

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Mestrado em Ciências da Saúde

JACKELINE GEBARA BUMUSSI MEZENCIO

**ATIVIDADE PROTETORA DA HESPERIDINA NO INÍCIO DA
HIPERTENSÃO ARTERIAL INDUZIDA POR L-NAME:
AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR**

Bragança Paulista

2015

JACKELINE GEBARA BUMUSSI MEZENCIO

**ATIVIDADE PROTETORA DA HESPERIDINA NO INÍCIO DA
HIPERTENSÃO ARTERIAL INDUZIDA POR L-NAME:
AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero

Bragança Paulista

2015

WG 340 Mezencio, Jackeline Gebara Bumussi.
M563a Atividade protetora da hesperidina no início da hipertensão arterial induzida por L-NAME: avaliação da reatividade vascular / Jackeline Gebara Bumussi Mezencio. -- Bragança Paulista, 2015.
58 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.
Orientação de: Fernanda Bruschi Marinho Priviero.

1. Hipertensão arterial. 2. Óxido nítrico.
3. Flavonóides. 4. Hesperidina. I. Priviero, Fernanda Bruschi Marinho. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

MEZENCIO, G. B, Jackeline , "Atividade protetora da hesperidina no início da hipertensão arterial induzida por L-name: avaliação da reatividade vascular", Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em dezoito de agosto de dois mil e quinze pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Patricia de Oliveira Carvalho
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Julio Alejandro Rojas Moscoso
Universidade Estadual de Campinas

Aos Orixás, o que seria de mim
sem a fé que eu tenho neles.

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos Orixás, que com voz de veludo auxiliaram meu caminhar, permitindo que tudo acontecesse, ao longo de minha vida e não somente como mestranda, mas que em todos os momentos são os maiores mestres que pode-se conhecer.

Ao meu, hoje, marido Fábio que desde o início da minha vontade em ingressar novamente no mundo acadêmico me apoiou e incentivou, sendo minha base de força para enfrentar as inúmeras dificuldades que passei neste período e não me deixando desistir em momento algum.

Ao meu pai, Marco Aurélio, que mesmo em silêncio, sempre torceu e vibrou por todos os momentos importantes de minha vida.

Aos meus pais espirituais, Regis e Marcela, por todo incentivo, força, vibrações e orações.

A professora Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho, quem possibilitou e ajudou a ingressar neste projeto.

A minha orientadora professora Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero, que teve paciência e me ajudou bastante a concluir este trabalho, passando-me todo o ensinamento e conhecimento necessário. Não tenho palavras para agradecer!

Aos membros das bancas examinadoras, por suas considerações que enriqueceram este trabalho.

Aos meus colegas Marcela Brigagão e Tiago Tomazini, já que sem a ajuda e disponibilidade deles, muitos experimentos não teriam acontecido.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos demais professores que estiveram presentes, sempre passando seus conhecimentos e ajudando em momentos oportunos.

Sem vocês este trabalho não seria possível. Muito Obrigada!

*“Se for fácil desconfie. Se for
difícil concretize.”*

Max Roberto

RESUMO

A hipertensão arterial é um problema de saúde pública, levando a disfunções orgânicas que representam risco à saúde e diminuem a qualidade de vida dos pacientes. Na hipertensão arterial, a disfunção vascular tem sido associada à menor biodisponibilidade do NO, substância vasodilatadora que pode reagir com espécies reativas de oxigênio e ter sua atividade prejudicada. Assim, terapias antioxidantes, como por exemplo, o uso de flavonóides, têm sido propostas como alternativa para prevenir danos vasculares associados ao aumento das substâncias pró-oxidantes na hipertensão arterial. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do tratamento agudo com a hesperidina, um flavonóide, sobre a reatividade vascular de ratos no início da hipertensão induzida pelo inibidor da síntese de NO, o L-NAME. Ratos Wistar machos foram submetidos à administração de L-NAME concomitante à administração da hesperidina, 24 horas prévias à eutanásia. Após a eutanásia, a aorta foi removida e preparada em miógrafo para análise das respostas de relaxamento e contração através de curvas concentração-efeito à acetilcolina, ao nitroprussiato de sódio e à fenilefrina. O plasma foi coletado para análises bioquímicas e do estado oxidativo. A acetilcolina produziu relaxamento concentração dependente da aorta, com potência similar nos 3 grupos estudados. Por outro lado, a resposta máxima da acetilcolina foi reduzida na aorta dos animais tratados com L-NAME e foi parcialmente prevenida pelo tratamento concomitante com hesperidina. Em contrapartida, o relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio foi mais potente na aorta do grupo L-NAME e este aumento foi parcialmente prevenido pelo tratamento com hesperidina. A contração produzida pela fenilefrina apresentou potência e resposta máxima similar nos 3 grupos estudados. Não houve alteração da atividade da SOD nem dos níveis de MDA, sugerindo que não há alteração significativa do estado oxidativo durante as 24 horas do tratamento empregado. Em conclusão, nossos resultados demonstram que o bloqueio da síntese de NO reduz o relaxamento dependente de endotélio nas primeiras 24 horas após o bloqueio, o que é parcialmente prevenido pelo tratamento com hesperidina, sugerindo um efeito vasoprotetor para este composto, que pode contribuir para prevenir o desenvolvimento de hipertensão arterial associada à menor biodisponibilidade de NO.

Palavras-chave: hipertensão arterial; óxido nítrico; flavonóides; hesperidina

ABSTRACT

High blood pressure is a public health problem associated with organ dysfunction representing health risk and diminish the quality of life of patients. In arterial hypertension, vascular dysfunction has been associated with a lower NO bioavailability, a vasodilator substance that reacts with reactive oxygen species and have their activity impaired. Thus, antioxidant therapies (such as the use of flavonoids), have been proposed as an alternative to prevent vascular damage associated with increased pro-oxidant substances in hypertension. The aim of this study was to evaluate the effect of acute treatment (24 hours) with hesperidin, an flavonoid, on vascular reactivity of rats at the beginning of L-NAME-induced hypertension, since L-NAME inhibits NO synthesis. Therefore, male Wistar rats were treated with L-NAME and hesperidin concomitantly, 24 hours prior to sacrifice. After sacrifice, the aorta was removed, cleaned up and set in myograph for functional evaluation. Relaxation of the aorta was obtained from concentration-response curves to acetylcholine and sodium nitroprusside (SNP) and the contraction was evaluated by the concentration-response curves to phenylephrine. Plasma was collected for analysis of the oxidant/antioxidant status. Acetylcholine produced concentration-dependent relaxation of the aorta with similar portency in the 3 groups. On the other hand, maximal response to acetylcholine was significantly reduced in aorta of L-NAME treated group, which was partially prevented by hesperidin. However, the endothelium-independent relaxation induced by sodium nitroprusside was more potent in L-NAME group, which was either partially prevented by hesperidin. The maximal response and potency of phenylephrine-induced contraction was similar in all groups studied. No changes were seen in the activity of SOD and MDA levels. In conclusion, our results show that the blockade of NO synthesis reduces the endothelium-dependent relaxation in the first 24 hours of blockade. This reduction was partially prevented by hesperidin, suggesting a vasoprotective effect of this compound, which might contributes to the development of arterial hypertension related to a decreased NO bioavailability.

