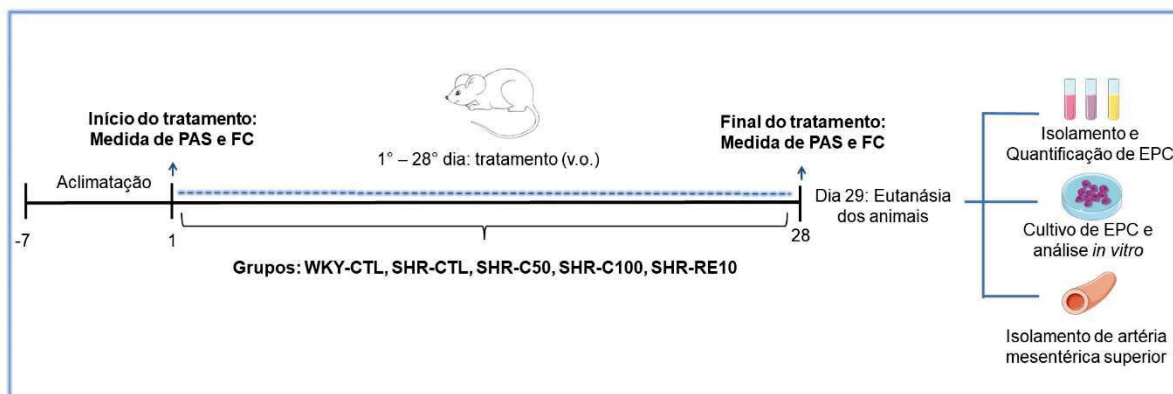
WKY: Ratos Wistar Kyoto tratados com salina; SHR: Ratos espontaneamente hipertensos; SHR-CTL: Ratos espontaneamente hipertensos tratados com salina; SHR-C50: Ratos espontaneamente hipertensos tratados com 50 mg/kg/dia de carvacrol; SHR-C100: Ratos espontaneamente hipertensos tratados com 100 mg/kg/dia de carvacrol. SHR-RE10: Ratos espontaneamente hipertensos tratados com 10 mg/kg/dia de resveratrol.

Fonte: GONÇALVES, 2023.

Todos os tratamentos foram administrados diariamente por via intragástrica (i.g.) em volume padronizado de 5 mL/kg (MACHHOLZ et al., 2012), por um período de quatro semanas. Os grupos controles receberam solução salina diluído com o veículo (cremofor®), na mesma proporção utilizada para diluir a maior dose de carvacrol.

As doses administradas de carvacrol de 50 e 100 mg/kg. Como controle positivo foi utilizado o resveratrol na dose de 10 mg/kg, por ser uma substância amplamente estudada devido aos seus efeitos antioxidantes apresentar benefícios sobre o sistema cardiovascular. Durante o tratamento os animais tiveram o peso monitorado semanalmente. A pressão arterial e frequência cardíaca foram monitoradas ao início e final do tratamento, enquanto a extração de EPC e avaliação histopatológica foram apenas realizadas ao final do tratamento (Figure 11).

Figura 12 - Delineamento experimental do tratamento



PAS: Pressão arterial sistólica; FC: Frequência cardíaca; EPC: Células progenitoras endoteliais; V.O.: Via oral; WKY: Ratos Wistar Kyoto tratados com salina; SHR: Ratos espontaneamente hipertensos; SHR-CTL: Ratos espontaneamente hipertensos tratados com salina; SHR-C50: Ratos espontaneamente hipertensos tratados com 50 mg/kg/dia de carvacrol; SHR-C100: Ratos espontaneamente hipertensos tratados com 100 mg/kg/dia de carvacrol. SHR-RE10: Ratos espontaneamente hipertensos tratados com 10 mg/kg/dia de resveratrol.

Fonte: Gonçalves, 2018.

4.8.2 Avaliação dos efeitos do carvacrol sobre a PA e FC

O método de plestimografia de cauda foi adotado para a realização da medida de pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC). Inicialmente os animais foram climatizados durante sete dias, para que houvesse uma adaptação ao equipamento e consequentemente reduzir os interferentes nas medições de PAS e FC relacionadas ao estresse do animal. Antes das medições cada animal foi alocado em uma caixa aquecida por 10 minutos, para promover a dilatação da artéria caudal. Em seguida, os animais foram alocados numa câmara de restrição de acrílico, sob aquecimento e apenas com a cauda para fora do restritor, onde foram acoplados a uma bomba para a insuflação e o sensor de piezo elétrico (TN1012/ST *Pulse Transducer*, ADInstruments, Bella Vista, NSW, AU) para a medida de pulso.

A bomba de insuflação acoplada ao manguito e o sensor foram acoplados a um sistema de aquisição de dados (*PowerLab*, ADInstruments, Unit 13, 22 Lexington Drive, Bella Vista, NSW, Australia) para registro do pulso correspondente ao fluxo sanguíneo. Ao observar os sinais de pulso e FC estáveis, o manguito foi insuflado para promover a interrupção do fluxo sanguíneo na artéria perdendo assim o pulso captado pelo sensor. Em seguida, o manguito foi desinflado para haver o retorno do fluxo de sangue e consequentemente regresso do pulso caracterizando a PAS

(WANG et al., 2017). Já para a análise da FC foram selecionados intervalos de 10 segundos entre os ciclos de aferição.

Os sinais a partir do sensor de pulso foram convenientemente amplificados e depois digitalizados e registrados pelo *software Labchart®* (versão 7,1, Colorado Springs, CO, EUA), para posterior análise. Os valores da PAS e FC foram calculados a partir da média aritmética de três aferições consecutivas.

4.8.3 Isolamento de EPC da medula óssea de animais tratados com carvacrol

Os animais foram anestesiados e eutanasiados para a dissecação e obtenção do fêmur e da tíbia (CHEN et al., 2020). Posteriormente, foi realizada a remoção das epífises e as cavidades dos ossos foram lavados com 10mL de PBS/EDTA. Em seguida as células foram centrifugadas a 600g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 10 ml de meio 199. O sangue coletado e o lavado da medula óssea foram adicionados ao *Ficoll®-Paque PLUS density gradient media* (Cytiva® life sciences), para separação das células os quais foram centrifugados a 400g por 30 minutos a 21°C. A camada de células mononucleares foi coletada e transferida para um tubo cônico onde foi adicionado uma solução lisante, para remover as hemácias presentes no meio. As células foram centrifugadas a 250g por 10 minutos a 4°C. Por fim, as EPC foram lavadas com PBS duas vezes e foram destinadas aos experimentos de citometria de fluxo para sua quantificação e caracterização ou para os experimentos de cultivo celular. Apenas suspensões com mais de 95% de viabilidade foram utilizadas para os experimentos de cultivo celular.

4.8.4 Isolamento de EPC da circulação periférica de animais tratados com o carvacrol

Os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (10 e 75 mg/kg, respectivamente, i.p.), e em seguida foi realizada uma laparotomia para a punção da veia cava inferior, onde foi coletado 10 mL de sangue periférico diluído em 2% de EDTA. Após a coleta o sangue foi adicionado na proporção 1:1 em *Ficoll®-Paque PLUS density gradient media* (Cytiva® Life sciences, Uppsala, SE), uma solução de Ficoll PM400, diatrizoato de sódio e EDTA dissódico de cálcio, utilizada para facilitar a rápida recuperação de células mononucleares viáveis, e foi centrifugado a 400g por 30 min a temperatura ambiente (KUNDU et al., 2017). Após a centrifugação foi obtida

camada de células mononucleares (Figura X), que foi coletada e adicionada em PBS, sendo submetida a uma nova centrifugação de 250g por 10 minutos, este processo foi repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação o sobrenadante foi descartado obtendo-se por fim as EPC e destinadas ao experimento de citometria de fluxo para sua quantificação e caracterização ou para os experimentos de cultivo celular. Apenas suspensões com mais de 95% de viabilidade foram utilizadas para os experimentos de cultivo celular.

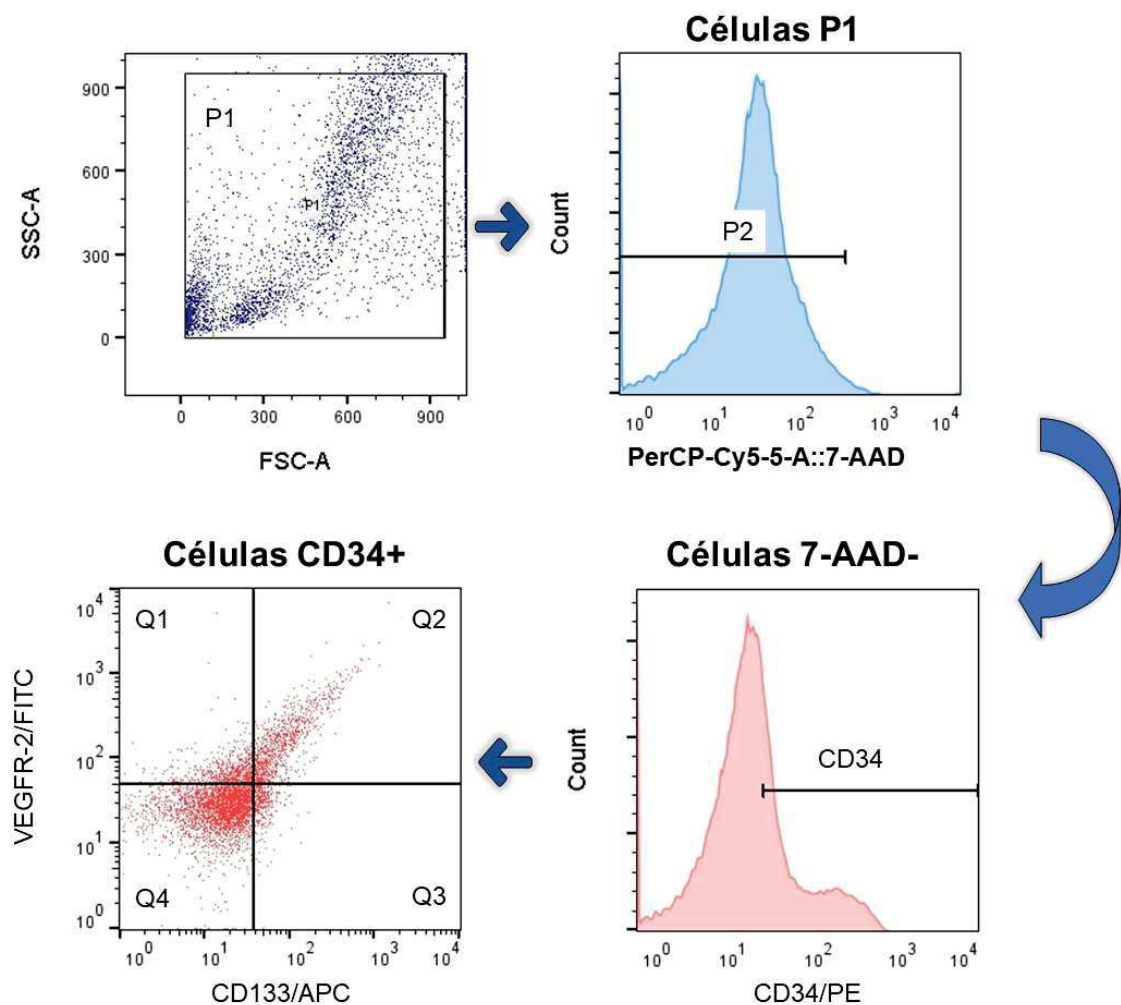
4.8.5 Quantificação e caracterização de EPC de animais tratados com carvacrol

A quantificação e caracterização de células progenitoras endoteliais foi realizada por citometria de fluxo para observar a expressão de antígenos CD34, CD133, VEGFR2. Estes são os marcadores de superfície específicos mais consensuais atualmente utilizados para caracterizar EPCs, que incluem antígenos que definem a linhagem hematopoética e sua imaturidade, CD34 e CD133, em combinação com um marcador de linhagem endotelial, VEGFR-2 (HEINISCH et al., 2022). A escolha destes antígenos permitirá a investigação de subpopulações com propriedades vasculogênicas: CD34⁺/CD133⁺/VEGFR2⁺, CD34⁺/CD133⁺ e CD34⁺/VEGFR2⁺. E como marcador de viabilidade celular foi utilizado o 7-AAD.

Após o isolamento das células do sangue periférico e medula óssea, as células foram contadas no citômetro e diluídas para alcançar a proporção de $10^6/100\mu\text{L}$. Em seguida, as amostras foram marcadas com FITC-anti-VEGFR-2 (1:50; Santa Cruz biotechnology, Dallas, TX, EUA) + PE-anti-CD34 (1:50; Santa Cruz biotechnology, Dallas, TX, EUA) + APC-anti-CD133 (1:10; BioLegend, San Diego, CA, EUA) e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS e ressuspensas em 100 μL de solução fisiológica, onde foi adicionado ao meio PerPCP-Cy5-7-AAD (0,25 $\mu\text{g}/10^6$; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA), o qual foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Prosseguindo, foi adicionado 500 μL de PBS as células as quais foram encaminhadas para centrifugação a 250g por 5 minutos a 4°C, para remoção do excesso de anticorpos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em PBS. Cada análise foi realizada com a população em 100.000 eventos utilizando o citômetro FACSCANTO (Becton Dickinson, San José, CA, EUA). Para a análise das populações, inicialmente, selecionamos as populações de células mononucleares. Em

seguida utilizamos a população de células viáveis (7-AAD) marcadas com o CD34, por ser um marcador de células hematopoiéticas. Para caracterizar a população final selecionamos as células 7-AAD-/CD34+ para avaliar a expressão de CD133 e VEGFR-2. A figura 13 ilustra a estratégia dos *gating* de citometria de fluxo utilizados para identificar as EPC.

Figura 13 - Estratégia representativa do *gating* de citometria de fluxo



Count: contagem; **SSC:** *side scatter*; **FSC:** *forward scatter*; **P1:** População de células 1; **PerCPCy5-5:** PerCP-Cyanine5.5; **7-AAD:** 7-Aminoactinomycin D; **PE:** ficoeritrina; **FITC:** isotiocianato de fluoresceína; **APC:** alofococianina.

Fonte: Gonçalves, 2023.

4.8.6 Avaliação funcional da EPC após o tratamento com o carvacrol

4.8.6.1 *Avaliação funcional das células progenitoras endoteliais por observação de unidade formadora de colônia*

Após o tratamento do carvacrol foi avaliado as propriedades de clonogenicidade das EPC, que é definida pela capacidade de duplicação demonstrada pelo seu potencial em formar colônias. Para determinar o número de unidades formadoras de colônia (UFC) após o cultivo celular de sete dias em placas de 24 poços as células foram inspecionadas através de um microscópio invertido com ampliação de 40X (NIKON Eclipse TS100, Tokyo, Japan). Para cada poço foi realizada a fotografia de dez campos, para posterior análise. Dois analisadores diferentes calcularam manualmente o número médio de colônias, os quais foram expressos através da média de UFC por 10^6 células plaqueadas.

4.8.6.2 *Avaliação da expressão e síntese de eNOS após o tratamento carvacrol em EPC*

Para avaliação da expressão da sintase de óxido nítrico endotelial total (eNOS) e sintase de óxido nítrico endotelial fosforilada (ps1177), foi utilizado a técnica de citometria de fluxo conforme descrito por Radziwon-Balicka (RADZIWON-BALICKA et al., 2017). Resumidamente, após sete dias de cultivo celular, as EPC foram fixadas com paraformaldeído 4%, durante 20 minutos à 37 °C e permeabilizadas com triton-x100 0,1%, por 10 minutos à 37 °C. Em seguida, foi adicionado uma solução de bloqueio, que consistiu em PBS e BSA 5%, durante duas horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as EPC foram ressuspensas e incubadas com anticorpos primário anti-eNOS (1:50; Bd Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) ou anti-eNOS ps1177 (1:100; Bd Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) durante 1h em temperatura ambiente. As amostras foram lavadas com PBS e incubadas com PE-conjugated anti-mouse IgG (Invitrogen™, Waltham, MA, EUA) por 1h no escuro. As amostras foram analisadas no citômetro FACS Canto-II (BD, Santa Mônica, CA, EUA), sendo considerado para análise 10.000 eventos.

4.8.6.3 *Avaliação do efeito do tratamento de carvacrol sobre a produção de ROS*

A análise de ROS foi realizada utilizando o DHE, conforme descrito no item 4.6.4 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Brevemente, as EPC cultivadas dos diferentes grupos, foram carregadas com DHE 10 μ M, durante 40 minutos a 37 °C no escuro. Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e analisadas em microscopia de fluorescência (NIKON Eclipse Ti-E, NIKON, Japão). A intensidade de fluorescência foi avaliada através do software NIS elemental® versão 4.2 por dois analisadores diferentes através da observação de 10 campos. Os dados foram expressos na forma de Δ de porcentagem de fluorescência, normalizados pela fluorescência emitida pelo DHE do grupo controle. A fluorescência obtida para os diferentes grupos de tratamento foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta\% \text{ Fluorescência} = (\text{TRATADO} - \text{CONTROLE}) \times 100 / \text{CONTROLE}$$

4.8.6.4 *Avaliação da senescência celular por citometria de fluxo*

Para medir a atividade SA- β -gal por citometria de fluxo, usamos o substrato fluorogênico C₁₂FDG (5-dodecanoilaminofluoresceína Di- β -D-galactopiranosídeo, Invitrogen, Life Technologies SAS), de acordo com a metodologia previamente descrita por Khemais-Benkhiat. Após o cultivo celular de sete dias, as foram lavadas com PBS e posteriormente pré-tratadas por 1h com cloroquina (300 μ M), com o objetivo de elevar o pH dos lisossomos. Em seguida, procedeu-se uma nova lavagem com PBS e foi incubado no meio C₁₂FDG (33 μ M) por 1h temperatura ambiente, ao abrigo da luz. No final do período de incubação, as EPC foram lavadas com PBS gelado por três vezes, tripsinizadas e imediatamente analisadas (KHEMAIS-BENKHIAT et al., 2020) no FACS Canto-II (BD, Santa Mônica, CA, EUA), sendo considerado para análise 10.000 eventos.

4.8.7 Avaliação do reparo endotelial mediado pelo carvacrol após o tratamento

4.8.7.1 *Avaliação da produção de ânion superóxido em artéria mesentérica superior isolada de ratos*

Segmentos de artéria mesentérica superior incluídas em meio ótimo de temperatura de corte (OCT) foram congeladas por meio do nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até microtomia em criostato (*Cryostat Leila*, Nussloc, DE) a -20°C.

Posteriormente, os cortes de tecido foram lavados com PBS e incubados com 5 µM da sonda DHE, ao abrigo da luz, em câmara úmida, por 30 minutos à 37°C. As secções de artéria mesentérica superior foram lavadas com PBS a 37°C, três vezes por um minutos, para a remoção do excesso da sonda fluorescente. As lâminas foram deixadas em repouso para até o total esgotamento do PBS e adicionou-se o meio de montagem com DAPI (Fluoroshield™, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para a identificação nuclear.

A obtenção das imagens dos grupos foi realizada utilizando o software NIS Elements versão 4.02 e a intensidade de fluorescência foi determinada utilizando o software ImageJ versão 1.50i. Os dados foram expressos na forma de Δ de porcentagem de fluorescência, normalizados pela fluorescência emitida pelo DHE do grupo controle. A fluorescência obtida para os diferentes grupos de tratamento foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta\% \text{ Fluorescência} = (\text{TRATADO} - \text{CONTROLE}) \times 100 / \text{CONTROLE}$$

4.8.7.2 Caracterização de EPC no reparo endotelial de artéria mesentérica superior isolada de ratos

Inicialmente, segmentos de artéria mesentérica superior dos animais tratados foram incluídas em OCT, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até a realização dos protocolos experimentais. Posteriormente, foi realizada a microtomia com auxílio de criostato (Cryostat Leila, Nussloc, DE) obtendo secções de secções de 10 µm, que foram mantidas a -80°C por 24 horas. As secções de artéria foram lavadas com PBS três vezes por um minuto e fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos a 37°C. Posteriormente foi adicionado sobre os vasos uma solução de PBS com BSA 5% por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, anticorpos monoclonais FITC-conjugated anti-PECAM antibody (1:500; Santa Cruz Biotechnology) e PE-conjugated anti-CD34 antibody (1:500; Santa Cruz Biotechnology) foram incubados, durante a noite a 4°C, ao abrigo da luz, em câmara úmida. Posteriormente, as secções foram lavadas com PBS e montadas com meio de montagem com DAPI (Fluoroshield™, Sigma Aldrich) para a identificação nuclear. Os dados adquiridos em microscopia de fluorescência (NIKON Eclipse Ti-E, NIKON, Japão) foram analisados com o *software* ImageJ® versão 1.50i.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média mais ou menos o erro padrão da média (e.p.m.) e para a comparação entre duas variáveis foi realizando a análise de variância (ANOVA) “*one-way*”, seguido dos pós teste de Tukey. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Todas as análises realizadas foram calculadas pelo programa estatístico Graph Pad Prism versão 7.0®.

Resultados

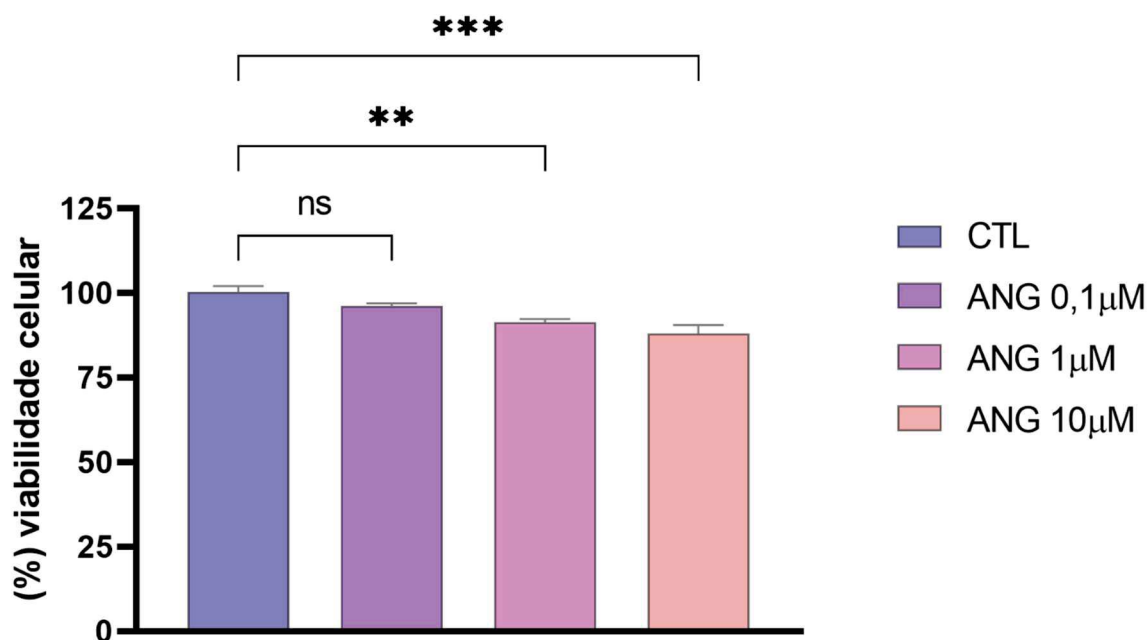
5 RESULTADOS

5.2 Avaliação da modulação do carvacrol em EPC cultivadas

5.2.1 Avaliação dos efeitos da ANG II sobre a viabilidade celular

As EPC isoladas da medula óssea de ratos foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de ANG para determinar seus efeitos sobre a viabilidade celular. A ANG mostrou reduzir a viabilidade celular nas concentrações de 1,0 ($87,8 \pm 1,3$; $p = 0,001$) e $10\mu\text{M}$ ($87,9 \pm 2,4$; $p = 0,001$) em comparação com o controle ($100,0 \pm 1,6$) (Figura 13). Entretanto, na concentração de 0,1 ($96,1 \pm 0,7$; $p = 0,02$), a ANG II não induziu alteração na viabilidade celular. Não foi observado diferença estatística significativa entre as concentrações de 0,1 e $1,0\mu\text{M}$ de ANG utilizadas no ensaio ($p > 0,05$). Portanto, a ANG reduz a viabilidade celular de maneira dependente de concentração.

Figura 14 - Viabilidade celular de EPC tratadas com ANG II utilizando o ensaio de MTT.



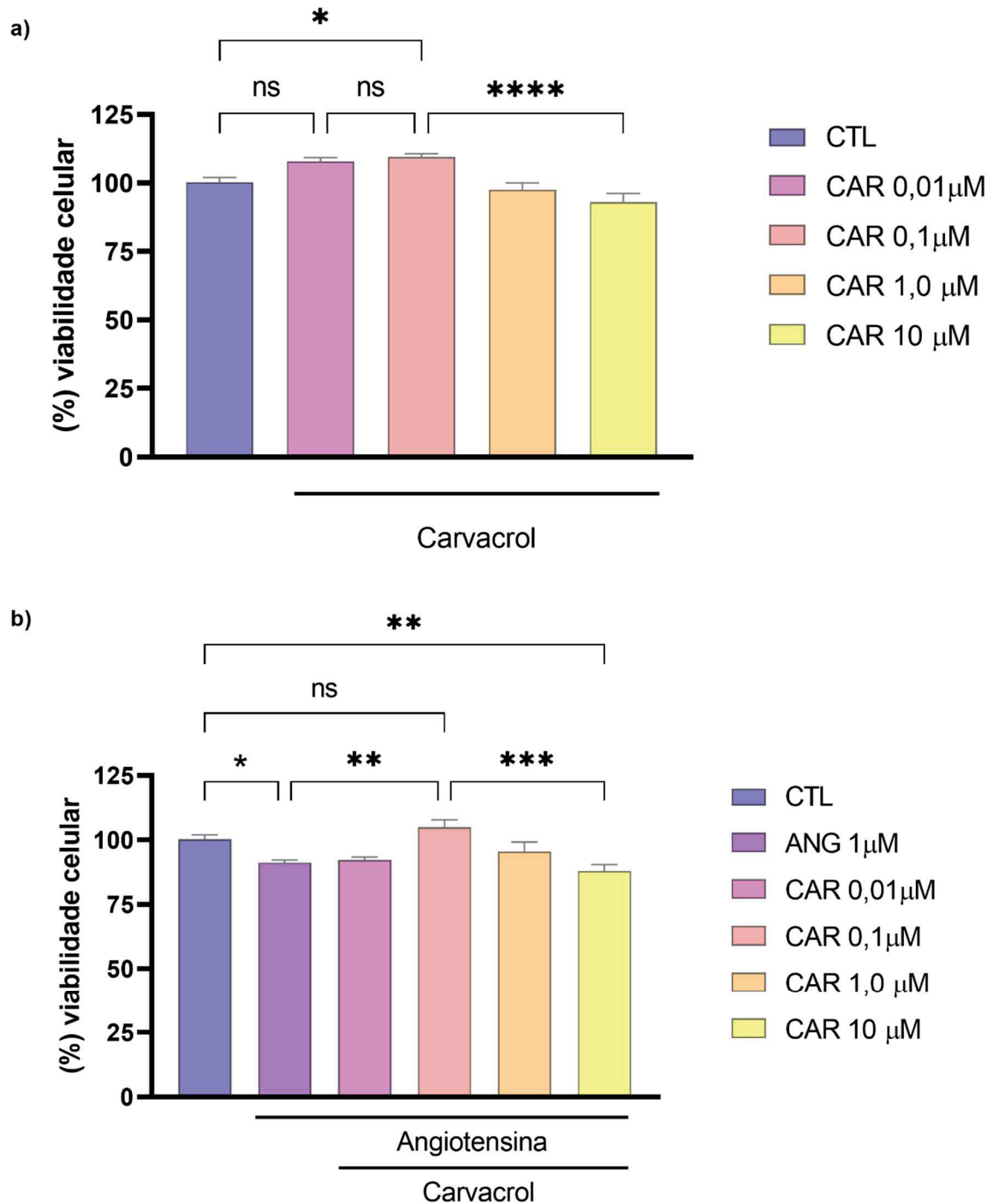
Viabilidade celular de EPC tratadas com Ang II medida pelo ensaio de MTT. As EPC foram tratadas com Ang II em três concentrações (0,1, 1,0 e $10\mu\text{M}$) por 24 h. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram todos normalizados pelo grupo controle e estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de *Tukey*. **0,01; *** $p < 0,001$.

Fonte: Gonçalves, 2023.

5.2.2 Avaliação dos efeitos do carvacrol sobre a viabilidade celular

Os efeitos do carvacrol sobre a viabilidade celular foi realizado através do ensaio de MTT, após 24 de incubação com as diferentes concentrações de carvacrol na presença e ausência de ANG II. Na ausência de ANG II a concentração de carvacrol de 0,1 μM ($109,5 \pm 1,1$; $p = 0,02$) e 0,01 ($107,9 \pm 1,3$; $p = 0,7$) não alterou a viabilidade celular ($100,0 \pm 1,6$). Em contrapartida, as concentrações de carvacrol de 1,0 ($97,5 \pm 2,5$; $p = 0,8$) e 10 μM ($93,1 \pm 3,0$; $p = 0,1$) apresenta-se inferior ao CTL (Figura 15a).

Figura 15 - Viabilidade celular de EPC tratadas com carvacrol utilizando o ensaio de MTT na presença e ausência de ANG II.



Viabilidade celular de EPC tratadas com Ang II e/ou carvacrol medida pelo ensaio de MTT. a) As EPC foram tratadas com carvacrol nas concentrações 0,01, 0,1, 1,0 e 10 µM por 24 h. b) As EPC foram tratadas com Ang II na concentração de 1,0 µM e/ou carvacrol nas concentrações de 0,01, 0,1, 1,0 e 10 µM por 24 h. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram todos normalizados pelo grupo controle e estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

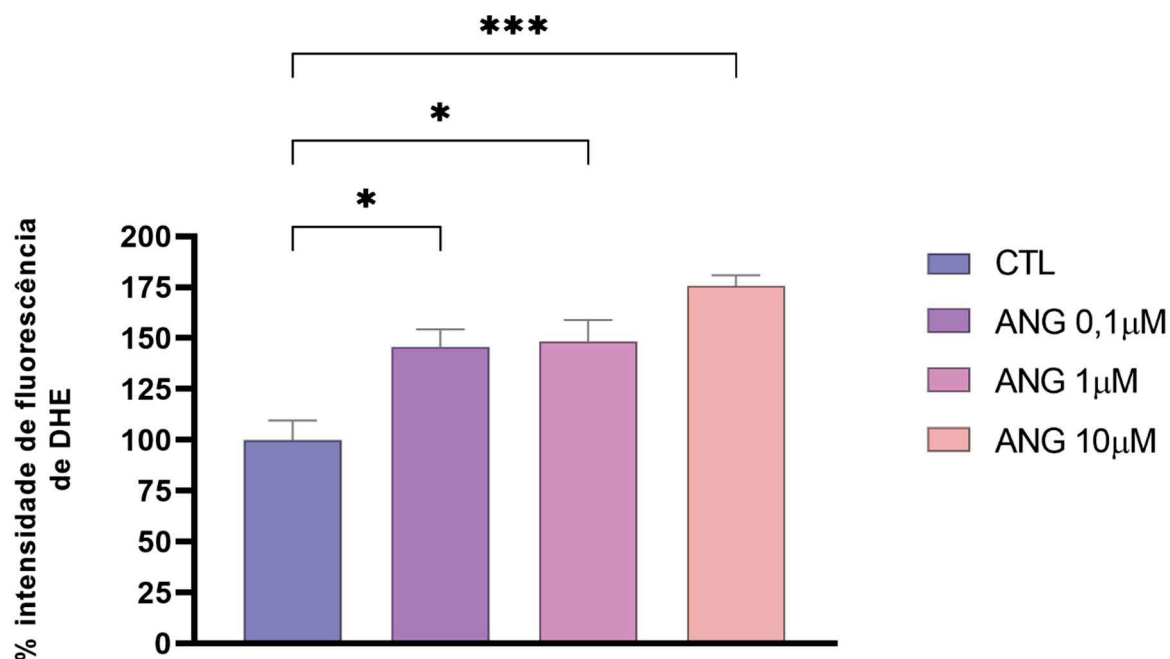
Fonte: Gonçalves, 2023.

Na presença de ANG II (1,0 μ M) a incubação com o carvacrol na concentração de 0,1 μ M (104,9 \pm 5,7; p = 0,007) foi capaz de melhorar a viabilidade celular, apresentando efeitos semelhantes ao controle (Figura 15b). As concentrações de 0,01 (92,2 \pm 2,8), 1,0 (95,5 \pm 8,2) e 10 μ M (87,9 \pm 6,1) não foram capazes de reverter o dano da viabilidade celular induzido pela incubação de ANG II (p > 0,05). Além disso, a concentração de 0,1 μ M apresentou uma diferença significativa em reação as concentrações de 0,01 (p = 0,009) e 10 μ M (p = 0,001).

5.2.3 Avaliação dos efeitos da ANG II sobre o estresse oxidativo

Os níveis de ROS produzidos em EPC após a estimulação por ANG II foram medidos utilizando o DHE através da citometria de fluxo, após 24 horas de incubação com as diferentes concentrações. As concentrações de 0,1 (145,8 \pm 8,4; p = 0,02), 1,0 (148,4 \pm 10,5; p = 0,01) e 10 μ M (175,6 \pm 5,2; p = 0,001) foram capazes de aumentar a fluorescência emitida pelo DHE quando comparado ao grupo controle (100,0 \pm 9,6) (Figura 15). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados com ANG II (p > 0,05). Para padronizar a comparação das respostas induzidas por ANG II, a concentração de 1,0 μ M foi utilizada em todos os experimentos subsequentes.

Figura16 - Intensidade de fluorescência emitida por DHE nas diferentes concentrações de ANG II.



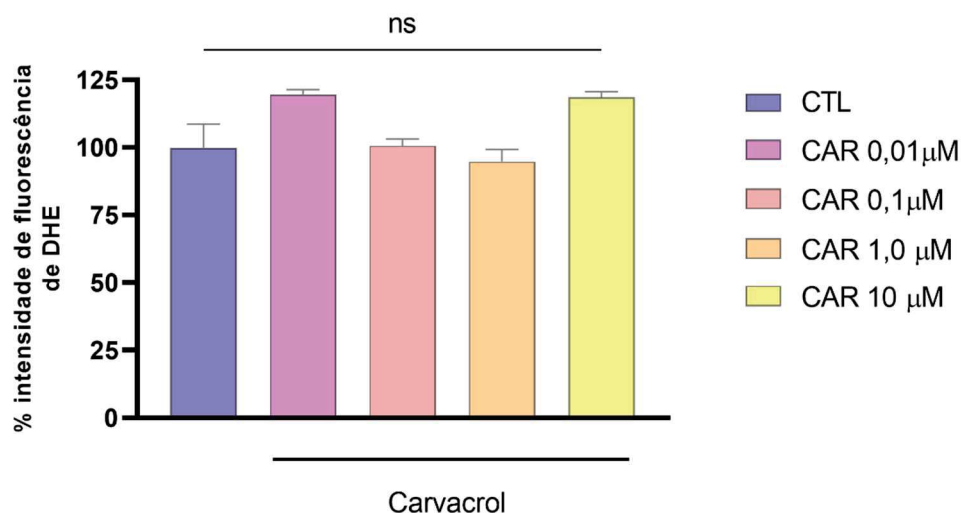
Efeito da incubação das diferentes concentrações de ANG II (0,1, 1,0 e 10µM) sobre a intensidade de fluorescência emitida por DHE em EPC isoladas da medula óssea de ratos. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram todos normalizados pelo grupo controle e estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. **0,01; ***p < 0,001.

Fontes: Gonçalves, 2023.

5.2.4 Avaliação dos efeitos de carvacrol sobre a produção de ânions superóxidos

A produção de ânions superóxidos foi avaliada pela detecção da fluorescência da sonda DHE através da citometria de fluxo. Em condições basais nenhuma concentração foi capaz de alterar a produção de ânions superóxidos ($p > 0,05$) (Figura 17).

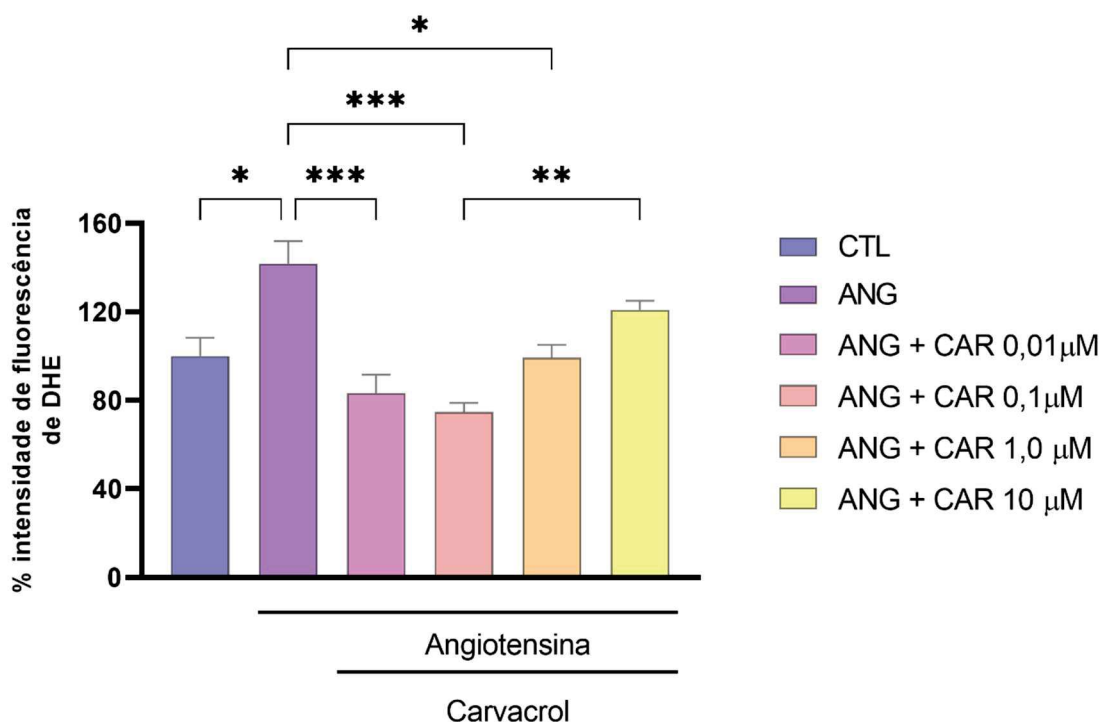
Figura 17 - Efeito do carvacrol sobre a produção de ânions superóxido em EPC



Efeito da incubação das diferentes concentrações de CAR (0,01, 0,1, 1,0 e 10 μM) sobre a intensidade de fluorescência emitida por DHE em EPC isoladas da medula óssea de ratos. Quantificação da intensidade de fluorescência emitida por DHE normalizado pelo controle por citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de *Tukey*.
Fonte: Gonçalves, 2023.

Em contrapartida, na presença da ANG II, o tratamento com o carvacrol nas concentrações de 0,01 ($83,2 \pm 16,8$; $p = 0,0009$), 0,1 ($74,6 \pm 8,3$; $p = 0,0002$) e 1,0 μM ($99,3 \pm 5,8$; $p = 0,01$) foram capazes de reduzir a intensidade de fluorescência emitida pela sonda DHE, quando comparados ao grupo ANG II, apresentando valores semelhantes ao controle. A concentração de 10 μM ($105,1 \pm 15,1$) não apresentou diferença estatística significativa entre o grupo controle e o grupo tratado apenas com ANG II ($p > 0,05$) (Figura 18). Ainda foi observado que a incubação por 0,1 μM de carvacrol foi eficiente em reduzir as ROS em comparação com a concentração 10 μM. Para padronizar a comparação das respostas induzidas por carvacrol, a concentração de 0,1 μM foi utilizada em todos os experimentos subsequentes, tomando como base os resultados obtidos pelos ensaios de MTT e sobre a avaliação do estresse oxidativo.

Figura 15 - Efeito do carvacrol sobre a produção de ânions superóxido em EPC

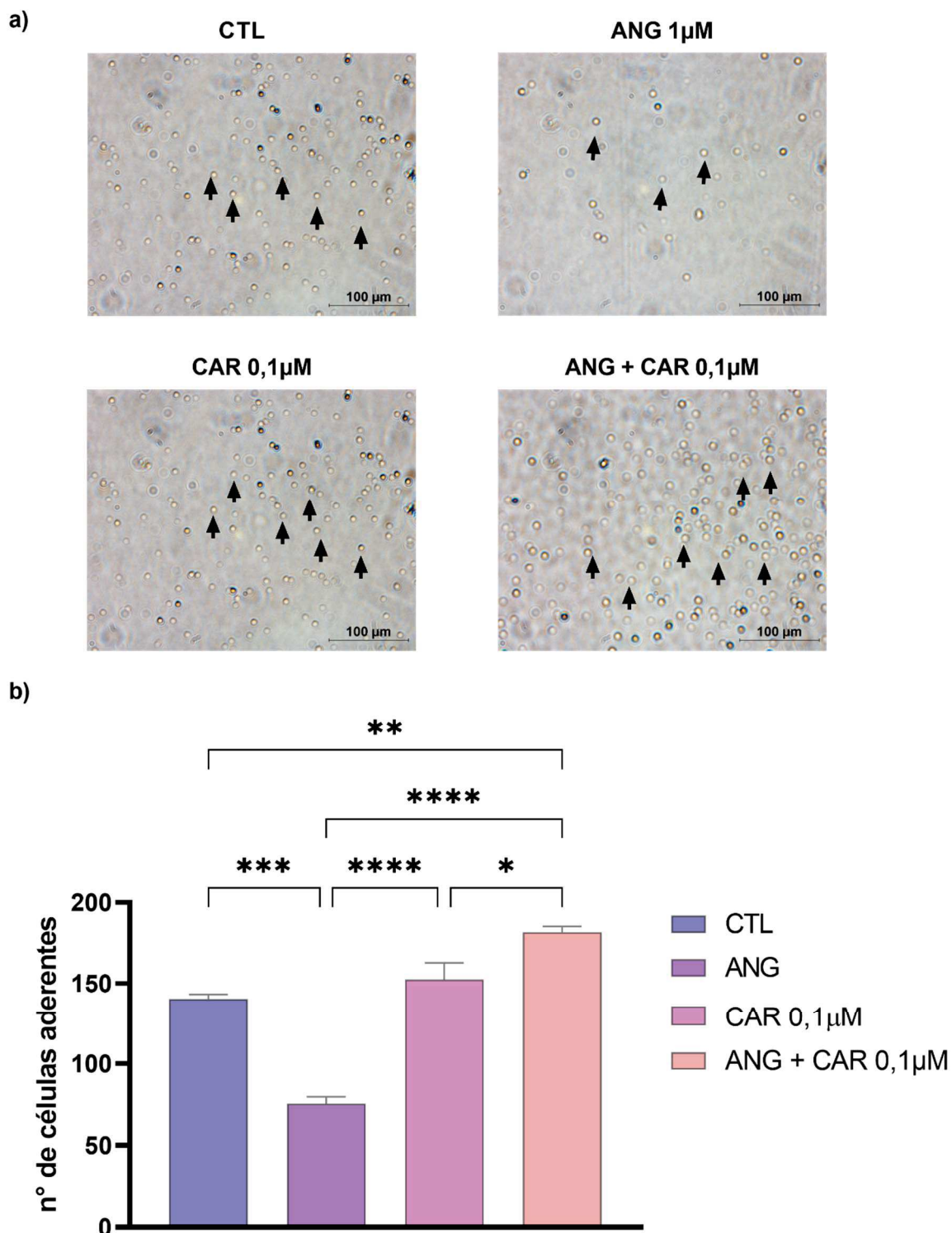


Efeito da incubação das diferentes concentrações de CAR (0,01, 0,1, 1,0 e 10 μM) na presença de ANG II (1 μM) sobre a intensidade de fluorescência emitida por DHE em EPC isoladas da medula óssea de ratos. Quantificação da intensidade de fluorescência emitida por DHE normalizado pelo controle por citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. Fonte: Gonçalves, 2023.

5.2.5 Efeito induzido pelo carvacrol sobre a adesão celular

O ensaio de adesão celular foi realizado pela contagem de células aderentes após a incubação com ANG II e/ou carvacrol. Em EPC cultivadas após isolamento da medula óssea de ratos a incubação com ANG II (1 μM; $75,3 \pm 7,6$; p = 0,0003) apresentou uma redução do número de células aderidas em placas com fibronectina quando comparados ao grupo CTL ($140 \pm 4,8$). Em contrapartida, o tratamento das EPC com ANG + CAR ($181,6 \pm 6,1$; p < 0,0001) foi capaz de aumentar o número de células aderidas quando comparadas ao grupo ANG. O tratamento do grupo CTL-CAR ($152,33 \pm 7,9$; p = 0,5) mostrou valores semelhantes ao CTL, não apresentando diferença estatística entre os grupos (Figura 19).