Key words: hypertension; nitric oxide; flavonoids; hesperidin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach: Acetilcolina

Ca²⁺: Cálcio

cNOS: Óxido nítrico sintase constitutiva

DBH VI: Diretrizes Brasileira de Hipertensão VI

eNOS : Óxido nítrico sintase endotelial

EROs: Espécies reativas de oxigênio

GC: Guanilato ciclase

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HA: Hipertensão arterial

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

HD: Hesperidina

L-NAME: N^o - Nitro – L- Arginina metil éster

MLC: Cadeia leve de miosina

MLCK: Quinase da cadeia leve de miosina

MLCP: Fosfatase da cadeia leve de miosina

MDA: Malondialdeído

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

PA: Pressão arterial

PAD: Pressão arterial diastólica

PAS: Pressão arterial sistólica

SNP: Nitroprussiato de sódio

SOD: Superóxido dismutase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da formação de NO a partir da L-arginina com ação da NOS. (ZAGO,2006)	19
Figura 2. Isoformas da <i>NO Sintase</i> (DUSSE et.al., 2003)	20
Figura 3. Estrutura química do L-NAME. (PINTO et al., 2009)	21
Figura 4. Esquema da síntese, liberação e ação do NO. (ZAGO, 2006)	22
Figura 5. Esquema da formação de espécies reativas de oxigênio. Espécies reativas de Oxigênio -Ânion superóxido (O_2^-) -Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) -Radical hidroxila (HO) Espécies reativas de Oxigênio -Ânion superóxido (O_2^-) -Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) - Radical hidroxila (HO) Espécies reativas de oxigênio Espécies reativas de nitrogênio -Óxido Nítrico (NO) -Peroxinitrito ($ONOO^-$) Espécies reativas de nitrogênio -Óxido Nítrico (NO) - Peroxinitrito ($ONOO^-$) (SOUZA, 2015).....	24
Figura 6. Estrutura genérica dos flavonóides (BEHLING et al., 2004).....	28
Figura 7. Estrutura química da Hesperidina. (YAMADA et al., 2006).....	31
Figura 8. Curva concentração-efeito à acetilcolina em anéis de aorta de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais. * P < 0,05 comparado ao grupo controle.	39
Figura 9. Potência (A) e resposta máxima (B) da acetilcolina em anéis de aorta de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais. * P < 0,05 comparado ao grupo controle.....	40
Figura 10. Curva concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais.	41
Figura 11. Potência (A) e resposta máxima (B) do nitroprussiato de sódio em anéis de aorta de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais. * P < 0,05 comparado ao grupo controle e [#] P < 0,05 comparado ao grupo L-NAME.....	42

Figura 12. Curva concentração-efeito à fenilefrina em anéis de aorta de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais.	43
Figura 13. Potência (A) e resposta máxima (B) da fenilefrina em anéis de aorta de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais.	44
Figura 14. Atividade plasmática da SOD (A) e índice de peroxidação lipídica avaliado pela concentração plasmática de MDA (B) em amostras de plasma de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais.	45
Figura 15. Concentração plasmática de ureia e albumina em amostras de plasma de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do comportamento da pressão arterial, segundo as DBH VI.....	17
Tabela 2. Classificação das isoformas da NOS conforme abreviaturas, sinonímia, débito e dependência de cálcio.	20
Tabela 3. Grupo de animais x quantidade	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL	16
1.2 ÓXIDO NÍTRICO (NO)	18
1.2.1 Síntese do NO	19
1.2.2 Bloqueio da síntese do óxido nítrico com L- NAME	21
1.2.3 Papel do NO nas doenças cardiovasculares	22
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO	22
1.3.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	23
1.3.2 O papel dos radicais livres e EROs em processos fisiológicos	24
1.4 MUSCULATURA LISA VASCULAR	25
1.4.1 Tono Vascular	25
1.4.2 O NO e o tono vascular	26
1.5 ANTIOXIDANTES NO COMBATE AO ESTRESSE OXIDATIVO	26
1.5.1 Flavonóides	27
1.5.2 Flavonóides e a Hipertensão arterial	29
1.5.3 Hesperidina	30
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVO	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	34
4. MÉTODO	35
4.1 GRUPOS DE ANIMAIS	35
4.2 PREPARO DOS ANIMAIS	35

4.3	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	36
4.4	AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA ARTÉRIA AORTA	36
4.5	AVALIAÇÃO DO ESTADO OXIDATIVO.....	37
4.6	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL E DA FUNÇÃO HEPÁTICA	37
5.	RESULTADOS	39
5.1	AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA ARTÉRIA AORTA	39
5.2	AVALIAÇÃO DO ESTADO OXIDATIVO.....	45
5.3	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA	46
6.	DISCUSSÃO	48
7.	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), de acordo com as Diretrizes Brasileira de Hipertensão VI – DBH VI, é conceituada como “uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos–alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais” (SBC, 2010).

Conforme o Sexto Relatório Internacional dos Institutos de Saúde dos Estados Unidos da América do Norte, a hipertensão arterial corresponde à pressão arterial máxima ou sistólica (PAS) igual ou maior do que 140mmHg e pressão mínima ou diastólica (PAD) igual ou maior do que 90mmHg, dados estes que condizem com as Diretrizes Brasileiras (DBH VI), conforme tabela 1 (JOINT, 1997).

Ainda a DBH VI, define grupos como “Limítrofe” e “Normal Alto” (estágios de hipertensão) com a finalidade de aumentar a importância de diagnosticar precocemente as alterações de comportamento da pressão arterial na população em geral. Esta patologia é um problema comum que afeta grande parte da população e vem aumentando significativamente com o passar dos anos, estando ligada, normalmente, a questões hereditárias, mudanças de estilo de vida, sedentarismo, estresses diários e hábitos alimentares.

A hipertensão esta associada a várias doenças, como acidente vascular encefálico (AVE), doença arterial periférica (DAP), insuficiência cardíaca (IC), doença renal crônica (DRC), infarto agudo do miocárdio (IAM) e doença arterial coronariana (DAC). Assim o tratamento adequado do controle da pressão arterial é de grande importância para reduzir a ocorrência de tais complicações e, conseqüentemente, a mortalidade (BORENSTEIN, 1999).

O tratamento para o controle da pressão arterial se dá através de uso de medicamentos anti-hipertensivos, mudanças na alimentação (eliminando o sal), mudança no estilo de vida (menos estresse) e prática de atividade física. Cada situação requer um tipo de tratamento e o uso de medicamento deve ser acompanhado e prescrito por um médico.

Na grande maioria dos casos existe a associação de todos os tratamentos, porém em algumas situações, dependendo da idade e dos sintomas apresentados pelo paciente, mesmo com valores ainda considerado normal alto, o tratamento em geral sem medicamentos, deve ser iniciado (BORENSTEIN, 1999).

Tabela 1. Classificação do comportamento da pressão arterial, segundo as DBH VI.

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Ótima	<120	<80
Normal	<130	<85
Limítrofe	130-139	85-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥180	≥110
Hipertensão sistólica isolada	≥140	<90

A prevalência da hipertensão no Brasil, avaliada por estudos populacionais ainda é considerada um tanto desconhecida. Estudos relatados na DBH VI, indicam que, em média, 30% da população adulta apresentam hipertensão arterial (NOBRE, 2013).

O controle da pressão arterial existe de forma central e local. O controle central é dado pelos barorreceptores que promovem alterações hemodinâmicas e alteram também o controle local. Assim HA se caracteriza por uma desordem metabólica que pode ser causada pelo desequilíbrio entre a produção aumentada de fatores vasoconstritores (a angiotensina, a endotelina) ou pela produção deficiente de fatores vasodilatadores (óxido nítrico, bradicinina), com o conseqüente aumento do grau de contração da musculatura das artérias e arteríolas (KRIEGER, 1996).

Entre as desordens metabólicas, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) tem sido descrito como um dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento do dano tecidual. As EROs tem efeitos prejudiciais, principalmente como a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), ocasionando consequentes distúrbios orgânicos. O óxido nítrico (NO) é considerado um potente vasodilatador da musculatura lisa (artérias e arteríolas), promovendo assim uma diminuição da pressão arterial elevada. Adicionalmente, em consequência da menor biodisponibilidade do NO, observa-se sensibilização ao cálcio, um evento mediado pelo aumento na expressão de proteínas da via da Rho-kinase, que favorece as contrações do tecido vascular, contribuindo para as disfunções observadas nas desordens metabólicas como a hipertensão arterial.

1.2 Óxido Nítrico (NO)

Desde a descoberta do óxido nítrico (NO) como principal mediador químico de uma série de funções fisiológicas, diversas patologias têm sido correlacionadas à sua deficiência, entre estas a hipertensão arterial, obesidade, dislipidemias, síndrome metabólica, diabetes, que são fatores de risco para a doença cardiovascular (DUSSE et al., 2003).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito elétrons do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (DUSSE et al., 2003).

Na década de 80, ele era considerado somente um poluente ambiental indesejado e carcinogênico. Atualmente, o NO é considerado um dos mais importantes mediadores químicos de processos intra e extracelulares. Este mediador esta envolvido diretamente no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo (DUSSE et al., 2003).

1.2.1 Síntese do NO

O NO é um radical produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima *NO-sintase*, ou seja, a síntese do óxido nítrico resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina, sendo esta reação catalizada pela enzima *NO-sintase* (NOS) (Figura 1) (DUSSE et al., 2003).

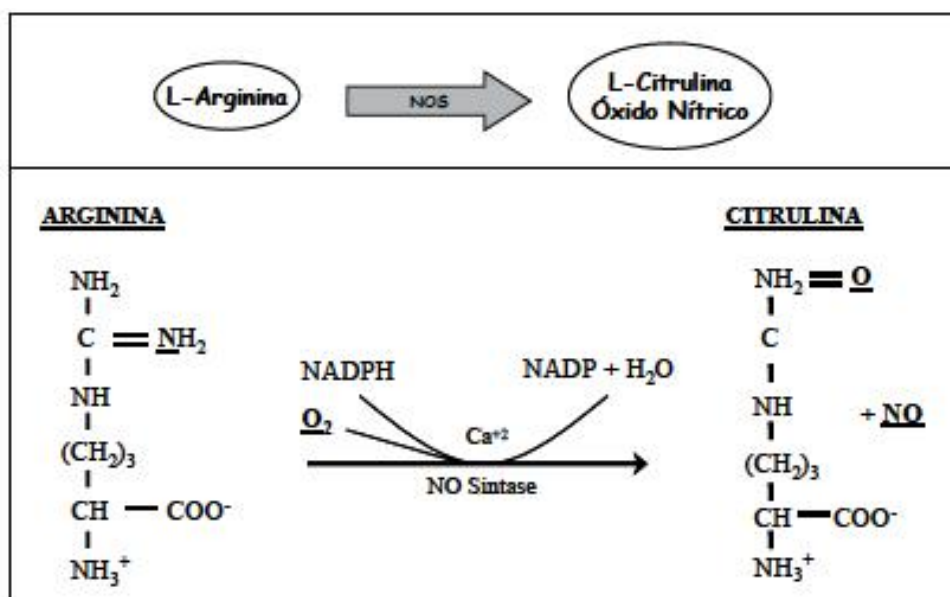


Figura 1. Esquema da formação de NO a partir da L-arginina com ação da NOS. (ZAGO, 2006)

Para que a formação aconteça, é necessária a presença da enzima NOS ativada, que existe em duas isoformas: a isoforma constitutiva (cNOS) e a induzível (iNOS) (figura 2). Estas isoformas diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e a capacidade de síntese de NO (DUSSE et al., 2003).

As isoformas constitutivas (cNOS) são encontradas no endotélio e nos neurônios, sendo denominadas, respectivamente, de eNOS (NOS endotelial) e nNOS (NOS neuronal). A tabela 2 apresenta a classificação das isoformas da NOS.

Tabela 2. Classificação das isoformas da NOS conforme abreviaturas, sinonímia, débito e dependência de cálcio. (FILHO, R.F et.al., 2000)

Nome	Abreviaturas	Sinonímia	Débito	Dependência de Ca ²⁺
Sintase neuronal	bNOS (brain-NOS)	Isoforma I	Baixo	Ca ²⁺ - dependente
	nNOS (neural-NOS)	Isoenzima I		
Sintase induzível	iNOS (induceble -NOS)	Isoforma II	Alto	Ca ²⁺ - independente
	macNOS (macrophage-NOS)	Isoenzima II		
	eNOS (endothelial-NOS)	Isoforma III		
Sintase endotelial	EC-NOS (endothelial – constitutive – NOS)		Baixo	Ca ²⁺ - dependente

É a isoforma eNOS que esta ligada à membrana das células endoteliais, regulando o tônus da célula muscular lisa vascular, bem como a adesão e agregação plaquetária. A ativação desta enzima é dependente da elevação de íons de cálcio nas células endoteliais (ZAGO, 2006).