Figura 16 - Avaliação da habilidade de adesão de EPC na presença de Carvacrol.

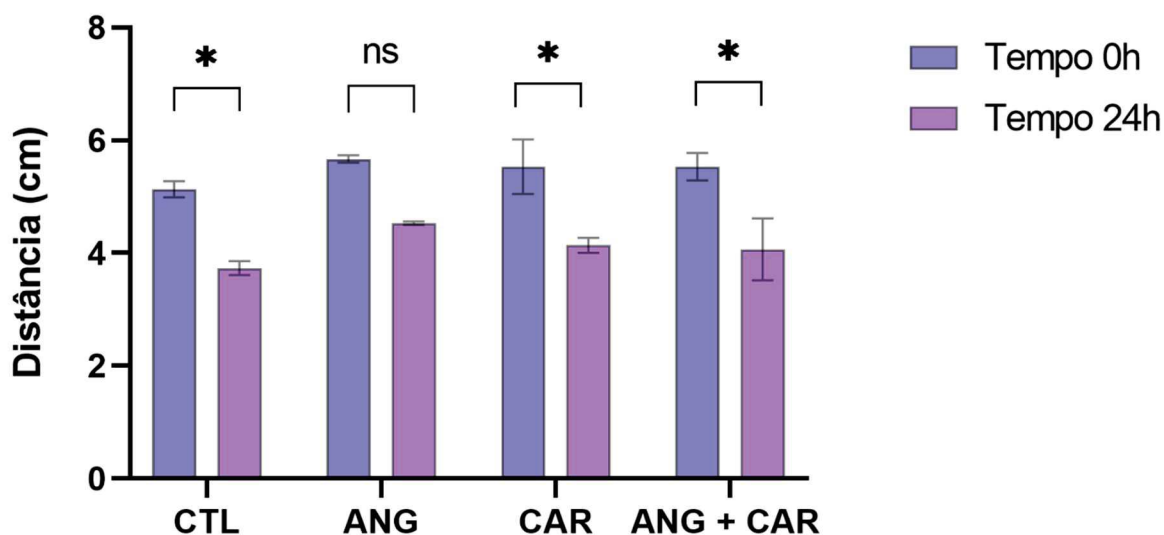


Efeito da incubação de carvacrol (0,1μM) na ausência ou presença de ANG II (1μM) sobre adesão em EPC isoladas da medula óssea de ratos. a) Imagens representativas de EPC aderidas em placas de fibronectina (Aumento 200x). b) Média no número de células aderidas após 1 horas em placas de fibronectina. Grupos experimentais: CTL, ANG 1μM, CTL-CAR 0,1μM, ANG-CAR 0,1μM. Os dados estão expressos como a média ± e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de *Tukey*. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. Fonte:Gonçalves,2023.

5.2.6 Influência do carvacrol sobre a migração celular

O ensaio de raspagem *in vitro* foi realizado para detectar o efeito do carvacrol sobre a migração de EPC. Após 24 horas ($3,7 \pm 0,1$ mm) o grupo CTL foi capaz de reduzir de forma significativa as arestas das feridas realizadas na placa em comparação ao tempo 0 ($5,1 \pm 0,1$ mm; $p = 0,04$). Em contraste, o grupo ANG ($T_0 = 5,6 \pm 0,1$ mm; $T_{24} = 4,5 \pm 0,3$ mm; $p = 0,16$) não apresentou uma migração celular significativa. As EPC incubadas com o carvacrol na presença ($T_0 = 5,5 \pm 0,2$ mm; $T_{24} = 4,0 \pm 0,5$ mm; $p = 0,03$) e ausência ($T_0 = 5,5 \pm 0,4$ mm; $T_{24} = 4,1 \pm 0,1$ mm; $p = 0,04$) de ANG II foi capaz de aumentar a taxa de migração celular após 24 horas (Figura 20).

Figura 17 - Avaliação do efeito de carvacrol sobre a migração de EPC.



Efeito da incubação de carvacrol ($0,1\mu\text{M}$) na ausência ou presença de ANG II ($1\mu\text{M}$) sobre migração de EPC isoladas da medula óssea de ratos. Distância (cm) das arestas das feridas realizadas na placa com EPC cultivadas. Grupos experimentais: CTL, ANG $1\mu\text{M}$, CTL-CAR $0,1\mu\text{M}$, ANG-CAR $0,1\mu\text{M}$. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

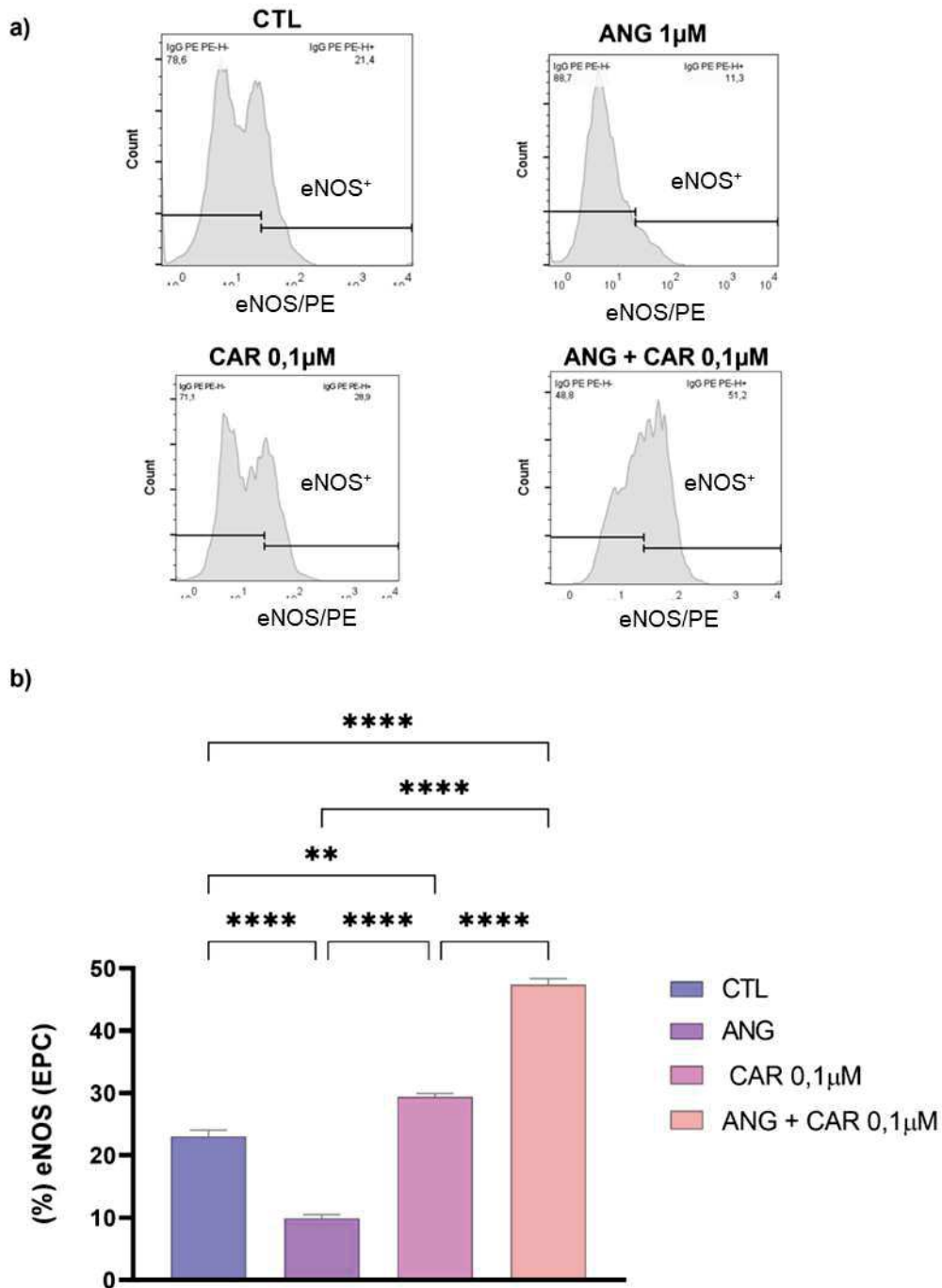
Fonte: Gonçalves, 2023.

5.2.7 Avaliação do efeito do carvacrol sobre a expressão da enzima eNOS

A expressão da enzima eNOS em EPC extraídas da medula óssea de ratos foi avaliada através da técnica de citometria de fluxo. A incubação de ANG ($9,9 \pm 1,1$; $p = 0,0001$) induziu a redução da expressão da enzima eNOS quando comparado ao

CTL ($23,0 \pm 1,7$). O tratamento ANG + CAR ($47,4 \pm 1,5$; $p = 0,0001$) foi capaz de reverter o efeito induzido na ANG II quando o monoterpreno foi incubado de forma concomitante. Além disso, o grupo CTL-CAR ($29,4 \pm 0,8$; $p = 0,001$) também aumentou a expressão da eNOS quando comparado ao grupo CTL e ANG (Figura 21). Entretanto, a expressão de eNOS induzida pelo carvacrol foi mais eficiente na presença da ANG II.

Figura 18 - Avaliação da expressão da eNOS após incubação com carvacrol

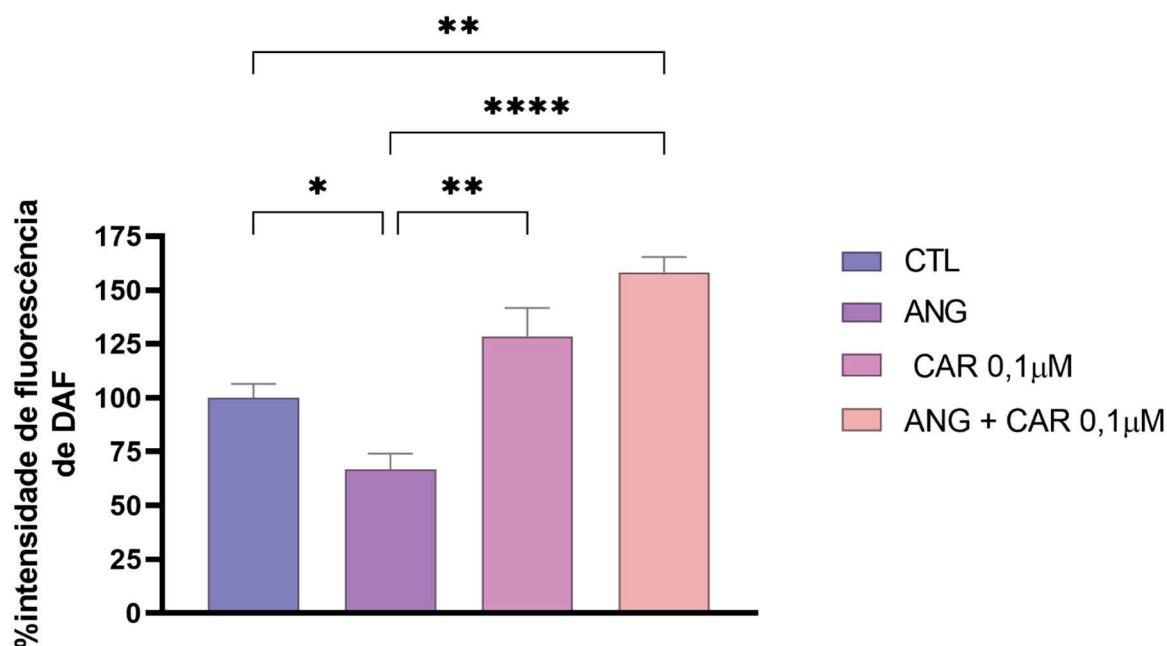


Efeito da incubação de carvacrol (0,1µM) na ausência ou presença de ANG II (1µM) sobre a expressão da enzima eNOS em EPC isoladas da medula óssea de ratos. a) Imagens representativas de histogramas de células marcadas com anti-eNOS. b) Quantificação da expressão de eNOS total em EPC isoladas da medula óssea de ratos após a incubação com carvacrol e/ou ANG. Grupos experimentais: CTL, ANG 1µM, CTL-CAR 0,1µM, ANG-CAR 0,1µM. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Fonte: Gonçalves, 2023.

5.2.8 Detecção de NO intracelular

A detecção da produção de NO intracelular foi realizada por citometria de fluxo, utilizando a sonda DAF-2DA. Em EPC isolada de ratos a ANG II ($66,7 \pm 14,6$) foi capaz de reduzir a produção de NO em comparação com o grupo CTL ($100,0 \pm 14,1$; $p = 0,04$) (Figura 22). A incubação com o carvacrol $0,1\mu\text{M}$ ($128,4 \pm 12,9$) induziu o aumento de fluorescência relativa após a incubação com o DAF-2DA, comparado aos grupos CTL ($p = 0,03$) e ANG ($p = 0,001$). Outrossim, o grupo ANG-CAR ($158,2 \pm 12,3$) também induziu o aumento da intensidade de fluorescência da sonda DAF-2A, quando comparado ao grupo controle ($p = 0,001$) e ANG II ($p < 0,0001$). Não foi observado diferença estatística entre os grupos tratados com o carvacrol.

Figura 19 - Avaliação na produção de NO induzida por carvacrol em EPC



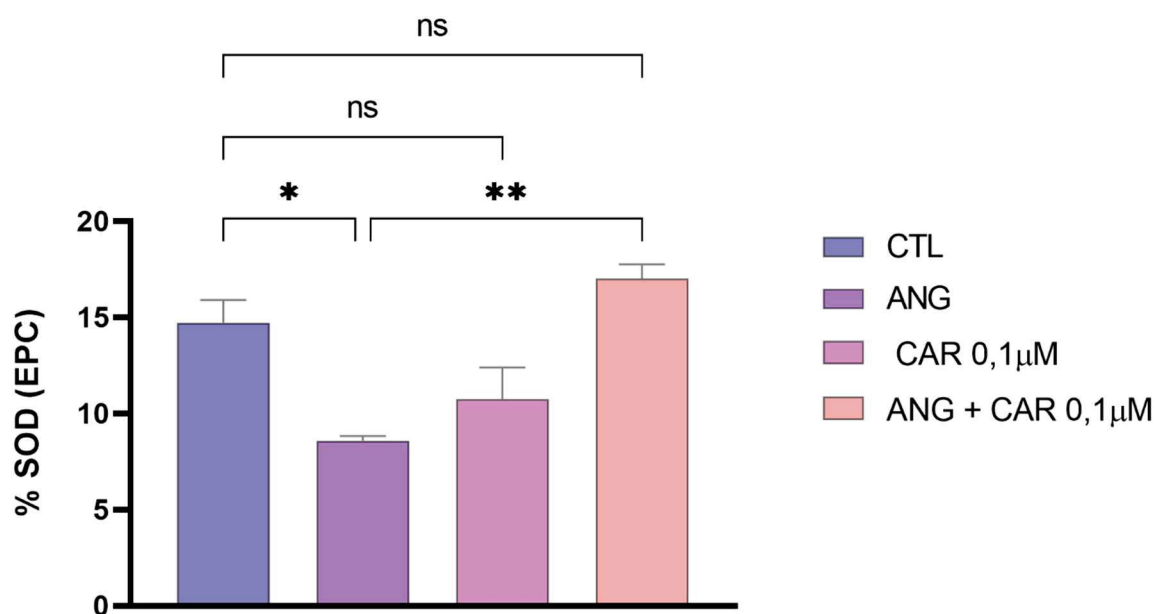
Detecção da intensidade de fluorescência da sonda DAF-2^a nos diferentes grupos experimentais. Grupos experimentais: CTL, ANG $1\mu\text{M}$, CTL-CAR $0,1\mu\text{M}$, ANG-CAR $0,1\mu\text{M}$. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Fonte: Gonçalves, 2023.

5.2.9 Avaliação do efeito do carvacrol sobre a expressão da superóxido dismutase (SOD)

A expressão da SOD foi avaliada através da utilização de um anticorpo policlonal por meio da técnica de citometria de fluxo em EPC extraídas da medula óssea de ratos. A incubação com ANG II ($8,59 \pm 0,4$; $p = 0,01$) promoveu a redução da expressão da SOD quando comparado ao CTL ($14,7 \pm 2,3$) (Figura 23). Entretanto, a expressão de SOD foi significativamente aumentada na presença do carvacrol no grupo ANG + CAR $0,1\mu\text{M}$ ($17,0 \pm 1,3$; $p = 0,003$) quando comparada ao grupo ANG. O grupo CTL-CAR ($10,7 \pm 2,8$; $p > 0,05$) não apresentou alteração significativa em relação ao grupo CTL.

Figura 20 - Efeito do carvacrol em EPC sobre a expressão de SOD

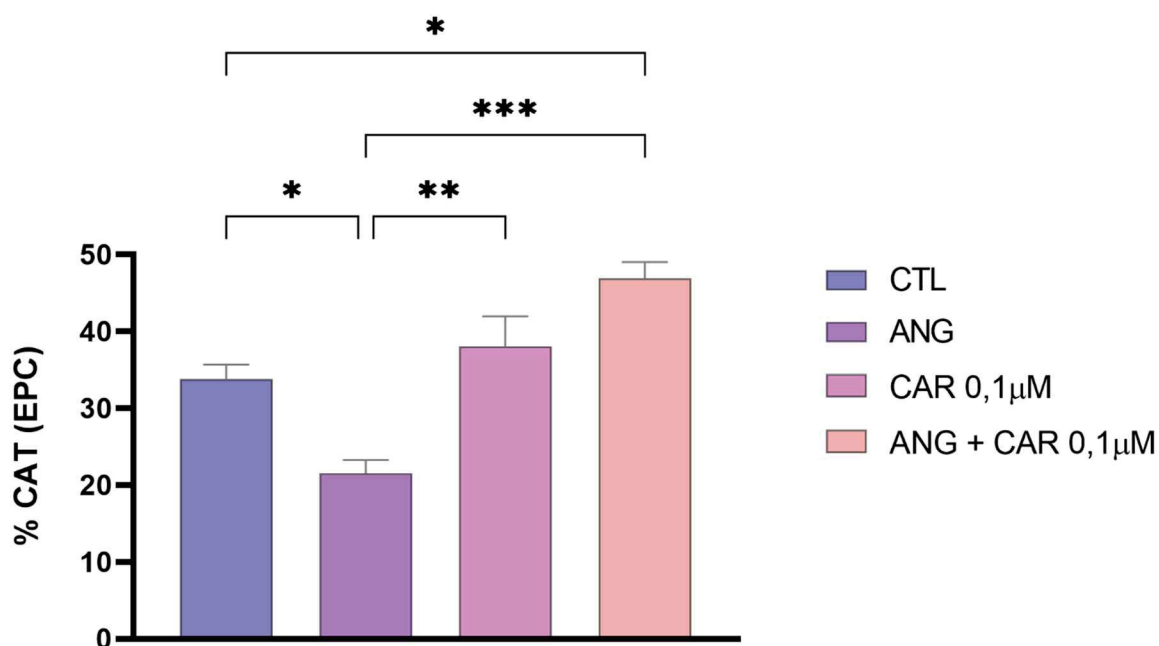


Quantificação da expressão de SOD em EPC isoladas da medula óssea de ratos após a incubação com carvacrol e/ou ANG. Grupos experimentais: CTL, ANG $1\mu\text{M}$, CTL-CAR $0,1\mu\text{M}$, ANG-CAR $0,1\mu\text{M}$. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.
Fonte: Gonçalves, 2023.

5.2.10 Avaliação do efeito do carvacrol sobre a expressão de catalase (CAT)

A expressão da CAT foi avaliada através da utilização de um anticorpo policlonal por meio da técnica de citometria de fluxo. Na avaliação da expressão de CAT em EPC isoladas de ratos foi possível verificar que o grupo ANG ($21,5 \pm 3,5$; $p = 0,01$) apresentou uma redução significativa da expressão desta enzima antioxidante em comparação ao grupo CTL ($33,8 \pm 3,7$) (Figura 24). Todavia, a incubação com o carvacrol no grupo ANG + CAR $1\mu\text{M}$ ($46,9 \pm 3,6$) reverteu o efeito da incubação com ANG ($p = 0,0001$) e apresentou valores de expressão da CAT superiores ao grupo CTL ($p = 0,01$). O tratamento apenas com o carvacrol ($38,0 \pm 6,8$) não aumentou a expressão de CAT em comparação ao grupo CTL ($p > 0,05$). Entretanto, apresentou níveis superiores ao grupo ANG ($p = 0,003$).

Figura 21 - Efeito do carvacrol em EPC sobre a expressão de CAT

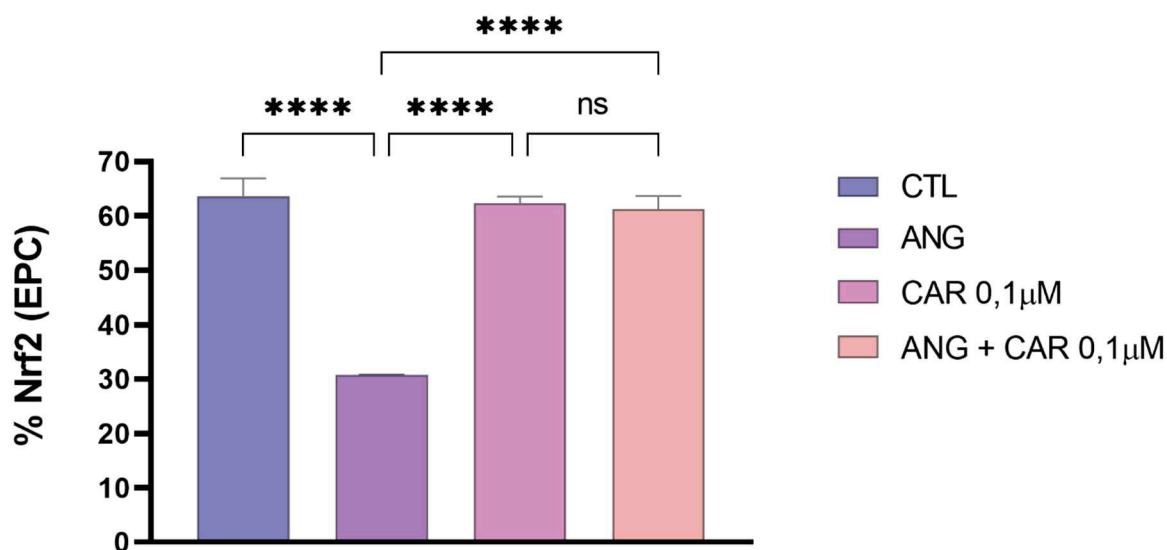


Quantificação da expressão de CAT em EPC isoladas da medula óssea de ratos após a incubação com carvacrol e/ou ANG. Grupos experimentais: CTL, ANG $1\mu\text{M}$, CTL-CAR $0,1\mu\text{M}$, ANG-CAR $0,1\mu\text{M}$. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.
Fonte: Gonçalves, 2023.

5.2.11 Avaliação do efeito do carvacrol sobre a expressão de Nrf2

A expressão da CAT foi avaliada através da utilização de um anticorpo policlonal por meio da técnica de citometria de fluxo. Na avaliação da expressão de Nrf2 em EPC isoladas de ratos foi possível verificar que o grupo ANG ($30,7 \pm 0,1$; $p = 0,0001$) apresentou uma redução significativa da expressão deste fator de transcrição em comparação ao grupo CTL ($63,6 \pm 5,6$) (Figura 25). Apesar disso, a incubação com o carvacrol no grupo ANG + CAR $1\mu\text{M}$ ($61,2 \pm 4,7$) reverteu o efeito da incubação com ANG ($p = 0,0001$) e apresentou valores semelhantes ao grupo CTL ($p > 0,05$). O tratamento apenas com o carvacrol ($62,3 \pm 2,5$) alterou a expressão de Nrf2 em comparação ao grupo CTL ($p > 0,05$). Entretanto, apresentou níveis superiores em relação ao grupo ANG ($p = 0,0001$).

Figura 22 - Efeito do carvacrol sobre a expressão de Nrf2 em EPC isolada de ratos



Quantificação da expressão de Nrf2 em EPC isoladas da medula óssea de ratos após a incubação com carvacrol e/ou ANG. Grupos experimentais: CTL, ANG $1\mu\text{M}$, CTL-CAR $0,1\mu\text{M}$, ANG-CAR $0,1\mu\text{M}$. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.
Fonte: Gonçalves, 2023.

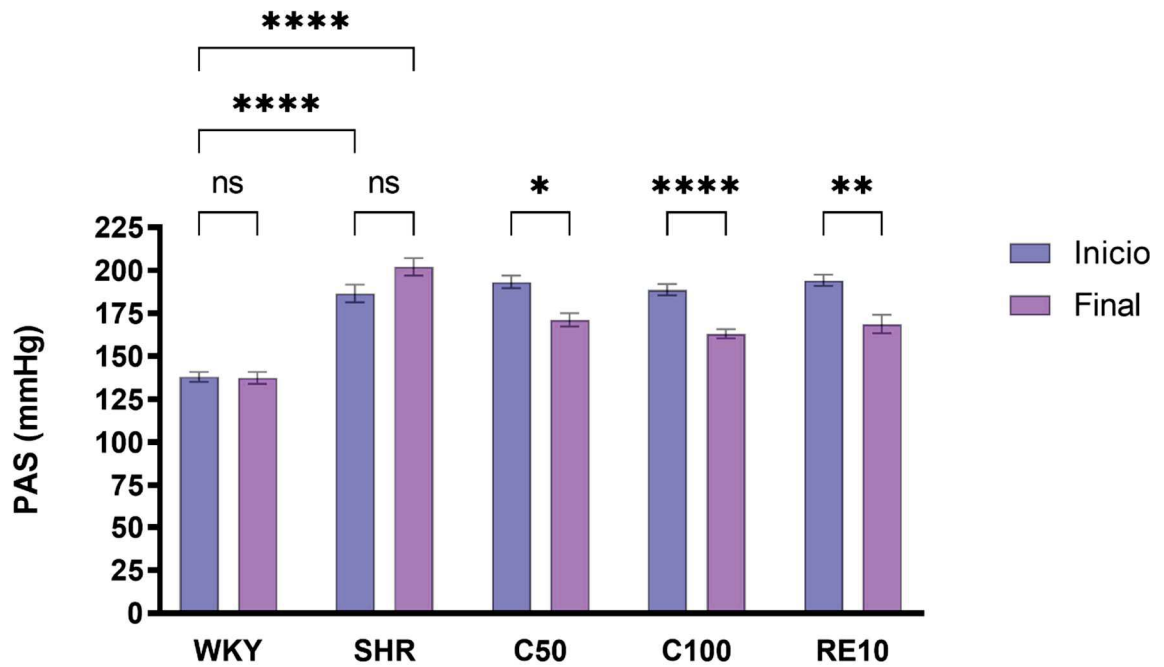
5.3 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM O CARVACROL SOBRE A MODULAÇÃO DE EPC

5.3.1 Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC)

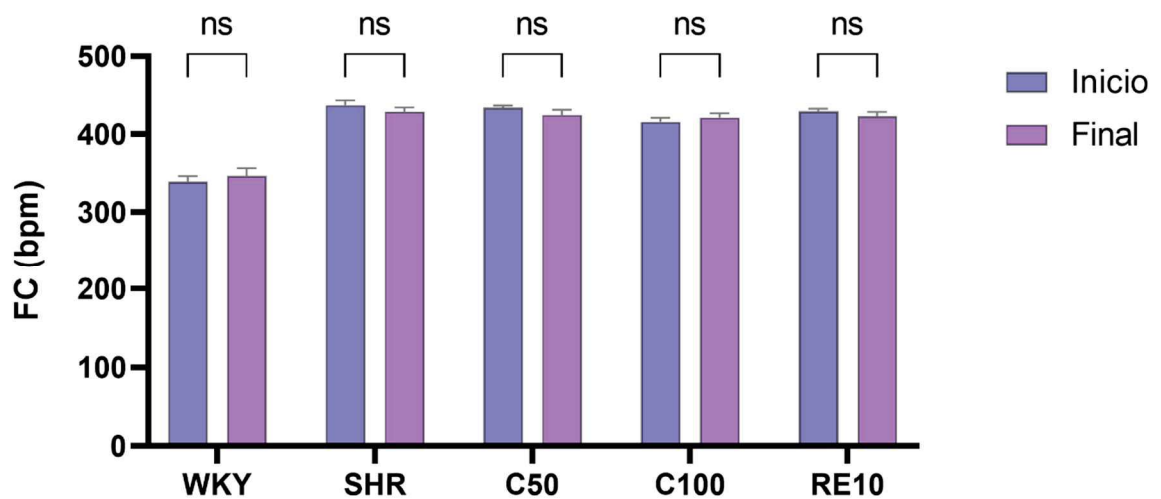
As alterações na PAS de animais WKY e SHR dos diferentes grupos experimentais após quatro semanas de tratamento, estão dispostas figura 26a e quadro 4. No início do tratamento, a PAS basal do grupo WKY-CTL foi significativamente inferior aos grupos SHR-CTL (Quadro 4), SHR-C50, SHR C100 e SHR-RE10 ($p > 0,05$). Os níveis pressóricos do grupo WKY-CTL, permaneceram inferiores ao grupo SHR-CTL ($p > 0,05$) no final do tratamento. Os grupos SHR-C50, SHR-C100 e SHR-RE10 apresentaram redução significativa da PAS quando comparado ao grupo SHR-CTL ao final do tratamento ($p < 0,05$). De forma semelhante, os grupos SHR-C50, SHR-C100 e SHR-RE10 apresentaram redução significativa da PAS quando comparado aos respectivos grupos no início do tratamento. A figura 26b também demonstra o comportamento da FC ao início e final do tratamento. O grupo WKY-CTL apresentou níveis de FC mais baixos quando comparado ao grupo SHR-CTL. Entretanto, entre os grupos hipertensos não houve diferença significativa na FC durante o período avaliado.

Figura 23 - Medida da PAS (mmHg) e FC (bpm) em relação início e final de tratamento dos diferentes grupos experimentais

a)



b)



Grupos: WKY-CTL (n = 6); SHR-CTL (n = 7); SHR-C50 (n = 5); SHR-C100 (n = 7); SHR-RE10 (n = 5). Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA two way, seguida de pós-teste de Tukey. *p < 0,01; **p < 0,006; ****p < 0,0001.

Fontes: Gonçalves, 2023.

Quadro 4 – Medida de PAS (mmHg) e FC (BPM) em relação ao início e final do tratamento dos diferentes grupos experimentais

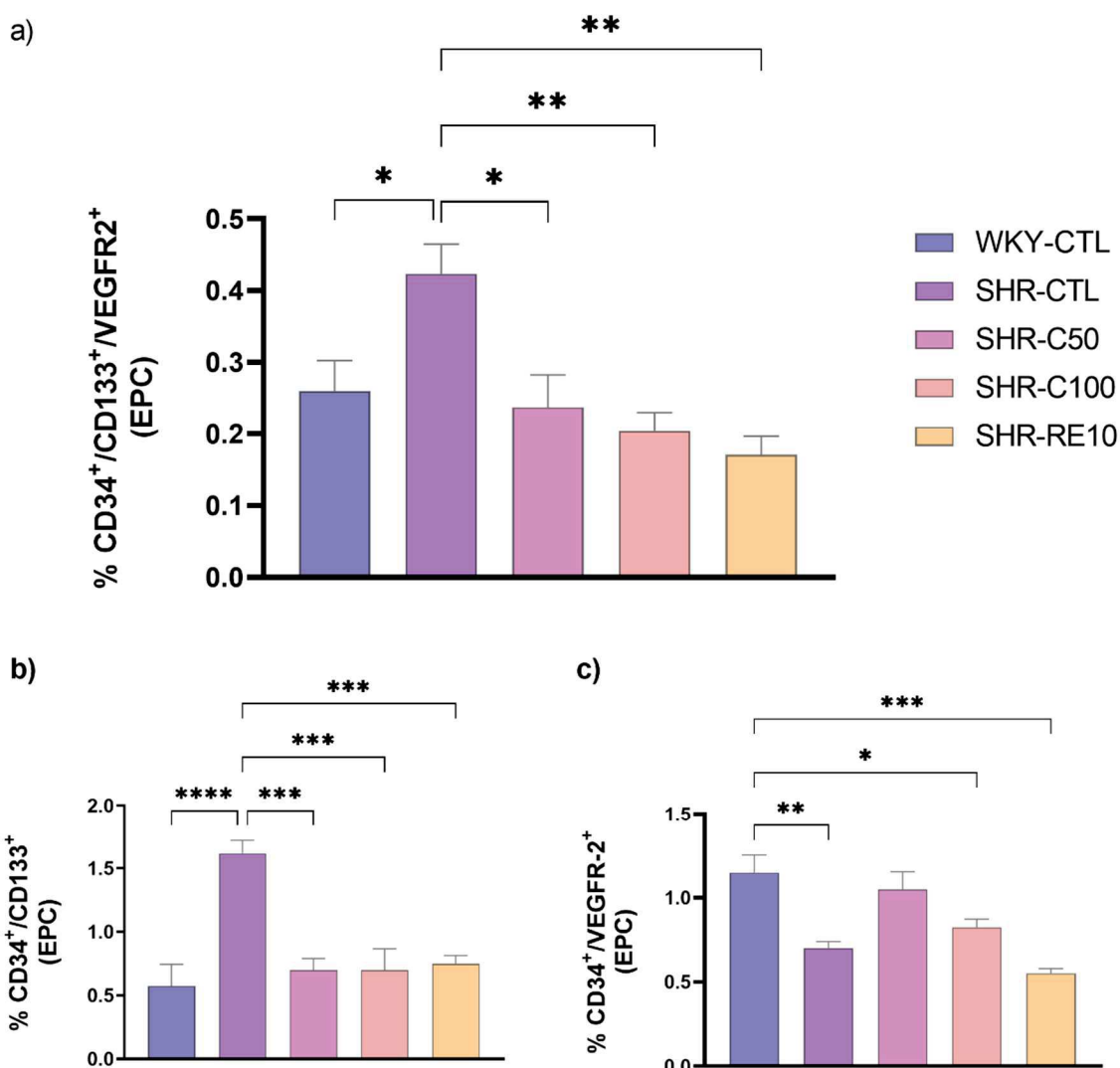
	WKY-CTL (n = 6)	SHR-CTL (n = 7)	SHR-C50 (n = 6)	SHR-C100 (n = 8)	SHR-RE10 (n = 6)
PAS inicial	138 ± 2.8	186 ± 5.1*	193 ± 3.7*	188 ± 3.2*	194 ± 3.2*
PAS final	137 ± 3.4	202 ± 5.1*	171 ± 3.8* ^{#†}	163 ± 2.7* ^{#†}	168 ± 5.2* ^{#†}
FC inicial	339 ± 6.9	437 ± 6.0*	433 ± 2.8*	416 ± 4.9*	429 ± 3.4*
FC final	346 ± 9.6	429 ± 5.4*	424 ± 6.7*	421 ± 5.0*	423 ± 5.4*

Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Para a análise estatística foi utilizado o teste de ANOVA seguido de pós-teste de Tukey's. *p < 0.05 vs WKY-CTL; #p < 0.05 vs final SHR-CTL; †p < 0.05 vs início do tratamento.

5.3.2 Avaliação no número de EPC na medula óssea após o tratamento com carvacrol

A quantificação de EPC na medula óssea e circulação periférica foi realizada pela expressão de antígenos superficiais CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺. Os níveis de EPC na medula óssea apresentaram-se inferiores no grupo WKY-CTL (0,26 ± 0,04, n = 4) em relação ao hipertenso SHR-CTL (0,42 ± 0,04, n = 4) (p = 0,01) (Figura 27a). O tratamento com o carvacrol na dose de 50 mg/kg (0,23 ± 0,04, n = 6) e de 100/kg (0,20 ± 0,03, n = 5) apresentaram-se de maneira semelhante ao grupo WKY-CTL e diferentes significativamente do grupo SHR-CTL (p < 0,05). O grupo SHR-RE10 (0,17 ± 0,03, n = 5) também se apresentou diferente significativamente do grupo SHR-CTL (p < 0,05) (Figura 27a).

Figura 24 - Quantificação e caracterização por citometria de fluxo de EPC isoladas da medula óssea de animais tratados.



Os níveis de EPC na medula óssea foram expressos pela porcentagem de células CD34⁺/CD133⁺/VEGFR2⁺ (a), CD34⁺/CD133⁺ (b) e CD34⁺/VEGFR2⁺ (c) em relação as células mononucleares. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. Fonte: Gonçalves, 2023.

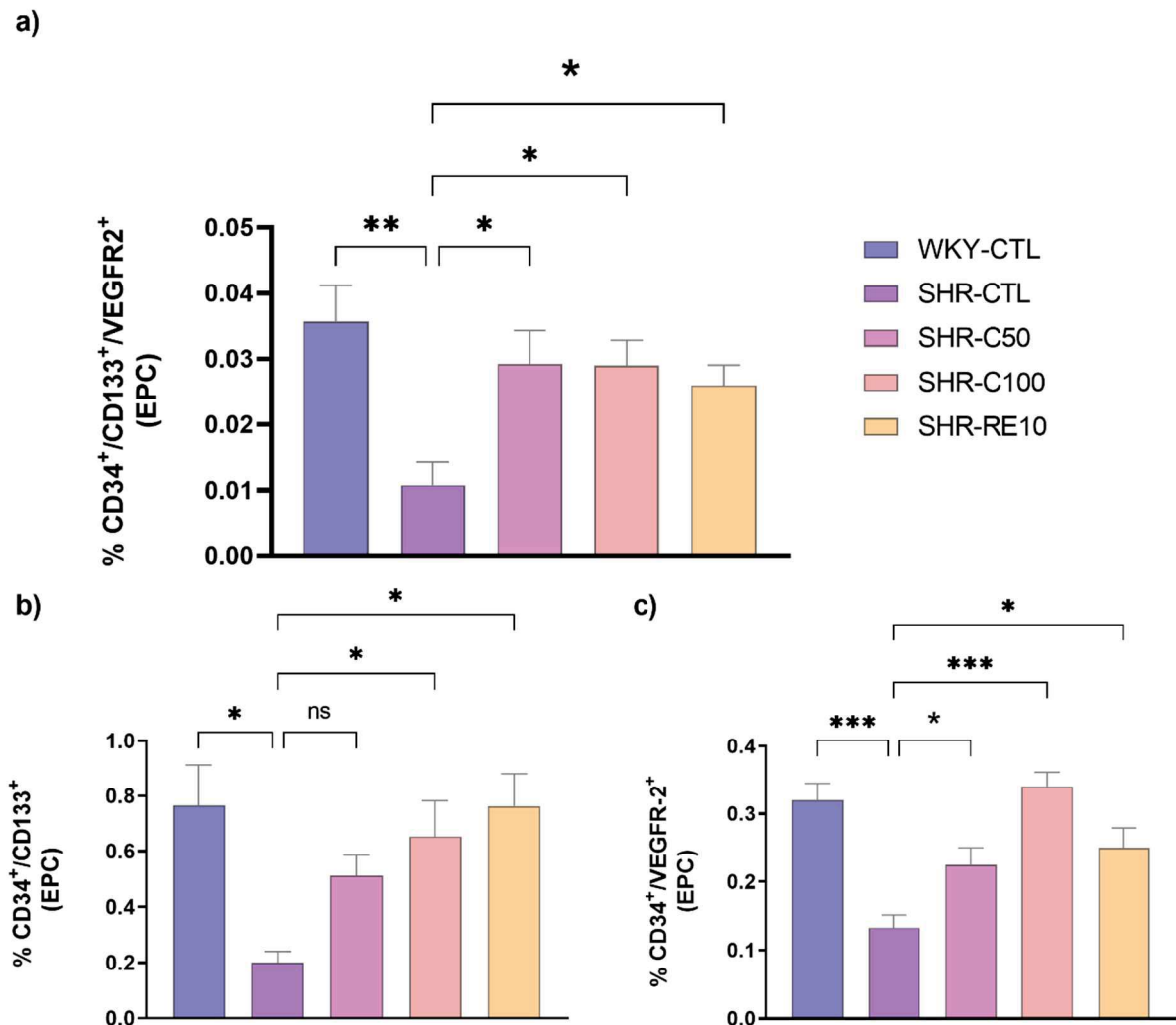
Os subconjuntos de populações de EPC foram avaliados com base na marcação dupla de CD34⁺, CD133⁺ e VEGFR-2⁺. Nossos dados revelaram que os animais SHR-CTL ($1,6 \pm 0,1$; p < 0,0001) apresentaram uma expressão de células CD34⁺/CD133⁺ em relação ao grupo WKY-CTL ($0,57 \pm 0,1$). Os grupos SHR-C50 ($0,70 \pm 0,2$; p = 0,0003), SHR-C100 ($0,70 \pm 0,1$; p = 0,0003) e SHR-RE10 ($0,75 \pm 0,1$; p = 0,0004) apresentaram níveis de CD34⁺/CD133⁺ semelhante ao grupo WKY-CTL (Figura 27c). Por outro lado, quando avaliado a população de células CD34⁺/VEGFR-

2⁺ os animais SHR-CTL ($0,70 \pm 0,1$; $p = 0,004$), SHR-C100 ($0,82 \pm 0,1$; $p = 0,04$) e SHR-RE10 ($0,55 \pm 0,1$; $p = 0,0003$) apresentaram níveis mais baixos quando comparado ao WKY-CTL ($1,12 \pm 0,1$). Contrariamente, os animais SHR-C50 ($1,05 \pm 0,1$; $p = 0,86$) apresentaram níveis de CD34⁺/VEGFR-2⁺ semelhante ao WKY-CTL (Figura 27c).

5.3.3 Avaliação no número de EPC circulantes após o tratamento com carvacrol

Os níveis de EPC circulantes apresentaram-se inferiores no grupo SHR-CTL ($0,011 \pm 0,004$, $n = 5$) em relação ao normotenso WKY-CTL ($0,036 \pm 0,005$, $n = 4$) ($p < 0,05$) (Figura 28a). Interessantemente, o tratamento com o carvacrol na dose de 50 mg/kg ($0,029 \pm 0,005$, $n = 4$) e de 100/kg ($0,029 \pm 0,005$, $n = 5$) melhoraram de forma significativa a circulação de EPC em relação ao grupo SHR-CTL ($p < 0,05$). De maneira semelhante o grupo SHR-RE10 ($0,026 \pm 0,003$, $n = 4$) também apresentou um aumento no número circulante de EPC (Figura 28a).

Figura 25 - Quantificação e caracterização por citometria de fluxo de EPC isoladas do sangue periférico de animais tratados.



Os níveis de EPC do sangue periférico foram expressos pela porcentagem de células CD34⁺/CD133⁺/VEGFR2⁺ (a), CD34⁺/CD133⁺ (b) e CD34⁺/VEGFR2⁺ (c) em relação as células mononucleares. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Fonte: Gonçalves, 2023.

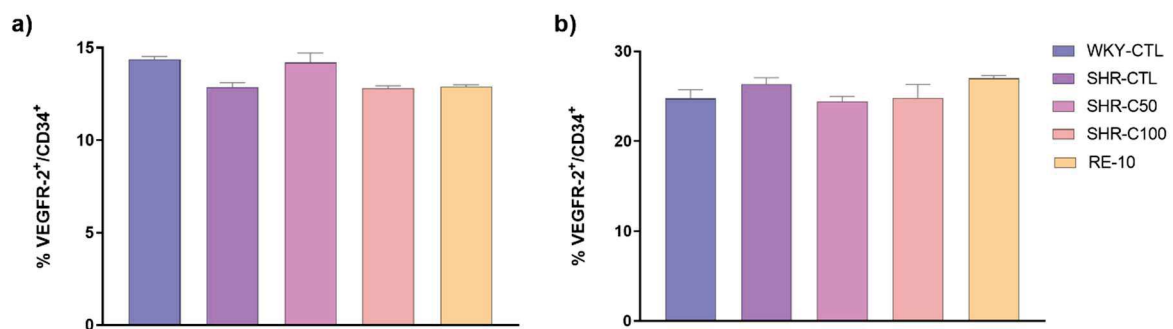
Em animais do grupo SHR-CTL ($1,6 \pm 0,1$; $p < 0,0001$), a subpopulação que expressa CD34⁺/CD133⁺ foi significativamente inferior grupo WKY-CTL ($0,57 \pm 0,1$). Os grupos SHR-C100 ($0,70 \pm 0,1$; $p = 0,0003$) e SHR-RE10 ($0,75 \pm 0,1$; $p = 0,0004$) apresentaram níveis de CD34⁺/CD133⁺ semelhante ao grupo WKY-CTL (Figura 28b). Por outro lado, o grupo SHR-C50 ($0,70 \pm 0,2$; $p = 0,0003$) não apresentou diferença estatística em relação aos grupos WKY-CTL e SHR-CTL. Quando avaliado a população de células CD34⁺/VEGFR-2⁺ os animais SHR-CTL ($0,70 \pm 0,1$; $p = 0,004$), apresentaram níveis mais baixos quando comparado ao WKY-CTL ($1,12 \pm 0,1$). Por

outro lado, os animais SHR-C50 ($1,05 \pm 0,1$; $p = 0,86$), SHR-C100 ($0,82 \pm 0,1$; $p = 0,04$) e SHR-RE10 ($0,55 \pm 0,1$; $p = 0,0003$) apresentaram porcentagem de células CD34⁺/VEGFR-2⁺ semelhantes ao WKY-CTL ($p > 0,05$) e significativamente superior ao SHR-CTL ($p < 0,05$).