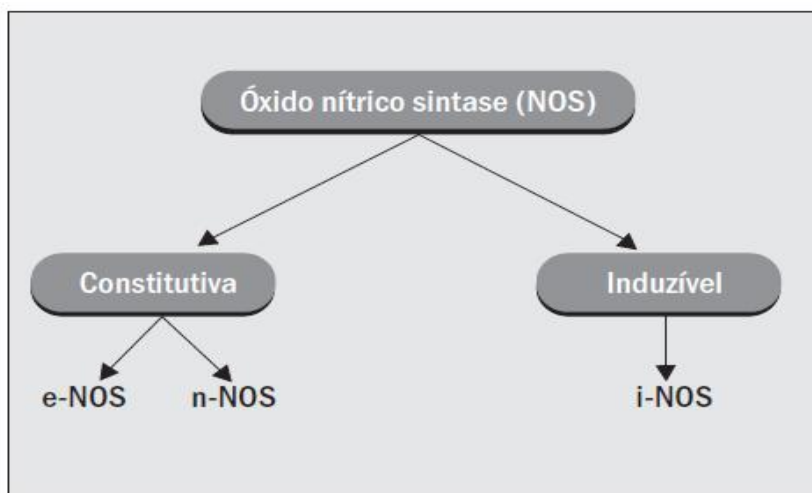


Figura 2. Isoformas da *NO Sintase* (DUSSE et.al., 2003)

A ativação da NOS e a consequente síntese de NO pelas células endoteliais ocorre a partir de estímulos físicos ou químicos. Os estímulos químicos são originados da interação de agonistas endógenos/exógenos com receptores específicos presentes nas células endoteliais, como por exemplo, a acetilcolina, bradicinina. Essa interação promove a formação de inositol trifosfato (IP3), que induz a liberação de íons de Ca²⁺ do retículo

endoplasmático, eleva os níveis de cálcio intracelular, formando o complexo cálcio – calmodulina, ativando a eNOS e sintetizando NO pelo endotélio. Os estímulos físicos são originados pela força que o sangue exerce sobre as paredes das artérias, conhecida como *shear stress*, promovendo a formação de NO, através das células endoteliais que possuem mecanorreceptores, que ativam diretamente a proteína G, os canais iônicos e as enzimas dos grupos das proteínas quinases e fosfatases que vão promover a formação de segundos mensageiros, desencadeando reações químicas que envolvem íons de cálcio, promovendo a vasodilatação (figura 4) (ZAGO, 2006).

1.2.2 Bloqueio da síntese do óxido nítrico com L- NAME

O óxido nítrico é um vasodilatador liberado pelo endotélio e seu bloqueio causa hipertensão arterial (XAVIER-VIDAL; MIDAL, 1997).

Os inibidores químicos da NOS atuam interrompendo a síntese do óxido nítrico. A administração de tais inibidores em mamíferos leva à vasoconstrição e a uma marcante elevação da pressão sanguínea, sugerindo que o óxido nítrico é de importância crucial na manutenção da pressão sanguínea *in vivo*. Dentre os inibidores químicos da síntese do óxido nítrico que têm sido muito utilizados nos estudos experimentais, o L-NAME ocupa lugar de destaque (XAVIER-VIDAL; MIDAL, 1997).

O N^o -Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME; Figura 3) é um análogo da arginina (precursor da síntese de óxido nítrico) que atua como inibidor reversível e inespecífico da *NO sintase* reduzindo assim a produção de NO (PINTO et al, 2009) e quando ministrado por via oral ou em dose intravenosa bloqueia a síntese do óxido nítrico produzindo hipertensão arterial experimental (XAVIER-VIDAL; MIDAL, 1997).

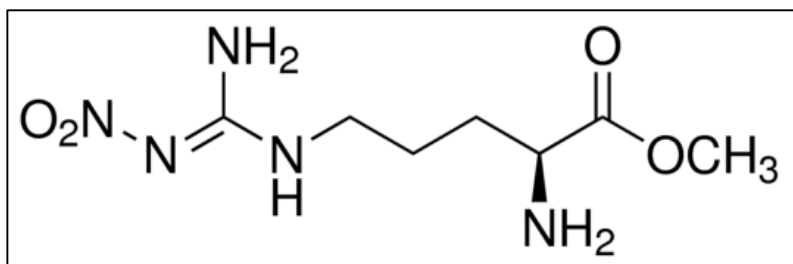


Figura 3. Estrutura química do L-NAME. (PINTO et al., 2009)

1.2.3 Papel do NO nas doenças cardiovasculares

Várias doenças, como a HA, as dislipidemias, aterosclerose, apresentam em seu mecanismo alterações na função endotelial das células. Assim essa disfunção endotelial é caracterizada por menor produção e/ou biodisponibilidade de NO e é um dos fatores que contribuem para o aparecimento de doenças cardiovasculares (ZAGO, 2006).

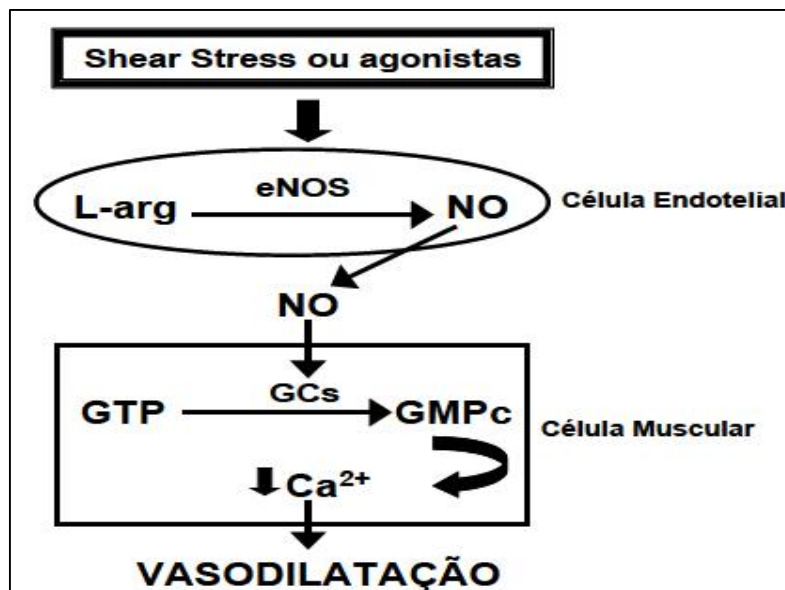


Figura 4. Esquema da síntese, liberação e ação do NO. (ZAGO, 2006)

1.3 Estresse oxidativo

O termo estresse oxidativo é utilizado quando a presença de radicais livres resulta em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos. Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

1.3.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio são produzidas nas mitocôndrias como um subproduto do metabolismo normal durante a produção de energia. O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio está acelerada ou quando mecanismos envolvidos na proteção contra elas encontram-se deteriorados (VINCENTINO; SOUSA, 2007).

O oxigênio, em razão da sua configuração eletrônica, tem forte tendência a receber um elétron de cada vez. A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental forma o radical superóxido (O_2^-), que ao receber mais dois íons de hidrogênio, forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em uma reação catalisada pela enzima superóxido dismutase – SOD (PAL, 1994).

Quando o H_2O_2 recebe mais um elétron e um íon de hidrogênio, forma o radical hidroxila (OH^-), que é o mais reativo dos intermediários, podendo reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima, influenciando enzimas, membranas e ácidos nucleicos (JENKINS, 1988).

Os radicais superóxido e hidroxila têm elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa e são, portanto, chamados de radicais livres. O H_2O_2 não é um radical livre, entretanto, representa um metabólito de oxigênio parcialmente reduzido. Este e outros metabólitos derivados do oxigênio (oxigênio singlete) são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs), devido à sua alta reatividade com biomoléculas.

Em geral, as EROs alteram o tamanho e forma dos compostos com os quais interagem. O radical superóxido pode ainda reagir diretamente com o NO, gerando peroxinitrito, e este, pode levar à formação de um radical hidroxila (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

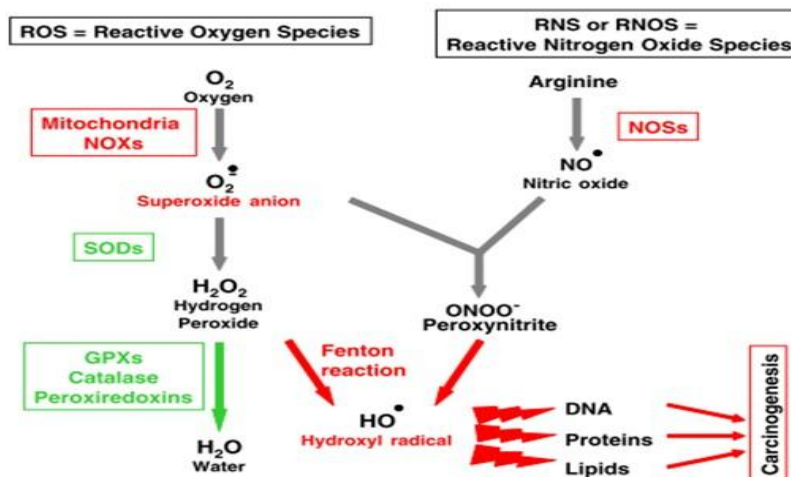


Figura 5. Esquema da formação de espécies reativas de oxigênio. Espécies reativas de Oxigênio - Ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) -Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) -Radical hidroxila (HO) Espécies reativas de Oxigênio -Ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) -Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) - Radical hidroxila (HO) Espécies reativas de oxigênio Espécies reativas de nitrogênio -Óxido Nítrico (NO) -Peroxinitrito ($ONOO^-$) Espécies reativas de nitrogênio -Óxido Nítrico (NO) -Peroxinitrito ($ONOO^-$) (SOUZA, 2015).

1.3.2 O papel dos radicais livres e EROs em processos fisiológicos

O papel dos radicais livres e EROs em processos fisiológicos como o envelhecimento e patológicos como câncer, aterosclerose, inflamação e doenças cardiovasculares vem sendo amplamente demonstrado (SANBONGI, 1997). O papel do ânion superóxido no dano celular é refletido em eventos que ocorrem durante a isquemia (quando ocorre hipóxia) e em outras condições que aumentam a conversão de O_2 para EROs (BARREIROS et al., 2006).

Assim, o aumento na formação de EROs parece estar envolvido no desenvolvimento e progressão das doenças cardiovasculares. No entanto, o organismo possui sistemas de defesa antioxidante, que conta com enzimas como a SOD (superóxido dismutase), glutathiona redutase e a catalase e outros sistemas não enzimáticos como vitamina C, vitamina E e flavonóides (PAL et al., 1994). Por outro lado, um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros predominem, leva o organismo a um quadro de estresse oxidativo (SIES, 1986). Este estado de estresse oxidativo seria o responsável por contribuir para o dano celular durante diversos estados

patológicos como hipertensão arterial, diabetes *mellitus*, aterosclerose, obesidade, entre outros.

1.4 Musculatura lisa vascular

Todas as células musculares lisas contêm as proteínas contráteis miosina, actina, tropomiosina e caldesmon. A miosina é a proteína principal do filamento grosso sendo composta por duas cadeias de alto peso molecular, cada uma das quais associadas a duas cadeias de baixo peso molecular. Estas últimas tem atividade ATPase e constituem o sítio principal da ativação, pelo íon cálcio, da contratilidade muscular. A actina é a principal proteína do filamento fino, sendo a tropomiosina e o caldesmon, as proteínas intermediárias deste filamento, as quais desempenham importante papel regulador na interação actina-miosina (WAIB; BURINI, 1991).

A contração ou tono vascular é dependente e regulada pela concentração do íon cálcio disponível no citosol, onde forma um complexo com a calmodulina, proteína carreadora de cálcio (WAIB; BURINI, 1991).

1.4.1 Tono Vascular

Tono vascular é o grau de constrição mantido pelo vaso sanguíneo. O principal determinante do tono vascular é o nível de fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC), que é controlado pela quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), dependente de (Ca^{2+}) -calmodulina, e pela fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) (HARTSHORNE, 1987).

O acoplamento de substâncias vasoconstritoras (como a noradrenalina, a angiotensina II e a endotelina), aos seus receptores de membrana leva à formação de segundos mensageiros que ativam proteínas alvo responsáveis pelo aumento do influxo de Ca^{2+} para o citosol. O Ca^{2+} intracelular se acopla à calmodulina, formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina que ativa a MLCK e esta por sua vez, fosforila a MLC.

A fosforilação da MLC é regulada pela MLCP, que remove o fosfato de alta energia da MLC, levando ao relaxamento do músculo liso. No entanto, a enzima Rho-kinase é capaz de fosforilar a subunidade de ligação da miosina da MLCP. Esta subunidade, uma vez fosforilada, inibe a atividade enzimática da MLCP, mantendo a MLC fosforilada e consequentemente, mantendo a contração do músculo liso, um mecanismo conhecido por sensibilização ao cálcio. A Rho-kinase é ativada por uma pequena proteína G, RhoA, que parece ser ativada por fatores de troca do nucleotídeo guanina (GEF) quando receptores acoplados à proteína G são ativados (WEBB, 2003).