5.3.4 Caracterização de EPC após cultivo celular em animais tratado com carvacrol

Após o cultivo celular de 7 dias foi realizada a caracterização de EPC provenientes da medula óssea e circulação periférica. Os resultados obtidos após a avaliação da expressão dos antígenos de superfície CD34 e VEGFR-2, demonstraram a obtenção de EPC em todos os grupos em estudo, não apresentando diferença estatística significativa entre os grupos tratados (Figura 29).

Figura 26 - Caracterização da população de EPC isoladas da medula óssea e circulação periférica após cultivo celular de sete dias.



Caracterização de EPC após sete de cultivo celular extraídas da medula óssea (a) e circulação periférica (b). Grupos: WKY-CTL (n = 3); SHR-CTL (n = 4); SHR-C50 (n=3); SHR-C100 (n=3). Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m.

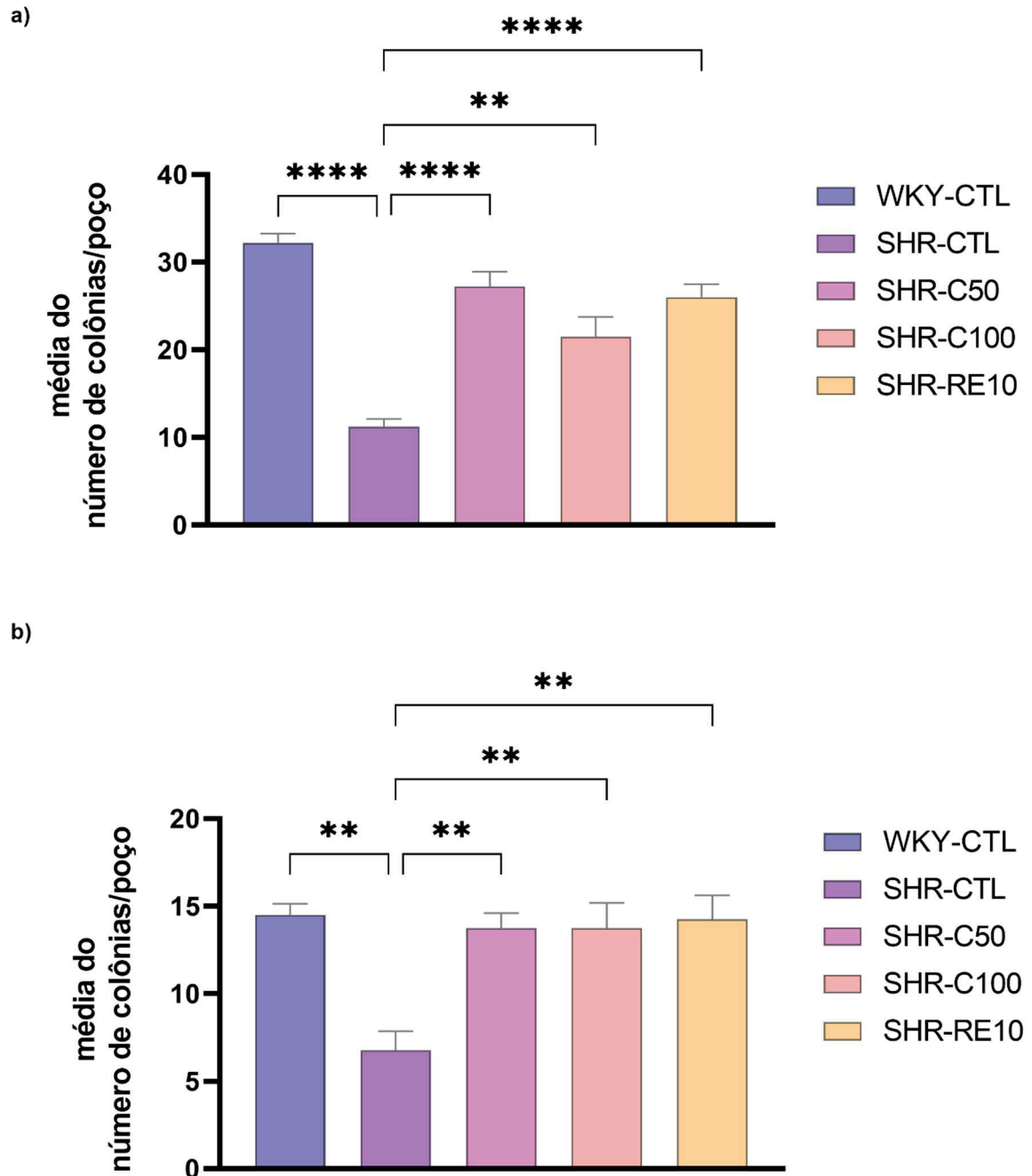
Fonte: Gonçalves, 2023.

5.3.5 Quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC)

O tratamento com o carvacrol foi capaz de aumentar a capacidade proliferativa de EPC derivadas da medula óssea e circulação periférica. Após sete dias de cultivo, os resultados indicaram que o grupo SHR-CTL (MO = $11,2 \pm 0,8$, n = 4; SP = $6,7 \pm 1,1$, n = 4) (Figura 31) reduziu pronunciadamente a formação de colônias (contagem de UFC) quando comparado ao grupo WKY-CTL (MO = $32,2 \pm 1,0$, n = 4; SP = $14,5 \pm 0,6$, n = 4) ($p < 0,05$). Interessantemente, este efeito foi revertido pelos tratamentos do grupo SHR-C50 (MO = $27,2 \pm 1,6$, n = 4; SP = $13,7 \pm 0,8$, n = 4), SHR-C100 (BM =

21.5 ± 2.2, n = 4; SP = 13.7 ± 1.4, n = 4) e SHR-RE10 (MO = 26.0 ± 1.4, n = 4; SP = 14.2 ± 1.3, n = 4).

Figura 27 - Número de unidades formadoras de colônias após sete dias de cultivo celular.



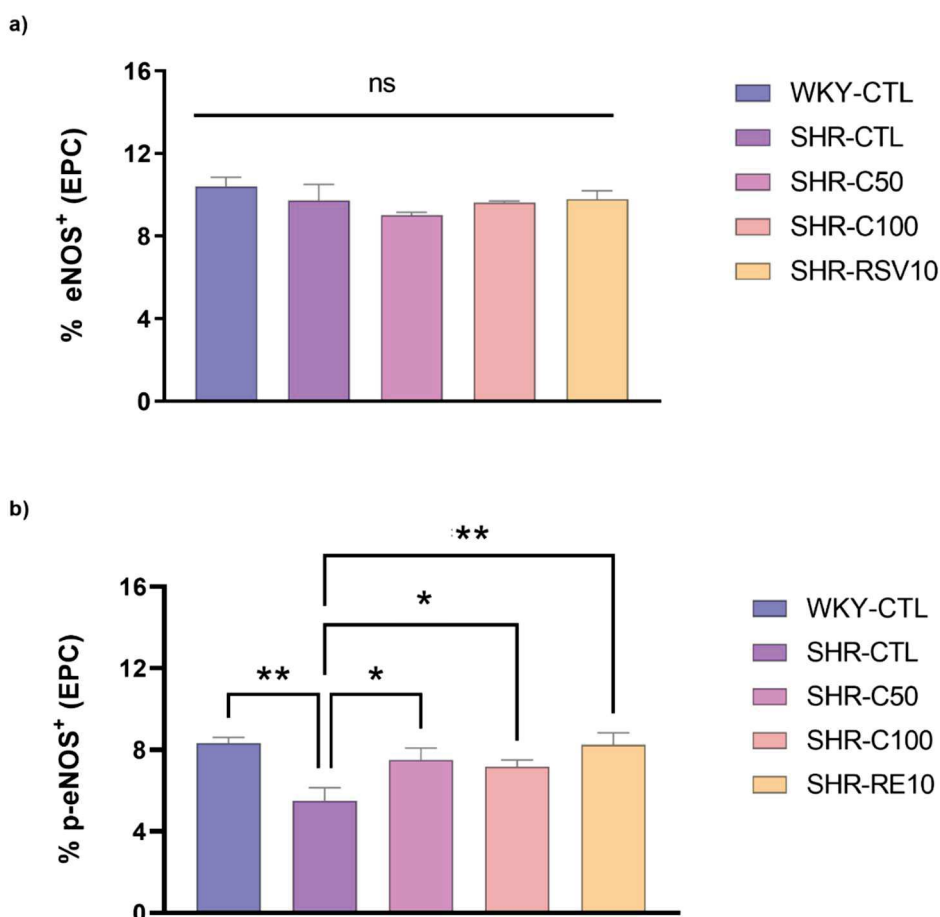
Efeito do tratamento de carvacrol sobre as unidades formadoras de colônias após o tratamento de quatro semanas de EPC isoladas da medula óssea (a) e circulação periférica (b). Os dados estão expressos como a média ± e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

Fonte: Gonçalves, 2023.

5.3.6 Avaliação da expressão da eNOS total e eNOS fosforilada em EPC isoladas da medula óssea

Em EPC isoladas da medula óssea os diferentes grupos experimentais não apresentaram alteração na expressão da eNOS ($p > 0,05$) (Figura 32a). Em contrapartida, o percentual de eNOS fosforilada (peNOS) foi significativamente reduzido no grupo SHR-CTL (5.50 ± 0.6 ; $n = 4$) em comparação com o grupo WKY-CTL (8.34 ± 0.2 ; $n = 5$) (Figura 32b). O tratamento com o carvedilol na dose de 50mg/kg (7.50 ± 0.5 ; $n = 4$) e 100mg/kg (7.17 ± 0.3 ; $n = 4$) foram capazes de reverter o prejuízo da atividade da peNOS caracterizado no grupo hipertenso. O tratamento com o resveratrol (8.42 ± 0.5 ; $n = 5$) se mostrou semelhante aos grupos tratados com o carvedilol.

Figura 28 - Avaliação da expressão de eNOS total e eNOS fosforilada em EPC cultivadas por 7 dias isoladas da medula óssea.



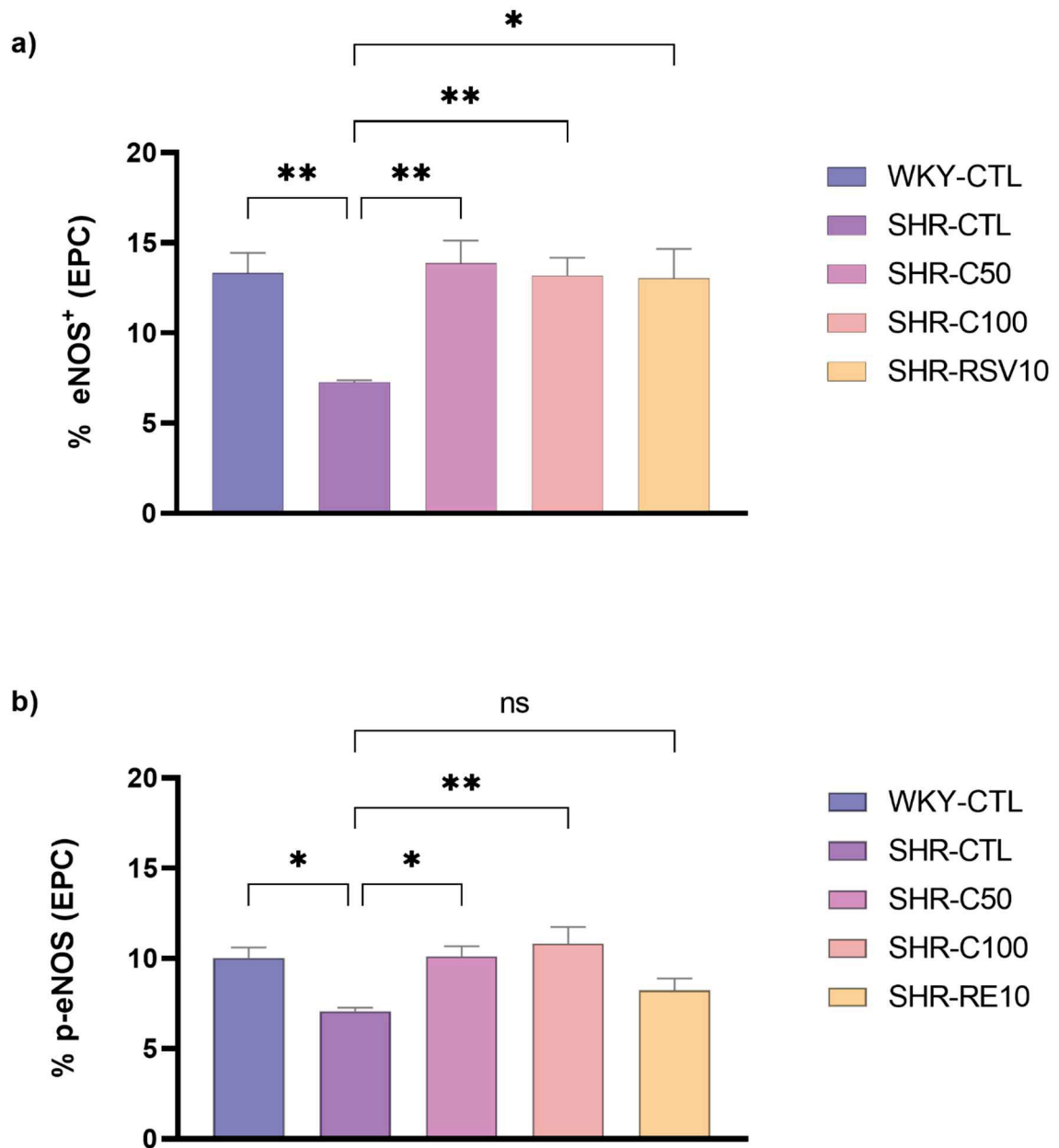
Quantificação da expressão de eNOS total (a) e p-eNOS (b) em cultura de EPC de medula óssea. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Fonte: Gonçalves, 2023.

5.3.7 Avaliação da expressão da eNOS total e eNOS fosforilada em EPC isoladas da circulação periférica

Nas EPC isoladas da circulação periférica verificamos uma redução do percentual de eNOS total e peNOS nos animais SHR-CTL (eNOS = $7.2 \pm 0.1\%$, n = 6; peNOS = $7.0 \pm 0.2\%$, n = 6) quando comparados com o grupo WKY-CTL (eNOS = $13.3 \pm 1.1\%$, n = 6; peNOS = $10.0 \pm 0.5\%$, n = 6) (Figura 32a). Em contrapartida, os grupos SHR-C50 (eNOS = $13.8 \pm 1.2\%$, n = 5; peNOS = 10.1 ± 0.5 , n = 6) e SHR-C100 (eNOS = $13.1 \pm 0.9\%$, n = 5; peNOS = 10.1 ± 0.8 , n = 5) aumentaram significativamente a expressão e atividade da eNOS, apresentando níveis semelhantes ao grupo WKY-CTL (Figura 32b). No grupo SHR-RE10 (eNOS = $13.0 \pm 1.6\%$, n = 5; peNOS = 8.42 ± 0.6 , n = 5) foi observado apenas o aumento da expressão de eNOS, não alterando a expressão da peNOS quando comparado ao SHR-CTL.

Figura 29 - Avaliação da expressão de eNOS total e eNOS fosforilada em EPC cultivadas por 7 dias isoladas da circulação periférica

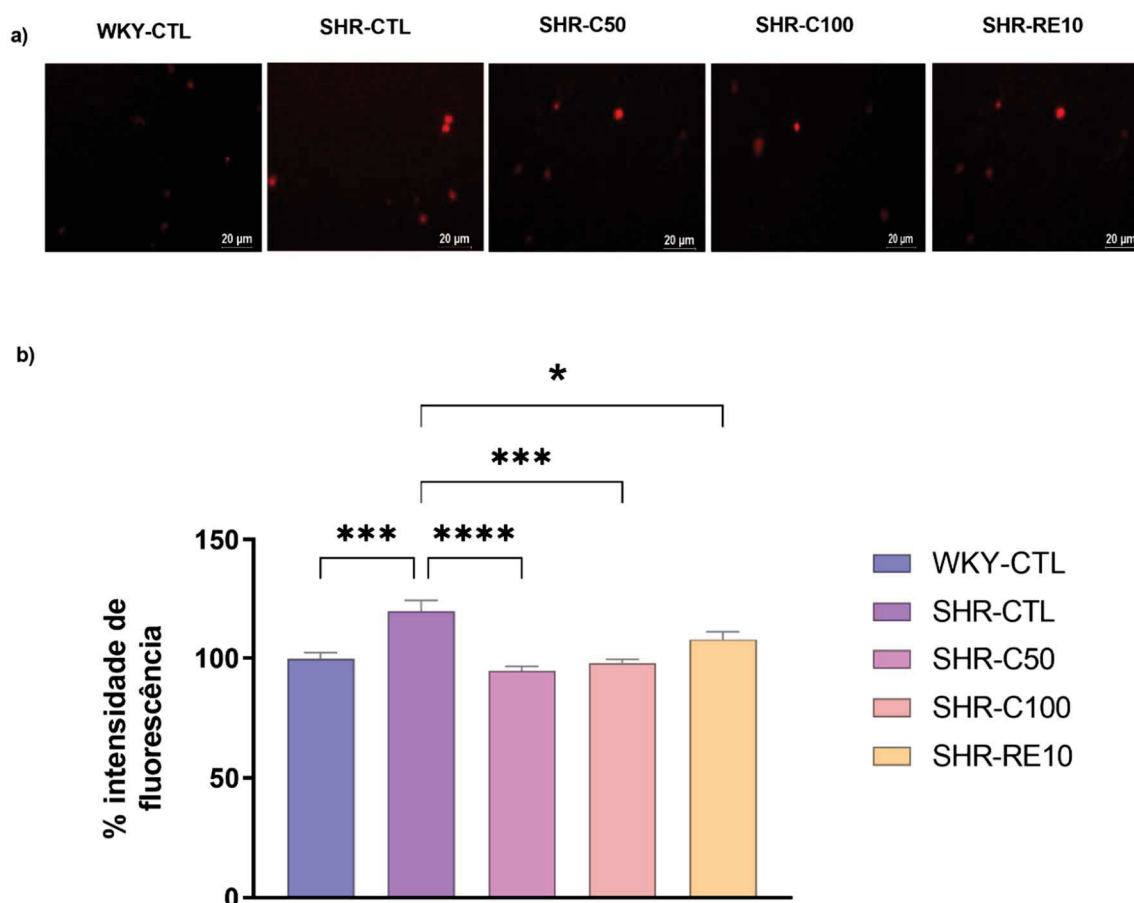


Quantificação da expressão de eNOS total (a) e p-eNOS (b) em cultura de EPC da circulação periférica. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. Fonte: Gonçalves, 2023.

5.3.8 Detecção da formação de ânions superóxidos intracelulares de EPC isolada da medula óssea

A sonda DHE emitiu fluorescência basal nas células cultivadas de EPC nos diferentes grupos experimentais. No grupo SHR-CTL foi verificado um aumento de intensidade de fluorescência basal ($120.1 \pm 4.3 \%$; $n = 6$), quando comparados com o grupo WKY-CTL ($100.0 \pm 2.3 \%$; $n = 6$) (Figura 32), em EPC derivadas da medula óssea. Interessantemente, os grupos SHR-C50 ($94.7 \pm 1.8 \%$; $n = 6$), SHR-C100 ($98.1 \pm 1.4 \%$; $n = 6$) e SHR-RE10 ($107.7 \pm 3.2\%$, $n = 4$) apresentaram níveis de intensidade de fluorescência semelhantes ao grupo WKY-CTL.

Figura 30 - Efeito do tratamento com carvacrol na produção de ROS nos diferentes grupos experimentais.



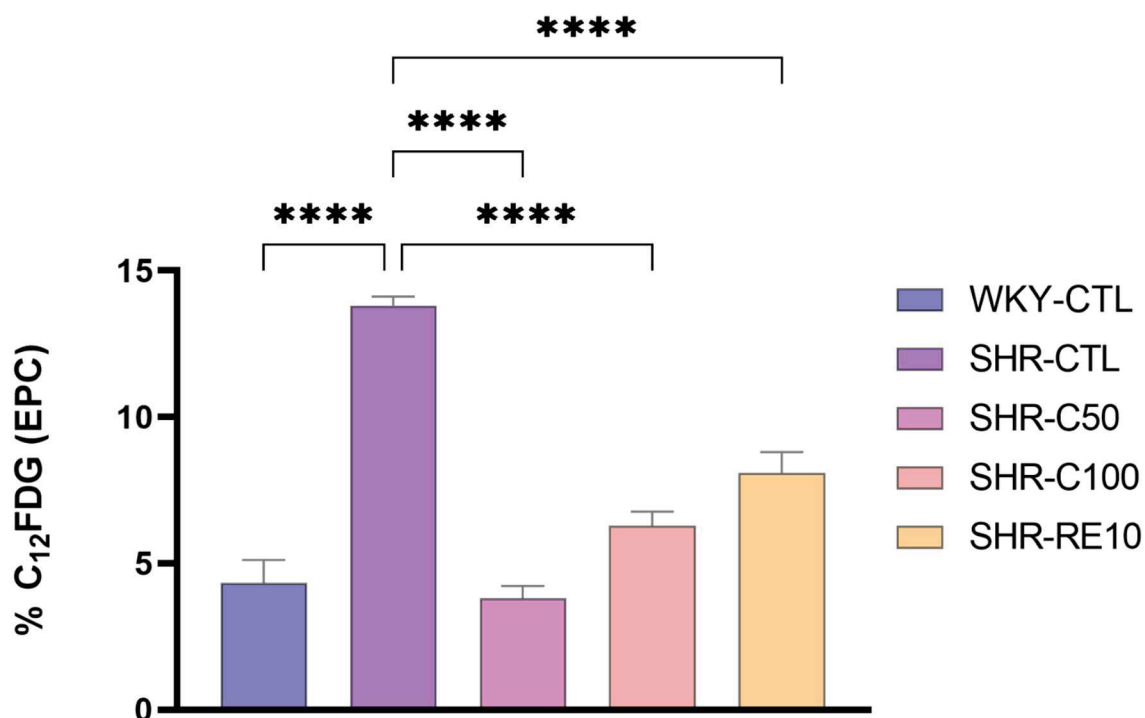
Efeito do tratamento com carvacrol na produção de ROS celular em diferentes grupos experimentais em EPC isoladas da medula óssea e cultivadas 7 dias após o tratamento. a) Imagens representativas da fluorescência DHE em EPC de medula óssea (Aumento 400x). b) Quantificação da intensidade de fluorescência de EPC isoladas da medula óssea. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Fonte: Gonçalves, 2023.

5.3.10 Influência do carvacrol sobre a senescência celular em EPC isoladas da medula óssea

A senescência celular foi avaliada por meio da atividade de SA- β -gal através da sonda C₁₂FDG. O grupo SHR-CTL (MO = 13.8 \pm 0.3, n = 4) aumentou a atividade da enzima SA- β -gal em relação ao grupo WKY-CTL (BM = 4.3 \pm 0.5, n = 4), apresentando uma maior intensidade de fluorescência em EPC isoladas da medula óssea de ratos. Por outro lado, os grupos SHR-C50 (MO = 3.8 \pm 0.4, n = 6 6), SHR-C100 (MO = 6.2 \pm 0.4, n = 5) e SHR-RE10 (MO = 8.1 \pm 0.5, n = 4) preveniram o aumento induzido pelo grupo SHR-CTL na atividade de SA- β -gal (Figure 34), apresentando níveis semelhantes ao grupo WKY-CTL.

Figura 32 - Efeito do tratamento com carvacrol na senescência celular em EPC nos diferentes grupos experimentais.

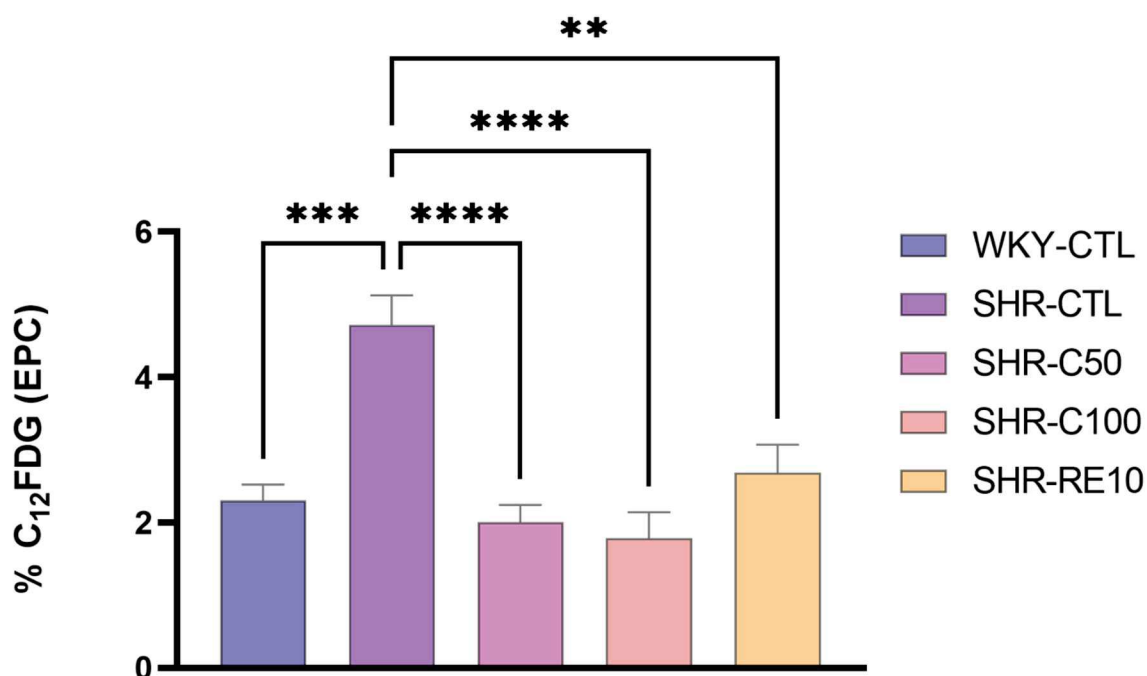


Efeito do tratamento com carvacrol na produção senescência celular em diferentes grupos experimentais em EPC isoladas da medula óssea e cultivadas por 7 dias após o tratamento. Quantificação da intensidade de fluorescência de C₁₂FDG de EPC isoladas da medula óssea. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de *Tukey*. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. Fonte: Gonçalves, 2023.

5.3.11 Influência do carvedilol sobre a senescência celular em EPC isoladas do sangue periférico

A avaliação da senescência celular em EPC isoladas da circulação periférica revelou resultados semelhantes ao apresentado em células da medula óssea. Os grupos SHR-C50 (SP = 2.0 ± 0.2 , n = 6), SHR-C100 (SP = 1.7 ± 0.3 , n = 6) e SHR-RE10 (SP = 2.6 ± 0.3 , n = 6) preveniram o aumento induzido pelo grupo SHR-CTL (SP = 4.7 ± 0.4 , n = 6) na atividade de SA- β -gal (Figure 35), apresentando níveis semelhantes ao grupo WKY-CTL (SP = 2.3 ± 0.2 , n = 6).

Figura 33 - Efeito do tratamento com carvedilol na senescência celular em EPC nos diferentes grupos experimentais.

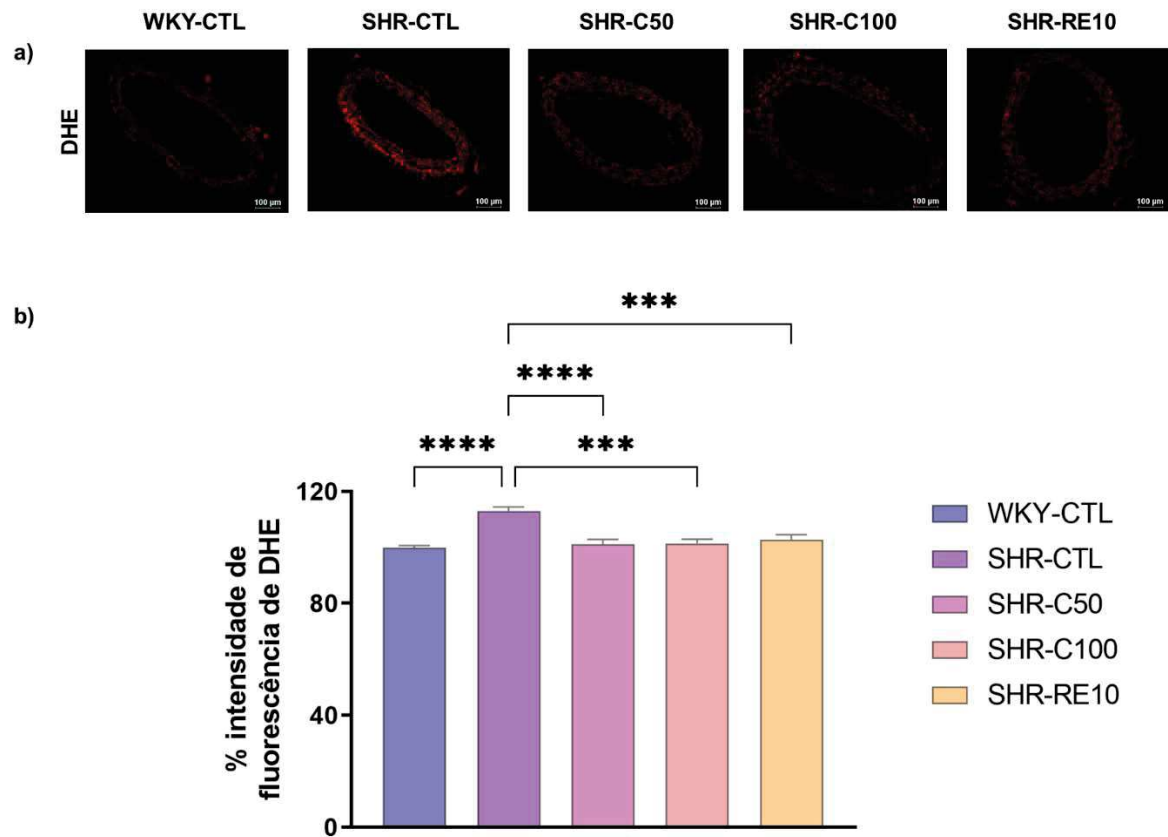


Efeito do tratamento com carvedilol na produção senescência celular em diferentes grupos experimentais em EPC isoladas da circulação periférica e cultivadas por 7 dias após o tratamento. Quantificação da intensidade de fluorescência de C₁₂FDG de EPC isoladas da circulação periférica. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, seguido do pós-teste de *Tukey*. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. Fonte: Gonçalves, 2023.

5.3.12 Efeito do carvacrol sobre o estresse oxidativo vascular de animais hipertensos tratados

O estresse oxidativo vascular relaciona-se com uma menor recuperação da camada endotelial, visto que pode causar lesões nas células endoteliais adjacentes e reduzir a capacidade de adesão celular. Em nosso estudo os animais SHR-CTL ($112,9 \pm 1,5$; $n = 6$) apresentaram um aumento da intensidade de fluorescência de DHE em relação ao grupo WKY-CTL ($100 \pm 0,6$; $n = 6$) (Figura 36). De forma interessante, os tratamentos dos grupos SHR-C50 ($112,9 \pm 1,5$; $n = 6$), SHR-C100 e SHR-RE10 foram capazes de reduzir a intensidade de fluorescência observada no grupo SHR-CTL ($p < 0,05$).

Figura 34 - Medida da intensidade de fluorescência basal da sonda DHE em cortes transversais artéria mesentérica superior isolada de rato dos diferentes grupos experimentais após tratamento de quatro semanas.

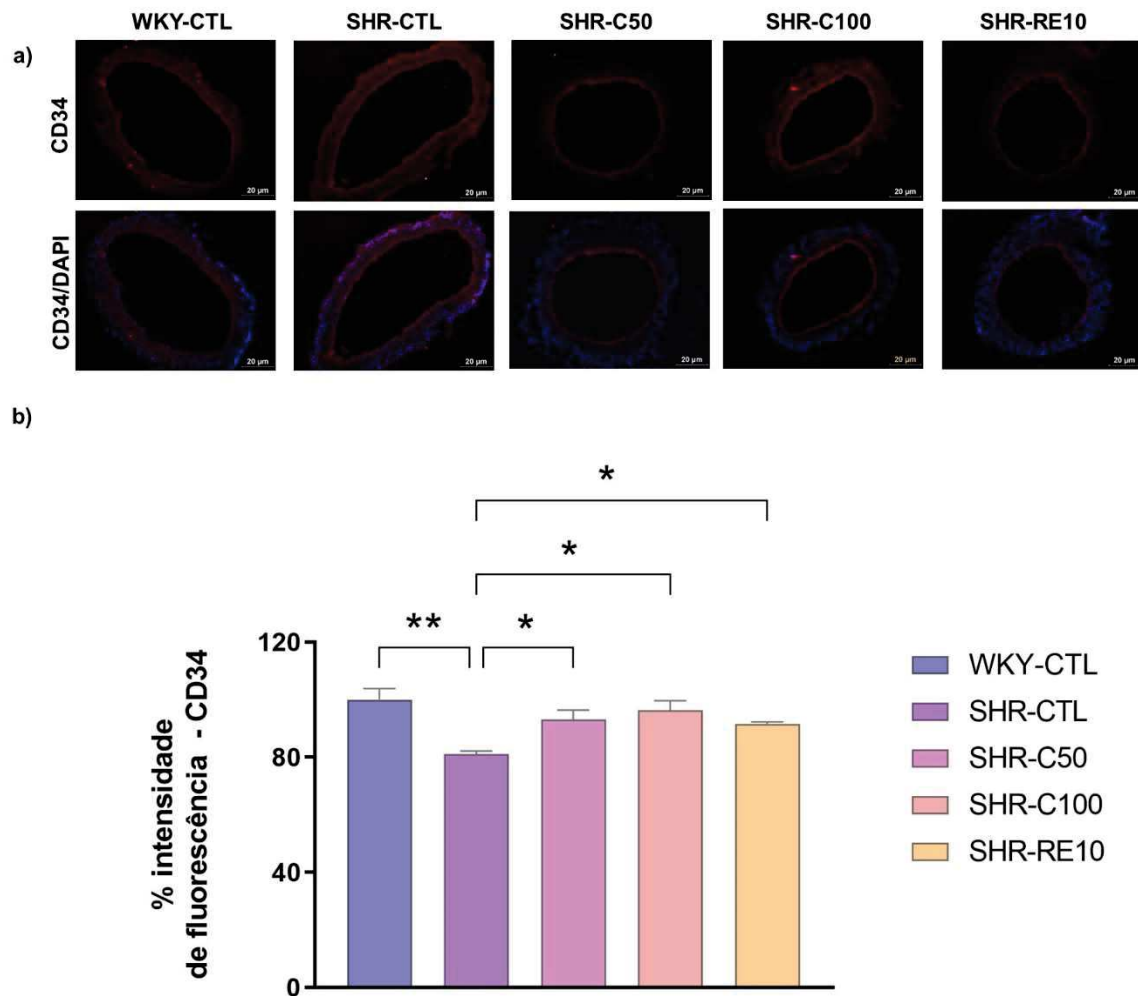


Grupos: WKY-CTL (n = 6); SHR-CTL (n = 6); SHR-C50 (n = 6); SHR-C100 (n = 5); SHR-RE10(n = 6).
a). Imagens da intensidade de fluorescência basal emitida pela sonda DHE em cortes histológicos de artéria mesentérica superior dos diferentes grupos experimentais tratados por quatro semanas (objetiva 10 X). b). Gráfico da intensidade relativa de fluorescência basal (%) de DHE em cortes histológicos de artéria mesentérica dos diferentes grupos tratados por quatro semanas. Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de fluorescência em relação ao controle \pm e.p.m. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.
Fonte: Gonçalves,2023.

5.3.13 Detecção de células vasculares marcadas com CD34

A melhoria da funcionalidade das EPC relaciona-se diretamente com o aumento da capacidade regenerativa. Sendo assim, avaliamos a expressão de CD34 em artéria mesentérica superior dos animais tratados através da técnica de microscopia de fluorescência. Os animais SHR-CTL ($81,0 \pm 1,0$ n = 5) apresentaram uma redução da intensidade de fluorescência de CD34 ($100 \pm 3,8$; n = 5) (Figura 37) em relação aos animais WKY-CTL. Este efeito foi revertido pelo tratamento dos animais SHR-C50 ($93,1 \pm 3,3$; n = 6), SHR-C100 ($96,2 \pm 3,3$; n = 6) e SHR-RE10 ($91,5 \pm 0,7$; n = 4). Os grupos tratados não apresentaram diferença estatística significativa entre si.

Figura 35 - Medida da intensidade de fluorescência de CD34 em cortes transversais artéria mesentérica superior isolada de rato dos diferentes grupos experimentais após tratamento de quatro semanas.

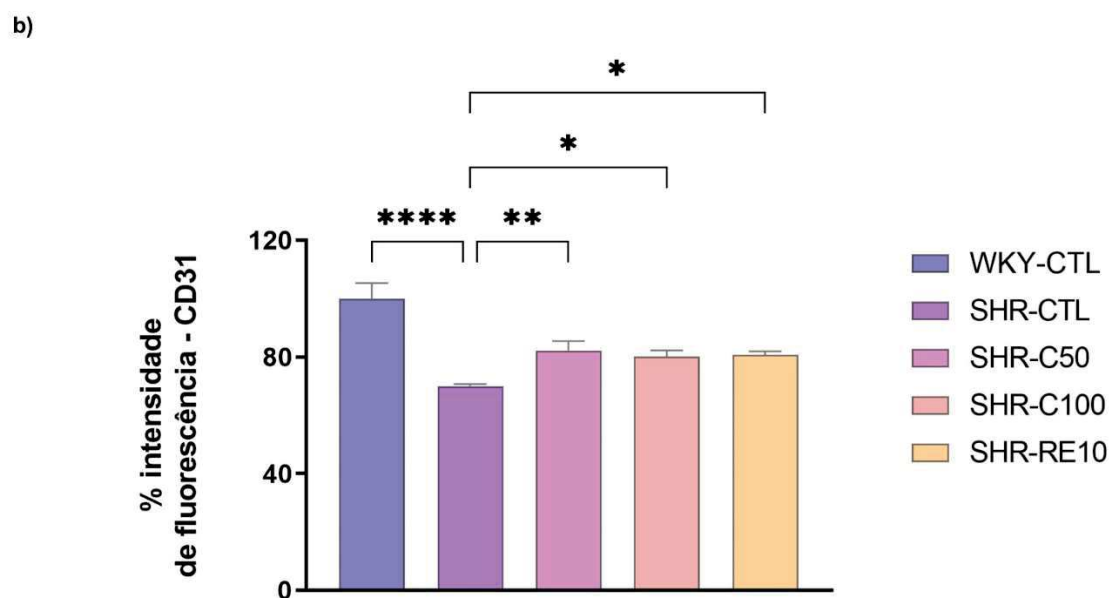
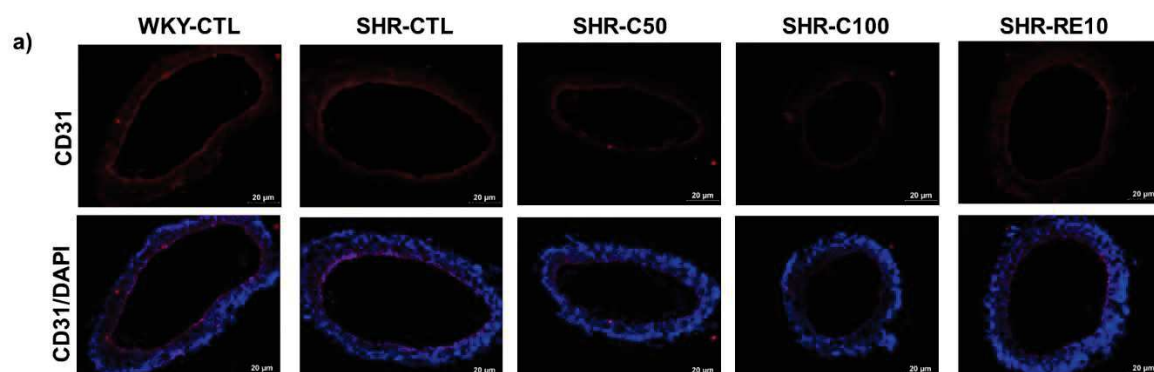


Grupos: WKY-CTL (n = 5); SHR-CTL (n = 5); SHR-C50 (n = 6); SHR-C100 (n = 6); SHR-RE10 (n = 4).
a). Imagens da intensidade de fluorescência basal emitida pelo anticorpo CD34 em cortes histológicos de artéria mesentérica superior dos diferentes grupos experimentais tratados por quatro semanas (objetiva 10 X). b). Gráfico da intensidade relativa de fluorescência basal de CD34 em cortes histológicos de artéria mesentérica dos diferentes grupos tratados por quatro semanas. Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de fluorescência em relação ao controle \pm e.p.m. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

5.3.14 Detecção de células vasculares marcadas com CD31

A imunofluorescência de artéria mesentérica superior isoladas de animais tratados mostraram uma diminuição significativa na expressão de CD31 nos animais SHR-CTL ($70,0 \pm 0,6$; $n = 6$) quando comparados ao grupo WKY-CTL ($100 \pm 5,3$; $n = 4$) (Figura 38). Todavia, os animais dos grupos SHR-C50 ($82,2 \pm 3,2$; $n = 6$), SHR-C100 ($80,1 \pm 2,0$; $n = 5$) e SHR-RE10 ($80,7 \pm 1,2$; $n = 5$) apresentaram expressão de CD31 superiores ao grupo SHR-CTL. Entretanto, a resposta não foi revertida ao nível de expressão do grupo WKY-CTL.

Figura 36 - Medida da intensidade de fluorescência de CD31 em cortes transversais artéria mesentérica superior isolada de rato dos diferentes grupos experimentais após tratamento de quatro semanas.



Grupos: WKY-CTL (n = 4); SHR-CTL (n = 6); SHR-C50 (n= 6); SHR-C100 (n = 5); SHR-RE10(n = 5).
a). Imagens da intensidade de fluorescência basal emitida pelo anticorpo CD31 em cortes histológicos de artéria mesentérica superior dos diferentes grupos experimentais tratados por quatro semanas (objetiva 10 X). b). Gráfico da intensidade relativa de fluorescência basal de CD31 em cortes histológicos de artéria mesentérica dos diferentes grupos tratados por quatro semanas. Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de fluorescência em relação ao controle \pm e.p.m. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Os principais achados desse estudo indicam que o carvacrol melhora a funcionalidade de EPC por reduzir o dano oxidativo através do aumento da síntese de fatores antioxidantes e melhora a biodisponibilidade de NO, um dos principais moduladores da atividade das EPC. Além disso, demonstramos que o carvacrol previne a disfunção endotelial de animais hipertensos através de uma regulação positiva da mobilização de EPC, aumentando a capacidade proliferativa e funcional e reduzindo o estresse oxidativo e senescência de células isoladas a partir da medula óssea e sangue periférico, contribuindo para a re-endotelização mediada por EPC.

O uso de produtos de origem vegetal é reconhecido há anos como uma fonte de agentes terapêuticos, em virtude de suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Nos últimos anos uma diversidade de técnicas de isolamento, análise e ensaios biológicos foram desenvolvidas para aprimorar as atividades atribuídas a esses produtos (CHOPRA;DHINGRA, 2021). Neste contexto, pesquisas tem evidenciado os óleos essenciais, compostos voláteis, de baixo peso molecular que apresenta em sua constituição altas concentrações de monoterpenos, com uma ampla variedade biológica e farmacológica (COSTA et al., 2019).

O carvacrol é o principal constituinte de óleos essenciais extraídos de plantas como *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Lepidium flavum* (SHARIFI-RAD et al., 2018). Este monoterpeno tem sido extensivamente estudado e demonstrou apresentar vários benefícios, incluindo propriedades antioxidantes (TOHIDI et al., 2020), anti-inflamatórias (LI, Y.;XU, J. Z.; et al., 2018) e cardioprotetoras [17,22,36] (DANTAS et al., 2015; CHEN et al., 2017a; SADEGHZADEH et al., 2018).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram a ação benéfica do carvacrol sobre a disfunção erétil associada a hipertensão de animais SHR, por reverter a disfunção endotelial e hipercontratilidade em tiras de corpos cavernosos provavelmente por um mecanismo que envolve a modulação do estresse oxidativo (GONÇALVES, 2018). Também demonstramos que o tratamento com o carvacrol foi capaz de reduzir a disfunção endotelial associada a uma redução do estresse oxidativo em animais hipertensos (dados não publicados). Entretanto, os mecanismos pelo qual ocorre este efeito ainda precisam ser elucidados.

O termo disfunção endotelial é utilizado para caracterizar a função celular endotelial prejudicada, sendo determinada por uma alteração na biodisponibilidade de NO, estresse oxidativo e senescência endotelial (PARK et al., 2021). A ANG II é um dos principais fatores que induzem anormalidades, causando danos vasculares e remodelamento vascular na hipertensão, afetando a inflamação, hipertrofia, migração e apoptose celular (ZHANG et al., 2017). Além disso, a sinalização mediada pela ANG II está associada ao estresse oxidativo e inflamação em EPC, acelerando o processo de senescência que inibe o reparo endotelial endógeno. Como resultado a lesão vascular progride aumentando a ocorrência de eventos cardiovasculares (LIN et al., 2013). Desta forma, devido as características mencionadas acima nós utilizamos a ANG II como modelo de estresse oxidativo *in vitro*, para avaliar os efeitos do carvacrol sobre a modulação de EPC.

Muitos estudos relataram a utilização de ANG II como modelo de estresse oxidado *in vitro* em células endoteliais, embora não tenha estabelecido uma concentração padrão de incubação. Entretanto, a literatura é escassa em relação a modelos de estresse oxidativo em EPC. Neste sentido, avaliamos qual seria concentração de ANG II mais adequada para induzir o aumento da detecção de $O_2^{\bullet-}$ pela sonda DHE. As concentrações testadas de 0,1, 1 e 10 μ M, foram escolhidas com base em estudos que descrevem a utilização de ANG II em células endoteliais (ZHANG et al., 2017).

A viabilidade celular é determinada pelo número de células vivas em uma população sendo usada como um indicador vital para a ação da sobrevivência ou morte celular em resposta a drogas ou agentes químicos (ADAN et al., 2016). Sendo assim, avaliamos inicialmente a capacidade citotóxica induzida por ANG II em EPC isoladas da medula óssea de ratos. Ao avaliar o impacto sobre a viabilidade celular foi observado uma redução deste parâmetro nas concentrações de 1,0 e 10 μ M.

Em contrapartida, todas as concentrações de ANG II foram capazes de induzir o aumento da intensidade de fluorescência da sonda DHE em relação ao controle em EPC isoladas da medula óssea de ratos. Entretanto, a concentração de 10 μ M induziu a formação de $O_2^{\bullet-}$ de maneira mais significativa que as demais concentrações. Desta forma, definimos padronizar a concentração de 1,0 μ M nos experimentos posteriores, por ser a menor concentração a induzir alteração da viabilidade celular e formação de $O_2^{\bullet-}$.

No presente estudo, também investigamos as concentrações celulares seguras de carvacrol sobre a viabilidade e estresse oxidativo em EPC extraídas da medula óssea de ratos. Interessantemente, a concentração de 0,1 μM não apenas não induziu citotoxicidade, mas também aumentou a taxa proliferativa de EPC e preveniu a citotoxicidade induzida por ANG II. Além disso, na presença de ANG II observamos nesta concentração uma redução efetiva da formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Desta forma, convencionamos a utilização da concentração de 0,1 μM de carvacrol nos experimentos subsequentes.

O estresse oxidativo está relacionado com a redução da função das EPC, reduzindo a capacidade de adesão, migração e reparo endotelial intensificando o dano endotelial de pacientes hipertensos (XIE et al., 2021). Vários agentes antioxidantes como resveratrol (SHEN et al., 2016), Ginkgo biloba (DONG;GOLDSCHMIDT-CLERMONT, 2007), berberine (ZHANG, G. et al., 2020) e ginsenoide (HE et al., 2011) melhoraram a funcionalidade das EPC em decorrência da diminuição do estresse oxidativo. Diante disso, avaliamos a funcionalidade das EPC *in vitro*. Em nosso estudo, a adesão e migração celular foi enfraquecida pela incubação de ANG II, corroborando com dados na literatura que demonstram uma redução da funcionalidade das EPC relacionada ao aumento da senescência celular devido ao intenso estresse oxidativo (LI, C. et al., 2021).

A incubação com o carvacrol em condições basais não alterou a adesão celular, entretanto induziu o aumento da migração celular de EPC extraídas da medula óssea de ratos. Matluobi e colaboradores demonstraram que o carvacrol nas concentrações de 12,5, 25 e 50 μM induz aumento de migração celular e angiogênese em células mesenquimais humanas através da modulação de fatores angiogênicos e diferenciação celular (MATLUOBI et al., 2018). Concentrações superiores as utilizadas em nosso estudo, justificando a divergência de resultados. Na presença de ANG II o carvacrol aumentou a adesão e migração celular. Portanto, podemos sugerir que o carvacrol contribui para melhorar a função das EPC em condições de estresse oxidativo, corroborando com diversos estudos na literatura que demonstram a ação benéfica deste monoterpene em reverter o dano oxidativo (RIAZ et al., 2022).

A produção do NO através da ativação da via PI3K/Akt/eNOS é um dos principais fatores associados ao processo de migração e angiogênese mediado pelas EPC. Hu e colaboradores demonstraram através de estudos clínicos que a regulação

positiva da expressão de Akt/eNOS promoveu a migração celular (HU et al., 2019). A sinalização da via PI3K/Akt/eNOS também está envolvida na restauração da função das EPC melhorando a reendotelização (YAO et al., 2020; MU et al., 2022). Entretanto, em condições de estresse oxidativo induzido por ANG II a sinalização da via da eNOS é prejudicada comprometendo a função vascular (YU et al., 2021), visto que o aumento da formação $O_2^{\bullet-}$ reduz a biodisponibilidade de NO por desencadear o desacoplamento da eNOS e favorece a formação de ONOO⁻, intensificando a ação de agentes oxidantes na célula (PEREZ-TORRES et al., 2020). Nós mostramos que o carvacrol melhora a formação de NO e induz o aumento da expressão da eNOS, o que provavelmente resultou em uma melhor função das EPC, tendo em vista que este é um importante regulador da funcionalidade dessas células.

As EPC são caracterizadas por apresentar maior expressão de genes antioxidantes em comparação com células endoteliais maduras (WANG et al., 2013). Todavia, condições de intenso estresse oxidativo nas EPC desencadeia redução da síntese e atividade de enzimas antioxidantes (MAI et al., 2022). Além disso, o estresse oxidativo promove a peroxidação lipídica, resultando em disfunção de EPC (D'APOLITO et al., 2017). Em EPC isoladas de sangue periférico, a ANG demonstrou reduzir a atividade de CAT, SOD e glutathione e aumentou o dano oxidativo (XU et al., 2019). Estudos demonstraram que a ANG (1 μ M) em EPC extraídas da medula óssea de ratos aumentou a resposta de secreção a malonaldeído (MDA) e reduziu a atividade de SOD (MAI et al., 2022). Sendo assim, passamos a avaliar se o carvacrol induziu a redução da formação de $O_2^{\bullet-}$ e melhorou a expressão da eNOS por aumentar a expressão de fatores antioxidantes.

Em nosso estudo demonstramos que o carvacrol foi eficiente em aumentar a produção das enzimas SOD e CAT, prevenindo o aumento do estresse oxidativo induzido pela presença da ANG II. Poucos estudos demonstram *in vitro* a ação do carvacrol sobre a modulação de enzimas antioxidantes. Entretanto, o tratamento com o carvacrol em diferentes concentrações tem se mostrado efetivo em aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, incluindo CAT, SOD entre outras, em diferentes modelos que induzem o estresse oxidativo (AMINIZADEH et al., 2020; HAKIMI et al., 2020; YILDIZ et al., 2022; MORTAZAVI et al., 2023), corroborando com os dados obtidos em nosso estudo.

O fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) controla a expressão de muitos genes que codificam reguladores redox celulares, sendo um importante mecanismo de sinalização na manutenção da homeostase redox. Sob condições de estresse oxidativo o Nrf2 é ativado e translocado para o núcleo, que se liga à região promotora ARE, desencadeando a transcrição de genes relacionados a enzimas antioxidantes, restaurando a homeostase redox (T et al., 2020). Desta forma, nosso estudo procurou avaliar se o aumento da expressão das enzimas SOD e CAT estão relacionadas com o aumento da expressão do Nrf2.

O carvacrol aumentou a expressão do Nrf2 apenas quando foi incubado de forma concomitante com a ANG, demonstrando sua importância em condições de dano oxidativo, assim como demonstrado em diferentes estudos que demonstram que este monoterpene induz o aumento da expressão do Nrf2 em condições de estresse oxidativo (AMINIZADEH et al., 2020; ARKALI et al., 2021; NAEEM et al., 2021).

Estudos tem demonstrado que o estresse oxidativo relaciona-se diretamente com o comprometimento funcional e redução do número de EPC circulantes na disfunção vascular. Além disso, a presença de fatores de risco cardiovascular pode alterar o estado redox dessas células, alterando suas habilidades de reparo. De fato substâncias antioxidantes tem demonstrado melhorar a biologia das EPC (LIN et al., 2013). Sendo assim, devido a ação efetiva do carvacrol em melhorar a funcionalidade das EPC em condições de estresse oxidativo, passamos a avaliar se o carvacrol poderia também modular a funcionalidade das EPC em experimentos *in vivo*.

Em acordo com resultados obtidos anteriormente, a administração oral e diária do carvacrol em ambas as doses (50 e 100 mg/kg), por quatro semanas, foram capazes de reduzir a PAS de animais hipertensos. Resultados semelhantes foram descritos na literatura, demonstrando que o tratamento oral com carvacrol por 30 dias reduziu a PAS, mesmo quando foram utilizadas doses inferiores ao nosso estudo (COSTA et al., 2021; DIAS et al., 2022). Desta forma, esses dados corroboram com a capacidade anti-hipertensiva do carvacrol.

Existem muitos estudos sobre os marcadores para identificação de populações de EPC. Em geral, as EPC são um grupo heterógeno de células caracterizadas por expressar em sua superfície CD133 e CD34 como marcadores de células progenitoras hematopoiéticas, e VEGFR2 como um marcador de linhagem endotelial, caracterizando a marcação celular mais fidedigna (HEINISCH et al., 2022). Desta

forma, para caracterizar a população de EPC adotamos a marcação concomitante de CD133⁺, CD34⁺ e VEGFR-2⁺.

Ao quantificar o número de EPC na medula óssea em nosso estudo, verificamos um elevado percentual de células no grupo SHR-CTL quando comparados ao grupo WKY-CTL. Resultados divergentes foram relatados por Fernandes et al., onde os autores descreveram que animais SHR apresentaram uma redução dos níveis de EPC derivadas da medula óssea em comparação com animais WKY (FERNANDES, T. et al., 2012). Uma possível variável para explicar essa divergência é a idade dos animais, uma vez que de acordo com o estágio da hipertensão podem ser encontrados níveis diferentes de EPC na medula óssea e circulação periférica, devido ao dano ocasionado pelas ROS nestas células ao longo da progressão da hipertensão arterial (LUO et al., 2016). Em nosso estudo, os animais tratados com carvacrol na dose de 50 e 100 mg/kg e com resveratrol apresentaram uma redução nos números de EPC na medula óssea quando comparados ao grupo SHR-CTL e não apresentaram diferença estatística do grupo WKY-CTL.

Em contraste na avaliação das EPC circulantes o grupo SHR-CTL apresentou concentrações significativamente menor, quando comparada ao grupo WKY-CTL, corroborando com dados na literatura, que demonstraram uma redução dos níveis de EPC circulantes em animais (YAO et al., 2008) e pacientes hipertensos (HU et al., 2021; LI, C. et al., 2021). Resultados divergentes são encontrados na literatura, caracterizando um aumento nos níveis de EPC circulantes de animais SHR em relação a animais WKY (ZHANG, G. et al., 2020; LI et al., 2022). Entretanto, tais estudos utilizam um perfil de caracterização diferente do utilizado em nosso estudo, caracterizando as células de forma isolada com marcadores CD144 (ZHANG, G. et al., 2020; LI et al., 2022) ou CD31 (LEAL et al., 2020). Tais marcadores também podem ser utilizados como marcadores adicionais de EPC (PETERS, 2018; LI, J.-H. et al., 2021), embora não sejam tão específicos quando utilizados de forma isolada.

Interessantemente, o tratamento por quatro semanas com o carvacrol (SHR-C50 e SHR-C100) restauraram as concentrações de EPC circulantes, para valores semelhantes ao grupo WKY-CTL, sem apresentar diferença estatística para o grupo SHR-RE10, com característica de diferenciação em células endoteliais, em decorrência da expressão de CD34 e VEGFR-2. Huang também demonstrou que o tratamento com resveratrol foi capaz de induzir o aumento nos níveis circulantes de

EPC, por restaurar a função biológica destas células, sendo este um importante fator para o reparo do dano vascular (HUANG, P. H. et al., 2010).

Além disso, estudos tem relatado que o aumento da mobilização das EPC na circulação apresenta como finalidade preservar a integridade endotelial em resposta a um dano vascular, prevenindo os danos relacionados a hipertensão (BUDZYN;GRYSZCZYNSKA; et al., 2019; BUDZYN;GRYSZCZYNSKA; et al., 2019). Entretanto, para que este reparo seja realizado é necessário a manutenção funcional destas células (NAITO et al., 2020). Desta forma, pode-se sugerir o carvacrol foi eficiente em aumentar a mobilização de EPC para a circulação periférica, modulando de forma benéfica a função celular.

A capacidade clonogênica das EPC tem sido utilizada como um índice de análise funcional, sendo correlacionada como um fator de risco cardiovascular quando apresenta baixa formação de UFC (LUO et al., 2016). Na hipertensão, o declínio da funcionalidade das EPC, parece ocorrer de forma primária a redução de EPC circulantes, sendo este fator acentuado a medida que a hipertensão progride (GIANNOTTI et al., 2010). A baixa funcionalidade destas células tem sido relatada em pacientes com hipertensão arterial de difícil controle e com danos em órgão alvos (HUANG, P.-H. et al., 2010; MAGEN et al., 2010; LEE et al., 2011).

Desta forma, avaliamos a capacidade de formação de colônias de EPC isoladas da medula óssea e sangue periférico. Em nosso estudo, o grupo hipertenso mostrou uma baixa capacidade de formação de colônias em comparação aos animais normotensos, sugerindo uma deficiência no reparo mediada por estas células. Resultados semelhantes foram relatados em estudos com animais (YU et al., 2008; FERNANDES, Tiago et al., 2012) e pacientes hipertensos (MACENEANEY et al., 2011; BOGDANSKI et al., 2012; WANG et al., 2019), corroborando que a hipertensão induz uma baixa regeneração vascular, por reduzir a proliferação.

Outrossim, semelhante aos resultados obtidos no estudo *in vitro*, o tratamento com o carvacrol foi capaz de aumentar a capacidade proliferativa das EPC de forma semelhante aos animais tratados com o resveratrol e ao grupo normotenso. Estudos anteriores demonstraram que o consumo do resveratrol foi capaz de melhorar a capacidade proliferativa de EPC por mecanismos que envolve o aumento da sinalização do óxido nítrico (NO) (HUANG, P. H. et al., 2010).

Como mencionado anteriormente, o NO é um importante mediador do processo da angiogênese, visto que esta molécula participa de forma ativa para induzir a mobilização de EPC, além de melhorar a capacidade migratória e proliferativa (PEYTER et al., 2021). Este fato foi evidenciado através de experimentos com camundongos knockout para eNOS^{-/-}, resultando em falha na mobilização de EPC para a circulação periférica (AICHER et al., 2003). Além disso, a downregulation da via de sinalização PI3K/Akt/eNOS está relacionada com o comprometimento do reparo endotelial mediado pelas EPC em pacientes hipertensos (YAO et al., 2020). Estudos com animais hipertensos também relacionaram a baixa expressão de eNOS em EPC com a deficiência de regeneração em tecidos que sofreram isquemia (DE NIGRIS et al., 2007). Diante disto, passamos a avaliar a modulação do carvacrol sobre a expressão e atividade da eNOS.

O presente estudo demonstra que o tratamento com o carvacrol foi capaz de induzir o aumento da atividade da eNOS em células cultivadas extraídas da medula óssea. Em contrapartida, nas células provenientes da circulação periférica o tratamento com o carvacrol induziu o aumento da síntese e atividade da eNOS, corroborando com os resultados obtidos anteriormente. Chen et al. relatou que o carvacrol aumentou a fosforilação da eNOS em modelo de isquemia/reperfusão em cardiomiócitos (CHEN et al., 2017b). O carvacrol também demonstrou aumentar os níveis de expressão de eNOS em tecido renal em modelo de isquemia/reperfusão bilateral (OZTURK et al., 2018). Além disso, o resveratrol mostrou promover o aumento da contagem e funcionalidade de EPC através da ativação da via PI3K/Akt/eNOS (CHEN et al., 2020). Desta forma, podemos sugerir que o carvacrol induziu o aumento da capacidade migratória da EPC por reverter o dano da via de sinalização do NO em animais hipertensos.

Estudos experimentais indicam que pacientes hipertensos, apresentam altos índices de formação de ROS associada ao aumento da senescência celular (HE et al., 2019; LI, C. et al., 2021). Desta forma, ao serem produzidas na medula óssea, devido a deficiência de fatores quimiotáticos e ao estado acelerado de senescência, a mobilização dessas células não ocorre adequadamente, ficando aprisionadas na medula óssea e intensificando a disfunção endotelial (PENG et al., 2015b). Esses dados estão em consonância com os dados apresentados neste estudo, que demonstrou o aumento ROS celular em animais hipertensos com consequente

indução de senescência nas EPC, justificando um elevado índice de EPC na medula óssea de animais SHR.

O tratamento com o carvacrol, por sua vez foi capaz de reverter o aumento de produção de ROS em EPC, reduzindo a prematuridade da senescência celular. De fato, vários estudos têm demonstrado que a capacidade antioxidante do carvacrol atua de forma benéfica sobre o sistema cardiovascular (EL-SAYED et al., 2015), restaurando a função vascular (COSTA et al., 2021; DIAS et al., 2022) e reduzindo a atividade da enzima NADPH oxidase, principal enzima envolvida na formação de ROS (LEE et al., 2015).

A redução do estresse oxidativo ainda pode ser explicado devido a uma melhora da performance antioxidante que o carvacrol induz, aumentando a expressão da SOD, CAT e Nrf2, como demonstramos anteriormente. Então podemos sugerir, pelo menos em parte, que o aumento da função observada nas EPC isoladas de animais hipertensos tratados com o carvacrol, está associada a capacidade antioxidante deste monoterpreno. Efeitos semelhantes também foram reportados em relação ao resveratrol (SHEN et al., 2016), corroborando com nossos achados.

Marketou et al relataram que as EPC apresentam um papel importante na rigidez e remodelamento arterial de pacientes hipertensos, onde a redução da mobilização reflete em um reparo ineficiente (MARKETOU et al., 2014). Sendo assim, investigamos como o aumento da mobilização das EPC induzido pelo carvacrol, alterou o remodelamento vascular.

Em animais SHR, o tratamento com o carvacrol reverteu o estresse oxidativo vascular o que pode ter contribuído para o aumento da re-endotelização mediada por EPC, como demonstrado pelo aumento de células marcadas com CD31 e CD34 nos vasos de animais hipertensos tratados. Resultados semelhantes foram observados com SHR-RE10, corroborando com estudos anteriores que demonstram que o resveratrol acelera a re-endotelização de segmentos arteriais com isquemia (J et al., 2006).

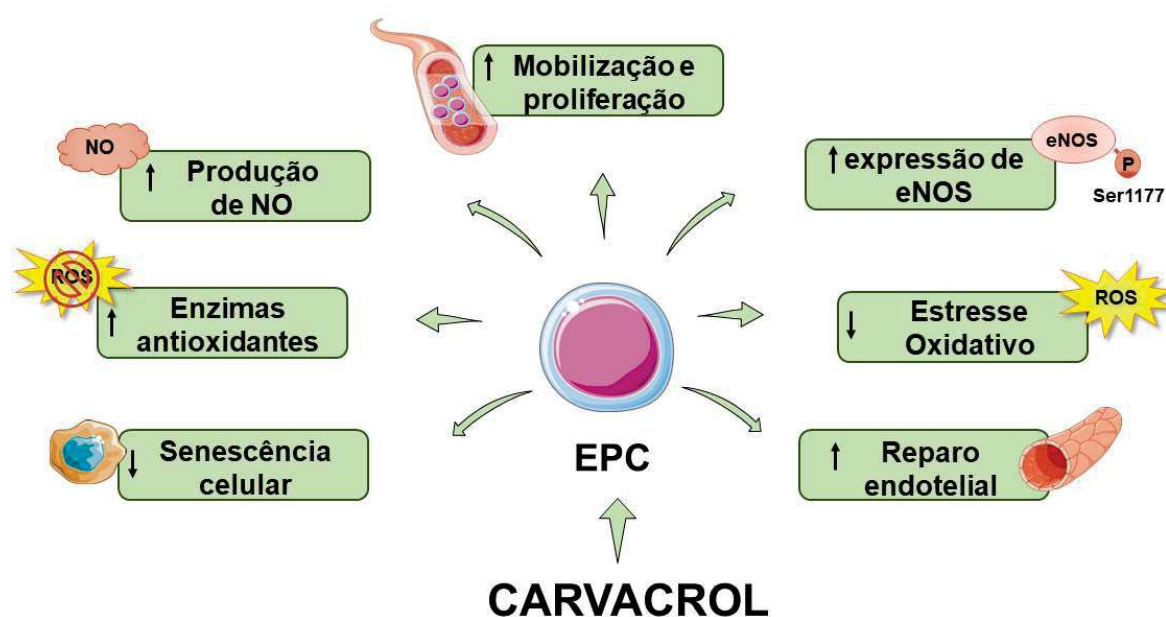
Matluobi e et al. mostraram através de experimentos *in vitro*, que o carvacrol aumentou a migração, angiogênese e a transdiferenciação de células mesenquimais para células endoteliais, sendo este efeito mediado por um aumento da expressão do VEGF, importante fator quimiotático envolvido na re-endotelização mediada pelas EPC. Desta forma, podemos sugerir que o carvacrol pode melhorar a capacidade

regenerativa dos vasos sanguíneos de animais hipertensos por modular de alguma forma o aumento da expressão do VEGF (MATLUOBI et al., 2018). Entretanto, estudos adicionais são necessários para comprovar esta hipótese e elucidar melhor os mecanismos pelos quais o carvacrol modula a função das EPC.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Em síntese, este estudo elucidou os efeitos que o carvacrol induz sobre o reparo endotelial mediado pelas EPC, sendo capaz de melhorar a mobilização, proliferação e função celular, aumentando a expressão da eNOS e fatores antioxidantes, promovendo a formação de NO e reduzindo o estresse oxidativo e senescência celular.



Perspectiva

8 PERSPECTIVA

Os resultados obtidos neste estudo apontam para o potencial do carvacrol na prevenção e redução da progressão da disfunção vascular induzido pelo estresse oxidativo no estado hipertensivo, possibilitando a produção de um produto que atue de maneira complementar para o tratamento da hipertensão. O próximo passo será investigar os mecanismos moleculares relacionados a angiogênese e o processo inflamatório observado na hipertensão arterial, visando consolidar os conhecimentos científicos sobre as ações do carvacrol.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAZEK, Ahmed S; EL-NAGGAR, Mehrez E; ALLAM, Ahmed; MORSY, Osama M; OTHMAN, Sarah I %J Processes. Microbial natural products in drug discovery. v. 8, n. 4, p. 470, 2020.
- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016.
- AGARWAL, A.; NANDIPATI, K. C.; SHARMA, R. K.; ZIPPE, C. D.; RAINA, R. Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction. **J Androl**, v. 27, n. 3, p. 335-47, May-Jun 2006.
- AICHER, A.; HEESCHEN, C.; MILDNER-RIHM, C.; URBICH, C.; IHLING, C.; TECHNIAU-IHLING, K.; ZEIHNER, A. M.; DIMMELER, S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. **Nat Med**, v. 9, n. 11, p. 1370-1376, Nov 2003.
- ALMANAITYTE, M.; JUREVICIUS, J.; MACIANSKIENE, R. Effect of Carvacrol, TRP Channels Modulator, on Cardiac Electrical Activity. **Biomed Res Int**, v. 2020, p. 6456805, 2020.
- AMINIZADEH, M.; KAVOOSI, G.; KARIMINIA, A. In vitro and ex vivo anti-diabetic and anti-hyperglycemic properties of Zataria multiflora essential oil. **Mol Biol Rep**, v. 47, n. 10, p. 7805-7813, Oct 2020.
- ARKALI, G.; AKSAKAL, M.; KAYA, S. O. Protective effects of carvacrol against diabetes-induced reproductive damage in male rats: Modulation of Nrf2/HO-1 signalling pathway and inhibition of Nf-kB-mediated testicular apoptosis and inflammation. **Andrologia**, v. 53, n. 2, p. e13899, Mar 2021.
- ASAHARA, Takayuki; MASUDA, Haruchika; TAKAHASHI, Tomono; KALKA, Christoph; PASTORE, Christopher; SILVER, Marcy; KEARNE, Marianne; MAGNER, Meredith; ISNER, Jeffrey M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. **Circulation research**, v. 85, n. 3, p. 221-228, 1999.
- ASAHARA, Takayuki; MUROHARA, Toyooki; SULLIVAN, Alison; SILVER, Marcy; VAN DER ZEE, Rien; LI, Tong; WITZENBICHLER, Bernhard; SCHATTEMAN, Gina; ISNER, Jeffrey M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v. 275, n. 5302, p. 964-966, 1997.
- BALCILAR, Cennet; ÖZAKÇA, Işıl; ALTAN, Vecdi Melih. Contribution of Rho-kinase and Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Signaling Pathways to Endothelium-Derived Contracting Factors Responses. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 207, 2017.
- BARROSO, Weimar Kunz Sebba; RODRIGUES, Cibele Isaac Saad; BORTOLOTTI, Luiz Aparecido; MOTA-GOMES, Marco Antônio; BRANDÃO, Andréa Araujo; FEITOSA, Audes Diógenes de Magalhães; MACHADO, Carlos Alberto; POLI-DE-FIGUEIREDO, Carlos Eduardo; AMODEO, Celso; MION, Décio %J Arquivos Brasileiros de Cardiologia. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial-2020. v. 116, p. 516-658, 2021.
- BAYRAKTUTAN, U. Endothelial progenitor cells: Potential novel therapeutics for ischaemic stroke. **Pharmacol Res**, v. 144, p. 181-191, Jun 2019.
- BEREZIN, A. E. Endothelial progenitor cells dysfunction and impaired tissue repair: The missed link in diabetes mellitus development. **Diabetes Metab Syndr**, v. 11, n. 3, p. 215-220, Jul-Sep 2017.
- BIANCONI, Vanessa; SAHEBKAR, Amirhossein; KOVANEN, Petri; BAGAGLIA, Francesco; RICCIUTI, Biagio; CALABRÒ, Paolo; PATTI, Giuseppe; PIRRO, Matteo. Endothelial and cardiac progenitor cells for cardiovascular repair: a controversial paradigm in cell therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 181, p. 156-168, 2018.

BOGDANSKI, P.; MILLER-KASPRZAK, E.; PUPEK-MUSIALIK, D.; JABLECKA, A.; LACINSKI, M.; JAGODZINSKI, P. P.; JAKUBOWSKI, H. Plasma total homocysteine is a determinant of carotid intima-media thickness and circulating endothelial progenitor cells in patients with newly diagnosed hypertension. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 50, n. 6, p. 1107-1113, Jan 14 2012.

BONAFE, F.; GUARNIERI, C.; MUSCARI, C. Nitric oxide regulates multiple functions and fate of adult progenitor and stem cells. **J Physiol Biochem**, v. 71, n. 1, p. 141-53, Mar 2015.

BRETON-ROMERO, Rosa; LAMAS, Santiago. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. **Redox biology**, v. 2, p. 529-534, 2014.

BRIONES, Ana M; TOUYZ, Rhian M. Oxidative stress and hypertension: current concepts. **Current hypertension reports**, v. 12, n. 2, p. 135-142, 2010.

BUDZYN, M.; GRYSZCZYNSKA, B.; BORUCZKOWSKI, M.; KACZMAREK, M.; BEGIER-KRASINSKA, B.; OSINSKA, A.; BUKOWSKA, A.; ISKRA, M.; KASPRZAK, M. P. The Potential Role of Circulating Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells in the Prediction of Left Ventricular Hypertrophy in Hypertensive Patients. **Frontier Physiology**, v. 10, p. 1005, 2019.

BUDZYN, M.; GRYSZCZYNSKA, B.; BORUCZKOWSKI, M.; KACZMAREK, M.; BEGIER-KRASINSKA, B.; OSINSKA, A.; BUKOWSKA, A.; ISKRA, M.; KASPRZAK, M. P. The endothelial status reflected by circulating endothelial cells, circulating endothelial progenitor cells and soluble thrombomodulin in patients with mild and resistant hypertension. **Vascul Pharmacol**, v. 113, p. 77-85, Feb 2019.

CANJUGA, D.; STEINLE, H.; MAYER, J.; UHDE, A. K.; KLEIN, G.; WENDEL, H. P.; SCHLENSAK, C.; AVCI-ADALI, M. Homing of mRNA-Modified Endothelial Progenitor Cells to Inflamed Endothelium. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 6, Jun 2 2022.

CHAVAN, Pradnya S; TUPE, Santosh G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control**, v. 46, p. 115-120, 2014.

CHEN, C.; SONG, C.; ZHANG, D.; YIN, D.; ZHANG, R.; CHEN, J.; DOU, K. Effect of resveratrol combined with atorvastatin on re-endothelialization after drug-eluting stents implantation and the underlying mechanism. **Life Sci**, v. 245, p. 117349, Mar 15 2020.

CHEN, Y.; BA, L.; HUANG, W.; LIU, Y.; PAN, H.; MINGYAO, E.; SHI, P.; WANG, Y.; LI, S.; QI, H.; SUN, H.; CAO, Y. Role of carvacrol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways. **Eur J Pharmacol**, v. 796, p. 90-100, Feb 5 2017a.

CHEN, Y.; BA, L.; HUANG, W.; LIU, Y.; PAN, H.; MINGYAO, E.; SHI, P.; WANG, Y.; LI, S.; QI, H.; SUN, H.; CAO, Y. Role of carvacrol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways. **European Journal of Pharmacology**, v. 796, p. 90-100, Feb 5 2017b.

CHONG, M. S.; NG, W. K.; CHAN, J. K. Concise Review: Endothelial Progenitor Cells in Regenerative Medicine: Applications and Challenges. **Stem Cells Transl Med**, v. 5, n. 4, p. 530-8, Apr 2016.

CHOPRA, B.; DHINGRA, A. K. Natural products: A lead for drug discovery and development. **Phytother Res**, v. 35, n. 9, p. 4660-4702, Sep 2021.

COPPOLINO, Giuseppe; BOLIGNANO, Davide; CAMPO, Susanna; LODDO, Saverio; TETI, Diana; BUEMI, Michele. Circulating progenitor cells after cold pressor test in hypertensive and uremic patients. **Hypertension research**, v. 31, n. 4, p. 717-724, 2008.

COSTA, A.; PASQUINELLI, G. Air Pollution Exposure Induces Vascular Injury and Hampers Endothelial Repair by Altering Progenitor and Stem Cells Functionality. **Front Cell Dev Biol**, v. 10, p. 897831, 2022.

COSTA, H. A.; DIAS, C. J. M.; MARTINS, V. A.; DE ARAUJO, S. A.; DA SILVA, D. P.; MENDES, V. S.; DE OLIVEIRA, M. N. S., Jr.; MOSTARDA, C. T.; BORGES, A. C. R.; RIBEIRO, R. M.; FILHO, N. S. Effect of treatment with carvedilol and aerobic training on cardiovascular function in spontaneously hypertensive rats. **Exp Physiol**, v. 106, n. 4, p. 891-901, Apr 2021.

COSTA, M. F.; DURCO, A. O.; RABELO, T. K.; BARRETO, R. S. S.; GUIMARAES, A. G. Effects of Carvedilol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: a systematic review. **J Pharm Pharmacol**, v. 71, n. 2, p. 141-155, Feb 2019.

CUI, B.; HUANG, L.; FANG, Y.; GUO, R.; YIN, Y.; ZHAO, X. Transplantation of endothelial progenitor cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase enhances inhibition of neointimal hyperplasia and restores endothelium-dependent vasodilatation. **Microvasc Res**, v. 81, n. 1, p. 143-50, Jan 2011.

D'APOLITO, M.; COLIA, A. L.; LASALVIA, M.; CAPOZZI, V.; FALCONE, M. P.; PETTOELLO-MANTOVANI, M.; BROWNLEE, M.; MAFFIONE, A. B.; GIARDINO, I. Urea-induced ROS accelerate senescence in endothelial progenitor cells. **Atherosclerosis**, v. 263, p. 127-136, Aug 2017.

DANTAS, B. P.; ALVES, Q. L.; DE ASSIS, K. S.; RIBEIRO, T. P.; DE ALMEIDA, M. M.; DE VASCONCELOS, A. P.; DE ARAUJO, D. A.; DE ANDRADE BRAGA, V.; DE MEDEIROS, I. A.; ALENCAR, J. L.; SILVA, D. F. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvedilol in normotensive rat. **Vascul Pharmacol**, v. 67-69, p. 48-58, Apr-Jun 2015.

DANTAS, Sabine Helena ; SILVA, Antônia Lêda; VERAS, Robson Cavalcante; REZENDE, Mathania Silva de Almeida; ARAÚJO, Islania Gisélia Albuquerque; GONÇALVES, Tays Amanda Felisberto; ALMEIDA, Arthur José Pontes de; MEDEIROS, Isac Almeida de. Evaluation of Cardiovascular Effects of Carvedilol in a D-(+)-Galactose-Induced aging Model. **Journal of Applied Life Sciences International**, v. 25, n. 6, p. 18-27, 2022.

DE ANDRADE, T. U.; BRASIL, G. A.; ENDRINGER, D. C.; DA NOBREGA, F. R.; DE SOUSA, D. P. Cardiovascular Activity of the Chemical Constituents of Essential Oils. **Molecules**, v. 22, n. 9, Sep 17 2017.

DE CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ, R.; ANDRADE, L. N.; DE SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1227-54, Jan 18 2013.

DE CAVANAGH, Elena MV; GONZÁLEZ, Sergio A; INSERRA, Felipe; FORCADA, Pedro; CASTELLARO, Carlos; CHIABAUT-SVANE, Jorge; OBREGÓN, Sebastián; CASARINI, María Jesús; KEMPNY, Pablo; KOTLIAR, Carol. Sympathetic predominance is associated with impaired endothelial progenitor cells and tunneling nanotubes in controlled-hypertensive patients. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 307, n. 2, p. H207-H215, 2014.

DE MELLO, Walmor C. Intracellular angiotensin II as a regulator of muscle tone in vascular resistance vessels. Pathophysiological implications. **Peptides**, v. 78, p. 87-90, 2016.

DE NIGRIS, F.; BALESTRIERI, M. L.; WILLIAMS-IGNARRO, S.; D'ARMIENTO, F. P.; LERMAN, L. O.; BYRNS, R.; CRIMI, E.; PALAGIANO, A.; FATIGATI, G.; IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C. Therapeutic effects of autologous bone marrow cells and metabolic intervention in the ischemic hindlimb of spontaneously hypertensive rats involve reduced cell senescence and CXCR4/Akt/eNOS pathways. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 50, n. 4, p. 424-433, Oct 2007.

DIAS, C. J.; COSTA, H. A.; ALVES DIAS-FILHO, C. A.; FERREIRA, A. C.; RODRIGUES, B.; IRIGOYEN, M. C.; ROMAO BORGES, A. C.; DE ANDADRE MARTINS, V.; BRANCO VIDAL, F. C.; RIBEIRO, R. M.; FILHO, N. S.; MOSTARDA, C. T. Carvedilol reduces blood pressure, arterial

responsiveness and increases expression of MAS receptors in spontaneously hypertensive rats. **Eur J Pharmacol**, v. 917, n. 15, p. 174717, Feb 15 2022.

DIGNAT-GEORGE, Françoise; BOULANGER, Chantal M. The many faces of endothelial microparticles. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 1, p. 27-33, 2011.

DONG, C.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J. Endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for cardiovascular disease. **J Interv Cardiol**, v. 20, n. 2, p. 93-9, Apr 2007.

DU, W. X.; OLSEN, C. W.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H.; LEVIN, C. E.; FRIEDMAN, M. Antibacterial activity against E. coli O157:H7, physical properties, and storage stability of novel carvacrol-containing edible tomato films. **J Food Sci**, v. 73, n. 7, p. M378-83, Sep 2008.

EL-FAR, A. H.; MOHAMED, H. H.; ELSABAGH, D. A.; MOHAMED, S. A.; NORELDIN, A. E.; AL JAOUNI, S. K.; ALSENOSY, A. A. Eugenol and carvacrol attenuate brain D-galactose-induced aging-related oxidative alterations in rats. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 29, n. 31, p. 47436-47447, Jul 2022.

EL-SAYED, E. M.; ABD-ALLAH, A. R.; MANSOUR, A. M.; EL-ARABEY, A. A. Thymol and carvacrol prevent cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. **JBMT**, v. 29, n. 4, p. 165-72, Apr 2015.

ENDTMANN, Cathleen; EBRAHIMIAN, Talin; CZECH, Thomas; ARFA, Omar; LAUFS, Ulrich; FRITZ, Mathias; WASSMANN, Kerstin; WERNER, Nikos; PETOUMENOS, Vasileios; NICKENIG, Georg. Angiotensin II impairs endothelial progenitor cell number and function in vitro and in vivo: implications for vascular regeneration. **Hypertension**, v. 58, n. 3, p. 394-403, 2011.

FACHINI-QUEIROZ, F. C.; KUMMER, R.; ESTEVAO-SILVA, C. F.; CARVALHO, M. D.; CUNHA, J. M.; GRESPAN, R.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of Thymus vulgaris L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 657026, 2012.

FERNANDES, T.; NAKAMUTA, J. S.; MAGALHAES, F. C.; ROQUE, F. R.; LAVINI-RAMOS, C.; SCHETTER, I. T.; COELHO, V.; KRIEGER, J. E.; OLIVEIRA, E. M. Exercise training restores the endothelial progenitor cells number and function in hypertension: implications for angiogenesis. **J Hypertens**, v. 30, n. 11, p. 2133-43, Nov 2012.

FERNANDES, Tiago; NAKAMUTA, Juliana S; MAGALHÃES, Flávio C; ROQUE, Fernanda R; LAVINI-RAMOS, Carolina; SCHETTER, Isolmar T; COELHO, Verônica; KRIEGER, José E; OLIVEIRA, Edilamar M. Exercise training restores the endothelial progenitor cells number and function in hypertension: implications for angiogenesis. **Journal of Hypertension**, v. 30, n. 11, p. 2133-2143, 2012.

FLEMING, I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. **Pflugers Arch**, v. 459, n. 6, p. 793-806, May 2010.

FOLDVARI, M.; OGUEJIOFOR, C.; AFRIDI, S.; KUDEL, T.; WILSON, T. Liposome encapsulated prostaglandin E1 in erectile dysfunction: correlation between in vitro delivery through foreskin and efficacy in patients. **Urology**, v. 52, n. 5, p. 838-43, Nov 1998.

FONG, D.; DUCEPPE, N.; HOEMANN, C. D. Mesenchymal stem cell detachment with trace trypsin is superior to EDTA for in vitro chemotaxis and adhesion assays. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 484, n. 3, p. 656-661, Mar 11 2017.

FRIEDRICH, Erik B; WALENTA, Katrin; SCHARLAU, John; NICKENIG, Georg; WERNER, Nikos. CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. **Circulation research**, v. 98, n. 3, p. e20-e25, 2006.

FU, Chen; CHEN, Baoxin; JIN, Xianglan; LIU, Xuemei; WANG, Fengli; GUO, Rongjuan; CHEN, Zhigang; ZHENG, Hong; WANG, Le; ZHANG, Yunling. Puerarin protects endothelial progenitor cells from damage of angiotensin II via activation of ERK1/2-Nrf2 signaling pathway. **Molecular medicine reports**, v. 17, n. 3, p. 3877-3883, 2018.

FUKAI, Tohru; USHIO-FUKAI, Masuko %J Cells. Cross-talk between NADPH oxidase and mitochondria: role in ROS signaling and angiogenesis. v. 9, n. 8, p. 1849, 2020.

GARLAND, CJ; DORA, KA. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 152-161, 2017.

GIANNOTTI, Giovanna; DOERRIES, Carola; MOCHARLA, Pavani S; MUELLER, Maja F; BAHLMANN, Ferdinand H; HORVÁTH, Tibor; JIANG, Hong; SORRENTINO, Sajoscha A; STEENKEN, Nora; MANES, Costantina. Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: relation to endothelial dysfunction. **Hypertension**, v. 55, n. 6, p. 1389-1397, 2010.

GILLING, D. H.; KITAJIMA, M.; TORREY, J. R.; BRIGHT, K. R. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. **J Appl Microbiol**, v. 116, n. 5, p. 1149-63, May 2014.

GKALIAGKOUSI, Eugenia; GAVRIILAKI, Eleni; TRIANTAFYLLOU, Areti; DOUMA, Stella. Clinical significance of endothelial dysfunction in essential hypertension. **Current hypertension reports**, v. 17, n. 11, p. 85, 2015.

GODO, Shigeo; SHIMOKAWA, Hiroaki. Endothelial functions. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 37, n. 9, p. e108-e114, 2017.

GONÇALVES, Tays Amanda Felisberto **Caracterização dos benefícios do carvacrol sobre a disfunção erétil de ratos hipertensos**. 2018. 93 Dissertação PgPNB, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

GUR, S.; KADOWITZ, P. J.; GURKAN, L.; CHANDRA, S.; DEWITT, S. Y.; HARBIN, A.; SIKKA, S. C.; AGRAWAL, K. C.; HELLSTROM, W. J. Chronic inhibition of nitric-oxide synthase induces hypertension and erectile dysfunction in the rat that is not reversed by sildenafil. **BJU Int**, v. 106, n. 1, p. 78-83, Jul 2010.

HAKIMI, Z.; SALMANI, H.; MAREFATI, N.; ARAB, Z.; GHOLAMNEZHAD, Z.; BEHESHTI, F.; SHAFEI, M. N.; HOSSEINI, M. Protective Effects of Carvacrol on Brain Tissue Inflammation and Oxidative Stress as well as Learning and Memory in Lipopolysaccharide-Challenged Rats. **Neurotox Res**, v. 37, n. 4, p. 965-976, Apr 2020.

HE, Jiang; LIU, Xing; SU, Chen; WU, Fang; SUN, Jiapan; ZHANG, Jianning; YANG, Xulong; ZHANG, Chanjuan; ZHOU, Ziting; ZHANG, Xiaoyu %J Arteriosclerosis, thrombosis,; BIOLOGY, vascular. Inhibition of mitochondrial oxidative damage improves reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells via SIRT3 (Sirtuin 3)-enhanced SOD2 (Superoxide Dismutase 2) deacetylation in hypertension. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 39, n. 8, p. 1682-1698, 2019.

HE, W.; WU, W. K.; WU, Y. L.; YANG, X. H.; LIN, Q. X.; YU, W. H. Ginsenoside-Rg1 mediates microenvironment-dependent endothelial differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. **J Asian Nat Prod Res**, v. 13, n. 1, p. 1-11, Jan 2011.

HEINISCH, Paul Philipp; BELLO, Corina; EMMERT, Maximilian Y; CARREL, Thierry; DREßEN, Martina; HÖRER, Jürgen; WINKLER, Bernhard; LUEDI, Markus M %J Cells. Endothelial progenitor cells as biomarkers of cardiovascular pathologies: A narrative review. **Cells**, v. 11, n. 10, p. 1678, 2022.