1.4.2 O NO e o tono vascular

Estudos reportam que o NO é capaz de ativar a MLCP e, portanto, em condições patológicas associadas à redução da biodisponibilidade do NO, é observada amplificação da via RhoA/Rho-kinase. Em modelo de diabetes, que tem sido correlacionado com redução da biodisponibilidade do NO (PANDOLFI, 2003-2007), foi demonstrado aumento da expressão ou atividade da via da Rho-kinase em corpo cavernoso (CHANG, 2005; BIVALACQUA, 2004), bexiga urinária (CHANG, 2006; NOBE, 2009) e tecido vascular (SHAH, 2006; YING, 2004). Em modelos de hipertensão, resultados similares foram descritos (CHITALEY, 2001; YING, 2004; RAJASEKARAN, 2005; JIN, 2006; PETERS, 2006; NOBE, 2008).

Na hipertensão associada à síndrome metabólica, induzida por uma dieta rica em frutose, são observados: redução da biodisponibilidade de NO, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e aumento da atividade de enzimas associadas à contração, como PKC β (BULOW, 1990; DONNELLY, 1994; ANITHA, 2004; RAJASEKAR, 2007).

1.5 Antioxidantes no combate ao estresse oxidativo

Os antioxidantes são um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, inibem ou atrasam significativamente os processos oxidativos (VINCENTINO; SOUSA, 2007).

O nosso organismo apresenta sistema de defesa antioxidante, enzimáticos e não enzimáticos.

Entre os enzimáticos destaca-se a enzima SOD e a catalase. A SOD é uma metaloenzima que converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, e pela ação da catalase que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (LEITE; SARNI, 2003).

Já entre os não enzimáticos, destacam-se os compostos fenólicos como efetivos doadores de hidrogênio e seu potencial antioxidante está correlacionado com o número e a posição dos grupos hidroxílicos e conjugações assim como com a presença de elétrons doadores no anel B devido à capacidade que esse anel aromático possui de suportar o desaparecimento de elétrons deslocalizados do sistema de elétrons (RAMIREZ-TORTOZA et al., 2001). Estes compostos podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila, e os encontrados nos alimentos são as cumarinas, os flavonóides e os taninos (DUBICK; OMAYE, 2001).

1.5.1 Flavonóides

Flavonóides são compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos graxos dentre outros (DORNAS et al., 2007).

Eles constituem o mais importante grupo de compostos fenólicos e podem ser divididos nos seguintes subgrupos: antocianinas (cianidina, delphinidina), flavanas (catequina, epicatequina, luteoforol, procianidina, theaflavina), flavanonas (hesperidina, naringenina), flavonas (apigenina, luteolina, diomestina, tangeritina, nobiletina, tricetina), flavonóis (quercetina, rutina, miricetina) e isoflavonóides (daidzeína, genisteína) (LOPES et al., 2000).

A estrutura do flavonóide (figura 6) consiste de um esqueleto de difenil propano (C6-C3-C6) com dois anéis benzênicos (A e B) ligado a um anel pirano (C) (BEHLING et al., 2004).

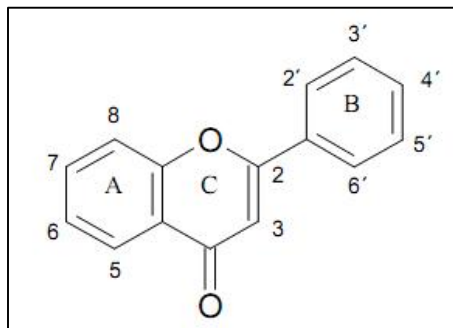


Figura 6. Estrutura genérica dos flavonóides (BEHLING et al., 2004)

Três tipos de flavonóides são achados com frequência em frutas cítricas: flavanonas, flavonas e flavonóis (BENAVENTE-GARCIA, 1997).

As flavanonas existem como mono ou diglicosídeos e contribuem para o sabor dos cítricos. São exemplos de flavanonas: a hesperidina, a narirutina, a naringina, e a neohesperidina (SIVAM, 2002). No entanto, sabe-se que os flavonóides glicosilados apresentam limitações em relação à sua biodisponibilidade, relacionadas à sua capacidade de absorção no lúmen intestinal, em especial devido ao alto peso molecular e a alta polaridade da estrutura destes compostos. A atuação de enzimas como ramnosidases e glicosidases, capazes de liberar as frações glicosídicas podem ser usadas para promover a hidrólise da hesperidina e formar compostos mais ativos. Os flavonóides das frutas cítricas, a hesperidina e a naringenina, são absorvidos no trato gastrointestinal (KRIS-ETHERTON et al., 1984; AMEER et al., 1996; KUROWSKA; MANTHEY, 2004), após desglicosilação por bactérias intestinais (HAVSTEEN, 1983). Quanto ao mecanismo de absorção e ação dos flavonóides no organismo ainda não está totalmente esclarecido, além disto, as cinéticas de absorção variam consideravelmente entre alimentos devido à heterogeneidade de açúcares e outros grupos funcionais ligados ao núcleo de flavonas. A absorção é dependente da dosagem, veículo de administração, antecedentes da dieta, diferenças sexuais, população microbiana do cólon e de flavonóides que são absorvidos ligados a proteínas (WALLE et al., 2003).

Por outro lado, seu papel antioxidante é bem descrito, embora os mecanismos de ação não estejam completamente elucidados. A atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de hidrogênio e elétrons, estabilidade do radical flavanol formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS, 2006).

A atividade de sequestro está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonóides e das espécies a serem sequestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonóide, maior é sua atividade como sequestrador de radicais livres. Flavonóides com potencial de oxidação menor que o do Fe^{3+} e Cu^{2+} e seus complexos podem reduzir esses metais, sendo potencialmente pró-oxidantes (RICE-EVAN, 1997). Quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H^+ e de elétrons (CAO, 1997).

Além disso, estudos mostram que os flavonóides inibem a peroxidação lipídica em células e tecidos corporais que são continuamente ameaçados pelos danos causados pelos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (DE GROOT, 1994; GRACE, 1994). A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lipídios das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca metabólica e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996).

1.5.2 Flavonóides e a Hipertensão arterial

Os flavonóides são inversamente relacionados à mortalidade por doença coronária cardíaca e possivelmente protegem contra o infarto do miocárdio. É possível que seus efeitos antioxidantes sejam responsáveis, pelo menos em parte, por este efeito protetor. Os flavonóides atuam relaxando os músculos do sistema vascular, contribuindo assim para reduzir a pressão arterial e melhorar a circulação em geral (MINETTO, 2009). Estudos exploram diferentes flavonoides utilizados para o controle da pressão arterial.