HEISS, C.; KEYMEL, S.; NIESLER, U.; ZIEMANN, J.; KELM, M.; KALKA, C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. **J Am Coll Cardiol**, v. 45, n. 9, p. 1441-8, May 3 2005.

HENNIGS, J. K.; MATUSZCAK, C.; TREPEL, M.; KORBELIN, J. Vascular Endothelial Cells: Heterogeneity and Targeting Approaches. **Cells**, v. 10, n. 10, Oct 10 2021.

HILLIER, S. G.; LATHE, R. Terpenes, hormones and life: isoprene rule revisited. **J Endocrinol**, v. 242, n. 2, p. R9-r22, Aug 2019.

HOWE, K. L.; CYBULSKY, M.; FISH, J. E. The Endothelium as a Hub for Cellular Communication in Atherogenesis: Is There Directionality to the Message? **Front Cardiovasc Med**, v. 9, p. 888390, 2022.

HRISTOV, M.; WEBER, C. Ambivalence of progenitor cells in vascular repair and plaque stability. **Curr Opin Lipidol**, v. 19, n. 5, p. 491-7, Oct 2008.

HU, Qingsong; GUO, Yiqun; ZHANG, Tao; FENG, Jianyi; WANG, Jinlong; DONG, Xiaobian; CHEN, Yangxin; NIE, Ruqiong; FENG, Zongming; HUANG, Yiteng Importance of β 2AR elevation for re-endothelialization capacity mediated by late endothelial progenitor cells in hypertensive patients. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 320, n. 2, p. H867-H880, 2021.

HU, Z.; WANG, H.; FAN, G.; ZHANG, H.; WANG, X.; MAO, J.; ZHAO, Y.; AN, Y.; HUANG, Y.; LI, C.; CHANG, L.; CHU, X.; LILI, LI, Y.; ZHANG, Y.; QIN, G.; GAO, X.; ZHANG, B. Danhong injection mobilizes endothelial progenitor cells to repair vascular endothelium injury via upregulating the expression of Akt, eNOS and MMP-9. **Phytomedicine**, v. 61, p. 152850, Aug 2019.

HUANG, P. H.; CHEN, Y. H.; TSAI, H. Y.; CHEN, J. S.; WU, T. C.; LIN, F. Y.; SATA, M.; CHEN, J. W.; LIN, S. J. Intake of red wine increases the number and functional capacity of circulating endothelial progenitor cells by enhancing nitric oxide bioavailability. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 4, p. 869-77, Apr 2010.

HUANG, Po-Hsun; HUANG, Shao-Sung; CHEN, Yung-Hsiang; LIN, Chih-Pei; CHIANG, Kuang-Hsing; CHEN, Jia-Shiong; TSAI, Hsiao-Ya; LIN, Feng-Yen; CHEN, Jaw-Wen; LIN, Shing-Jong. Increased circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles and decreased circulating endothelial progenitor cell levels in hypertensive patients with microalbuminuria. **J hypertensi**, v. 28, n. 8, p. 1655-1665, 2010.

IMANISHI, T.; TSUJIOKA, H.; AKASAKA, T. Endothelial progenitor cells dysfunction and senescence: contribution to oxidative stress. **Curr Cardiol Rev**, v. 4, n. 4, p. 275-286, Nov 2008.

J, Gu.; CQ, Wang.; HH, Fan.; HY, Ding.; XL, Xie.; YM, Xu.; BY, Wang.; DJ, Huang. Effects of resveratrol on endothelial progenitor cells and their contributions to reendothelialization in intima-injured rats. **J Cardiovasl Pharmacol**, v. 47, n. 5, p. 711-721, May 2006.

KALKA, C.; MASUDA, H.; TAKAHASHI, T.; GORDON, R.; TEPPER, O.; GRAVEREAUX, E.; PIECZEK, A.; IWAGURO, H.; HAYASHI, S. I.; ISNER, J. M.; ASAHARA, T. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. **Circ Res**, v. 86, n. 12, p. 1198-202, Jun 23 2000.

KATAKAWA, Mayumi; FUKUDA, Noboru; TSUNEMI, Akiko; MORI, Mari; MARUYAMA, Takashi; MATSUMOTO, Taro; ABE, Masanori; YAMORI, Yukio. Taurine and magnesium supplementation enhances the function of endothelial progenitor cells through antioxidation in healthy men and spontaneously hypertensive rats. **Hypertension Research**, v. 39, n. 12, p. 848-856, 2016.

KHAN, M. A.; THOMPSON, C. S.; MUMTAZ, F. H.; MIKHAILIDIS, D. P.; MORGAN, R. J.; BRUCKDORFER, R. K.; NASEEM, K. M. The effect of nitric oxide and peroxynitrite on rabbit cavernosal smooth muscle relaxation. **World J Urol**, v. 19, n. 3, p. 220-4, Jun 2001.

KHEMAIS-BENKHIAT, S.; BELCASTRO, E.; IDRIS-KHODJA, N.; PARK, S. H.; AMOURA, L.; ABBAS, M.; AUGER, C.; KESSLER, L.; MAYOUX, E.; TOTI, F.; SCHINI-KERTH, V. B. Angiotensin II-induced

redox-sensitive SGLT1 and 2 expression promotes high glucose-induced endothelial cell senescence. **J Cell Mol Med**, v. 24, n. 3, p. 2109-2122, Feb 2020.

KIEWISZ, J.; KACZMAREK, M. M.; PAWLOWSKA, A.; KMIEC, Z.; STOMPOR, T. Endothelial progenitor cells participation in cardiovascular and kidney diseases: a systematic review. **Acta Biochim Pol**, v. 63, n. 3, p. 475-82, 2016.

KOZIOŁ, A.; STRYJEWSKA, A.; LIBROWSKI, T.; SAŁAT, K.; GAWEŁ, M.; MONICZEWSKI, A.; LOCHYŃSKI, S. An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes. **Mini Rev Med Chem**, v. 14, n. 14, p. 1156-68, 2014.

KRÜGER-GENGE, Anne; BLOCKI, Anna; FRANKE, Ralf-Peter; JUNG, Friedrich. Vascular endothelial cell biology: An update. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4411, 2019.

KUNDU, N.; DOMINGUES, C. C.; CHOU, C.; AHMADI, N.; HOUSTON, S.; JERRY, D. J.; SEN, S. Use of p53-Silenced Endothelial Progenitor Cells to Treat Ischemia in Diabetic Peripheral Vascular Disease. **J Am Heart Assoc**, v. 6, n. 4, p. e005146, Apr 01 2017.

KUTIKHIN, Anton G; SINITSKY, Maxim Yu; YUZHALLIN, Arseniy E; VELIKANOVA, Elena A. Shear stress: an essential driver of endothelial progenitor cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 118, p. 46-69, 2018.

LEAL, M. A. S.; AIRES, R.; PANDOLFI, T.; MARQUES, V. B.; CAMPAGNARO, B. P.; PEREIRA, T. M. C.; MEYRELLES, S. S.; CAMPOS-TOIMIL, M.; VASQUEZ, E. C. Sildenafil reduces aortic endothelial dysfunction and structural damage in spontaneously hypertensive rats: Role of NO, NADPH and COX-1 pathways. **Vascul Pharmacol**, v. 124, p. 106601, Jan 2020.

LEE, C. W.; HUANG, P. H.; HUANG, S. S.; LEU, H. B.; HUANG, C. C.; WU, T. C.; CHEN, J. W.; LIN, S. J. Decreased circulating endothelial progenitor cell levels and function in essential hypertensive patients with electrocardiographic left ventricular hypertrophy. **Hypertens Res**, v. 34, n. 9, p. 999-1003, Sep 2011.

LEE, H. W.; SHIN, J. H.; SIMONS, M. Flow goes forward and cells step backward: endothelial migration. **Exp Mol Med**, v. 54, n. 6, p. 711-719, Jun 2022.

LEE, K. P.; SUDJARWO, G. W.; JUNG, S. H.; LEE, D.; LEE, D. Y.; LEE, G. B.; BAEK, S.; KIM, D. Y.; LEE, H. M.; KIM, B.; KWON, S. C.; WON, K. J. Carvacrol inhibits atherosclerotic neointima formation by downregulating reactive oxygen species production in vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v. 240, n. 2, p. 367-73, Jun 2015.

LI, C.; LIN, L.; ZHANG, L.; XU, R.; CHEN, X.; JI, J.; LI, Y. Long noncoding RNA p21 enhances autophagy to alleviate endothelial progenitor cells damage and promote endothelial repair in hypertension through SESN2/AMPK/TSC2 pathway. **Pharmacol Res**, v. 173, p. 105920, Nov 2021.

LI, Ji-Hua; LI, Yang; HUANG, Dan; YAO, Min %J Tissue Engineering; MEDICINE, Regenerative. Role of stromal cell-derived factor-1 in endothelial progenitor cell-mediated vascular repair and regeneration. v. 18, n. 5, p. 747-758, 2021.

LI, Ji.; MA, Yan.; MIAO, Xiao-Hui.; GUO, Ji-Dong.; LI, Da-Wei. Neovascularization and tissue regeneration by endothelial progenitor cells in ischemic stroke. **Neurol Sci**, v. 42, n. 9, p. 3585-3593, Sep 2021.

LI, N.; LU, X.; ZHAO, X.; XIANG, F. L.; XENOCOSTAS, A.; KARMAZYN, M.; FENG, Q. Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via upregulation of stromal cell-derived factor-1alpha. **Stem Cells**, v. 27, n. 4, p. 961-70, Apr 2009.

LI, Ting-Bo; ZHANG, Yin-Zhuang; LIU, Wei-Qi; ZHANG, Jie-Jie; PENG, Jun; LUO, Xiu-Ju; MA, Qi-Lin. Correlation between NADPH oxidase-mediated oxidative stress and dysfunction of endothelial progenitor cell in hyperlipidemic patients. **The Korean journal of internal medicine**, v. 33, n. 2, p. 313, 2018.

LI, W. D.; LI, N. P.; SONG, D. D.; RONG, J. J.; QIAN, A. M.; LI, X. Q. Metformin inhibits endothelial progenitor cell migration by decreasing matrix metalloproteinases, MMP-2 and MMP-9, via the AMPK/mTOR/autophagy pathway. **Int J Mol Med**, v. 39, n. 5, p. 1262-1268, May 2017.

LI, X.; YANG, H. F.; CHEN, Y.; PEI, L. J.; JIANG, R. Effect of the icariin on endothelial microparticles, endothelial progenitor cells, platelets, and erectile function in spontaneously hypertensive rats. **Andrology**, v. 10, n. 3, p. 576-584, Mar 2022.

LI, Y.; CHANG, S.; LI, W.; TANG, G.; MA, Y.; LIU, Y.; YUAN, F.; ZHANG, Z.; YANG, G. Y.; WANG, Y. cxcl12-engineered endothelial progenitor cells enhance neurogenesis and angiogenesis after ischemic brain injury in mice. **Stem Cell Res Ther**, v. 9, n. 1, p. 139, May 11 2018.

LI, Y.; XU, J. Z.; GU, C. X.; LIU, G. L.; TIAN, K. Carvacrol suppresses inflammatory responses in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **J Cell Biochem**, Nov 28 2018.

LIN, C. P.; LIN, F. Y.; HUANG, P. H.; CHEN, Y. L.; CHEN, W. C.; CHEN, H. Y.; HUANG, Y. C.; LIAO, W. L.; HUANG, H. C.; LIU, P. L.; CHEN, Y. H. Endothelial progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases: role of reactive oxygen species and inflammation. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 845037, 2013.

LIN, Yong; LI, Li; LIU, Junjie; ZHAO, Xiaoting; YE, Juxiu; REINACH, Peter S; QU, Jia; YAN, Dongsheng %J Investigative Ophthalmology; SCIENCE, Visual. SIRT1 deletion impairs retinal endothelial cell migration through downregulation of VEGF-A/VEGFR-2 and MMP14. v. 59, n. 13, p. 5431-5440, 2018.

LIU, Xing; ZHANG, Gao-Xing; ZHANG, Xiao-Yu; XIA, Wen-Hao; YANG, Zhen; SU, Chen; QIU, Yan-Xia; XU, Shi-Yue; ZHAN, Hong; TAO, Jun. Lacidipine improves endothelial repair capacity of endothelial progenitor cells from patients with essential hypertension. **Int J Cardiol**, v. 168, n. 4, p. 3317-3326, 2013a.

LIU, Xing; ZHANG, Gao-Xing; ZHANG, Xiao-Yu; XIA, Wen-Hao; YANG, Zhen; SU, Chen; QIU, Yan-Xia; XU, Shi-Yue; ZHAN, Hong; TAO, Jun. Lacidipine improves endothelial repair capacity of endothelial progenitor cells from patients with essential hypertension. **International journal of cardiology**, v. 168, n. 4, p. 3317-3326, 2013b.

LIU, Y.; WEI, J.; MA, K. T.; LI, C. L.; MAI, Y. P.; QIU, X. X.; WEI, H.; HOU, N.; LUO, J. D. Carvacrol protects against diabetes-induced hypercontractility in the aorta through activation of the PI3K/Akt pathway. **Biomed Pharmacother**, v. 125, p. 109825, May 2020.

LIU, Zhenguo; JIANG, Yuehua; HAO, Hong; GUPTA, Kalpna; XU, Jian; CHU, Ling; MCFALLS, Edward; ZWEIER, Jay; VERFAILLIE, Catherine; BACHE, Robert J %J American Journal of Physiology-Heart; PHYSIOLOGY, Circulatory. Endothelial nitric oxide synthase is dynamically expressed during bone marrow stem cell differentiation into endothelial cells. v. 293, n. 3, p. H1760-H1765, 2007.

LJOKI, A.; ASLAM, T.; FRIIS, T.; OHM, R. G.; HOUEN, G. In Vitro Angiogenesis Inhibition and Endothelial Cell Growth and Morphology. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 8, Apr 12 2022.

LOH, K. M.; ANG, L. T. Building human artery and vein endothelial cells from pluripotent stem cells, and enduring mysteries surrounding arteriovenous development. **Semin Cell Dev Biol**, Jun 29 2023.

LUO, Shengyuan; XIA, Wenhao; CHEN, Cong; ROBINSON, Eric A; TAO, Jun. Endothelial progenitor cells and hypertension: current concepts and future implications. **Clin Sci**, v. 130, n. 22, p. 2029-2042, 2016.

MACENEANEY, O. J.; DESOUSA, C. A.; WEIL, B. R.; KUSHNER, E. J.; VAN GUILDER, G. P.; MESTEK, M. L.; GREINER, J. J.; STAUFFER, B. L. Prehypertension and endothelial progenitor cell function. **J Hum Hypertens**, v. 25, n. 1, p. 57-62, Jan 2011.

MACHHOLZ, E.; MULDER, G.; RUIZ, C.; CORNING, B. F.; PRITCHETT-CORNING, K. R. Manual restraint and common compound administration routes in mice and rats. **J Vis Exp**, n. 67, Sep 26 2012.

MAGEN, E.; FELDMAN, A.; COHEN, Z.; ALON, D. B.; MINZ, E.; CHERNYAVSKY, A.; LINOVA, L.; MISHAL, J.; SCHLEZINGER, M.; STHOEGER, Z. Circulating endothelial progenitor cells, Th1/Th2/Th17-related cytokines, and endothelial dysfunction in resistant hypertension. **Am J Med Sci**, v. 339, n. 2, p. 117-122, Feb 2010.

MAI, H.; HUANG, Z.; ZHANG, X.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; CHEN, M.; ZHANG, Y.; SONG, Y.; WANG, B.; LIN, Y.; GU, S. Protective effects of endothelial progenitor cell microvesicles carrying miR-98-5p on angiotensin II-induced rat kidney cell injury. **Exp Ther Med**, v. 24, n. 5, p. 702, Nov 2022.

MANCIA, Giuseppe. **Introduction to a compendium on hypertension**: Am Heart Assoc 2015.

MARCOLA, M.; RODRIGUES, C. E. Endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis: another brick in the wall. **Stem Cells Int**, v. 2015, p. 832649, 2015.

MARKETOU, M. E.; KALYVA, A.; PARTHENAKIS, F. I.; PONTIKOGLIOU, C.; MARAGKOUKAKIS, S.; KONTARAKI, J. E.; CHLOUVERAKIS, G.; ZACHARIS, E. A.; PATRIANAKOS, A.; PAPADAKI, H. A.; VARDAS, P. E. Circulating endothelial progenitor cells in hypertensive patients with increased arterial stiffness. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v. 16, n. 4, p. 295-300, Apr 2014.

MARTI-FABREGAS, J.; CRESPO, J.; DELGADO-MEDEROS, R.; MARTINEZ-RAMIREZ, S.; PENA, E.; MARIN, R.; DINIA, L.; JIMENEZ-XARRIE, E.; FERNANDEZ-ARCOS, A.; PEREZ-PEREZ, J.; QUEROL, L.; SUAREZ-CALVET, M.; BADIMON, L. Endothelial progenitor cells in acute ischemic stroke. **Brain Behav**, v. 3, n. 6, p. 649-55, Nov 2013.

MARZIANO, C.; GENET, G.; HIRSCHI, K. K. Vascular endothelial cell specification in health and disease. **Angiogenesis**, v. 24, n. 2, p. 213-236, May 2021.

MASSA, M.; ROSTI, V.; FERRARIO, M.; CAMPANELLI, R.; RAMAJOLI, I.; ROSSO, R.; DE FERRARI, G. M.; FERLINI, M.; GOFFREDO, L.; BERTOLETTI, A.; KLERSY, C.; PECCI, A.; MORATTI, R.; TAVAZZI, L. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. **Blood**, v. 105, n. 1, p. 199-206, Jan 1 2005.

MATLUOBI, D.; ARAGHI, A.; MARAGHEH, B. F. A.; REZABAKHSH, A.; SOLTANI, S.; KHAKSAR, M.; SIAVASHI, V.; FEYZI, A.; BAGHERI, H. S.; RAHBARGHAZI, R.; MONTAZERSAHEB, S. Carvacrol promotes angiogenic paracrine potential and endothelial differentiation of human mesenchymal stem cells at low concentrations. **Microvasc Res**, v. 115, p. 20-27, Jan 2018.

MATSUMURA, Mitsuyasu; FUKUDA, Noboru; KOBAYASHI, Naohiko; UMEZAWA, Hisaki; TAKASAKA, Ayako; MATSUMOTO, Taro; YAO, En-Hui; UENO, Takahiro; NEGISHI, Nanao. Effects of atorvastatin on angiogenesis in hindlimb ischemia and endothelial progenitor cell formation in rats. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, p. 0908100056-0908100056, 2009.

MEDINA, Reinhold J; BARBER, Chad L; SABATIER, Florence; DIGNAT-GEORGE, Francoise; MELERO-MARTIN, Juan M; KHOSROTEHRANI, Kiarash; OHNEDA, Osamu; RANDI, Anna M; CHAN, Jerry KY; YAMAGUCHI, Teruhide. Endothelial progenitors: a consensus statement on nomenclature. **Stem cells translational medicine**, v. 6, n. 5, p. 1316-1320, 2017.

MORRONE, D.; PICOI, M. E. L.; FELICE, F.; DE MARTINO, A.; SCATENA, C.; SPONTONI, P.; NACCARATO, A. G.; DI STEFANO, R.; BORTOLOTTI, U.; DAL MONTE, M.; PINI, S.; ABELLI, M.

BALBARINI, A. Endothelial Progenitor Cells: An Appraisal of Relevant Data from Bench to Bedside. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 23, Nov 28 2021.

MORTAZAVI, A.; MOHAMMAD POUR KARGAR, H.; BEHESHTI, F.; ANAEIGOUDARI, A.; VAEZI, G.; HOSSEINI, M. The effects of carvacrol on oxidative stress, inflammation, and liver function indicators in a systemic inflammation model induced by lipopolysaccharide in rats. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 93, n. 2, p. 111-121, Apr 2023.

MU, Q.; LV, K.; YU, J.; CHU, S.; ZHANG, L.; KONG, L.; ZHANG, L.; TIAN, Y.; JIA, X.; LIU, B.; WEI, Y.; YANG, N. Hydrogen Repairs LPS-Induced Endothelial Progenitor Cells Injury via PI3K/AKT/eNOS Pathway. **Front Pharmacol**, v. 13, p. 894812, 2022.

MUDYANADZO, T. A. Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Correlates. **Cureus**, v. 10, n. 9, p. e3342, Sep 21 2018.

NAEEM, K.; TARIQ AL KURY, L.; NASAR, F.; ALATTAR, A.; ALSHAMAN, R.; SHAH, F. A.; KHAN, A. U.; LI, S. Natural Dietary Supplement, Carvacrol, Alleviates LPS-Induced Oxidative Stress, Neurodegeneration, and Depressive-Like Behaviors via the Nrf2/HO-1 Pathway. **J Inflamm Res**, v. 14, p. 1313-1329, 2021.

NAITO, H.; IBA, T.; TAKAKURA, N. Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells. **Int Immunol**, v. 32, n. 5, p. 295-305, May 8 2020.

NAITO, H.; KIDOYA, H.; SAKIMOTO, S.; WAKABAYASHI, T.; TAKAKURA, N. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. **EMBO J**, v. 31, n. 4, p. 842-55, Feb 15 2012.

NAZIROGLU, M. A novel antagonist of TRPM2 and TRPV4 channels: Carvacrol. **Metab Brain Dis**, v. 37, n. 3, p. 711-728, Mar 2022.

NEWMAN, David J; CRAGG, Gordon M %J Journal of natural products. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NOSTRO, A.; SUDANO ROCCARO, A.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. **J Med Microbiol**, v. 56, n. Pt 4, p. 519-23, Apr 2007.

OAK, M. H.; AUGER, C.; BELCASTRO, E.; PARK, S. H.; LEE, H. H.; SCHINI-KERTH, V. B. Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium. **Free Radic Biol Med**, v. 122, p. 161-170, Jul 2018.

OLMEZTURK KARAKURT, T. C.; EMIR, I.; BEDIR, Z.; OZKALOGLU ERDEM, K. T.; SULEYMAN, H.; SARIGUL, C.; MENDIL, A. S. Effects of carvacrol on ketamine-induced cardiac injury in rats: an experimental study. **Drug Chem Toxicol**, v. 13, p. 1-6, Dec 13 2022.

ORGANIZATION, World Health. **The international pharmacopoeia**. World Health Organization, 2006. ISBN 924156301X.

OZKOK, Abdullah; YILDIZ, Alaattin. Endothelial progenitor cells and kidney diseases. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 43, n. 3, p. 701-718, 2018.

OZTURK, H.; CETINKAYA, A.; DUZCU, S. E.; TEKCE, B. K.; OZTURK, H. Carvacrol attenuates histopathologic and functional impairments induced by bilateral renal ischemia/reperfusion in rats. **Biomed Pharmacother**, v. 98, p. 656-661, Feb 2018.

PADFIELD, G. J.; TURA-CEIDE, O.; FREYER, E.; BARCLAY, G. R.; TURNER, M.; NEWBY, D. E.; MILLS, N. L. Endothelial progenitor cells, atheroma burden and clinical outcome in patients with coronary artery disease. **Heart**, v. 99, n. 11, p. 791-8, Jun 2013.

PARK, S. H.; BELCASTRO, E.; HASAN, H.; MATSUSHITA, K.; MARCHANDOT, B.; ABBAS, M.; TOTI, F.; AUGER, C.; JESEL, L.; OHLMANN, P.; MOREL, O.; SCHINI-KERTH, V. B. Angiotensin II-induced upregulation of SGLT1 and 2 contributes to human microparticle-stimulated endothelial senescence and dysfunction: protective effect of gliflozins. **Cardiovasc Diabetol**, v. 20, n. 1, p. 65, Mar 16 2021.

PATEL, J.; SEPPANEN, E. J.; RODERO, M. P.; WONG, H. Y.; DONOVAN, P.; NEUFELD, Z.; FISK, N. M.; FRANCOIS, M.; KHOSROTEHRANI, K. Functional Definition of Progenitors Versus Mature Endothelial Cells Reveals Key SoxF-Dependent Differentiation Process. **Circulation**, v. 135, n. 8, p. 786-805, Feb 21 2017.

PEACH, C. J.; MIGNONE, V. W.; ARRUDA, M. A.; ALCOBIA, D. C.; HILL, S. J.; KILPATRICK, L. E.; WOOLARD, J. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 4, Apr 23 2018.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, KS; GOMES, MDM; LIMA, FC; LAHLOU, S; MAGALHÃES, PJC; CECCATTO, VM; COELHO-DE-SOUZA, AN; LEAL-CARDOSO, JH. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 341-350, 2010.

PENG, Jun; LIU, Bin; MA, Qi-Lin; LUO, Xiu-Ju. Dysfunctional endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases: role of NADPH oxidase. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 65, n. 1, p. 80-87, 2015a.

PENG, Jun; LIU, Bin; MA, Qi-Lin; LUO, Xiu-Ju. Dysfunctional endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases: role of NADPH oxidase. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 65, n. 1, p. 80-87, 2015b.

PENG, Z.; SHU, B.; ZHANG, Y.; WANG, M. Endothelial Response to Pathophysiological Stress. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 39, n. 11, p. e233-e243, Nov 2019.

PEREZ-TORRES, I.; MANZANO-PECH, L.; RUBIO-RUIZ, M. E.; SOTO, M. E.; GUARNER-LANS, V. Nitrosative Stress and Its Association with Cardiometabolic Disorders. **Molecules**, v. 25, n. 11, May 31 2020.

PERROTTA, F.; PERNA, A.; KOMICI, K.; NIGRO, E.; MOLLIKA, M.; D'AGNANO, V.; DE LUCA, A.; GUERRA, G. The State of Art of Regenerative Therapy in Cardiovascular Ischemic Disease: Biology, Signaling Pathways, and Epigenetics of Endothelial Progenitor Cells. **Cells**, v. 9, n. 8, Aug 11 2020.

PETERS, E. B. Endothelial Progenitor Cells for the Vascularization of Engineered Tissues. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 24, n. 1, p. 1-24, Feb 2018.

PEYTER, A. C.; ARMENGAUD, J. B.; GUILLLOT, E.; YZYDORCZYK, C. Endothelial Progenitor Cells Dysfunctions and Cardiometabolic Disorders: From Mechanisms to Therapeutic Approaches. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 13, p. 6667, Jun 22 2021.

PIRRO, Matteo; SCHILLACI, Giuseppe; MENECAI, Cinzia; BAGAGLIA, Francesco; PALTRICCIA, Rita; VAUDO, Gaetano; MANNARINO, Massimo R; MANNARINO, Elmo. Reduced number of circulating endothelial progenitors and HOXA9 expression in CD34+ cells of hypertensive patients. **Journal of hypertension**, v. 25, n. 10, p. 2093-2099, 2007.

POTENTE, M.; MAKINEN, T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 18, n. 8, p. 477-494, Aug 2017.

POTENTE, Michael; CARMELIET, Peter The link between angiogenesis and endothelial metabolism. **Annual review of physiology**, v. 79, p. 43-66, 2017.

PULKKINEN, H. H.; KIEMA, M.; LAPPALAINEN, J. P.; TOROPAINEN, A.; BETER, M.; TIRRONEN, A.; HOLAPPA, L.; NISKANEN, H.; KAIKKONEN, M. U.; YLA-HERTTUALA, S.; LAAKKONEN, J. P. BMP6/TAZ-Hippo signaling modulates angiogenesis and endothelial cell response to VEGF. **Angiogenesis**, v. 24, n. 1, p. 129-144, Feb 2021.

QIU, Y.; ZHANG, C.; ZHANG, G.; TAO, J. Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. **Aging Med (Milton)**, v. 1, n. 2, p. 204-208, Sep 2018.

QUINTANS, J. S. S.; SHANMUGAM, S.; HEIMFARTH, L.; ARAÚJO, A. A. S.; ALMEIDA, Jrgds; PICOT, L.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Monoterpenes modulating cytokines - A review. **Food Chem Toxicol**, v. 123, p. 233-257, Jan 2019.

RADU, P.; ZURZU, M.; PAIC, V.; BRATUCU, M.; GAROFIL, D.; TIGORA, A.; GEORGESCU, V.; PRUNOIU, V.; PASNICU, C.; POPA, F.; SURLIN, P.; SURLIN, V.; STRAMBU, V. CD34-Structure, Functions and Relationship with Cancer Stem Cells. **Medicina (Kaunas)**, v. 59, n. 5, May 12 2023.

RADZIWON-BALICKA, A.; LESYK, G.; BACK, V.; FONG, T.; LOREDO-CALDERON, E. L.; DONG, B.; EL-SIKHRY, H.; EL-SHERBENI, A. A.; EL-KADI, A.; OGG, S.; SIRAKI, A.; SEUBERT, J. M.; SANTOS-MARTINEZ, M. J.; RADOMSKI, M. W.; VELAZQUEZ-MARTINEZ, C. A.; WINSHIP, I. R.; JURASZ, P. Differential eNOS-signalling by platelet subpopulations regulates adhesion and aggregation. **Cardiovasc Res**, v. 113, n. 14, p. 1719-1731, Dec 1 2017.

RAKKAR, Kamini; OTHMAN, Othman; SPRIGG, Nikola; BATH, Philip; BAYRAKTUTAN, Ulvi. Endothelial progenitor cells, potential biomarkers for diagnosis and prognosis of ischemic stroke: protocol for an observational case-control study. **Neural regeneration research**, v. 15, n. 7, p. 1300, 2020.

REN, B Endothelial cells: a key player in angiogenesis and lymphangiogenesis. **MOJ Cell Sci Report**, v. 2, n. 1, p. 00015, 2015.

RIAZ, M.; AL KURY, L. T.; ATZAZ, N.; ALATTAR, A.; ALSHAMAN, R.; SHAH, F. A.; LI, S. Carvacrol Alleviates Hyperuricemia-Induced Oxidative Stress and Inflammation by Modulating the NLRP3/NF-kappaB Pathwayt. **Drug Des Devel Ther**, v. 16, p. 1159-1170, 2022.

RIPA, R. S.; WANG, Y.; GOETZE, J. P.; JORGENSEN, E.; JOHNSEN, H. E.; TAGIL, K.; HESSE, B.; KASTRUP, J. Circulating angiogenic cytokines and stem cells in patients with severe chronic ischemic heart disease--indicators of myocardial ischemic burden? **Int J Cardiol**, v. 120, n. 2, p. 181-7, Aug 21 2007.

RISS, Terry L; MORAVEC, Richard A; NILES, Andrew L; DUELLMAN, Sarah; BENINK, Hélène A; WORZELLA, Tracy J; MINOR, Lisa %J Assay Guidance Manual. Cell viability assays. 2016.

RODRIGO, Glenn C; HERBERT, Karl E. Regulation of vascular function and blood pressure by circadian variation in redox signalling. **Free radical biology and medicine**, v. 119, p. 115-120, 2018.

RODRÍGUEZ-CARRIO, Javier; LÓPEZ, Patricia; SUÁREZ, Ana. EPC dysfunction and immune networks: translating opportunities for clinical setting in personalized medicine. **Current medicinal chemistry**, v. 25, n. 35, p. 4497-4506, 2018.

ROSSI, F; BERTONE, C; MICHELON, E; BIANCO, MJ; SANTIEMMA, V. High-density lipoprotein cholesterol affects early endothelial progenitor cell number and endothelial function in obese women. **Obesity**, v. 21, n. 11, p. 2356-2361, 2013.

SADEGHZADEH, Sara; HEJAZIAN, Seyed Hasan; JAMHIRI, Mohabbat; HAFIZIBARJIN, Zeynab; SADEGHZADEH, Salman; SAFARI, Fatemeh ; PHARMACOLOGY. The effect of carvacrol on transcription levels of Bcl-2 family proteins in hypertrophied heart of rats. **J Physiology**, v. 22, n. 1, p. 54-62, 2018.

SAMARGHANDIAN, S.; FARKHONDEH, T.; SAMINI, F.; BORJI, A. Protective Effects of Carvacrol against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat's Brain, Liver, and Kidney. **Biochem Res Int**, v. 2016, p. 2645237, 2016.

SAMMAN TAHHAN, A.; HAMMADAH, M.; KELLI, H. M.; KIM, J. H.; SANDESARA, P. B.; ALKHODER, A.; KASEER, B.; GAFEER, M. M.; TOPEL, M.; HAYEK, S. S.; O'NEAL, W. T.; OBIDEEN, M.; KO, Y. A.; LIU, C.; HESAROEI, I.; MAHAR, E.; VACCARINO, V.; WALLER, E. K.; QUYYUMI, A. A. Circulating Progenitor Cells and Racial Differences. **Circ Res**, v. 123, n. 4, p. 467-476, Aug 3 2018.

SANDHU, K.; MAMAS, M.; BUTLER, R. Endothelial progenitor cells: Exploring the pleiotropic effects of statins. **World J Cardiol**, v. 9, n. 1, p. 1-13, Jan 26 2017.

SHANTSILA, Alena; DWIVEDI, Girish; SHANTSILA, Eduard; BUTT, Mehmood; BEEVERS, D Gareth; LIP, Gregory YH. Persistent macrovascular and microvascular dysfunction in patients with malignant hypertension. **Hypertension**, v. 57, n. 3, p. 490-496, 2011.

SHARIFI-RAD, M.; VARONI, E. M.; IRITI, M.; MARTORELL, M.; SETZER, W. N.; DEL MAR CONTRERAS, M.; SALEHI, B.; SOLTANI-NEJAD, A.; RAJABI, S.; TAJBAKHS, M.; SHARIFI-RAD, J. Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytother Res**, v. 32, n. 9, p. 1675-1687, Sep 2018.

SHEN, X.; WANG, M.; BI, X.; ZHANG, J.; WEN, S.; FU, G.; XIA, L. Resveratrol prevents endothelial progenitor cells from senescence and reduces the oxidative reaction via PPAR-gamma/HO-1 pathways. **Molecul medic report**, v. 14, n. 6, p. 5528-5534, Dec 2016.

SUN, Hai-Jian; WU, Zhi-Yuan; NIE, Xiao-Wei; BIAN, Jin-Song %J Frontiers in pharmacology. Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the link between inflammation and hydrogen sulfide. v. 10, p. 1568, 2020.

SUZUKI, Ryo; FUKUDA, Noboru; KATAKAWA, Mayumi; TSUNEMI, Akiko; TAHIRA, Yoshiko; MATSUMOTO, Taro; UENO, Takahiro; SOMA, Masayoshi. Effects of an angiotensin II receptor blocker on the impaired function of endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension. **American journal of hypertension**, v. 27, n. 5, p. 695-701, 2014.

T, L. Suraweera; RUPASINGHE, H. P. V.; DELLAIRE, G.; XU, Z. Regulation of Nrf2/ARE Pathway by Dietary Flavonoids: A Friend or Foe for Cancer Management? **Antioxidants (Basel)**, v. 9, n. 10, Oct 11 2020.

TAGAWA, Shotoku; NAKANISHI, Chiaki; MORI, Masayuki; YOSHIMUTA, Tsuyoshi; YOSHIDA, Shohei; SHIMOJIMA, Masaya; YOKAWA, Junichiro; KAWASHIRI, Masa-aki; YAMAGISHI, Masakazu; HAYASHI, Kenshi. Determination of early and late endothelial progenitor cells in peripheral circulation and their clinical association with coronary artery disease. **International journal of vascular medicine**, v. 2015, 2015.

TAN, Jian Liang; THAKUR, Kshitij. Systolic Hypertension. In: (Ed.). **StatPearls [Internet]**: StatPearls Publishing, 2020.

TESTAI, L.; CHERICONI, S.; MARTELLI, A.; FLAMINI, G.; BRESCHI, M. C.; CALDERONE, V. Voltage-operated potassium (Kv) channels contribute to endothelium-dependent vasorelaxation of carvacrol on rat aorta. **J Pharm Pharmacol**, v. 68, n. 9, p. 1177-83, Sep 2016.

THUM, Thomas; SCHMITTER, Kerstin; FLEISSNER, Felix; WIEBKING, Volker; DIETRICH, Bernd; WIDDER, Julian D; JAZBUTYTE, Virginija; HAHNER, Stefanie; ERTL, Georg; BAUERSACHS, Johann. Impairment of endothelial progenitor cell function and vascularization capacity by aldosterone in mice and humans. **European heart journal**, v. 32, n. 10, p. 1275-1286, 2011.

TILLING, L.; CHOWIENCZYK, P.; CLAPP, B. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. **Br J Clin Pharmacol**, v. 68, n. 4, p. 484-92, Oct 2009.

TOHIDI, B.; RAHIMMALEK, M.; ARZANI, A.; SABZALIAN, M. R. Thymol, carvacrol, and antioxidant accumulation in Thymus species in response to different light spectra emitted by light-emitting diodes. **Food Chem**, v. 307, p. 125521, Mar 1 2020.

TOUYZ, Rhian M; ALVES-LOPES, Rheure; RIOS, Francisco J; CAMARGO, Livia L; ANAGNOSTOPOULOU, Aikaterini; ARNER, Anders; MONTEZANO, Augusto C. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovascular research**, v. 114, n. 4, p. 529-539, 2018.

TSAI, N. W.; HUNG, S. H.; HUANG, C. R.; CHANG, H. W.; CHANG, W. N.; LEE, L. H.; WANG, H. C.; LIN, Y. J.; LIN, W. C.; CHENG, B. C.; CHIANG, Y. F.; SU, Y. J.; TSAI, T. R.; LU, C. H. The association between circulating endothelial progenitor cells and outcome in different subtypes of acute ischemic stroke. **Clin Chim Acta**, v. 427, p. 6-10, Jan 1 2014.

URBICH, Carmen; DIMMELER, Stefanie. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. **Circulation research**, v. 95, n. 4, p. 343-353, 2004.

VALLE, M. L.; DWORSHAK, J.; SHARMA, A.; IBRAHIM, A. S.; AL-SHABRAWAY, M.; SHARMA, S. Inhibition of interleukin-6 trans-signaling prevents inflammation and endothelial barrier disruption in retinal endothelial cells. **Exp Eye Res**, v. 178, p. 27-36, Jan 2019.

VAN ZONNEVELD, Anton-Jan; RABELINK, Ton J %J Current opinion in nephrology; HYPERTENSION. Endothelial progenitor cells: biology and therapeutic potential in hypertension. v. 15, n. 2, p. 167-172, 2006.

VANHOUTTE, PM; SHIMOKAWA, H; FELETOU, M; TANG, EHC. Endothelial dysfunction and vascular disease—a 30th anniversary update. **Acta physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22-96, 2017.

VASA, Mariuca; FICHTLSCHERER, Stephan; AICHER, Alexandra; ADLER, Klaudia; URBICH, Carmen; MARTIN, Hans; ZEIHNER, Andreas M; DIMMELER, Stefanie. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. **Circulation research**, v. 89, n. 1, p. e1-e7, 2001.

WAKABAYASHI, T.; NAITO, H.; SUEHIRO, J. I.; LIN, Y.; KAWAJI, H.; IBA, T.; KOUNO, T.; ISHIKAWA-KATO, S.; FURUNO, M.; TAKARA, K.; MURAMATSU, F.; WEIZHEN, J.; KIDOYA, H.; ISHIHARA, K.; HAYASHIZAKI, Y.; NISHIDA, K.; YODER, M. C.; TAKAKURA, N. CD157 Marks Tissue-Resident Endothelial Stem Cells with Homeostatic and Regenerative Properties. **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 3, p. 384-397 e6, Mar 1 2018.

WANG, J.; CHEN, S.; MA, X.; CHENG, C.; XIAO, X.; CHEN, J.; LIU, S.; ZHAO, B.; CHEN, Y. Effects of endothelial progenitor cell-derived microvesicles on hypoxia/reoxygenation-induced endothelial dysfunction and apoptosis. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, p. 572729, 2013.

WANG, Jinju; CHEN, Shuzhen; BIHL, Ji. Exosome-Mediated Transfer of ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) from Endothelial Progenitor Cells Promotes Survival and Function of Endothelial Cell. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

WANG, W.; ZHANG, Y.; HUI, H.; TONG, W.; WEI, Z.; LI, Z.; ZHANG, S.; YANG, X.; TIAN, J.; CHEN, Y. The effect of endothelial progenitor cell transplantation on neointimal hyperplasia and

reendothelialisation after balloon catheter injury in rat carotid arteries. **Stem Cell Res Ther**, v. 12, n. 1, p. 99, Feb 3 2021.

WANG, X.; WANG, R.; JIANG, L.; XU, Q.; GUO, X. Endothelial repair by stem and progenitor cells. **J Mol Cell Cardiol**, v. 163, p. 133-146, Feb 2022.

WANG, Y.; LIU, C.; HE, X.; LI, Y.; ZOU, Y. Effects of metoprolol, methyldopa, and nifedipine on endothelial progenitor cells in patients with gestational hypertension and preeclampsia. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 46, n. 4, p. 302-312, Apr 2019.

WANG, Y.; THATCHER, S. E.; CASSIS, L. A. Measuring Blood Pressure Using a Noninvasive Tail Cuff Method in Mice. **Methods Mol Biol**, v. 1614, p. 69-73, 2017.

WENCESLAU, C. F.; MCCARTHY, C. G.; EARLEY, S.; ENGLAND, S. K.; FILOSA, J. A.; GOULOPOULOU, S.; GUTTERMAN, D. D.; ISAKSON, B. E.; KANAGY, N. L.; MARTINEZ-LEMUS, L. A.; SONKUSARE, S. K.; THAKORE, P.; TRASK, A. J.; WATTS, S. W.; WEBB, R. C. Guidelines for the measurement of vascular function and structure in isolated arteries and veins. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 321, n. 1, p. H77-H111, Jul 1 2021.

WILS, J.; FAVRE, J.; BELLIN, J. Modulating putative endothelial progenitor cells for the treatment of endothelial dysfunction and cardiovascular complications in diabetes. **Pharmacol Ther**, v. 170, p. 98-115, Feb 2017.

WOJTALA, A.; BONORA, M.; MALINSKA, D.; PINTON, P.; DUSZYNSKI, J.; WIECKOWSKI, M. R. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. **Methods Enzymol**, v. 542, p. 243-62, 2014.

XIE, W.; WU, F.; HE, J.; SU, C.; CHEN, L.; ZHANG, X.; SUN, J.; LIU, X.; TAO, J. PGC-1 α gene transfer restores adhesion and reendothelialization of endothelial progenitor cells from patients with hypertension. **J Hum Hypertens**, v. 35, n. 6, p. 510-516, Jun 2021.

XU, S.; TAO, J.; YANG, L.; ZHANG, E.; BORIBOUN, C.; ZHOU, J.; SUN, T.; CHENG, M.; HUANG, K.; SHI, J.; DONG, N.; LIU, Q.; ZHAO, T. C.; QIU, H.; HARRIS, R. A.; CHANDEL, N. S.; LOSORDO, D. W.; QIN, G. E2F1 Suppresses Oxidative Metabolism and Endothelial Differentiation of Bone Marrow Progenitor Cells. **Circ Res**, v. 122, n. 5, p. 701-711, Mar 2 2018.

XU, W.; HU, X.; QI, X.; ZHU, R.; LI, C.; ZHU, Y.; YIN, S.; CHENG, L.; ZHU, R. Vitamin D Ameliorates Angiotensin II-Induced Human Endothelial Progenitor Cell Injury via the PPAR- γ /HO-1 Pathway. **J Vasc Res**, v. 56, n. 1, p. 17-27, 2019.

YAN, F.; LI, J.; ZHANG, W. Transplantation of Endothelial Progenitor Cells: Summary and prospect. **Acta Histochem**, v. 125, n. 1, p. 151990, Jan 2023.

YAN, F.; LIU, X.; DING, H.; ZHANG, W. Paracrine mechanisms of endothelial progenitor cells in vascular repair. **Acta Histochem**, v. 124, n. 1, p. 151833, Jan 2022.

YAO, En-Hui; FUKUDA, Noboru; MATSUMOTO, Taro; KATAKAWA, Mayumi; YAMAMOTO, Chii; HAN, Ying; UENO, Takahiro; KOBAYASHI, Naohiko; MATSUMOTO, Koichi. Effects of the antioxidative β -blocker celiprolol on endothelial progenitor cells in hypertensive rats. **Am J Hypertens**, v. 21, n. 9, p. 1062-1068, 2008.

YAO, S.; SU, C.; WU, S. H.; HU, D. J.; LIU, X. Aliskiren Improved the Endothelial Repair Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Hypertension via the Tie2/PI3k/Akt/eNOS Signalling Pathway. **Cardiol Res Pract**, v. 2020, p. 6534512, 2020.

YILDIZ, M. O.; CELIK, H.; CAGLAYAN, C.; GENÇ, A.; DOĞAN, T.; SATICI, E. Neuroprotective effects of carvacrol against cadmium-induced neurotoxicity in rats: role of oxidative stress, inflammation and apoptosis. **Metab Brain Dis**, v. 37, n. 4, p. 1259-1269, Apr 2022.

YIN, Q. H.; YAN, F. X.; ZU, X. Y.; WU, Y. H.; WU, X. P.; LIAO, M. C.; DENG, S. W.; YIN, L. L.; ZHUANG, Y. Z. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. **Cytotechnology**, v. 64, n. 1, p. 43-51, Jan 2012.

YU, Bing-Bo; ZHI, Hui; ZHANG, Xiao-Yu; LIANG, Jian-Wen; HE, Jiang; SU, Chen; XIA, Wen-Hao; ZHANG, Gao-Xing; TAO, Jun. Mitochondrial dysfunction-mediated decline in angiogenic capacity of endothelial progenitor cells is associated with capillary rarefaction in patients with hypertension via downregulation of CXCR4/JAK2/SIRT5 signaling. **EBioMedicine**, v. 42, p. 64-75, 2019.

YU, J.; WANG, S.; SHI, W.; ZHOU, W.; NIU, Y.; HUANG, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, A.; JIA, Z. Roxadustat prevents Ang II hypertension by targeting angiotensin receptors and eNOS. **JCI Insight**, v. 6, n. 18, Sep 22 2021.

YU, Min; LIU, Qian; SUN, Jing; YI, Kaihong; WU, Libiao; TAN, Xuerui. Nicotine improves the functional activity of late endothelial progenitor cells via nicotinic acetylcholine receptors. **Biochemistry and cell biology**, v. 89, n. 4, p. 405-410, 2011.

YU, Y.; FUKUDA, N.; YAO, E. H.; MATSUMOTO, T.; KOBAYASHI, N.; SUZUKI, R.; TAHIRA, Y.; UENO, T.; MATSUMOTO, K. Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension. **Am J Hypertens**, v. 21, n. 1, p. 72-77, Jan 2008.

ZAMPETAKI, A.; KIRTON, J. P.; XU, Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. **Cardiovasc Res**, v. 78, n. 3, p. 413-21, Jun 1 2008.

ZHANG, Gaoxing; LIN, Xiufang; SHAO, Yijia; SU, Chen; TAO, Jun; LIU, Xing. Berberine reduces endothelial injury and arterial stiffness in spontaneously hypertensive rats. **Clin Exp Hypertens**, v. 42, n. 3, p. 257-265, 2020.

ZHANG, L.; SONG, J.; KONG, L.; YUAN, T.; LI, W.; ZHANG, W.; HOU, B.; LU, Y.; DU, G. The strategies and techniques of drug discovery from natural products. **Pharmacol Ther**, v. 216, p. 107686, Dec 2020.

ZHANG, Xi; YANG, Jia; YU, Xinyi; CHENG, Si; GAN, Hua; XIA, Yunfeng. Angiotensin II-induced early and late inflammatory responses through NOXs and MAPK pathways. **Inflammation**, v. 40, n. 1, p. 154-165, 2017.

ZHAO, W.; DENG, C.; HAN, Q.; XU, H.; CHEN, Y. Carvacrol may alleviate vascular inflammation in diabetic db/db mice. **Int J Mol Med**, v. 46, n. 3, p. 977-988, Sep 2020.

ZHAO, W.; ZHAO, L.; LIAO, J.; LUO, Y.; HE, L. Early risk assessment of circulating endothelial progenitor cells and plasma stromal cell-derived factor-1 for nondisabling ischemic cerebrovascular events. **BMC Neurol**, v. 19, n. 1, p. 22, Feb 12 2019.

ZHAO, Yingzi; VANHOUTTE, Paul M; LEUNG, Susan WS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of pharmacological sciences**, v. 129, n. 2, p. 83-94, 2015.

ZHOU, Z.; PENG, J.; WANG, C. J.; LI, D.; LI, T. T.; HU, C. P.; CHEN, X. P.; LI, Y. J. Accelerated senescence of endothelial progenitor cells in hypertension is related to the reduction of calcitonin gene-related peptide. **J Hypertens**, v. 28, n. 5, p. 931-9, May 2010.

ZREIKAT, H. H.; HARPE, S. E.; SLATTUM, P. W.; MAYES, D. P.; ESSAH, P. A.; CHEANG, K. I. Effect of Renin-Angiotensin system inhibition on cardiovascular events in older hypertensive patients with metabolic syndrome. **Metabolism**, v. 63, n. 3, p. 392-9, Mar 2014.

ZUBCEVIC, Jasenka; JUN, Joo Yun; KIM, Seungbum; PEREZ, Pablo D; AFZAL, Aqeela; SHAN, Zhiying; LI, Wencheng; SANTISTEBAN, Monica M; YUAN, Wei; FEBO, Marcelo. Altered inflammatory response is associated with an impaired autonomic input to the bone marrow in the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 63, n. 3, p. 542-550, 2014.



ZUBCEVIC, Jasenka; WAKI, Hidefumi; RAIZADA, Mohan K; PATON, Julian FR. Autonomic-immune-vascular interaction: an emerging concept for neurogenic hypertension. **Hypertension**, v. 57, n. 6, p. 1026-1033, 2011.

Apêndice

APÊNDICE A – Carvacrol improves vascular function in hypertensive animals by modulating endothelial progenitor cell.

Article

Carvacrol Improves Vascular Function in Hypertensive Animals by Modulating Endothelial Progenitor Cells

Tays Amanda Felisberto Gonçalves , Viviane Silva Lima, Arthur José Pontes Oliveira de Almeida , Alinne Villar de Arruda, Ana Caroline Meneses Ferreira Veras, Thaís Trajano Lima, Evyllen Myllena Cardoso Soares, Adhonia Correia dos Santos, Maria Eduarda Costa de Vasconcelos, Mathania Silva de Almeida Feitosa, Robson Cavalcante Veras and Isac Almeida de Medeiros *

Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58059-900, PB, Brazil; taysamanda@ltf.ufpb.br (T.A.F.G.); vivianelima@ltf.ufpb.br (V.S.L.); arthur-jp@hotmail.com (A.J.P.O.d.A.); alinnevillar@ltf.ufpb.br (A.V.d.A.); carolmeneses@ltf.ufpb.br (A.C.M.F.V.); thais.trajano@academico.ufpb.br (T.T.L.); evyllen.cardoso@academico.ufpb.br (E.M.C.S.); adhonia.correia@academico.ufpb.br (A.C.d.S.); mecv@academico.ufpb.br (M.E.C.d.V.); mathaniarez@ltf.ufpb.br (M.S.d.A.F.); robsonveras@ccs.ufpb.br (R.C.V.)

* Correspondence: isac.medeiros@academico.ufpb.br; Tel.: +55-(83)-3209-8787

Abstract: Carvacrol, a phenolic monoterpene, has diverse biological activities, highlighting its antioxidant and antihypertensive capacity. However, there is little evidence demonstrating its influence on vascular regeneration. Therefore, we evaluated the modulation of carvacrol on endothelial repair induced by endothelial progenitor cells (EPC) in hypertension. Twelve-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) were treated with a vehicle, carvacrol (50 or 100 mg/kg/day), or resveratrol (10 mg/kg/day) orally for four weeks. Wistar Kyoto (WKY) rats were used as the normotensive controls. Their systolic blood pressure (SBP) was measured weekly through the tail cuff. The EPCs were isolated from the bone marrow and peripheral circulation and were quantified by flow cytometry. The functionality of the EPC was evaluated after cultivation through the quantification of colony-forming units (CFU), evaluation of eNOS, intracellular detection of reactive oxygen species (ROS), and evaluation of senescence. The superior mesenteric artery was isolated to evaluate the quantification of ROS, CD34, and CD31. Treatment with carvacrol induced EPC migration, increased CFU formation and eNOS expression and activity, and reduced ROS and senescence. In addition, carvacrol reduced vascular ROS and increased CD31 and CD34 expression. This study showed that treatment with carvacrol improved the functionality of EPC, contributing to the reduction of endothelial dysfunction.

Keywords: oxidative stress; endothelial progenitor cells; endothelial dysfunction



Citation: Gonçalves, T.A.F.; Lima, V.S.; de Almeida, A.J.P.O.; de Arruda, A.V.; Veras, A.C.M.F.; Lima, T.T.; Soares, E.M.C.; Santos, A.C.d.; Vasconcelos, M.E.C.d.; de Almeida Feitosa, M.S.; et al. Carvacrol Improves Vascular Function in Hypertensive Animals by Modulating Endothelial Progenitor Cells. *Nutrients* **2023**, *15*, 3032. <https://doi.org/10.3390/nu15133032>

Academic Editor: Arrigo Cicero

Received: 31 May 2023

Revised: 29 June 2023

Accepted: 29 June 2023

Published: 4 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Endothelial progenitor cells (EPC), precursors of mature endothelial cells, are capable of exerting functional effects on arteries, capillaries, and veins, which include maintenance of the endothelial layer and vascular homeostasis, as well as participation in vascular regeneration and neovascularization [1].

Under normal conditions, most EPC remains in the bone marrow, relatively inactivated, in contact with stromal cells. However, in response to an injury through chemotactic factors, EPCs are released from the bone marrow and mobilized to the injured tissue directly into the damaged vessel structures, preventing blood vessel dysfunction [2,3]. In contrast, when the percentage of EPC decreases, or its function is impaired, the angiogenic capacity is weakened, reducing its regeneration capacity and potentiating vascular injury [4].

A series of experimental and clinical studies have been conducted in the context of hypertension that demonstrate reductions in functionality and proliferative capacity [5] with lower numbers of circulating EPCs [6–8]. The pathological mechanisms involving

EPC dysfunction in arterial hypertension are complex and include abnormalities of the oxidant and antioxidant system, which leads to the increased production of reactive oxygen species [9]. A fundamental point of this process is that prolonged exposure to high levels of ROS induces EPC dysfunction, causing premature cell senescence driven by telomere wear, making the regeneration process difficult [10]. Thus, attenuating oxidative stress by antioxidant molecules may maintain the functional integrity of EPC [11].

There is an increasing search for products of natural origin that act as the biological aspect, helping the individual's well-being in several areas of science. In this sense, evidence has linked the Mediterranean diet with a variety of benefits to cardiovascular health [12]. *Origanum vulgare* (oregano), an herb commonly used in this diet, has been shown to possess various antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, and antinociceptive activities [13]. Such activities can be mainly attributed to the components present in this herb's essential oil [14]. Carvacrol, the main constituent of the essential oil of oregano, stands out for its various pharmacological activities, such as antioxidant properties [15], including on the cardiovascular system [16–18].

Carvacrol leads to reduced levels of inflammatory factors [19,20], inhibits the formation of atheroma plaques [21], increases the levels of antioxidant enzymes and activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) [22], and reduces senescence cell [23]. Furthermore, carvacrol instigates the angiogenesis of human mesenchymal cells by modulating the differentiation of these cells [24].

Therefore, the main objective of this work was to evaluate the regenerative potential of carvacrol through EPC modulation in spontaneously hypertensive rats.

2. Materials and Methods

2.1. Animal and Experimental Design

Male Wistar Kyoto (WKY) and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR), 12 weeks old, were housed in temperature-controlled conditions (21 ± 1 °C), with a 12-h light–dark cycle and with free access to food (NUVILAB CR-1, QUIMTIA®, Curitiba, PR, BR) and water. The animals came from the Animal Production Unit of IPerFarm/UFPB and the Central Animal Facility/UFAL. The Committee on Ethics and Use of Animals (CEUA) from the Federal University of Paraíba under no. 2171120320 approved the current experimental protocols.

WKY animals were used as a negative control (WKY-CTL; $n = 8$). As a model of hypertension, we used SHR animals, which have changes in EPC functionality associated with impaired vascular function [25]. The SHR animals were randomly divided into four experimental groups: hypertensive control (SHR-CTL; $n = 8$), hypertensive treated with carvacrol 50 mg/kg (SHR-C50; $n = 8$) or 100 mg/kg (SHR-C100; $n = 8$), and hypertensive treated with resveratrol 10 mg/kg (SHR-RE10; $n = 8$). All experimental groups received daily doses of the respective treatments for four weeks.

2.2. Indirect Measurement of Systolic Blood Pressure (SBP) and Heart Rate (HR)

The tail plethysmography method was used to detect the SBP and HR at the start and end of each treatment [26]. Before the measurements, the rats were allowed a 10-min period to acclimate to the heated (28–30 °C) acrylic box environment. After this period, the animals were transferred to an acrylic container, and the tail cuff and piezoelectric sensor were connected to the tail for pulse measurements.

The piezoelectric sensor signals were amplified using ADInstruments® (Bella Vista, NSW, Australia) and digitized using suitable software (Labchart7®). In addition, the SBP and HR values were calculated using the average of three consecutive measurements.

2.3. Isolation and In Vitro Culture of EPC Derived from Bone Marrow and Peripheral Blood

After the animal was anesthetized, 10 mL of peripheral blood (PB) with EDTA was collected in the hepatic portal vein to obtain circulating mononuclear cells [27,28]. After euthanasia, the femur and tibia were separated and dissected [29]. Subsequently, the epiphyses were removed, and the bone cavities were washed with 10 mL of PBS/EDTA.

Then, the cells were centrifuged at $600 \times g$ for 10 min at 4°C . Next, the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 10 mL of medium 199 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). Finally, the blood was collected, and bone marrow (BM) washing was added to the Ficoll®-Paque PLUS density gradient media (Cytiva Life Sciences, Uppsala, Sweden) for cell separation. Thus, the mononuclear cell layer was used for flow cytometry to quantify, characterize, and follow seven-day cell cultures.

Suspensions with at least 95% viability were transferred to 6-well plates, in the proportion of 1×10^6 mononuclear cells/ 1 cm^2 /0.5 mL of EBM-2 supplemented with endothelial growth factors such as human epidermal growth factor (hEGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), basic human fibroblast growth factor (hFGF-b), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), hydrocortisone, gentamicin and amphotericin, 2% fetal bovine serum, ascorbic acid, and heparin (Lonza, Walkersville, MD, USA) and kept in a 5% CO_2 incubator at 37°C for 24 h. In addition, nonadherent cells were plated in 24-well plates, previously prepared with fibronectin ($1\text{ }\mu\text{g/mL}$), in proportions of 1×10^6 cells/ 1 cm^2 /0.5 mL of EBM-2. Every 2 days, the culture medium was changed until the seventh day, whereas the experimental protocols were followed.

2.4. EPC Quantification and Characterization after Treatment with Carvacrol

After isolating cells from the peripheral blood and bone marrow, cells were diluted to reach a ratio of $10^6/100\text{ }\mu\text{L}$. Then, the cells were labeled with the following antibodies: FITC-anti-VEGFR-2 (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), plus PE-anti-CD34 (1:50; Santa Cruz Biotechnology), plus APC-anti-CD133 (1:10; BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA), and PerPCP-Cy5-7-AAD ($0.25\text{ }\mu\text{g}/106$; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). After adding the antibodies, the cells were incubated for 30 min and the 7-AAD for 10 min at 4°C away from light. Each analysis was performed on the population of 100,000 events using a FACS Canto-II cytometer (BD, Santa Monica, CA, USA).

2.5. Functional Evaluation of Endothelial Progenitor Cells (EPCs) by Colony-Forming Units

Following carvacrol treatment, the EPC clonogenicity properties were evaluated. Thus, to determine the number of colony-forming units (CFU), the cells were visually inspected after seven days through an inverted microscope with $40\times$ magnification (NIKON Eclipse TS100, Tokyo, Japan). The results were expressed as a percentage of the average number of colonies formed by 10^6 plated cells. Two different observers manually calculated the average number of colonies from ten wells under a light microscope.

2.6. Evaluation of EPC-eNOS Expression after Carvacrol Treatment

The expression of total endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (ps1177) are performed by the flow cytometry technique as previously described [30]. In brief, after seven days of cell culture, EPC was fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 37°C , following permeabilization with 0.1% Triton X-100 for 10 min at 37°C . Then, a blocking solution consisting of PBS and 5% BSA was added for 2 h at room temperature. Subsequently, the EPCs were resuspended and incubated with primary anti-eNOS (1:50; Bd Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) or anti-eNOS ps1177 (1:100; Bd Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) antibodies for 1 h at room temperature. Finally, the samples were washed with PBS and incubated with PE-conjugated anti-mouse IgG (Invitrogen™, Waltham, MA, USA) for 1 h in the dark. The samples were analyzed using a FACS Canto-II cytometer (BD, Santa Monica, CA, USA).

2.7. Evaluation of the Effect of Carvacrol Treatment on ROS Production

Superoxide anions (ROS) were measured by a dihydroethidium (DHE) probe (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). DHE, an oxidative fluorescent dye, was oxidized to ethidium bromide and intercalated into DNA in the presence of superoxide anions. Briefly, cultured EPC or superior mesenteric artery sections ($10\text{ }\mu\text{m}$) from different groups were loaded with $10\text{ }\mu\text{M}$ DHE for 40 min at 37°C in the dark. Subsequently,

the samples were washed with PBS and analyzed by fluorescence microscopy (NIKON Eclipse TS100, Tokyo, Japan). The analysis of ROS production in EPC was performed by two different analyzers, quantifying the fluorescence intensity using NIS elemental[®] software version 4.2 through the observations of 10 other fields. Data were normalized by the control group.

2.8. Evaluation of Cellular Senescence by Flow Cytometry

To measure SA- β -gal activity by flow cytometry, the fluorogenic substrate C12FDG (5-dodecanoylamino fluorescein Di- β -D-galactopyranoside, Invitrogen, Life Technologies SAS; Waltham, MA, USA) was used as previously described [31]. Briefly, the EPC was pretreated for 1 h with chloroquine (300 μ M) to raise the pH of the lysosomes (pH = 6.0), plus an additional 1 h of C12FDG (33 μ M) in the dark. Finally, EPCs were washed with ice-cold PBS, trypsinized, and immediately analyzed with a FACS Canto-II (BD, Santa Monica, CA, USA).

2.9. Immunofluorescence

Initially, superior mesenteric artery segments of the treated animals were included in Tissue Tek Compound (OCT), frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C until the experimental protocols. Subsequently, superior mesenteric artery sections (10 μ m) from different groups were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at 37°C . Next, the vessels were blocked with PBS with 5% BSA for 30 min at room temperature. Finally, monoclonal antibodies were incubated: FITC-conjugated anti-PECAM antibody (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and PE-conjugated anti-CD34 antibody (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) overnight at 4°C . Subsequently, the sections were washed with PBS and mounted with DAPI mounting medium (Fluoroshield[™], Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for nuclear identification [32]. Data were acquired using fluorescence microscopy (NIKON Eclipse TS100, Tokyo, Japan) and analyzed with ImageJ[®] software version 1.50i.

2.10. Statistical Analysis

All data were expressed as the mean plus or minus the standard error of the mean (e.p.m). The significant difference between the tested groups was tested by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-test. Data were considered significant when $p < 0.05$. All analyses performed were calculated using the statistical program Graph Pad Prism version 7.0[®].

3. Results

3.1. Carvacrol Reduces SBP in SHR Animals

Changes in the SBP of WKY and SHR animals from the different experimental groups after four weeks of treatment are shown in Table 1. At the beginning of the treatment, the baseline SBP of the WKY-CTL group was significantly lower than the SHR-CTL (Table 1), SHR-C50, SHR-C100, and SHR-RE10 groups ($p > 0.05$). The pressure levels of the WKY-CTL group remained lower than the SHR-CTL group ($p > 0.05$) at the end of the treatment. The SHR-C50, SHR-C100, and SHR-RE10 groups significantly reduced SBP compared to the SHR-CTL group at the end of the treatment ($p < 0.05$). Similarly, the SHR-C50, SHR-C100, and SHR-RE10 groups significantly reduced SBP compared to the respective groups at the beginning of the treatment. Thus, carvacrol effectively reduced SBP in hypertensive animals.

Table 1. SBP (mmHg) measurements at the beginning and the end of the treatments for the different experimental groups.

Groups	Initial SBP	Final SBP
WKY-CTL (<i>n</i> = 6)	138 ± 2.8	137 ± 3.4
SHR-CTL (<i>n</i> = 7)	186 ± 5.1 *	202 ± 5.1
SHR-C50 (<i>n</i> = 6)	193 ± 3.7 *	171 ± 3.8 #†‡
SHR-C100 (<i>n</i> = 7)	188 ± 3.2 *	163 ± 2.7 #†‡
SHR-RE10 (<i>n</i> = 6)	194 ± 3.2 *	168 ± 5.2 #†‡

Results are expressed as the mean ± e.p.m. The ANOVA test was used for the statistical analysis, followed by Tukey's post-test. * *p* < 0.05 vs. initial WKY-CTL; # *p* < 0.05 vs. final WKY-CTL; † *p* < 0.05 vs. final SHR-CTL; ‡ *p* < 0.05 vs. start of treatment.

3.2. Carvacrol Enhances EPC Mobilization to the Peripheral Circulation

EPC was quantified in the bone marrow and peripheral circulation by expressing surface antigens CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ (Figure 1a). Hematopoietic cells were selected based on the forward and side scatter values, excluding debris, aggregates, and dead cells [33]. The EPC levels in the bone marrow were lower in the WKY-CTL group (0.26 ± 0.04, *n* = 4) compared to the hypertensive SHR-CTL group (0.42 ± 0.04, *n* = 4) (*p* < 0.05) (Figure 1b). Treatments with carvacrol at doses of 50 mg/kg (0.23 ± 0.04, *n* = 6) and 100 mg/kg (0.20 ± 0.03, *n* = 5) were similar to that of the WKY-CTL group and significantly different from the SHR-CTL group (*p* < 0.05). The SHR-RE10 group (0.17 ± 0.03, *n* = 5) was also significantly different from the SHR-CTL group (*p* < 0.05) (Figure 1b).

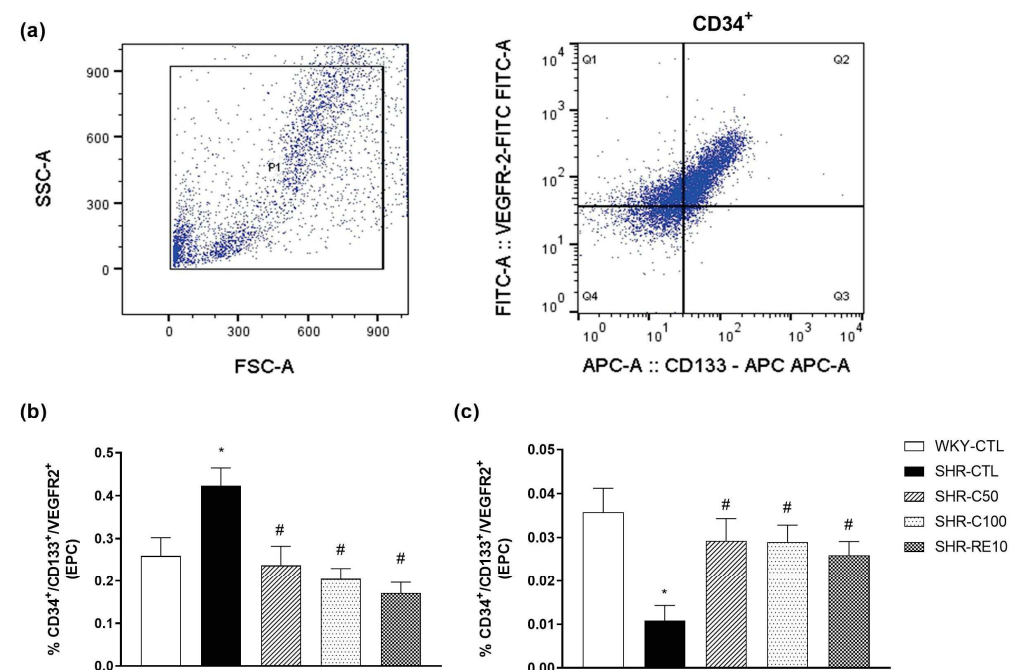


Figure 1. Quantification and characterization of EPC after treatment with carvacrol. Representative images of EPC characterization by flow cytometry in the bone marrow (a). Quantification of EPC isolated from bone marrow (b) and peripheral circulation (c). EPC levels were expressed as the percentage of CD34⁺/CD133⁺/VEGFR2⁺ cells in relation to mononuclear cells. * *p* < 0.05 vs. WKY-CTL; # *p* < 0.05 vs. SHR-CTL. Results are expressed as the mean ± e.p.m. The ANOVA test was used for the statistical analysis, followed by Tukey's post-test.

On the other hand, the circulating EPC levels were lower in the SHR-CTL group (0.011 ± 0.004, *n* = 5) compared to the normotensive WKY-CTL group (0.036 ± 0.005, *n* = 4) (*p* < 0.05) (Figure 1c). Interestingly, treatments with carvacrol at doses of 50 mg/kg (0.029 ± 0.005, *n* = 4) and 100 mg/kg (0.029 ± 0.005, *n* = 5) significantly improved EPC

circulation compared to the SHR group -CTL ($p < 0.05$). Similarly, the SHR-RE10 group (0.026 ± 0.003 , $n = 4$) also showed an increase in the circulating number of EPCs (Figure 1c). These results indicated that carvacrol reduced the entrapment of EPC in the bone marrow, favoring its migration to the peripheral circulation.

3.3. Characterization of EPC after Cell Culture

After 7 days of cell culture, EPC was characterized in the bone marrow and peripheral circulation. The results obtained after evaluating the expression of the CD34 and VEGFR-2 surface antigens demonstrated the achievement of EPC in all the groups under study, with no statistically significant differences between the treated groups (Figure 2a,b).

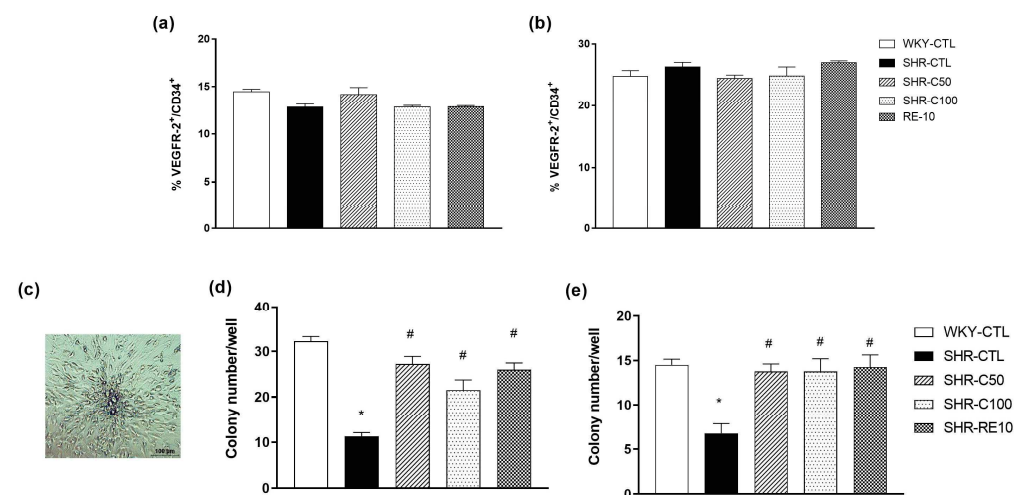


Figure 2. Effect of carvacrol treatment on CFU expression in EPC cultured 7 days after treatment. Characterization of the EPC population confirmed by the expression of VEGFR-2 and CD34 in the bone marrow, (a) peripheral circulation, and (b) cultured cells. Representative image of CFU evaluated after seven days of cell culture (c). Number of CFU after seven days of cell culture of cells isolated from bone marrow (d) and peripheral circulation (e). Results are expressed as the mean \pm e.p.m. The ANOVA test was used for the statistical analysis, followed by Tukey's post-test. * $p < 0.05$ vs. WKY-CTL; # $p < 0.05$ vs. SHR-CTL.

Treatment with carvacrol increased the proliferative capacity of EPC derived from the bone marrow and peripheral circulation. After seven days of cultivation, the results indicated that the SHR-CTL group (BM = 11.2 ± 0.8 , $n = 4$; PB = 6.7 ± 1.1 , $n = 4$) (Figure 2d,e) markedly reduced the colony-forming units (CFU) when compared to the WKY-CTL group (BM = 32.2 ± 1.0 , $n = 4$; PB = 14.5 ± 0.6 , $n = 4$) ($p < 0.05$). Interestingly, this effect was reversed by the treatments of the SHR-C50 group (BM = 27.2 ± 1.6 , $n = 4$; PB = 13.7 ± 0.8 , $n = 4$), SHR-C100 (BM = 21.5 ± 2.2 , $n = 4$; PB = 13.7 ± 1.4 , $n = 4$), and SHR-RE10 (BM = 26.0 ± 1.4 , $n = 4$; PB = 14.2 ± 1.3 , $n = 4$). Therefore, these results indicate that carvacrol improved the clonogenicity of EPC.

3.4. Carvacrol Treatment Increases eNOS Activity and Expression

The depletion in NO levels is linked to the low repair capacity mediated by EPC. In contrast, NO signaling mediates the induction of proliferation, angiogenesis, and migration of EPC to the peripheral circulation. Thus, we evaluated the expression and activity of eNOS, the enzyme that synthesizes NO. In EPC isolated from bone marrow, the different experimental groups did not show significant changes in eNOS expression ($p > 0.005$) (Figure 3a). In contrast, the percentage of phosphorylated eNOS (p-eNOS) was significantly reduced in the SHR-CTL group (BM = 5.50 ± 0.6 ; $n = 4$) compared to the WKY-CTL group (BM = 8.34 ± 0.2 ; $n = 5$) (Figure 3b). Treatments with carvacrol at doses of 50 mg/kg (BM = 7.50 ± 0.5 ; $n = 4$) and 100 mg/kg (BM = 7.17 ± 0.3 ; $n = 4$) were able to reverse the

impairment of eNOS activity characterized in the hypertensive group. Treatment with resveratrol (BM = 8.42 ± 0.5 ; $n = 5$) was similar to the groups treated with carvacrol.

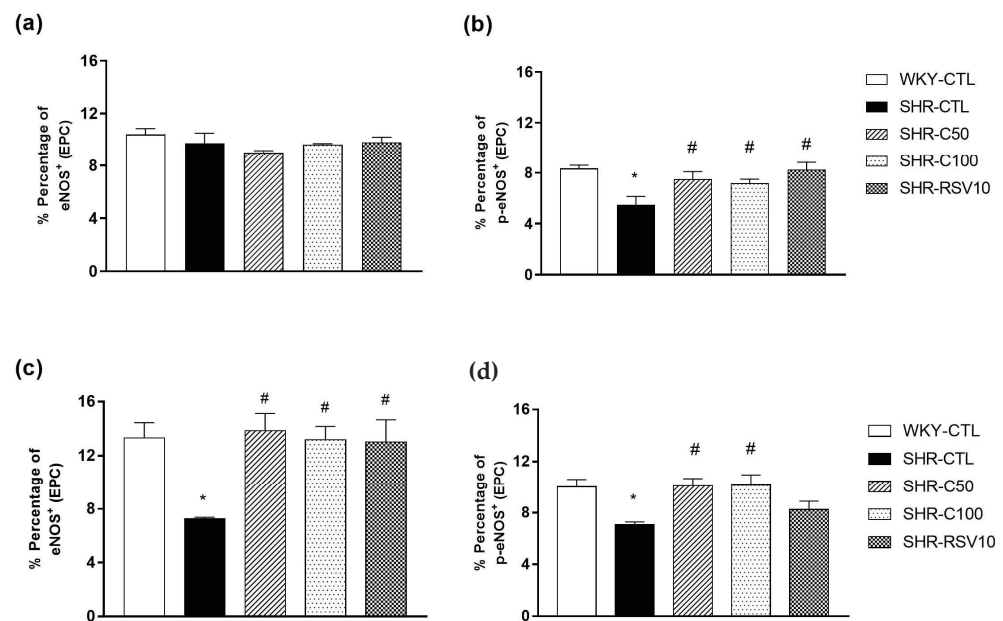


Figure 3. Evaluation of the total eNOS and phosphorylated eNOS in EPC cultured 7 days after treatment. Evaluation of the total eNOS (a) and p-eNOS (b) expression in cultured EPC from bone marrow. Quantification of the total eNOS (c) and p-eNOS (d) expression in EPC isolated from the peripheral circulation. Results are expressed as the mean \pm e.p.m. The ANOVA test was used for the statistical analysis, followed by Tukey's post-test. * $p < 0.05$ vs. WKY-CTL; # $p < 0.05$ vs. SHR-CTL.

In the EPC isolated from the peripheral circulation, we verified a reduction in the percentage of total eNOS and p-eNOS in the SHR-CTL animals (eNOS = $7.2 \pm 0.1\%$, $n = 6$; p-eNOS = $7.0 \pm 0.2\%$, $n = 6$) when compared to the WKY group -CTL (eNOS = $13.3 \pm 1.1\%$, $n = 6$; p-eNOS = $10.0 \pm 0.5\%$, $n = 6$) (Figure 3c,d). In contrast, the SHR-C50 (eNOS = $13.8 \pm 1.2\%$, $n = 5$; p-eNOS = $10.1 \pm 0.5\%$, $n = 6$), SHR-C100 (eNOS = $13.1 \pm 0.9\%$, $n = 5$; p-eNOS = $10.1 \pm 0.8\%$, $n = 5$), and SHR-RE10 groups (eNOS = $13.0 \pm 1.6\%$, $n = 5$; p-eNOS = 8.42 ± 0.6 , $n = 5$) (Figure 3c,d) significantly increased in eNOS expression and activity, showing similar levels to the WKY-CTL group. The results revealed that enhanced EPC functionality may be related to increased eNOS activation.

3.5. Carvacrol Reduced Oxidative Stress and Cellular Senescence in EPCs

Elevated ROS levels, such as oxidative stress conditions, lead to reduced cell migration due to, at least in part, an increase in senescence and cell apoptosis, in addition to reducing the mobilization, migration, and adhesion factors. Therefore, we evaluated the fluorescence intensity by quantifying superoxide anions in EPC after 7 days of cultivation using the DHE probe.

The DHE probe emitted basal fluorescence in EPC-cultured cells in the different experimental groups. In the SHR-CTL group, an increase in basal fluorescence intensity ($120.1 \pm 4.3\%$; $n = 6$) was verified when compared to the WKY-CTL group ($100.0 \pm 2.3\%$; $n = 6$) (Figure 4a,c) in bone marrow-derived EPC. Interestingly, the SHR-C50 ($94.7 \pm 1.8\%$; $n = 6$), SHR-C100 ($98.1 \pm 1.4\%$; $n = 6$), and SHR-RE10 ($107.7 \pm 3.2\%$, $n = 4$) groups showed fluorescence similar to the WKY-CTL group.

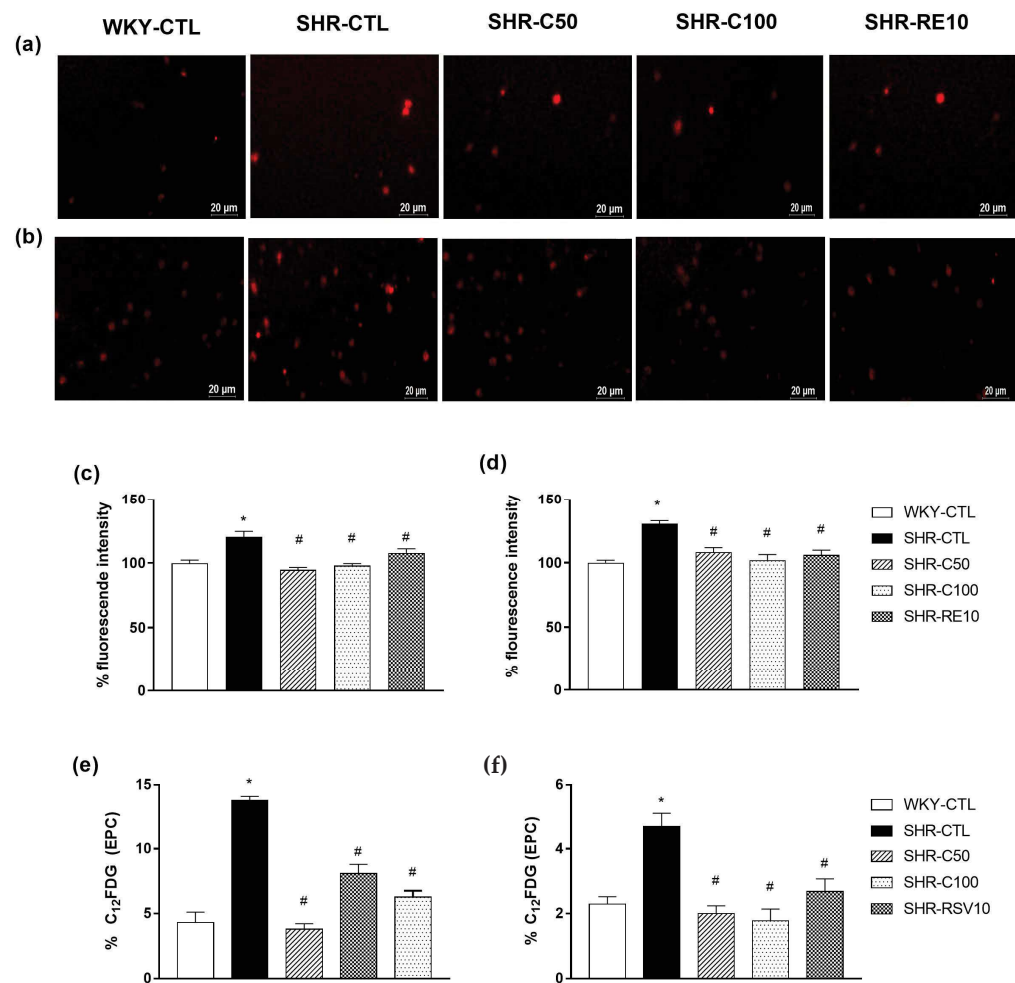


Figure 4. Effect of carvacrol treatment on ROS production and cellular senescence in different experimental groups in EPC cultured 7 days after treatment. Representative images of DHE fluorescence in EPC from MO (a) and SP (b). Quantification of fluorescence intensity of EPC isolated from MO (c) and SP (d) after seven days of cultivation. Evaluation of cellular senescence by quantifying the fluorescence intensity of C12FDG from EPC isolated from MO (e) and SP (f). Results are expressed as the mean \pm e.p.m. The ANOVA test was used for the statistical analysis, followed by Tukey's post-test. * $p < 0.05$ vs. WKY-CTL; # $p < 0.05$ vs. SHR-CTL.

Similar results were observed in the EPC derived from the peripheral circulation, where the levels of DHE fluorescence intensity of the WKY-CTL group ($100.0 \pm 2.1\%$; $n = 6$) showed no significant difference between the SHR-C50 ($108.1 \pm 3.5\%$; $n = 6$), SHR-C100 ($102.0 \pm 4.4\%$; $n = 6$), and SHR-RE10 groups ($106.1 \pm 3.7\%$; $n = 6$) (Figure 4b,d). However, the SHR-CTL group ($130.5 \pm 2.3\%$; $n = 6$) showed an increase in the basal production of superoxide anions compared to the other experimental groups.

Cellular senescence decreases the functionality and migration of EPC, hampering its ability to restore endothelial dysfunction. Thus, we evaluated senescence through the activity of SA- β -gal through the C12FDG probe. As a result, the SHR-C50 (BM = 3.8 ± 0.4 , $n = 6$; PB = 2.0 ± 0.2 , $n = 6$) and SHR-C100 (BM = 6.2 ± 0.4 , $n = 5$; PB = 1.7 ± 0.3 , $n = 6$) groups and SHR-RE10 (BM = 8.1 ± 0.5 , $n = 4$; PB = 2.6 ± 0.3 , $n = 6$) prevented increase induced by the SHR-CTL group (BM = 13.8 ± 0.3 , $n = 4$; PB = 4.7 ± 0.4 , $n = 6$) during SA- β -gal activity (Figure 4e,f), showing levels similar to the WKY-CTL group (BM = 4.3 ± 0.5 , $n = 4$; PB = 2.3 ± 0.2 , $n = 6$) both in bone marrow-derived EPC and in peripheral circulation EPC. Considering these results, we can infer that carvacrol negatively modulated cellular senescence due to reduced oxidative stress.

3.6. Carvacrol Reduces Vascular Oxidative Stress and Induces EPC-Mediated Reendothelialization

Vascular oxidative stress is related to a lower recovery of the endothelial layer, as it can damage adjacent endothelial cells and reduce the cell adhesion capacity. In our study, the SHR-CTL animals (112.9 ± 1.5 ; $n = 6$) showed an increase in the intensity of DHE fluorescence compared to the WKY-CTL group (100 ± 0.6 ; $n = 6$) (Figure 5a,d). Interestingly, the treatments of the SHR-C50 (101.9 ± 1.9 ; $n = 6$), SHR-C100, and SHR-RE10 groups were able to reduce the fluorescence intensity observed in the SHR-CTL group ($p < 0.05$). These results show that carvacrol inhibited the production of ROS characteristic of hypertension, reducing vascular damage.

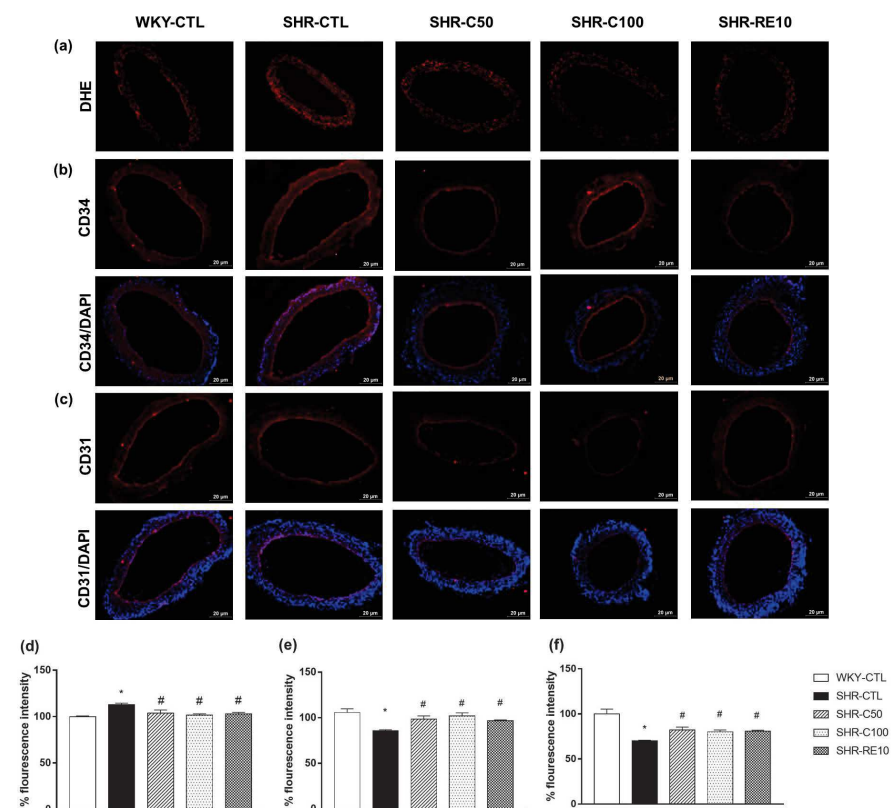


Figure 5. Assessment of vascular oxidative stress and reendothelialization after the treatment. Representative images of the fluorescence intensity of DHE (a), CD34 (b), and CD31 (c) in superior mesenteric arteries isolated from the treated animals. The cell nucleus (blue) was stained with DAPI. Bar graph expressing the measure of the relative intensity of the basal fluorescence (%) of DHE (d), CD34 (e), and CD31 (f) in histological sections of the superior mesenteric artery. Results are expressed as the mean \pm E.P.M. Data were analyzed using the one-way ANOVA statistical test, followed by Tukey's post-test. * $p < 0.05$ vs. WKY; # $p < 0.05$ vs. SHR.

The improvement in EPC functionality was directly related to the increase in regenerative capacity. Thus, we evaluated the expressions of CD34 and CD31 in the blood vessels of treated animals. SHR-CTL animals showed a reduction in CD34 (Figure 5b,e) and CD31 (Figure 5c,f) fluorescence intensity compared to WKY-CTL animals. However, this effect was reversed by treating animals SHR-C50, SHR-C100, and SHR-RE10. Therefore, these results indicate that carvacrol improved endothelial dysfunction in the treated hypertensive animals.

4. Discussion

A critical component of the Mediterranean diet includes the herb oregano, which is commonly added to salads, spaghetti, soups, and sauces and is also used in the preparation of meats, sausages, and canned foods and to preserve cucumbers, mushrooms,

and tomatoes [12]. Essential oils are responsible for the main pharmacological properties attributed to oregano, with carvacrol as the main constituent [34]. This monoterpene has been extensively studied and has been shown to present several benefits, including antioxidant [35], anti-inflammatory [36], and cardioprotective [17,22,37] properties, especially antihypertensive action [18,38], as demonstrated by our results.