Em modelo animal bem como em humanos, a administração de produtos à base de uva reduziu a pressão sanguínea. Os autores sugerem que o efeito hipotensor destes

flavonóides estejam relacionados à capacidade de modular a liberação de óxido nítrico pelo endotélio vascular, uma vez que o vinho tem sido proposto como regulador da síntese do óxido nítrico do endotélio através de fatores transcricionais e pós-transcripcionais (JIMENEZ; CALIXTO, 2008).

Os flavonóides presentes nos chocolates também parecem ter efeitos positivos sobre a pressão arterial. Um estudo mostrou que a ingestão de chocolate preto reduziu a pressão arterial sistólica. Outro, comparando os efeitos do chocolate e do cacau administrados aguda e cronicamente, mostraram um efeito benéfico sobre a pressão arterial sistólica e diastólica (GRASSI et al., 2004; HOOPER et al., 2008).

O grupo de HOOPER et al., (2008) ainda mostrou o efeito dos flavonoides sobre a vasodilatação, através do estudo de vasodilatação mediada pelo fluxo (FMD), que representa a produção de óxido nítrico pelo endotélio em resultado da força de cisalhamento gerada pelo fluxo sanguíneo. Foi observado que diferentes grupos de flavonóides têm diferentes efeitos na FMD. A ingestão crônica de proteína isolada de soja, extratos de isoflavona e o chocolate ou cacau melhoram a FMD. Por outro lado, somente a ingestão aguda de chocolate ou cacau é capaz de melhorar a FMD. Tais efeitos tem sido atribuídos às propriedades antioxidantes, antiinflamatória e antiagregante dos flavonóides (HOOPER et al., 2008).

Outro estudo experimental avaliou um dos metabólitos da Hesperidina, o HPT7G, e mostrou que quando administrado por via intravenosa, diminui a pressão arterial de ratos SHR e melhora a vasodilatação dependente do endotélio em resposta a acetilcolina (YAMAMOTO et al., 2013a).

1.5.3 Hesperidina

Hesperidina é classificada como uma flavanona glicosídica, com estrutura química constituída pela hesperitina (forma aglicona) ligada aos açúcares glicose e a ramnose na posição 7 (YAMADA et al., 2006).

Está presente naturalmente em frutas cítricas, principalmente no limão e na laranja e suas quantidades podem variar de acordo com o solo, clima, variedade da fruta, e tipo de suco (MANTHEY et al., 2001).

Apesar de ser reconhecida a importância biológica dos flavonóides cítricos, ainda não há recomendações para a ingestão (KNEKT et al., 2002). No Brasil, não existem dados disponíveis sobre a ingestão específica dos flavonóides cítricos. Contudo nos EUA, o consumo individual médio diário de frutas cítricas tem sido estimado em 68g, dos quais 59g são consumidos em sucos, geralmente de laranja (ERLUND et al., 2001).

À hesperidina são atribuídas múltiplas atividades biológicas, tais como antiinflamatória, antioxidante, vasodilatadora, antiviral, hipolipidêmica, antitumoral, antimicrobiana, antiviral, anticancerígena, entre outras. A hesperidina pode atuar como varredor de radicais livres, moduladores de atividades enzimáticas, e inibindo a proliferação celular. As propriedades funcionais relacionadas a esta substância, foram observadas em diversas pesquisas *in vitro* e *in vivo* (ROMERO et al., 1998).

As propriedades antiinflamatórias apresentadas pela hesperidina são justificadas pela inibição da síntese de mediadores pró-inflamatórios, principalmente os derivados do ácido araquidônico, prostaglandinas e tromboxano (BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008).

Ela ainda é considerada como um protetor vascular que atua sobre a parede dos capilares e sobre a permeabilidade dos endotélios, resultando em uma atividade antiinflamatória e antiexsudativa.

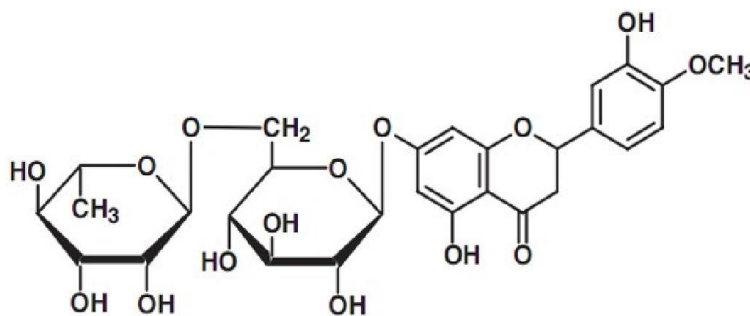


Figura 7. Estrutura química da Hesperidina. (YAMADA et al., 2006).

Um recente estudo mostrou que os metabólitos da hesperetina têm maior atividade antioxidante contra vários sistemas oxidativos, incluindo a eliminação de ânion superóxido, reduzindo o poder quelante do metal, sendo estes mais ativos do que a hesperetina ou hesperidina (YANG et al., 2012).

Em estudo relatado por Yamamoto, ratos Wistar machos que apresentavam hipertensão foram suplementados com doses de hesperitina e G- hesperidina por um curto intervalo de tempo (1 dose) por via oral e intraperitoneal, o resultado apresentado foi que tanto a hesperitina quanto a G-hesperidina apresentaram resultados positivos independente da forma de administração, visto que causou uma redução significativa da pressão arterial sistólica. O efeito depressor foi significativamente inibida por um inibidor de síntese de óxido nítrico (YAMAMOTO et al., 2008).

2. JUSTIFICATIVA

A hipertensão arterial é um problema de saúde pública mundial. Trata-se de uma patologia primária para diversas outras doenças, na grande maioria cardiovasculares. O tratamento para tal inclui inicialmente mudança no estilo de vida, com a ingestão de uma dieta pobre em cloreto de sódio (sal) e prática de atividade física. Quando o fator de risco da patologia é alto e as medidas iniciais de tratamento não são suficientes para diminuir este risco, o tratamento é complementado com medicamentos anti-hipertensivos, de acordo com orientação médica. Em consequência da hipertensão arterial, são observadas disfunções orgânicas que representam grande risco à saúde e diminuem a qualidade de vida dos pacientes. Dentre elas, a disfunção vascular tem sido associada à menor biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras como o NO e há evidências de que a reduzida biodisponibilidade destas substâncias está associada a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O NO atua fisiologicamente ativando a miosina fosfatase, que desfosforila a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) favorecendo o relaxamento dos músculos lisos vasculares. Assim, a deficiência no NO está associada ao aumento da expressão/atividade da via da Rho-kinase, favorecendo o estado contrátil dos músculos lisos. O uso de flavonóides, que são substâncias antioxidantes, tem sido vastamente proposto como terapia para os distúrbios cardiovasculares.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento agudo (24 horas) com a hesperidina sobre a reatividade vascular de ratos no início da hipertensão arterial induzida pelo inibidor da síntese de NO, o L-NAME.