Furthermore, in the present study, carvacrol prevents endothelial dysfunction in hypertensive animals by upregulating EPC mobilization, increasing the proliferative and functional capacity, and reducing the oxidative stress and senescence of cells isolated from bone marrow and peripheral blood, which contribute to EPC-mediated reendothelialization.

Multiple data indicate that EPC has diverse surface markers, which depend on the EPC maturation levels. Furthermore, EPC is a heterogeneous group of cells characterized by expressing on their surface CD133 and CD34 as hematopoietic progenitor cell markers and VEGFR2 as an endothelial lineage marker, characterizing the most reliable cell marking [39]. Thus, to characterize the EPC population, we adopted the concomitant labeling of CD133⁺, CD34⁺, and VEGFR-2⁺.

When quantifying the number of EPCs, we verified that carvacrol reduced the entrapment of EPCs in the bone marrow, making them more available to perform endothelial repair in the peripheral circulation. Studies have reported that increased EPC mobilization in the circulation aims to preserve the endothelial integrity in response to vascular damage [8]. The increase in EPC migration is associated with functional maintenance, a necessary condition for their repair capacity [40]. Thus, carvacrol efficiently increased the mobilization of EPC to the peripheral circulation, improving cell function. Similar results were observed by treatment with resveratrol, as demonstrated by Huang, who reported an increase in the biological process of EPC [41].

The clonogenic capacity of EPC has been used as an index of functional analyses, being correlated as a cardiovascular risk factor when it presents a low formation of CFU [9]. In hypertension, the decline in the functionality of the EPC occurs primarily in the reduction of circulating EPC, and this factor is accentuated as hypertension progresses [42]. The low functionality of these cells has been reported in patients with hypertension that is difficult to control and with damage to the target organs [43–45]. In our study, we also demonstrated that hypertensive animals have a deficiency in repair mediated by these cells by reducing the proliferation of these cells, corroborating with studies in SHR animals [46,47] and hypertensive patients [48–50].

Furthermore, treatment with carvacrol increased the proliferative capacity of EPC similarly to animals treated with resveratrol and the normotensive group. Studies have demonstrated that consuming resveratrol can enhance the proliferative capacity of EPCs through increasing nitric oxide (NO) signaling [41].

NO is an essential mediator for angiogenesis by inducing EPC mobilization and improving the migratory and proliferative capacity [4]. This fact was evidenced through experiments with knockout eNOS^{-/-} mice, which failed in the mobilization of EPC to the peripheral circulation [51]. The malfunction in NO bioavailability is a characteristic of endothelial dysfunction, which depends on the balance between eNOS production and inactivation triggered by ROS. Interestingly, carvacrol treatment not only repaired the inactivation of the PI3K/AKT-eNOS-NO pathway but also attenuated ROS production in SHR EPCs. The NO-mediated pathway can promote the growth and mobilization of EPC from the bone marrow into the peripheral circulation [52,53]. Thus, we suggest that carvacrol increases the EPC migratory capacity by reversing the damage to the NO signaling pathway in hypertensive animals.

Experimental studies have indicated that hypertensive patients have high rates of ROS formation associated with increased cellular senescence [54,55]. Thus, when produced in the bone marrow, due to the deficiency of chemotactic factors and the accelerated state of senescence, the mobilization of these cells does not occur properly, becoming trapped in the bone marrow and intensifying the endothelial dysfunction [56]. Therefore, we demon-

strated that carvacrol reduced cellular senescence, causing an increase in the migratory capacity of EPC and making them available to perform the repair of damaged organs.

The antioxidant capacity of carvacrol [20] acts beneficially on the cardiovascular system, restoring vascular function [18,38] and reducing the activity of the NADPH oxidase enzyme, the main enzyme involved in the formation of ROS [21]. Recently, carvacrol has been shown to increase SOD activity in human mesenchymal stem cells [24]. Thus, we can suggest that the increase in performance observed in EPC isolated from hypertensive animals treated with carvacrol is associated with its antioxidant capacity.

Marketou et al. reported that EPC plays an important role in arterial stiffness and remodeling in hypertensive patients, where reduced mobilization reflects inefficient repair [57]. Therefore, we investigated how the increase in EPC mobilization induced by carvacrol altered vascular remodeling. In SHR animals, treatment with carvacrol reversed vascular oxidative stress, which may contribute to the increase in EPC-mediated reendothelialization, as demonstrated by the increase in CD31- and CD34-labeled cells in the vessels of treated hypertensive animals. Similar results were observed with SHR-RE10, corroborating previous studies demonstrating that resveratrol accelerates the reendothelialization of balloon-injured arterial segments [58].

Furthermore, Matluobi et al. showed through in vitro experiments that carvacrol increased the migration, angiogenesis, and transdifferentiation of mesenchymal cells to endothelial cells. This effect was mediated by an increase in the expression of VEGF, a critical chemotactic factor involved in EPC-mediated reendothelialization [24]. However, in our study, the expression of chemotactic factors was not quantified, which is the main limitation. Therefore, additional studies are needed to prove this hypothesis and better elucidate the mechanisms by which carvacrol modulates EPC function and the reendothelialization process.

5. Conclusions

This study elucidated the effects of carvacrol on EPC-mediated endothelial repair, improving mobilization, proliferation, and cell function; increasing eNOS expression; and reducing oxidative stress and cell senescence. However, additional studies to evaluate the intracellular signaling mechanisms involved in the regenerative potential of carvacrol are necessary to consolidate its protective action in the cardiovascular system.

Author Contributions: Conceptualization, T.A.F.G., R.C.V. and I.A.d.M.; Methodology, T.A.F.G., V.S.L., A.C.M.F.V., R.C.V., A.J.P.O.d.A. and I.A.d.M.; Formal Analysis, T.A.F.G., V.S.L., A.C.M.F.V., R.C.V. and I.A.d.M.; Investigation, T.A.F.G., V.S.L., A.J.P.O.d.A., A.C.M.F.V., A.V.d.A., T.T.L., E.M.C.S., A.C.d.S., M.E.C.d.V. and M.S.d.A.F.; Resources, I.A.d.M.; Data Curation, T.A.F.G.; Writing—Original Draft Preparation, T.A.F.G., V.S.L. and A.J.P.O.d.A.; Writing—Review and Editing, R.C.V. and I.A.d.M.; Visualization, T.A.F.G., E.M.C.S., A.C.d.S., R.C.V. and I.A.d.M.; Supervision, R.C.V. and I.A.d.M.; Project Administration, I.A.d.M.; and Funding Acquisition, I.A.d.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This article was funded by the Universidade Federal da Paraíba-Chamada de Produtividade em Pesquisa PROPESQ/PRPG/UFPB 04/2021-PQ-1 (grant number: PVG14861-2021), the Instituto UFPB de Desenvolvimento da Paraíba (IDEP), the Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba-Fapesq (grant number: 47759.673.28850.11082021), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number: 311711/2018-9).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (protocol code 2171120320 and approved on 29 May 2020).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

Acknowledgments: The authors wish to sincerely thank José Crispim Duarte and Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori for their technical assistance. We also thank Elisângela Patrícia Maia de Araújo, Elane Nascimento dos Santos Filho, and Eurica Adélia Nogueira Ribeiro for supplying the animals.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Yan, F.; Liu, X.; Ding, H.; Zhang, W. Paracrine mechanisms of endothelial progenitor cells in vascular repair. *Acta Histochem.* **2022**, *124*, 151833. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Li, J.; Ma, Y.; Miao, X.-H.; Guo, J.-D.; Li, D.-W. Neovascularization and tissue regeneration by endothelial progenitor cells in ischemic stroke. *Neurol. Sci.* **2021**, *42*, 3585–3593. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Peters, E.B. Endothelial Progenitor Cells for the Vascularization of Engineered Tissues. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2018**, *24*, 1–24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Peyter, A.C.; Armengaud, J.B.; Guillot, E.; Zyzdorzcyk, C. Endothelial Progenitor Cells Dysfunctions and Cardiometabolic Disorders: From Mechanisms to Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6667. [\[CrossRef\]](#)
5. Suzuki, R.; Fukuda, N.; Katakawa, M.; Tsunemi, A.; Tahira, Y.; Matsumoto, T.; Ueno, T.; Soma, M. Effects of an angiotensin II receptor blocker on the impaired function of endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* **2014**, *27*, 695–701. [\[CrossRef\]](#)
6. Zhang, Y.; Murugesan, P.; Huang, K.; Cai, H. NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: Novel therapeutic targets. *Nat. Rev. Cardiol.* **2020**, *17*, 170–194. [\[CrossRef\]](#)
7. De Cavanagh, E.M.; González, S.A.; Inserra, F.; Forcada, P.; Castellaro, C.; Chiabaut-Svane, J.; Obregón, S.; Casarini, M.J.; Kempny, P.; Kotliar, C. Sympathetic predominance is associated with impaired endothelial progenitor cells and tunneling nanotubes in controlled-hypertensive patients. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2014**, *307*, H207–H215. [\[CrossRef\]](#)
8. Budzyn, M.; Gryszczyńska, B.; Borucki, M.; Kaczmarek, M.; Begier-Krasinska, B.; Osinska, A.; Bukowska, A.; Iskra, M.; Kasprzak, M.P. The endothelial status reflected by circulating endothelial cells, circulating endothelial progenitor cells and soluble thrombomodulin in patients with mild and resistant hypertension. *Vasc. Pharmacol.* **2019**, *113*, 77–85. [\[CrossRef\]](#)
9. Luo, S.; Xia, W.; Chen, C.; Robinson, E.A.; Tao, J. Endothelial progenitor cells and hypertension: Current concepts and future implications. *Clin. Sci.* **2016**, *130*, 2029–2042. [\[CrossRef\]](#)
10. Wang, C.; Wang, F.; Li, Z.; Huang, L.; Cao, Q.; Chen, S. MeCP2 mediated dysfunction in senescent EPCs. *Oncotarget* **2017**, *8*, 78289–78299. [\[CrossRef\]](#)
11. Reskiawan, A.K.R.; Alwjaj, M.; Ahmad Othman, O.; Rakkar, K.; Sprigg, N.; Bath, P.M.; Bayraktutan, U. Inhibition of oxidative stress delays senescence and augments functional capacity of endothelial progenitor cells. *Brain Res.* **2022**, *1787*, 147925. [\[CrossRef\]](#)
12. Veenstra, J.P.; Johnson, J.J. Oregano (*Origanum vulgare*) extract for food preservation and improvement in gastrointestinal health. *Int. J. Nutr.* **2019**, *3*, 43–52. [\[CrossRef\]](#)
13. Sharifi-Rad, M.; Berkay Yilmaz, Y.; Antika, G.; Salehi, B.; Tumer, T.B.; Kulandaisamy Venil, C.; Das, G.; Patra, J.K.; Karazhan, N.; Akram, M.; et al. Phytochemical constituents, biological activities, and health-promoting effects of the genus *Origanum*. *Phytother. Res. PTR* **2021**, *35*, 95–121. [\[CrossRef\]](#)
14. Teixeira, B.; Marques, A.; Ramos, C.; Serrano, C.; Matos, O.; Neng, N.R.; Nogueira, J.M.; Saraiva, J.A.; Nunes, M.L. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 2707–2714. [\[CrossRef\]](#)
15. Naziroglu, M. A novel antagonist of TRPM2 and TRPV4 channels: Carvacrol. *Metab. Brain Dis.* **2022**, *37*, 711–728. [\[CrossRef\]](#)
16. Peixoto-Neves, D.; Silva-Alves, K.S.; Gomes, M.D.; Lima, F.C.; Lahlou, S.; Magalhaes, P.J.; Ceccatto, V.M.; Coelho-de-Souza, A.N.; Leal-Cardoso, J.H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2010**, *24*, 341–350. [\[CrossRef\]](#)
17. Dantas, B.P.; Alves, Q.L.; de Assis, K.S.; Ribeiro, T.P.; de Almeida, M.M.; de Vasconcelos, A.P.; de Araujo, D.A.; de Andrade Braga, V.; de Medeiros, I.A.; Alencar, J.L.; et al. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvacrol in normotensive rat. *Vasc. Pharmacol.* **2015**, *67*–69, 48–58. [\[CrossRef\]](#)
18. Costa, H.A.; Dias, C.J.M.; Martins, V.A.; de Araujo, S.A.; da Silva, D.P.; Mendes, V.S.; de Oliveira, M.N.S., Jr.; Mostarda, C.T.; Borges, A.C.R.; Ribeiro, R.M.; et al. Effect of treatment with carvacrol and aerobic training on cardiovascular function in spontaneously hypertensive rats. *Exp. Physiol.* **2021**, *106*, 891–901. [\[CrossRef\]](#)
19. Olmezturk Karakurt, T.C.; Emir, I.; Bedir, Z.; Ozkaloglu Erdem, K.T.; Suleyman, H.; Sarigul, C.; Mendil, A.S. Effects of carvacrol on ketamine-induced cardiac injury in rats: An experimental study. *Drug. Chem. Toxicol.* **2022**, *13*, 1–6. [\[CrossRef\]](#)
20. El-Sayed, E.M.; Abd-Allah, A.R.; Mansour, A.M.; El-Arabey, A.A. Thymol and carvacrol prevent cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *JBMT* **2015**, *29*, 165–172. [\[CrossRef\]](#)
21. Lee, K.P.; Sudjarwo, G.W.; Jung, S.H.; Lee, D.; Lee, D.Y.; Lee, G.B.; Baek, S.; Kim, D.Y.; Lee, H.M.; Kim, B.; et al. Carvacrol inhibits atherosclerotic neointima formation by downregulating reactive oxygen species production in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **2015**, *240*, 367–373. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Chen, Y.; Ba, L.; Huang, W.; Liu, Y.; Pan, H.; Mingyao, E.; Shi, P.; Wang, Y.; Li, S.; Qi, H.; et al. Role of carvacrol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *796*, 90–100. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. El-Far, A.H.; Mohamed, H.H.; Elsabagh, D.A.; Mohamed, S.A.; Noreldin, A.E.; Al Jaouni, S.K.; Alsenosy, A.A. Eugenol and carvacrol attenuate brain D-galactose-induced aging-related oxidative alterations in rats. *Env. Sci. Pollut. Res. Int.* **2022**, *29*, 47436–47447. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

24. Matluobi, D.; Araghi, A.; Maragheh, B.F.A.; Rezabakhsh, A.; Soltani, S.; Khaksar, M.; Siavashi, V.; Feyzi, A.; Bagheri, H.S.; Rahbarghazi, R.; et al. Carvacrol promotes angiogenic paracrine potential and endothelial differentiation of human mesenchymal stem cells at low concentrations. *Microvasc. Res.* **2018**, *115*, 20–27. [\[CrossRef\]](#)
25. Zhang, G.; Lin, X.; Shao, Y.; Su, C.; Tao, J.; Liu, X. Berberine reduces endothelial injury and arterial stiffness in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.* **2020**, *42*, 257–265. [\[CrossRef\]](#)
26. Wang, Y.; Thatcher, S.E.; Cassis, L.A. Measuring Blood Pressure Using a Noninvasive Tail Cuff Method in Mice. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1614*, 69–73. [\[CrossRef\]](#)
27. Kundu, N.; Domingues, C.C.; Chou, C.; Ahmadi, N.; Houston, S.; Jerry, D.J.; Sen, S. Use of p53-Silenced Endothelial Progenitor Cells to Treat Ischemia in Diabetic Peripheral Vascular Disease. *J. Am. Heart Assoc.* **2017**, *6*, e005146. [\[CrossRef\]](#)
28. Souza, L.V.; De Meneck, F.; Oliveira, V.; Higa, E.M.; Akamine, E.H.; Franco, M.D.C. Detrimental Impact of Low Birth Weight on Circulating Number and Functional Capacity of Endothelial Progenitor Cells in Healthy Children: Role of Angiogenic Factors. *J. Pediatr.* **2019**, *206*, 72–77.e71. [\[CrossRef\]](#)
29. Chen, C.; Song, C.; Zhang, D.; Yin, D.; Zhang, R.; Chen, J.; Dou, K. Effect of resveratrol combined with atorvastatin on re-endothelialization after drug-eluting stents implantation and the underlying mechanism. *Life Sci.* **2020**, *245*, 117349. [\[CrossRef\]](#)
30. Radziwon-Balicka, A.; Lesyk, G.; Back, V.; Fong, T.; Loredó-Calderon, E.L.; Dong, B.; El-Sikhry, H.; El-Sherbeni, A.A.; El-Kadi, A.; Ogg, S.; et al. Differential eNOS-signalling by platelet subpopulations regulates adhesion and aggregation. *Cardiovasc. Res.* **2017**, *113*, 1719–1731. [\[CrossRef\]](#)
31. Khemais-Benkhiat, S.; Belcastro, E.; Idris-Khodja, N.; Park, S.H.; Amoura, L.; Abbas, M.; Auger, C.; Kessler, L.; Mayoux, E.; Toti, F.; et al. Angiotensin II-induced redox-sensitive SGLT1 and 2 expression promotes high glucose-induced endothelial cell senescence. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 2109–2122. [\[CrossRef\]](#)
32. Soh, B.S.; Ng, S.Y.; Wu, H.; Buac, K.; Park, J.H.; Lian, X.; Xu, J.; Foo, K.S.; Felldin, U.; He, X.; et al. Endothelin-1 supports clonal derivation and expansion of cardiovascular progenitors derived from human embryonic stem cells. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10774. [\[CrossRef\]](#)
33. Castela, A.; Gomes, P.; Silvestre, R.; Guardao, L.; Leite, L.; Chirro, R.; Rodrigues, I.; Vendeira, P.; Virag, R.; Costa, C. Vasculogenesis and Diabetic Erectile Dysfunction: How Relevant Is Glycemic Control? *J. Cell. Biochem.* **2017**, *118*, 82–91. [\[CrossRef\]](#)
34. Aimad, A.; Youness, E.A.; Sanae, R.; El Moussaoui, A.; Bourhia, M.; Salamatullah, A.M.; Alzahrani, A.; Alyahya, H.K.; Albadr, N.A.; Nafidi, H.A.; et al. Chemical Composition and Antifungal, Insecticidal and Repellent Activity of Essential Oils From *Origanum compactum* Benth. Used in the Mediterranean Diet. *Front. Plant. Sci.* **2022**, *13*, 798259. [\[CrossRef\]](#)
35. Tohidi, B.; Rahimmalek, M.; Arzani, A.; Sabzalian, M.R. Thymol, carvacrol, and antioxidant accumulation in Thymus species in response to different light spectra emitted by light-emitting diodes. *Food Chem.* **2020**, *307*, 125521. [\[CrossRef\]](#)
36. Li, Y.; Xu, J.Z.; Gu, C.X.; Liu, G.L.; Tian, K. Carvacrol suppresses inflammatory responses in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *120*, 8169–8176. [\[CrossRef\]](#)
37. Sadeghzadeh, S.; Hejazi, S.H.; Jamhiri, M.; Hafizibarjini, Z.; Sadeghzadeh, S.; Safari, F.; Pharmacology. The effect of carvacrol on transcription levels of Bcl-2 family proteins in hypertrophied heart of rats. *J. Physiol.* **2018**, *22*, 54–62.
38. Dias, C.J.; Costa, H.A.; Alves Dias-Filho, C.A.; Ferreira, A.C.; Rodrigues, B.; Irigoyen, M.C.; Romão Borges, A.C.; de Andradre Martins, V.; Branco Vidal, F.C.; Ribeiro, R.M.; et al. Carvacrol reduces blood pressure, arterial responsiveness and increases expression of MAS receptors in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2022**, *917*, 174717. [\[CrossRef\]](#)
39. Heinisch, P.P.; Bello, C.; Emmert, M.Y.; Carrel, T.; Dreßen, M.; Hörer, J.; Winkler, B.; Luedi, M.M.J.C. Endothelial progenitor cells as biomarkers of cardiovascular pathologies: A narrative review. *Cells* **2022**, *11*, 1678. [\[CrossRef\]](#)
40. Naito, H.; Iba, T.; Takakura, N. Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells. *Int. Immunol.* **2020**, *32*, 295–305. [\[CrossRef\]](#)
41. Huang, P.H.; Chen, Y.H.; Tsai, H.Y.; Chen, J.S.; Wu, T.C.; Lin, F.Y.; Sata, M.; Chen, J.W.; Lin, S.J. Intake of red wine increases the number and functional capacity of circulating endothelial progenitor cells by enhancing nitric oxide bioavailability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 869–877. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Giannotti, G.; Doerries, C.; Mocharla, P.S.; Mueller, M.F.; Bahlmann, F.H.; Horvath, T.; Jiang, H.; Sorrentino, S.A.; Steenken, N.; Manes, C.; et al. Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: Relation to endothelial dysfunction. *Hypertension* **2010**, *55*, 1389–1397. [\[CrossRef\]](#)
43. Huang, P.H.; Huang, S.S.; Chen, Y.H.; Lin, C.P.; Chiang, K.H.; Chen, J.S.; Tsai, H.Y.; Lin, F.Y.; Chen, J.W.; Lin, S.J. Increased circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles and decreased circulating endothelial progenitor cell levels in hypertensive patients with microalbuminuria. *J. Hypertens.* **2010**, *28*, 1655–1665. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Magen, E.; Feldman, A.; Cohen, Z.; Alon, D.B.; Minz, E.; Chernyavsky, A.; Linov, L.; Mishal, J.; Schlezinger, M.; Sthoeger, Z. Circulating endothelial progenitor cells, Th1/Th2/Th17-related cytokines, and endothelial dysfunction in resistant hypertension. *Am. J. Med. Sci.* **2010**, *339*, 117–122. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Lee, J.O.; Oak, M.H.; Jung, S.H.; Park, D.H.; Auger, C.; Kim, K.R.; Lee, S.W.; Schini-Kerth, V.B. An ethanolic extract of *Lindera obtusiloba* stems causes NO-mediated endothelium-dependent relaxations in rat aortic rings and prevents angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.* **2011**, *383*, 635–645. [\[CrossRef\]](#)
46. Fernandes, T.; Nakamuta, J.S.; Magalhaes, F.C.; Roque, F.R.; Lavini-Ramos, C.; Schetter, I.T.; Coelho, V.; Krieger, J.E.; Oliveira, E.M. Exercise training restores the endothelial progenitor cells number and function in hypertension: Implications for angiogenesis. *J. Hypertens.* **2012**, *30*, 2133–2143. [\[CrossRef\]](#)

47. Yu, Y.; Fukuda, N.; Yao, E.H.; Matsumoto, T.; Kobayashi, N.; Suzuki, R.; Tahira, Y.; Ueno, T.; Matsumoto, K. Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension. *Am. J. Hypertens.* **2008**, *21*, 72–77. [\[CrossRef\]](#)
48. MacEneaney, O.J.; DeSouza, C.A.; Weil, B.R.; Kushner, E.J.; Van Guilder, G.P.; Mestek, M.L.; Greiner, J.J.; Stauffer, B.L. Prehypertension and endothelial progenitor cell function. *J. Hum. Hypertens.* **2011**, *25*, 57–62. [\[CrossRef\]](#)
49. Bogdanski, P.; Miller-Kasprzak, E.; Pupek-Musialik, D.; Jablecka, A.; Lacinski, M.; Jagodzinski, P.P.; Jakubowski, H. Plasma total homocysteine is a determinant of carotid intima-media thickness and circulating endothelial progenitor cells in patients with newly diagnosed hypertension. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2012**, *50*, 1107–1113. [\[CrossRef\]](#)
50. Wang, Y.; Liu, C.; He, X.; Li, Y.; Zou, Y. Effects of metoprolol, methyl dopa, and nifedipine on endothelial progenitor cells in patients with gestational hypertension and preeclampsia. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2019**, *46*, 302–312. [\[CrossRef\]](#)
51. Aicher, A.; Heeschen, C.; Mildner-Rihm, C.; Urbich, C.; Ihling, C.; Technau-Ihling, K.; Zeiher, A.M.; Dimmeler, S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 1370–1376. [\[CrossRef\]](#)
52. Georgescu, A. Vascular dysfunction in diabetes: The endothelial progenitor cells as new therapeutic strategy. *World J. Diabetes* **2011**, *2*, 92–97. [\[CrossRef\]](#)
53. Cao, W.; Cui, J.; Li, S.; Zhang, D.; Guo, Y.; Li, Q.; Luan, Y.; Liu, X. Crocetin restores diabetic endothelial progenitor cell dysfunction by enhancing NO bioavailability via regulation of PI3K/AKT-eNOS and ROS pathways. *Life Sci.* **2017**, *181*, 9–16. [\[CrossRef\]](#)
54. He, J.; Liu, X.; Su, C.; Wu, F.; Sun, J.; Zhang, J.; Yang, X.; Zhang, C.; Zhou, Z.; Zhang, X.; et al. Inhibition of Mitochondrial Oxidative Damage Improves Reendothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells via SIRT3 (Sirtuin 3)-Enhanced SOD2 (Superoxide Dismutase 2) Deacetylation in Hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2019**, *39*, 1682–1698. [\[CrossRef\]](#)
55. Li, C.; Lin, L.; Zhang, L.; Xu, R.; Chen, X.; Ji, J.; Li, Y. Long noncoding RNA p21 enhances autophagy to alleviate endothelial progenitor cells damage and promote endothelial repair in hypertension through SESN2/AMPK/TSC2 pathway. *Pharmacol. Res.* **2021**, *173*, 105920. [\[CrossRef\]](#)
56. Peng, J.; Liu, B.; Ma, Q.-L.; Luo, X.-J. Dysfunctional endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases: Role of NADPH oxidase. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2015**, *65*, 80–87. [\[CrossRef\]](#)
57. Marketou, M.E.; Kalyva, A.; Parthenakis, F.I.; Pontikoglou, C.; Maragkoudakis, S.; Kontaraki, J.E.; Chlouverakis, G.; Zacharis, E.A.; Patrianakos, A.; Papadaki, H.A.; et al. Circulating endothelial progenitor cells in hypertensive patients with increased arterial stiffness. *J. Clin. Hypertens.* **2014**, *16*, 295–300. [\[CrossRef\]](#)
58. Gu, J.; Wang, C.; Fan, H.; Ding, H.; Xie, X.; Xu, Y.; Wang, B.; Huang, D. Effects of resveratrol on endothelial progenitor cells and their contributions to reendothelialization in intima-injured rats. *J. Cardiovasl Pharm.* **2006**, *47*, 711–721. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

APÊNDICE B – 5-Isopropyl-s-Methylphenol enhances penile function in spontaneously hypertensive rats.

5-ISOPROPYL-2-METHYLPHENOL ENHANCES PENILE FUNCTION IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Abstract: 5-isopropyl-2-methylphenol, a monoterpene found in essential oils from various plants, has been shown to have anti-inflammatory, antioxidant, vasorelaxant, and hypotensive effects. The current study looked at the effects of 5-isopropyl-2-methylphenol on male hypertensive rats with erectile dysfunction. During four weeks, 12-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) were given intragastrically with saline, 5-isopropyl-2-methylphenol (50 or 100 mg/kg/day), or sildenafil (1.5 mg/kg/day). Wistar Kyoto (WKY) rats were utilized as normotensive controls. All the drugs examined throughout the treatment period lowered systolic blood pressure. Treatments with 5-isopropyl-2-methylphenol and sildenafil enhanced the intracavernosal pressure/mean arterial pressure ratio in hypertensive rats. The acetylcholine- and SNP-induced relaxation responses in isolated rat corpora cavernosa were considerably improved by sildenafil or 5-isopropyl-2-methylphenol treatments. Treatment with 5-isopropyl-2-methylphenol reduced hypercontractility produced by phenylephrine or electric field stimulation in corpora cavernosa SHR. The contractile response of rats treated with 5-isopropyl-2-methylphenol was not affected in the presence of tempol. The fluorescence intensity emitted by the DHE probe in rat corpora cavernosa was considerably lower in SHR-treated groups compared to SHR-CTL. The present study suggests that 5-isopropyl-2-methylphenol enhances SHR erectile performance while decreasing endothelial dysfunction, smooth muscle cell hypercontractility, and superoxide anion production.

Keywords: corpus cavernosum, erectile dysfunction, reactive oxygen species, SHR.

INTRODUCTION

Erectile function is dependent on a balance between relaxing and contracting factors acting on cavernous smooth muscle, which is regulated by neural and local control mechanisms. Therefore, changes in these mechanisms may lead to erectile dysfunction (ED) (De Souza *et al.*, 2022). This clinical condition has been defined by the United States National Institutes of Health as the inability to achieve or maintain a penile erection that would enable satisfactory sexual activity (Consensus, 1993).

ED is closely associated with chronic diseases, such as diabetes and systemic arterial hypertension (Hernandez-Cerda *et al.*, 2020). Several studies describe a higher incidence of ED in hypertensive men when they occur in normotensive individuals (Doulmas *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2002; Seftel *et al.*, 2004). In addition, studies have identified ED as a predictive factor for the development of hypertension (Wang *et al.*, 2021). In both situations, ED is triggered by the deregulation of endothelial factors and increased smooth muscle contraction, which consequently causes an increase in vascular pressure, poor cavernous perfusion, and inadequate intumescence (Wang *et al.*, 2021).

ED treatment is based on the use of phosphodiesterase type 5 inhibitors (iPDE-5), such as sildenafil, vardenafil, and tadalafil (Ganapathy *et al.*, 2021). However, the number of studies seeking to develop new strategies for the treatment of ED has been increasing (Decaluwe *et al.*, 2014) since treatment with iPDE-5 is less effective in patients with an impaired nitric oxide (NO) pathway, especially in individuals with vascular diseases (Albersen *et al.*, 2010). Antioxidant compounds have been gaining prominence in these studies as they reduce oxidative damage, improve NO bioavailability and have a protective effect on erectile function (Akomolafe *et al.*, 2018; Cevik *et al.*, 2013; Ushiyama *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2013).

5-isopropyl-2-methylphenol is an aromatic monoterpene found in essential oils from various plants, such as *Origanum vulgare* (oregano), *Thymus vulgaris* (thyme), and *Citrus*

aurantium bergamia (bergamot) (Sharifi-Rad *et al.*, 2018), and has been shown to have potent antioxidant activity (El-Sayed *et al.*, 2015; Samarghandian *et al.*, 2016) in addition to antifungal (Chavan *et al.*, 2014), antibacterial (Nostro *et al.*, 2007), antiviral (Gilling *et al.*, 2014), anti-inflammatory (Fachini-Queiroz *et al.*, 2012) and anticarcinogenic (Yin *et al.*, 2012) activities.

Some studies highlight the free radical scavenging activity induced by 5-isopropyl-2-methylphenol, with the compound enhancing antioxidant enzyme activity and non-enzymatic antioxidant activity (Sharifi-Rad *et al.*, 2018). In addition, 5-isopropyl-2-methylphenol plays a role in the cardiovascular system, acting as a vasodilator through the interaction with voltage-gated calcium (CaV) and transient receptor potential (TRP) channels, which also contribute to a hypotensive effect (Dantas *et al.*, 2015; Peixoto-Neves *et al.*, 2010). Based on the range of pharmacological activities already described for 5-isopropyl-2-methylphenol and especially its antioxidant activity, this study aimed to evaluate the effect of 5-isopropyl-2-methylphenol on the erectile dysfunction of SHR.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All protocols were carried out using 12-week-old *Wistar Kyoto* (WKY) and SHR from the IPeFarM Animal Production Unit of the Federal University of Paraiba, where the rats were held under a controlled temperature (21 ± 1 °C) in a 12-hour light/12-hour dark cycle with water and food ad libitum. All experimental protocols were approved by the Animal Research Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of Paraiba under certificate n° 132/2017.

Study design

The rats were randomly divided into five experimental groups: normotensive control (WKY-CTL; n = 8); hypertensive control (SHR-CTL; n = 8); hypertensive rats treated with 50 mg/kg/day 5-isopropyl-2-methylphenol (SHR-C50; n = 8) or 100 mg/kg/day 5-isopropyl-2-

methylphenol (SHR-C100; n = 8); and hypertensive rats treated with 1.5 mg/kg/day sildenafil (SHR-S1.5, n = 8). All animals received their treatments intragastrically for four weeks.

Reagents

To carry out the experiments, the following substances were used: sodium heparin, L(-)-phenylephrine (Phe) hydrochloride, acetylcholine (ACh) hydrochloride, sodium nitroprusside (SNP), dihydroethidium (DHE), 4-hydroxy-TEMPO (tempol) and Cremophor®, all of which were obtained from SigmaAldrich Brazil Ltda. (São Paulo-SP, Brazil); xylazine hydrochloride and ketamine hydrochloride, which were both obtained from Syntec (Santana de Parnaíba - SP, Brazil); and sildenafil citrate, which was obtained from the Sigma-Aldrich Brazil Ltda. (São Paulo-SP, Brazil). 5-isopropyl-2-methylphenol (carvacrol) was obtained from Sigma-Aldrich Brazil Ltda at 98% purity, with the reference 28219710G, batch #STBH1940, molecular formula C₁₀H₁₄O, molecular mass 150.217 g/mol and density 0.98 g/mL. The stock solutions of 5-isopropyl-2-methylphenol were prepared from the solubilization of this substance with Cremophor®. The desired concentrations were obtained by diluting it in saline solution. The concentrations of Cremophor® in the solution did not exceed 0.03%.

Systolic blood pressure measurement

The rats' systolic blood pressure (SBP) was evaluated weekly using the tail cuff method (*Panlab, Harvard Apparatus*, Spain). To measure the blood pressure, the rats were kept in a heated acrylic container (28-30°C) for 10 minutes prior to the measurement to make the caudal artery pulsation more readily detectable. At least three successive measurements were recorded in the data acquisition system (*LabChart*® software, version 7.1; ADInstruments, Colorado Springs, CO) to obtain the mean SBP.

Intracavernosal pressure (ICP) measurement

Under anesthesia, a small incision was made in the cervical region for dissection and exteriorization of the right common carotid artery, where a polyethylene (PE) catheter was

implanted (PE-10 tube soldered to a PE-50 catheter) to access the thoracic aorta and perform continuous measurements. mean arterial pressure (MAP). Then, the cavernous nerve was identified and stimulated using a bipolar bronze electrode (Animal Nerve Stimulating Electrode, MLA0320, ADInstruments) connected to a stimulus generator (Stimulus generators contained in PowerLab®, ADInstruments). Consecutive electrical stimulation with 1 ms and 6 V pulses at different frequencies (0.2, 0.4, 0.6, 1, 2, 4, 8 and 12 Hz) and lasting 45 s were induced in the ganglion to measure the PIC and to construct a frequency response curve. ICP was measured by introducing a 30 G needle connected to a catheter in the crura region of the left corpora cavernosa. MAP and ICP variations were measured with pressure transducers (Disposable BP Transducer, MLT0699, ADInstruments) coupled to the PowerLab® data acquisition system (LabChart® software, version 8.1; ADInstruments, Colorado Springs, CO).

Functional studies in strips of rat corpora cavernosa

For dissection and removal of the rat corpora cavernosa, the penis was removed at the level of the attachment to the ischium and immersed in Krebs solution with the following composition (mM): 118.0 NaCl; 4.7 KCl; 1.56 CaCl₂ 2H₂O; 1.2 KH₂PO₄; 1.17 MgSO₄; 25.0 NaHCO₃ and 5.5 glucose. Strips of corpus cavernosum were suspended by metal rods connected to a force transducer and inserted into tanks for isolated organ baths (Panlab Multi Chamber Organ Baths, ADInstruments) containing 10 mL of solution at 37°C that was continuously bubbled with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ (pH 7.4). The strips were maintained under a basal tension of 0.5 g for a stabilization period of 60 minutes. The tension changes were measured using isometric transducers (MLT020, ADInstruments, Australia) and recorded in the PowerLab® system (ML870/P, LabChart version 7.0, ADInstruments, Australia).

The contractility of the rat corpora cavernosa was evaluated by increasing the cumulative concentration of Phe (10 nM - 300 µM) and via electrical field stimulation (EFS). The EFS

was performed using 50 V electric pulses having a duration of 1 ms at different frequencies (1, 2, 4, 8, and 16 Hz) with a duration of 10 seconds for each frequency. The contractile response of the corpora cavernosa to Phe was also evaluated by pre-incubation for 30 minutes with tempol (1 mM), which is a superoxide dismutase (SOD) mimetic. The relaxation response of the corpora cavernosa in the different treatment groups was assessed by increasing the cumulative concentration to ACh (0.1 nM - 100 μ M), which is an endothelial muscarinic agonist, or to SNP (10 nM - 300 μ M), which is a spontaneous NO donor.

Evaluation of superoxide anion production

Reactive oxygen species (ROS) generation in the rat corpus cavernosum was detected with the fluorescent dye DHE. The rat corpora cavernosa were isolated, embedded into the *Tissue Tek Compound* (OCT) embedding medium, and frozen in liquid nitrogen. Subsequently, sections of corpora cavernosa (10 μ M) were incubated with 5 μ M DHE at 37 °C for 30 minutes in a humid chamber and protected from light. The intensity of the fluorescence emitted by DHE was used to measure the superoxide anion production in the different groups. The digital images were captured using a fluorescence microscope (NIKON Eclipse Ti-E, NIKON, Japan) for further analysis.

Statistical analysis

The data are expressed as the mean \pm SEM. For statistical analysis, one-way or two-way ANOVA was used, followed by the Bonferroni post-hoc test. The differences between the means were considered significant when $p < 0.05$. The data were analyzed and plotted in the statistical software GraphPad Prism 7.0[®]. The maximum relaxation corresponded to the maximum effect (E_{\max}) for the highest concentration used. Pharmacological potency was determined using the EC_{50} (concentration that induces a response halfway between the baseline and maximum).

RESULTS

5-isopropyl-2-methylphenol induces antihypertensive effect in SHR

Treatment with 5-isopropyl-2-methylphenol at doses of 50 mg/kg and 100 mg/kg and sildenafil 1.5 mg/kg decreased blood pressure in SHR animals compared to the SHR-CTL group after the second week of treatment. However, none of the experimental groups could revert the SBP value to the level of the WKY-CTL group (Figure 1; table 1).

5-isopropyl-2-methylphenol improves the ICP/MAP ratio in SHR

The representative records of the ICP/MAP ratio in the different experimental groups are shown in figure 2a. The ICP/MAP ratio was significantly lower in the SHR-CTL group when compared to that in the WKY-CTL group (Figure 2b, c). Treatment with 5-isopropyl-2-methylphenol at a dose of 100 mg/kg and with sildenafil at a dose of 1.5 mg/kg significantly improved hypertensive animals' ICP/MAP ratio. Meanwhile, the SHR-C50 group showed a significant increase in the ICP/MAP ratio only at the 12Hz frequency compared to the SHR-CTL group.

5-isopropyl-2-methylphenol improves relaxation of the corpora cavernosa when exposed to ACh and SNP in SHR

ACh (0.1 nM - 100 μ M) induced significantly lower relaxation in the corpora cavernosa of the SHR-CTL group when compared to that in the corpora cavernosa of the WKY-CTL group ($p < 0.05$) (Figure 3a). The treatments of the SHR-C100 and SHR-S1.5 groups improved the relaxation response induced by ACh in hypertensive rats, presenting a reply similar to that observed in the WKY-CTL group, thus reversing the endothelial dysfunction associated with hypertension. However, treatment of the SHR-C50 group was not able to improve the inadequate relaxant response in hypertension (Figure 3a).

SNP (10 nM - 300 μ M) induced significantly lower relaxation in the corpora cavernosa of the SHR-CTL group when compared to that in the corpora cavernosa of the WKY-CTL group

($p < 0.05$) (Figure 3b). However, in the SHR-C50, SHR-C100, and SHR-S1.5 groups, the SNP-induced relaxation response in the corpora cavernosa was restored ($p < 0.05$) (Figure 3b).

5-isopropyl-2-methylphenol reduces hypercontractility of the corpora cavernosa in SHR

Phe (10 nM - 300 μ M) induced significantly greater contraction in the corpora cavernosa of the SHR-CTL group when compared to the corpora cavernosa of the WKY-CTL group ($p < 0.05$) (Figure 4a). In the SHR-C50 and SHR-C100 groups (Figure 4a), the hypercontractility response to Phe observed in the SHR-CTL group was reduced ($p < 0.05$). On the other hand, the SHR-S1.5 group did not change the Phe hypercontractility observed in the SHR-CTL group (Figure 4a).

The representative records of the EFS in the different experimental groups are shown in figure 4c. Similarly observed with Phe, the SHR-C50 and SHR-C100 groups attenuated the hypercontractility response in the corpora cavernosa to EFS compared to that in the SHR-CTL group (Figure 4b). The SHR-S1.5 group did not alter the hypercontractility to EFS induced by hypertension compared to the SHR-CTL group (Figure 4b).

5-isopropyl-2-methylphenol reduces hypercontractility in a similar way to tempol of the corpora cavernosa in SHR

The contractile response induced by Phe in the SHR-CTL group was significantly reduced by pre-incubation of tempol in corpora cavernosa compared to the respective group without this antioxidant (Figure 5a, e). A similar effect was observed in the SHR-S1.5 group (Figure 5d, e). In contrast, the contractile response remained unchanged in the SHR-C50 and SHR-C100 groups compared to their respective groups in the absence of tempol (Figure 5b and c, respectively).

5-isopropyl-2-methylphenol reduces reactive oxygen species in the corpus cavernosum of SHR

The DHE probe emitted baseline fluorescence in the rat corpora cavernosa sections of all experimental groups. The SHR-CTL showed an increase in DHE fluorescence intensity ($226.0 \pm 13.1\%$; $n = 5$) when compared to the DHE fluorescence intensity of the WKY-CTL group ($103.3 \pm 12.0\%$; $n = 5$) (Figure 6a, b). The corpora cavernosa sections of the SHR-C50 ($101.3 \pm 10.1\%$; $n = 5$), SHR-C100 ($103.4 \pm 5.0\%$; $n = 6$), and SHR-S1.5 ($142.5 \pm 6.1\%$; $n = 6$) groups showed a significant reduction in the fluorescence intensity emitted by the DHE probe when compared to that emitted by the DHE probe in the SHR-CTL group.

DISCUSSION

This study revealed that 5-isopropyl-2-methylphenol improves the erectile function of SHR, likely through a mechanism involving restoring endothelial dysfunction and reducing rat corpus cavernosum hypercontractility.

First-line therapy for the treatment of ED consists of the administration of iPDE-5. However, their efficacy is reduced when NO bioavailability is decreased. Thus, endothelial dysfunction may limit the efficacy of this therapy (Kedia *et al.*, 2020; Toque *et al.*, 2014). Therefore, it is necessary to develop new therapeutic options that may attenuate the progression of the problem in patients with this condition (Decaluwe *et al.*, 2011).

Plant products have been an important alternative and the subject of several studies that demonstrate a significant effect in the treatment of ED (Cevik *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Ushiyama *et al.*, 2008). In this context, monoterpenes, particularly the isomers carvacrol and thymol, stand out in the literature due to their important activity on the cardiovascular system (Aydin *et al.*, 2007; Dantas *et al.*, 2015; Peixoto-Neves *et al.*, 2010). In general, these compounds have antioxidant activity (El-Sayed *et al.*, 2015) and may, thus, be indicated for protecting cellular constituents susceptible to chronic oxidative damage (Samarghandian *et al.*, 2016). Therefore, our group sought to assess whether 5-isopropyl-2-methylphenol would benefit erectile dysfunction in hypertensive animals.

Our study confirmed the antihypertensive activity of 5-isopropyl-2-methylphenol at both doses, corroborating previous studies carried out with SHR animals (Costa *et al.*, 2021). The SHR-S1.5 group also showed reduced blood pressure levels, which aligns with literature data showing a reduction in SBP after two months of treatment (Yaguas *et al.*, 2010). Interestingly, treatments with 5-isopropyl-2-methylphenol or sildenafil reduced SBP almost to the same level.

Erectile function was assessed by the ICP/MAP ratio. The ICP/MAP ratio in the SHR-CTL group was significantly reduced compared to that in the WKY-CTL group, confirming the development of ED in SHRs, as previously observed in the literature (He *et al.*, 2020). In contrast, the SHR-C100 group exhibited a restored erectile function in most stimulation frequencies tested compared to the SHR-CTL group.

These results demonstrate that 5-isopropyl-2-methylphenol, in addition to having an antihypertensive effect, which may contribute to improving or delaying the development of ED, also influences erectile function, capable of reversing hypertension-associated ED. This statement is in agreement with the results showing that the reduction in pressure levels alone is not effective in improving ED, as demonstrated by the effects induced by some antihypertensive drugs, such as beta-blockers and thiazide diuretics (Cordero *et al.*, 2010; Sharp *et al.*, 2017). In addition, the SHR-S1.5 group presented an improved erectile function, corroborating with reports in the literature (Da Silva *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2010; Sung *et al.*, 2017).

Since NO is considered the primary peripheral pro-erectile physiological regulator and changes in its synthesis or bioavailability may lead to the development of ED (Alves-Lopes *et al.*, 2017; Sangiorgi *et al.*, 2021), the activity of ACh, was assessed to determine whether there is any impairment endothelial function. Thus, in the present study, we confirmed the

dysfunction of ACh-induced relaxation in SHR, as previously described (Behr-Roussel *et al.*, 2005; Toblli *et al.*, 2007).

5-isopropyl-2-methylphenol at a dose of 100 mg/kg wholly restored endothelial function in corpora cavernosa SHR, which may suggest the involvement of this mechanism in reversing erectile dysfunction. This effect corroborates data from the literature, demonstrating that different antioxidant substances also improve endothelial function in rat corpora cavernosa (Long *et al.*, 2018; Murat *et al.*, 2016; Ushiyama *et al.*, 2008).

SNP was used to assess endothelium-independent relaxation. Our study showed that hypertension decreases the response to components of the NO-mediated signaling cascade in smooth muscle cells of cavernous corpora of rats, corroborating data already presented in the literature (Ushiyama *et al.*, 2004).

5-isopropyl-2-methylphenol and sildenafil treatments improved the SNP-mediated response, similar to the results observed for the WKY-CTL group. These data suggest that the abovementioned treatments improved the NO-mediated signaling cascade. This result is quite significant compared to data in the literature that showed that treatment with other antioxidants, such as α -tocopherol, could not change this parameter (Ushiyama *et al.*, 2008).

In hypertension, some pathophysiological mechanisms involved in developing ED are related to cavernous smooth muscle hypertrophy, inducing hypercontractility. In our study, we demonstrated that SHR-CTL animals showed an increase in erectile tissue tone, which may contribute to a reduction in blood flow and intracavernous pressure, as identified in previous studies (Toblli *et al.*, 2007; Toblli *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2018). Differing results were observed by Toblli (2007), who showed reduced contractility to Phe in strips of cavernous bodies of SHR at 24 weeks of age.

Treatment with 5-isopropyl-2-methylphenol at both doses (50 or 100 mg/kg) reduced hypercontractility for Phe and EFS in SHR. These results suggest that the improvement in the

contractile response induced by appears to involve a common pathway mediated by a reduction in the sensitivity of smooth muscle machinery to contractile substances, which contributed to an improvement in erectile function. However, treatment with sildenafil could not reduce hypercontractility, similar to that demonstrated by Toblli (2007), suggesting that the improvement of erectile function does not involve the modulation of contractile muscle response.

Oxidative stress appears to significantly modulate the neurovascular alteration involved in the development of ED. Antioxidant agents act by limiting the activity of ROS-generating enzymes, reversing oxidative damage (Agarwal *et al.*, 2006; De Oliveira *et al.*, 2021).

Therefore, the modulation by $O_2^{\bullet-}$ of Phe-induced contraction in corpus cavernosum strips of rats pretreated with tempol, a SOD mimetic, was evaluated. In present study demonstrated that the reduced levels of $O_2^{\bullet-}$, evoked by pre-incubation with tempol, negatively modulate the Phe-induced contraction in the corpora cavernosa of SHR -CTL rats.

In contrast, The pre-incubation with tempol in SHR-C50 and SHR-C100 rats had no additive effect in reducing Phe-induced contraction compared to the effect in the absence of this scavenger. Therefore, treatment with 5-isopropyl-2-methylphenol at both doses probably reduces contractility through a mechanism similar to that induced by tempol. Conversely, pre-incubation with tempol in the SHR-S1.5 group reduced the Phe-mediated contractile response compared to the SHR-CTL group. This suggests that treatment with sildenafil seems to improve erectile function mainly by other mechanisms.

To confirm the modulating effect of oxidative stress, we evaluated whether treatment with 5-isopropyl-2-methylphenol was able to modify baseline ROS levels in corpus cavernosum sections of SHR by measuring the DHE fluorescence intensity.

Our results corroborate data in the literature that show an increase in oxidative stress in the cavernous bodies of SHR (Ushiyama *et al.*, 2004). Treatment with 5-isopropyl-2-methylphenol

at the two doses studied (50 and 100 mg/kg) was able to reverse the oxidative damage of hypertension. Animals from the SHR-S1.5 group also showed a reduction in the DHE fluorescence intensity; however, this response was not reversed to the baseline levels of the WKY-CTL group. This result suggests that treatment with sildenafil reduces oxidative stress; however, this does not appear to be the primary mechanism by which erectile function is improved.

The increase in superoxide anion production in hypertension-associated ED is related to increased NADPH activity (Agarwal *et al.*, 2006). Studies have shown that 5-isopropyl-2-methylphenol reduces ROS formation through the modulation of NADPH expression, suggesting that 5-isopropyl-2-methylphenol can prevent the formation of pathological lesions of atherosclerosis (Lee *et al.*, 2015).

Finalmente, os canais TRPC3 e TRPC4 estão envolvidos na modulação positiva do estresse oxidativo. O canal TRPC3 amplifica a formação de ROS por meio da interação com a NADPH oxidase (Nox2), que causa a estabilização desse complexo proteico e consequentemente aumenta a produção de ERO, levando a alteração funcional das células que culmina em dano tecidual (Kitajima *et al.*, 2016; Poteser *et al.*, 2006). Considering the wide action of 5-isopropyl-2-methylphenol on the blockade of TRP receptors, we can hypothesize a possible involvement of the monoterpene studied in the inhibition of these receptors for a more pronounced reduction of oxidative stress, which needs future investigations.

CONCLUSIONS

In conclusion, our results demonstrate that treatment with 5-isopropyl-2-methylphenol improves hypertension-associated erectile dysfunction in SHR, at least by a mechanism involving endothelial function restoration and reduction of rat corpora cavernosa hypercontractility.

Acknowledgments: The authors wish to sincerely thank José Crispim Duarte and Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori for their technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, grant number 1803735) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 311711/2018-9).

REFERENCES

- Agarwal, A; Nandipati, KC; Sharma, RK; Zippe, CD; Raina, R. Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction. *J Androl*, 2006; 27(3):335-347
- Akomolafe, SA; Oyeleye, SI; Olasehinde, TA; Oboh, GJIJoFP. Phenolic characterization, antioxidant activities, and inhibitory effects of *Physalis angulata* and *Newbouldia laevis* on enzymes linked to erectile dysfunction. 2018; 21(1):645-654
- Albersen, M; Shindel, AW; Mwamukonda, KB; Lue, TF. The future is today: emerging drugs for the treatment of erectile dysfunction. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2010; 15(3):467-480
- Alves-Lopes, RU; Neves, KB; Silva, MA; Olivon, VC; Ruginsk, SG; Antunes-Rodrigues, J; Ramalho, LN; Tostes, RC; Carneiro, FS. Functional and structural changes in internal pudendal arteries underlie erectile dysfunction induced by androgen deprivation. *Asian J Androl*, 2017; 19(5):526-532
- Aydin, Y; Kutlay, O; Ari, S; Duman, S; Uzuner, K; Aydin, S. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta Med*, 2007; 73(13):1365-1371
- Behr-Roussel, D; Gorny, D; Mevel, K; Compagnie, S; Kern, P; Sivan, V; Bernabe, J; Bedigian, MP; Alexandre, L; Giuliano, F. Erectile dysfunction: an early marker for hypertension? A longitudinal study in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005; 288(1):R276-283
- Cevik, O; Cadirci, S; Sener, TE; Tinay, I; Akbal, C; Tavukcu, HH; Cetinel, S; Kiran, D; Sener, G. Quercetin treatment against ischemia/reperfusion injury in rat corpus cavernosum tissue: a role on apoptosis and oxidative stress. *Free Radic Res*, 2013; 47(9):683-691
- Chavan, PS; Tupe, SG. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. *Food Control*, 2014; 46:115-120
- Consensus, N. Development Panel on Impotence. NIH Consensus Conference. Impotence. *JAMA*, 1993; 270:83-90
- Cordero, A; Bertomeu-Martinez, V; Mazon, P; Facila, L; Bertomeu-Gonzalez, V; Conthe, P; Gonzalez-Juanatey, JR. Erectile dysfunction in high-risk hypertensive patients treated with beta-blockade agents. *Cardiovasc Ther*, 2010; 28(1):15-22
- Costa, HA; Dias, CJM; Martins, VA; de Araujo, SA; da Silva, DP; Mendes, VS; de Oliveira, MNS, Jr.; Mostarda, CT; Borges, ACR; Ribeiro, RM; Filho, NS. Effect of treatment with carvacrol and aerobic training on cardiovascular function in spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol*, 2021; 106(4):891-901

da Silva, CN; Nunes, KP; Almeida, FDM; Costa, FLS; Borges, PV; Lacativa, P; Pimenta, AMC; de Lima, ME. PnPP-19 Peptide Restores Erectile Function in Hypertensive and Diabetic Animals Through Intravenous and Topical Administration. *The Journal of Sexual Medicine*, 2019; 16(3):365-374

Dantas, BP; Alves, QL; de Assis, KS; Ribeiro, TP; de Almeida, MM; de Vasconcelos, AP; de Araujo, DA; de Andrade Braga, V; de Medeiros, IA; Alencar, JL; Silva, DF. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvacrol in normotensive rat. *Vascul Pharmacol*, 2015; 67-69:48-58

de Oliveira, AA; Nunes, KP. Hypertension and Erectile Dysfunction: Breaking Down the Challenges. *Am J Hypertens*, 2021; 34(2):134-142

de Souza, ILL; Ferreira, EDS; Vasconcelos, LHC; Cavalcante, FA; da Silva, BA. Erectile Dysfunction: Key Role of Cavernous Smooth Muscle Cells. *Front Pharmacol*, 2022; 13:895044

Decaluwe, K; Pauwels, B; Boydens, C; Van de Voorde, J. Treatment of erectile dysfunction: new targets and strategies from recent research. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014; 121:146-157

Decaluwe, K; Pauwels, B; Verpoest, S; Van de Voorde, J. New therapeutic targets for the treatment of erectile dysfunction. *J Sex Med*, 2011; 8(12):3271-3290

Doumas, M; Tsakiris, A; Douma, S; Grigorakis, A; Papadopoulos, A; Hounta, A; Tsiodras, S; Dimitriou, D; Giamarellou, H. Factors affecting the increased prevalence of erectile dysfunction in Greek hypertensive compared with normotensive subjects. *J Androl*, 2006; 27(3):469-477

El-Sayed, EM; Abd-Allah, AR; Mansour, AM; El-Arabey, AA. Thymol and carvacrol prevent cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *JBMT*, 2015; 29(4):165-172

Fachini-Queiroz, FC; Kummer, R; Estevao-Silva, CF; Carvalho, MD; Cunha, JM; Grespan, R; Bersani-Amado, CA; Cuman, RK. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012; 2012:657026

Ganapathy, AA; Priya, VH; Kumaran, AJJoE. Medicinal plants as a potential source of Phosphodiesterase-5 inhibitors: A review. 2021; 267:113536

Gilling, DH; Kitajima, M; Torrey, JR; Bright, KR. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *J Appl Microbiol*, 2014; 116(5):1149-1163

He, W; Liu, J; Liu, D; Hu, J; Jiang, Y; Li, M; Wang, Q; Chen, P; Zeng, G; Xu, D; Wang, X; DiSanto, ME; Zhang, X. Alterations in the phosphodiesterase type 5 pathway and oxidative stress correlate with erectile function in spontaneously hypertensive rats. *J Cell Mol Med*, 2020; 24(24):14280-14292

Hernandez-Cerda, J; Bertomeu-Gonzalez, V; Zuazola, P; Cordero, A. Understanding Erectile Dysfunction in Hypertensive Patients: The Need for Good Patient Management. *Vasc Health Risk Manag*, 2020; 16:231-239

Kedia, GT; Uckert, S; Tsikas, D; Becker, AJ; Kuczyk, MA; Bannowsky, A. The Use of Vasoactive Drugs in the Treatment of Male Erectile Dysfunction: Current Concepts. *J Clin Med*, 2020; 9(9):2987

Kitajima, N; Numaga-Tomita, T; Watanabe, M; Kuroda, T; Nishimura, A; Miyano, K; Yasuda, S; Kuwahara, K; Sato, Y; Ide, T; Birnbaumer, L; Sumimoto, H; Mori, Y; Nishida, M. TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. *Sci Rep*, 2016; 6:37001

Lee, KP; Sudjarwo, GW; Jung, SH; Lee, D; Lee, DY; Lee, GB; Baek, S; Kim, DY; Lee, HM; Kim, B; Kwon, SC; Won, KJ. Carvacrol inhibits atherosclerotic neointima formation by downregulating reactive oxygen species production in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 2015; 240(2):367-373

Li, Y; Jiang, J; He, Y; Jiang, R; Liu, J; Fan, Z; Cheng, Y. Icariin combined with breviscapine improves the erectile function of spontaneously hypertensive rats. *J Sex Med*, 2014; 11(9):2143-2152

Liu, G; Sun, X; Dai, Y; Zheng, F; Wang, D; Huang, Y; Bian, J; Deng, C. Chronic administration of sildenafil modified the impaired VEGF system and improved the erectile function in rats with diabetic erectile dysfunction. *J Sex Med*, 2010; 7(12):3868-3878

Long, H; Jiang, J; Xia, J; Jiang, R. Icariin improves SHR erectile function via inhibiting eNOS uncoupling. *Andrologia*, 2018; 50(9):e13084

Moreira, ED, Jr.; Bestane, WJ; Bartolo, EB; Fittipaldi, JA. Prevalence and determinants of erectile dysfunction in Santos, southeastern Brazil. *Sao Paulo Med J*, 2002; 120(2):49-54

Murat, N; Korhan, P; Kizer, O; Evcim, S; Kefi, A; Demir, O; Gidener, S; Atabey, N; Esen, AA. Resveratrol Protects and Restores Endothelium-Dependent Relaxation in Hypercholesterolemic Rabbit Corpus Cavernosum. *J Sex Med*, 2016; 13(1):12-21

Nostro, A; Sudano Roccaro, A; Bisignano, G; Marino, A; Cannatelli, MA; Pizzimenti, FC; Cioni, PL; Procopio, F; Blanco, AR. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol*, 2007; 56(Pt 4):519-523

Peixoto-Neves, D; Silva-Alves, K; Gomes, M; Lima, F; Lahlou, S; Magalhães, P; Ceccatto, V; Coelho-de-Souza, A; Leal-Cardoso, J. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental & clinical pharmacology*, 2010; 24(3):341-350

Poteser, M; Graziani, A; Rosker, C; Eder, P; Derler, I; Kahr, H; Zhu, MX; Romanin, C; Groschner, K. TRPC3 and TRPC4 associate to form a redox-sensitive cation channel. Evidence for expression of native TRPC3-TRPC4 heteromeric channels in endothelial cells. *J Biol Chem*, 2006; 281(19):13588-13595

Samarghandian, S; Farkhondeh, T; Samini, F; Borji, A. Protective Effects of Carvacrol against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat's Brain, Liver, and Kidney. *Biochem Res Int*, 2016; 2016:2645237

Sangiorgi, G; Cereda, A; Benedetto, D; Bonanni, M; Chiricolo, G; Cota, L; Martuscelli, E; Greco, F. Anatomy, Pathophysiology, Molecular Mechanisms, and Clinical Management of Erectile Dysfunction in Patients Affected by Coronary Artery Disease: A Review. *Biomedicines*, 2021; 9(4):432

Seftel, AD; Sun, P; Swindle, R. The prevalence of hypertension, hyperlipidemia, diabetes mellitus and depression in men with erectile dysfunction. *J Urol*, 2004; 171(6 Pt 1):2341-2345

Sharifi-Rad, M; Varoni, EM; Iriti, M; Martorell, M; Setzer, WN; Del Mar Contreras, M; Salehi, B; Soltani-Nejad, A; Rajabi, S; Tajbakhsh, M; Sharifi-Rad, J. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytother Res*, 2018; 32(9):1675-1687

Sharp, RP; Gales, BJ. Nebivolol versus other beta blockers in patients with hypertension and erectile dysfunction. *Ther Adv Urol*, 2017; 9(2):59-63

Sung, HH; Kang, SJ; Chae, MR; Kim, HK; Park, JK; Kim, CY; Lee, SW. Effect of BKCa Channel Opener LDD175 on Erectile Function in an In Vivo Diabetic Rat Model. *J Sex Med*, 2017; 14(1):59-68

Toblli, JE; Cao, G; Lombrana, A; Rivero, M. Functional and morphological improvement in erectile tissue of hypertensive rats by long-term combined therapy with phosphodiesterase type 5 inhibitor and losartan. *J Sex Med*, 2007; 4(5):1291-1303

Toblli, JE; Stella, I; Inserra, F; Ferder, L; Zeller, F; Mazza, ON. Morphological changes in cavernous tissue in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 2000; 13(6 Pt 1):686-692

Toque, HA; Caldwell, RW. New approaches to the design and discovery of therapies to prevent erectile dysfunction. *Expert Opin Drug Discov*, 2014; 9(12):1447-1469

Ushiyama, M; Kuramochi, T; Yagi, S; Katayama, S. Antioxidant treatment with alpha-tocopherol improves erectile function in hypertensive rats. *Hypertens Res*, 2008; 31(5):1007-1013

Ushiyama, M; Morita, T; Kuramochi, T; Yagi, S; Katayama, S. Erectile dysfunction in hypertensive rats results from impairment of the relaxation evoked by neurogenic carbon monoxide and nitric oxide. *Hypertens Res*, 2004; 27(4):253-261

Wang, TD; Lee, CK; Chia, YC; Tsoi, K; Buranakitjaroen, P; Chen, CH; Cheng, HM; Tay, JC; Teo, BW; Turana, Y; Sogunuru, GP; Wang, JG; Kario, K; Network, HA. Hypertension and erectile dysfunction: The role of endovascular therapy in Asia. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2021; 23(3):481-488

Wang, X-y; Huang, W; Zhang, YJJoIR. Relation between hypertension and erectile dysfunction: a meta-analysis of cross-section studies. 2018; 30(3):141-146

Yaguas, K; Bautista, R; Quiroz, Y; Ferrebuz, A; Pons, H; Franco, M; Vaziri, ND; Rodriguez-Iturbe, B. Chronic sildenafil treatment corrects endothelial dysfunction and improves hypertension. *Am J Nephrol*, 2010; 31(4):283-291

Yin, QH; Yan, FX; Zu, XY; Wu, YH; Wu, XP; Liao, MC; Deng, SW; Yin, LL; Zhuang, YZ. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*, 2012; 64(1):43-51

Yu, W; Wan, Z; Qiu, XF; Chen, Y; Dai, YT. Resveratrol, an activator of SIRT1, restores erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian J Androl*, 2013; 15(5):646-651

Figure Legends

Figure 1 – SBP (mmHg) weekly changes measured by tail-cuff. Groups: WKY-CTL (n = 6; ●); SHR-CTL (n = 5; ■); SHR-C50 (n = 6; Δ); SHR-C100 (n = 6; ▽); SHR-S1.5 (n = 6; ◆). Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM). *p < 0.05 vs WKY-CTL; #p < 0.05 vs SHR-CTL.

Figure 2 – Effect of carvedilol on ICP/MAP ratio in response to pelvic ganglion stimulations (0.2 – 12 Hz). a) original tracings of ICP/MAP ratio. b) ICP/MAP ratio curves. c) ICP/MAP values as a function of the different frequencies (Hz) of stimulation in the different groups of animals treated for four weeks. Groups: WKY-CTL (n = 5; ●); SHR-CTL (n = 5; ■); SHR-C50 (n = 5; Δ); SHR-C100 (n = 5; ▽); SHR-S1.5 (n = 6; ◆). Results are expressed as mean ± SEM *p < 0.05 vs WKY-CTL; #p < 0.05 vs SHR-CTL.

Figure 3 – Vascular reactivity to ACh (a) and SNP (b) in rat corpora cavernosa. Groups: WKY-CTL (n = 5 and 7, respectively; ●); SHR-CTL (n = 6 and 5, respectively; ■); SHR-C50 (n = 5 and 7, respectively; Δ); SHR-C100 (n = 5 and 6, respectively; ▽); SHR-S1.5 (n = 5 and 7, respectively; ◆). Results are expressed as mean ± SEM *p < 0.05 vs WKY-CTL; #p < 0.05 vs SHR-CTL.

Figure 4 – Concentration-response curves to Phe (10 nM – 300 μM) (a) and EFS (1 – 16 Hz) (b) in rat corpora cavernosa. (c) Original representative tracings showing the contractile frequency-response curves in rat corpora cavernosa. Groups: WKY-CTL (n = 5 and 7, respectively; ●); SHR-CTL (n = 5 and 6; ■); SHR-C50 (n = 6 and 5, respectively; Δ); SHR-C100 (n = 5 and 6, respectively; ▽); SHR-S1.5 (n = 6; ◆). Results are expressed as mean ± SEM *p < 0.05 vs WKY-CTL; #p < 0.05 vs SHR-CTL.

Figure 5 – Effect of carvedilol on concentration-response curves to Phe (10 nM – 300 μM), in presence of tempol (1 mM), in rat corpora in different groups (a-d). Percentage of the maximum effect of the Phe-induced contractile response in the presence and absence of tempol (e). Groups: WKY-CTL (n = 5; ●); SHR-CTL (n = 5; ■); SHR-CTL-TEMPOL (n = 5; □); SHR-C50 (n = 6; Δ); SHR-C50-TEMPOL (n = 5; ▲); SHR-C100 (n = 5; ▼); SHR-C100-TEMPOL (n = 6; ▽); SHR-S1.5 (n = 6; ◆); SHR-S1.5-TEMPOL (n = 5; ◆). Results are expressed as mean ± SEM. *p < 0.05 vs WKY-CTL; #p < 0.05 vs SHR-CTL.

Figure 6 – Effect of carvedilol on reactive oxygen species (ROS) in rat corpora cavernosa. Basal fluorescence intensity of DHE in transverse sections of rat corpora cavernosa. Groups: WKY-CTL (n = 5); SHR-CTL (n = 5); SHR-C50 (n = 5); SHR-C100 (n = 6); SHR-S1.5 (n = 6). a) Basal fluorescence intensity emitted by the DHE in transverse sections of rat corpora cavernosa (objective 10X). b) Measurement of basal fluorescence intensity of

DHE (%) in transverse sections of corpora cavernosa. The data are expressed as mean of percentage of fluorescence in relations to the control \pm SEM. * $p < 0.05$ vs WKY-CTL, # $p < 0.05$ vs SHR-CTL.

Anexos

ANEXO A – Certidão de aprovação da CEUA.



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito do carvacrol na regeneração vascular induzida por células progenitoras endoteliais de ratos espontaneamente hipertensos", protocolada sob o CEUA nº 2171120320 (ID 001086), sob a responsabilidade de **Isac Almeida de Medeiros e equipe; Tays Gonçalves** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 29/05/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of the effect of carvacrol on vascular regeneration induced by endothelial progenitor cells of spontaneously hypertensive rats", utilizing 42 Heterogenics rats (42 males), 84 Isogenic rats (84 males), protocol number CEUA 2171120320 (ID 001086), under the responsibility of **Isac Almeida de Medeiros and team; Tays Gonçalves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/29/2020.

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

Vigência da Proposta: de **06/2020** a **01/2023**

Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Machos	idade: 8 a 12 semanas N: 42
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar		Peso: 200 a 300 g
Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM		
Espécie:	Ratos isogênicos	sexo: Machos	idade: 8 a 10 semanas N: 28
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar Kyoto		Peso: 200 a 300 g
Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM		
Espécie:	Ratos isogênicos	sexo: Machos	idade: 8 a 10 semanas N: 56
Linhagem:	Rattus Norvegicus - SHR		Peso: 200 a 300 g

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia cardiovascular , IPeFarM e Laboratório pré-clínico de envelhecimento, Instituto do Envelhecimento da Paraíba.

João Pessoa, 02 de junho de 2020










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

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

ANEXO B – Artigos completos publicados em periódicos entre 2018 e 2023.

Review Article

Unveiling the Role of Inflammation and Oxidative Stress on Age-Related Cardiovascular Diseases

Arthur José Pontes Oliveira de Almeida ¹, **Mathania Silva de Almeida Rezende** ¹,
Sabine Helena Dantas ¹, **Sonaly de Lima Silva** ¹, **Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira** ¹,
Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo ¹, **Rayanne Maira Felix Ribeiro Alves** ¹,
Geovânia Maria Sales de Menezes ¹, **Pablo Ferreira dos Santos** ¹,
Tays Amanda Felisberto Gonçalves ¹, **Valérie B. Schini-Kerth** ²,
and **Isac Almeida de Medeiros** ¹

¹*Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária-Campus I, Caixa Postal 5009, 58.051-970 João Pessoa, PB, Brazil*

²*INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, 67000 Strasbourg, France*

Correspondence should be addressed to Isac Almeida de Medeiros; isac@lftf.ufpb.br

Received 20 December 2019; Revised 12 March 2020; Accepted 3 April 2020; Published 9 May 2020

Guest Editor: Adam P. Lightfoot

Copyright © 2020 Arthur José Pontes Oliveira de Almeida et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The global population above 60 years has been growing exponentially in the last decades, which is accompanied by an increase in the prevalence of age-related chronic diseases, highlighting cardiovascular diseases (CVDs), such as hypertension, atherosclerosis, and heart failure. Aging is the main risk factor for these diseases. Such susceptibility to disease is explained, at least in part, by the increase of oxidative stress, in which it damages cellular components such as proteins, DNA, and lipids. In addition, the chronic inflammatory process in aging “inflammaging” also contributes to cell damage, creating a stressful environment which drives to the development of CVDs. Taken together, it is possible to identify the molecular connection between oxidative stress and the inflammatory process, especially by the crosstalk between the transcription factors Nrf-2 and NF- κ B which are mediated by redox signalling and are involved in aging. Therapies that control this process are key targets in the prevention/combat of age-related CVDs. In this review, we show the basics of inflammation and oxidative stress, including the crosstalk between them, and the implications on age-related CVDs.

1. Introduction

The average life expectancy of the global population has been increasing rapidly [1]. According to the United Nations (UN), the world population over 60 years will keep growing exponentially in the next decades, rising from 12%, data from 2015, to 22% in 2050 [2]. In parallel, age-related diseases have also been increasing, highlighting cardiovascular diseases (CVDs) as the main cause of morbidity and mortality worldwide, aging being the main risk factor for these diseases [3–5].

Cardiovascular aging (cardiac and vascular aging) is characterized by a progressive decline in physiological processes at the molecular, cellular, and tissue levels [6–8]. Two factors play a key role in this process: the gradual and persistent increase in inflammation “inflammaging” and the oxidative stress, including the crosstalk between them [9, 10]. These processes are associated with the pathophysiology of aging-related CVDs, such as hypertension, acute myocardial infarction, and stroke (Figure 1) [11–13].

This review brings an integrated approach to the role of inflammation and oxidative stress associated with the



Vasorelaxant Effect Induced by the Essential Oil of *Ocotea duckei* Vattimo Leaves and Its Main Constituent, Trans-caryophyllene, in Rat Mesenteric Artery

**Renildo Moura da Cunha¹, Tays Amanda Felisberto Gonçalves²,
Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez¹, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti³,
Marcio Roberto Viana Santos⁴, José Maria Barbosa-Filho²,
Êurica Adélia Nogueira Ribeiro⁵, Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito⁶
and Isac Almeida de Medeiros^{2*}**

¹Center of Biological Sciences and Nature, Federal University of Acre, Rio Branco, Acre, Brazil

²Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brazil

³Application School, Federal University of Acre, Rio Branco, Acre, Brazil.

⁴Department of Physiology, Federal University of Sergipe (UFS), São Cristóvão, Sergipe, Brazil.

⁵School of Nursing and Pharmacy, Federal University of Alagoas (UFAL), Maceió, Alagoas, Brazil.

⁶Department of Pharmacy, Health Sciences Centre, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. Author RMC designed the study, conducted the research, analyzed the results and drafted the manuscript. Authors TAFG, AFRR and DUOM analyzed the results and helped to review the manuscript. Author ESTE helped to draft the manuscript. Author IAM primary responsibility for the work, conceived and coordinated the study and helped to review the final version of manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/JALSI/2020/v23i1230202

Editor(s):

(1) Dr. Purnachandra Nagaraju Ganji, Emory University School of Medicine, USA.

(2) Dr. J. Rodolfo Rendón Villalobos, National Polytechnic Institute, México.

Reviewers:

(1) Ahmed Hamad Saleh, Al-Qalam University, Iraq.

(2) Dilip Kumar Deka, Assam Agricultural University, India.

Complete Peer review History: <http://www.sdiarticle4.com/review-history/63877>

Original Research Article

**Received 10 October 2020
Accepted 17 December 2020
Published 26 December 2020**



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,^b  ^{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 Paraná (IFPR), 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

Cardiovascular Effects Induced by Fruit Peels from *Passiflora edulis* in Hypertensive Rats and Fingerprint Analysis by HPLC-ESI-MSⁿ spectrometry

Authors

Bárbara Cabral¹, Tays Amanda Felisberto Gonçalves³, Lucas Silva Abreu³, Anderson Wilbur Lopes Andrade⁴ ,
Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo³, Francker Duarte de Castro¹, Josean Fachine Tavares³,
Gerlane Coelho Bernardo Guerra⁴, Adriana Augusto de Rezende², Isac Almeida de Medeiros³, Silvana Maria Zucolotto¹ 

Affiliations

- 1 Research Group on Bioactive Natural Products (PNBio), Laboratory of Pharmacognosy, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN, Brazil
- 2 Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil
- 3 Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil
- 4 Department of Biophysics and Pharmacology, Center for Biosciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

Key words

Passifloraceae, *Passiflora edulis* fo. *flavicarpa*, oxidative stress, glycoside flavonoids, antihypertensive, vascular function

received

December 8, 2019

accepted after revision

February 6, 2021

published online

Bibliography

Planta Med 2021

DOI 10.1055/a-1385-8863

ISSN 0032-0943

© 2021. Thieme. All rights reserved.

Georg Thieme Verlag KG, Rüdigerstraße 14,
70469 Stuttgart, Germany

Correspondence

Profa. Dra. Silvana Maria Zucolotto
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences,
Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN)
Avenida General Gustavo Cordeiro de Farias, 1257 s/n,
59012-570 Natal, RN, Brazil
Phone: + 55 84 33 42 98 18, Fax: + 55 84 33 42 98 33
silvanazucolotto@ufrnet.br

ABSTRACT

Hypertension is a chronic disease and a global health problem. Due to its high prevalence, it constitutes the most important risk factor for cardiovascular disease. Fruit peels from *Passiflora edulis* fo. *flavicarpa* are rich in bioactive natural compounds that may have action in hypertension. This study aimed to perform a fingerprinting analysis of *Passiflora edulis* fruit peel extract and evaluate its actions on the cardiovascular system in an *in vivo* model. The extract was obtained from the dried and powdered fruit peels of *Passiflora edulis*. Glycoside flavonoids were identified in the extract by HPLC-ESI-MSⁿ. The extract showed a significant hypotensive effect after 28 days of treatment and improved vascular function in the mesenteric artery. This effect was verified by decreased vascular hypercontractility and increased vasorelaxant in response to sodium nitroprusside and acetylcholine. There was also a decrease in endothelial dysfunction, which can be attributed to nitric oxide's increased bioavailability. Thus, we hypothesize that all these effects contributed to a reduction in peripheral vascular resistance, leading to a significant hypotensive effect. These results are novel for fruit peels from *P. edulis*. Also, there was a decrease in plasma and cardiac malondialdehyde levels and an increase in glutathione, suggesting a reduction in oxidative stress, as well as an increase of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 in the plasma. This study demonstrated that the extract can be a new source of raw material to be applied as food or medicine adjuvant for treating hypertension.

Introduction

Hypertension is a condition that accounts for 9.4 million deaths around the world every year, thereby constituting a public health

challenge [1]. Data reveal that hypertension is present in 69% of patients in the first episode of acute myocardial infarction, 77% of cerebrovascular accidents, 75% with heart failure, and 60% with peripheral arterial disease [2]. It is also responsible for 45% of car-



Hypoglycemic and Vasorelaxant Effect of *Passiflora edulis* Fruit Peel By-Product

Bárbara Cabral¹ · Raul Hernandes Bortolin^{2,3} · Tays Amanda Felisberto Gonçalves⁴ · Priscilla Maria Pereira Maciel⁴ · Alinne Villar de Arruda⁴ · Thais Gomes de Carvalho⁵ · Kahlile Youssef Abboud⁶ · Jovelina Samara Ferreira Alves¹ · Lucimara M. C. Cordeiro⁶ · Isac Almeida de Medeiros⁴ · Adriana Augusto de Rezende² · Silvana Maria Zucolotto¹

Accepted: 31 August 2021 / Published online: 28 September 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Passiflora edulis fo. *flavicarpa* (Passifloraceae) is popularly known as yellow passion fruit and its fruit peels are considered a rich by-product in bioactive compounds which has greatly beneficial health properties. The objective of this study was to evaluate the effects of *P. edulis* fruit peel extracts in a type 1 diabetes model and the potential vasorelaxant effect. The aqueous and hydroethanolic extracts were obtained from *P. edulis* fruit peels and orientin and isorientin flavonoids were identified in both extracts through ultra-high performance liquid chromatography. Pectin was only identified in the aqueous extract by high-performance steric exclusion chromatography and nuclear magnetic resonance. Regarding the vascular system, the hydroethanolic extract showed better vasorelaxant effects in the mesenteric artery rings when compared to the aqueous extract. These effects mainly occur by opening the potassium channels. In the type 1 diabetes model, extracts at doses of 400 and 600 mg/kg were able to restore the effect of insulin in diabetic rats which were not responding to its action. The antidiabetic effect was more significant for the aqueous extract. Thus, the results suggest that the hydroethanolic and aqueous extracts have greater potential to be used to treat cardiovascular diseases such as hypertension and as a hypoglycemic agent, respectively. Taken together, *P. edulis* fruit peel extracts proved to be a source of valuable bioactive raw material to produce nutraceuticals or pharmaceutical products.

Keywords Yellow passion fruit peel · Type 1 diabetes mellitus · Vasorelaxant · Nutraceuticals

Introduction

Systemic arterial hypertension (SAH) and diabetes mellitus (DM) are public health problems worldwide. Due to their high prevalence, they are the most important risk factors for cardiovascular and renal diseases [1, 2]. Several drugs used to treat these diseases are often limited in their effectiveness and have adverse reactions that affect the patient's quality of life [3, 4]. Thus, natural products with hypoglycemic and hypotensive properties are valuable sources for developing new nutraceuticals with physiological benefits or pharmaceutical products [5, 6].

Previous pharmacological studies reported in the literature regarding *P. edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg. (Passifloraceae) species have revealed its potential antidiabetic and antihypertensive effects [7, 8]. Specifically for the fruit peels of *P. edulis*, it is possible to find several studies with the powder (dried and crushed peels) in type 2 diabetes mellitus models. However, its vasorelaxant and hypoglycemic

✉ Silvana Maria Zucolotto
szucolotto@hotmail.com

¹ PNBIO, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande Do Norte (UFRN), Natal, RN, Brazil

² Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Rio Grande Do Norte, Avenue Gen. Gustavo Cordeiro de Faria, Natal, RN, Brazil

³ Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

⁴ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

⁵ Department of Morphology, Federal University of Rio Grande Do Norte, Natal, Brazil

⁶ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

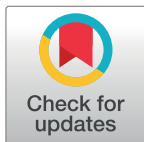
RESEARCH ARTICLE

D-(+)-Galactose-induced aging: A novel experimental model of erectile dysfunction

Mathania Silva de Almeida Rezende¹, Arthur José Pontes Oliveira de Almeida², Tays Amanda Felisberto Gonçalves¹, Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo¹, Sabine Helena Dantas³, Sonaly de Lima Silva², Evyllen Myllena Cardoso Soares⁴, Hayaly Felinto Alves⁴, Thais Trajano Lima⁴, Javanyr Frederico de Souza Júnior⁴, Ricardo Romão Guerra⁵, Islania Giselia Albuquerque Araújo³, Isac Almeida de Medeiros^{1*}

1 Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, **2** Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, **3** Programa de Mestrado Profissional em Gerontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, **4** Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, **5** Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brazil

* isac.ufpb@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: de Almeida Rezende MS, Oliveira de Almeida AJP, Gonçalves TAF, de Azevedo FdLAA, Dantas SH, Silva SdL, et al. (2021) D-(+)-Galactose-induced aging: A novel experimental model of erectile dysfunction. PLoS ONE 16(4): e0249487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249487>

Editor: Michael Bader, Max Delbrück Centrum fur Molekulare Medizin Berlin Buch, GERMANY

Received: October 26, 2020

Accepted: March 18, 2021

Published: April 15, 2021

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249487>

Copyright: © 2021 de Almeida Rezende et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Erectile dysfunction (ED) is defined as the inability to achieve and/or maintain penile erection sufficient for satisfactory sexual relations, and aging is one of the main risk factors involved. The D-(+)-Galactose aging model is a consolidated methodology for studies of cardiovascular aging; however, its potential for use with ED remain unexplored. The present study proposed to characterize a new experimental model for ED, using the D-(+)-Galactose aging model. For the experiments, the animals were randomly divided into three groups receiving: vehicle (CTL), D-galactose 150 mg/kg (DGAL), and D-(+)-galactose 150 mg/Kg + sildenafil 1.5 mg/Kg (DGAL+SD1.5) being administered daily for a period of eight weeks. All of the experimental protocols were previously approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the Federal University of Paraíba n° 9706070319. During the treatment, we analyzed physical, molecular, and physiological aspects related to the aging process and implicated in the development of ED. Our findings demonstrate for the first time that D-(+)-Galactose-induced aging represents a suitable experimental model for ED assessment. This was evidenced by an observed hyper-contractility in corpora cavernosa, significant endothelial dysfunction, increased ROS levels, an increase in cavernous tissue senescence, and the loss of essential penile erectile components.

Introduction

Erectile dysfunction (ED) is defined as the inability to achieve and/or maintain sufficient erection for satisfactory sexual relations [1]. Its prevalence tends to increase throughout the individual's life, affecting mainly men over 40 years old [2]. With the global increase in life

Original Research Article

Beneficial effects of Carvacrol in a D-(+)-galactose-induced aging model

ABSTRACT

Aim: To evaluate the cardiovascular effect of carvacrol treatment in a D(+)-galactose accelerated aging model, investigating effects on vascular reactivity, oxidative stress, and systolic blood pressure (SBP).

Methodology: Eight-week-old male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used for oral treatment for eight weeks. Organ baths were used for vascular reactivity studies (FEN, ACh, and NPS), fluorescence microscopy to detect reactive oxygen species (ROS, using DHE probe), and Tail-Cuff for systolic blood pressure (SBP) measurements. Non-linear regression was used to create the concentration-response curves. Emax denotes the tissue's maximum response.

Results: The aged rats showed a significant increase in fluorescence intensity by the DHE probe compared to the CTL group (CTL=100 ± 3.6%, n=5 and Dgal=167.7 ± 7.9%, n=5, respectively). However, the levels of ROS in the carvacrol-treated groups were significantly attenuated in the Dgal+C50 (138.8 ± 4.5%, n=5) and Dgal+C100 (130.0 ± 5.5%, n=5) groups. The animals of the Dgal group presented hypertension through the significant increase in SBP compared to the CTL group (CTL=135.9 ± 3.9 mmHg, n=6, Dgal=170.9 ± 2.0 mmHg, n=9, respectively). The increased SBP of Dgal rats could be reversed by treatment with carvacrol (Dgal+C50=137.9 ± 2.7 mmHg, n=5, and Dgal+C100=124.6 ± 8.2 mmHg, n=5, respectively). On the other hand, carvacrol was unable to restore the ACh-induced vasorelaxation effect found in CTL (Emax=100.0 ± 3.9%), Dgal (Emax=84.9 ± 4.4%), Dgal+C50 (Emax=84.9 ± 4.4%) and Dgal+C100 (Emax=82.1 ± 6.2 %).

Conclusion: Carvacrol shows protective antioxidant effects capable of reducing SBP in aged animals, being an important tool in promoting healthy aging.

Keywords: carvacrol, aging, d-galactose-induced aging model, oxidative stress, antioxidant, systolic blood pressure,

1. INTRODUCTION



The aging process, characterized by the gradual decline of cellular, molecular, and tissue functions, is regarded as the leading risk factor for the development of age-related diseases, such as cardiovascular diseases (CVDs), which are the leading cause of morbidity and mortality worldwide [1, 2]. Data indicate that by 2050, approximately a quarter of the world's population will comprise the elderly. However, despite the population's increased life expectancy, individuals do not necessarily experience an improvement in their quality of life [3, 4].

Cardiovascular aging is a dynamic process caused by several mechanisms, including progressive function and structure change, resulting in compromised cardiovascular homeostasis [5]. These changes are associated with increased synthesis and release of Reactive Oxygen Species (ROS) [4]. Briefly, with oxidative stress, vessels and the heart become stiffer, and endothelial dysfunction as one ages, a factor that predisposes to the onset of CVDs [6]. Due to the high prevalence of CVDs in aging, understanding the causes and associated mechanisms is important [7, 8].

It has been shown in the literature that rats given D-(+)-galactose for eight weeks to induce aging developed oxidative stress, vascular remodeling, changes in cardiac anatomy, and senescent cell accumulation, similar to naturally aged rats. Thus, this accelerated aging model is a reliable experimental aging model at the cardiovascular system level and can be widely used [9, 10]. The exploration of biomarkers and the search for new therapeutic targets, especially those with antioxidant activity that can act to slow or reverse the aging process, has aroused much interest [11]. Natural products have been a constant inspiration for medication research and development. Carvacrol, a natural compound of the monoterpene class, is the constituent of the essential oil produced by numerous aromatic plants and spices, such as

Review Article

ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways

Arthur José Pontes Oliveira de Almeida ¹, Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira,¹
Larisse Virgolino da Silva Pontes,¹ Javanyr Frederico de Souza Júnior,¹
Tays Amanda Felisberto Gonçalves,¹ Sabine Helena Dantas,¹
Mathania Silva de Almeida Feitosa,¹ Antonia Oliveira Silva,²
and Isac Almeida de Medeiros ¹

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária-Campus I, Caixa Postal 5009, 58051-970 João Pessoa, PB, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Enfermagem/Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária-Campus I, Caixa Postal 5009, 58051-970 João Pessoa, PB, Brazil

Correspondence should be addressed to Isac Almeida de Medeiros; isac@ltf.ufpb.br

Received 20 May 2022; Revised 24 September 2022; Accepted 26 September 2022; Published 19 October 2022

Academic Editor: Daniela Giustarini

Copyright © 2022 Arthur José Pontes Oliveira de Almeida et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Reactive oxygen species (ROS) are bioproducts of cellular metabolism. There is a range of molecules with oxidizing properties known as ROS. Despite those molecules being implied negatively in aging and numerous diseases, their key role in cellular signaling is evident. ROS control several biological processes such as inflammation, proliferation, and cell death. The redox signaling underlying these cellular events is one characteristic of the new generation of scientists aimed at defining the role of ROS in the cellular environment. The control of redox potential, which includes the balance of the sources of ROS and the antioxidant system, implies an important target for understanding the cells' fate derived from redox signaling. In this review, we summarized the chemical, the redox balance, the signaling, and the implications of ROS in biological aging.

1. Introduction

All living organisms produce reactive oxygen species (ROS) as a result of cellular metabolism [1, 2]. Despite the presence of antioxidant defenses (e.g., enzymes, proteins, and vitamins) in organisms, ROS can accumulate due to overproduction or failure in the antioxidant system, leading to the stage of “oxidative stress” [3], a key hallmark of aging [4–6].

Harman, in 1956, proposed the “free radical theory of aging,” which argued that ROS derived from metabolism were the primary cause of aging [7]. Since then, several publications have reported the deleterious effects of ROS on aging [8, 9]. However, recent studies on long-lived models and genetically altered animals challenge the role of ROS in aging [10]. In this

way, ROS appear to have a dual effect, first as an activator of a homeostatic compensatory response that increases with age to maintain survival, and then, beyond a certain point, as a factor that, rather than alleviating, aggravates the damages associated with aging [11, 12].

In this context, this review drafts an integrated approach to the dual role of ROS on aging, addressing molecular, cellular, and physiological aspects of ROS.

2. A General Overview of ROS

A range of molecules with oxidizing properties contributes to oxidative stress [3]. These ROS include superoxide anions ($O_2^{\bullet -}$), hydroxyl radical (HO^{\bullet}), nitric oxide ($^{\bullet}NO$), and lipid