3.2 Objetivo Específico

Investigar o efeito da administração de hesperidina, sobre a modulação da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) e a peroxidação lipídica, através dos níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA).

Avaliar o efeito da administração de hesperidina sobre a função renal e hepática, através da dosagem dos níveis séricos de uréia e albumina, respectivamente.

4. MÉTODO

Foram utilizados ratos Wistar machos, com oito semanas de vida, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP, Campinas, SP), os quais ficaram alojados no biotério da Universidade São Francisco em gaiolas coletivas. Água e ração padrão foram fornecidas *ad libitum*. O biotério dispõe de ciclo claro/escuro (12/12 h).

4.1 Grupos de animais

Foram utilizados 12 animais divididos aleatoriamente em 03 grupos, com “n” de 04 animais, conforme a tabela 3. Os dados funcionais podem ser representados por “n” de 03 em grupos cujo experimento funcional não respondeu aos estímulos farmacológicos de contração inicial e, portanto, foram eliminados do estudo.

Tabela 3. Grupo de animais x quantidade

Grupo	Tratamento	Quantidade de animal
1	Controle	04
2	L-NAME	04
3	L-NAME + HD	04

4.2 Preparo dos animais

Os animais do grupo 1 não sofreram nenhum tipo de manipulação e foram designados como controle negativo do estudo. Aos animais do grupo 2 foi administrado L-NAME (20 mg/rato) e aos animais do grupo 3 lhes foi administrado L-NAME (20 mg/rato) e Hesperidina (75 mg/rato), por gavagem, 24 horas antes da eutanásia. Os volumes para administração por gavagem foram de 0,5 ml tanto para L-NAME quanto para Hesperidina, evitando administrar volume superior a 1 ml por rato.

4.3 Eutanásia dos animais

Os animais foram sedados com o anestésico Isoflurano e sacrificados por deslocamento cervical. Após laparotomia, foi feita a inserção de uma agulha na porção abdominal da artéria aorta para coleta de sangue para dosagens bioquímicas e oxidativas. A porção torácica da artéria aorta foi removida para avaliação funcional.

4.4 Avaliação funcional da artéria aorta

A artéria aorta foi isolada e imediatamente colocada em solução de Krebs-Henseleit gelado. O tecido foi submetido à remoção de tecidos gordurosos e conjuntivos e em seguida, foram feitos cortes transversais para a obtenção de anéis da artéria.

Os anéis foram montados em miógrafo para órgão isolado de 5 ml contendo solução de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl: 118; NaHCO₃: 25; glicose 5,6; KCl: 4,7; KH₂PO₄: 1,2; MgSO₄.7H₂O: 1,17 e CaCl₂.2H₂O: 2,5), aquecida a 37°C e aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os tecidos foram montados entre dois ganchos de metal, sendo um deles fixo e o outro conectado a um transdutor de força. Foi aplicada uma tensão inicial de aproximadamente 10 mN e periodicamente ajustada até que ocorresse a estabilização de tensão dos mesmos, durante um período aproximado de 45 a 60 minutos. As alterações de tensão foram medidas por transdutores isométricos e registradas em sistema PowerLab de aquisição de dados (software versão 7.2, AD Instruments, MA, EUA).

A contração foi avaliada por curvas concentração-efeito à fenilefrina. As respostas de relaxamento para acetilcolina e nitroprussiato de sódio foram obtidas em anéis de aorta pré-contráidos com fenilefrina.

Para avaliar o relaxamento dependente do endotélio, foram realizadas curvas concentração-efeito para o agonista acetilcolina (estimulador da liberação do NO endotelial) nos diferentes grupos experimentais. O relaxamento independente do endotélio foi avaliado através de curvas concentração-efeito ao doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio.

As curvas concentração-efeito foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações da droga utilizada em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas.

4.5 Avaliação do estado oxidativo

Amostras de plasma e kits específicos (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) foram utilizados para dosagem da atividade plasmática da SOD e os níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA) para avaliação do estado oxidativo.

Para dosagem dos níveis plasmáticos de malondialdeídos (MDA), marcador da peroxidação lipídica, utilizou-se medida de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Conforme a técnica, 250µL de amostra (plasma) foram misturados com 25µL BHT 4% em metanol, 1mL de ácido tricloroacético a 12%, 1mL de ácido tiobarbitúrico 0,73% e 750µL 0,1 mol/L tampão Tris-HCl contendo 0,1mmol/L EDTA pH 7,4. Após 60 minutos de incubação em banho-maria fervente, as amostras foram rapidamente resfriadas em banho de gelo, e adicionado 1,5mL de n-butanol. A amostra foi homogeneizada por 30 segundos em vortex e centrifugada a 3.000rpm por 10 minutos. As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 532 nm.

Para dosagem da atividade plasmática da enzima SOD empregou-se o método que utiliza o sal de tetrazólio para detectar os radicais de superóxido gerados da xantina oxidase e da hipoxantina. A xantina oxidase e a hipoxantina produzem radicais superóxido, os quais reagem ao sal tetrazólio e formam compostos vermelho formazan. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade da enzima necessária para a exposição de 50 % da dismutação do radical superóxido. A amostra foi colocada nos poços presentes no prato do kit de dosagem de SOD, juntamente com o detector de radical diluído. Incubou-se o prato por 30 minutos em temperatura ambiente. Após realizou-se a leitura da absorbância em 460 nm.

4.6 Avaliação da função renal e da função hepática

As funções renal e hepática foram avaliadas pela dosagem dos níveis plasmáticos de uréia e albumina, respectivamente, utilizando kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Os níveis plasmáticos de albumina foram dosados a partir do sistema de desvio de picos de absorvidade máxima de um corante complexo (verde de bromocresol) quando este se liga na albumina. A amostra foi misturada com o reagente de cor e após 2 minutos foi determinada a absorbância. A cor formada foi medida colorimetricamente em 630 nm, sendo proporcional a concentração de albumina na amostra.

Os níveis plasmáticos de uréia foram dosados a partir do princípio de que a uréia é hidrolisada pela urease produzindo amônia e dióxido de carbono. Os íons de amônia reagem em pH alcalino com o salicilato e o hipoclorito de sódio sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar o azul de indofenol. A amostra foi misturada com a uréase tamponada, incubada a 37°C por 5 minutos. Após adicionou-se o oxidante de uso e incubou-se novamente a 37°C por 5 minutos. Determinou a absorbância em 600nm. A intensidade de cor formada foi proporcional a quantidade de uréia na amostra.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação funcional da artéria aorta

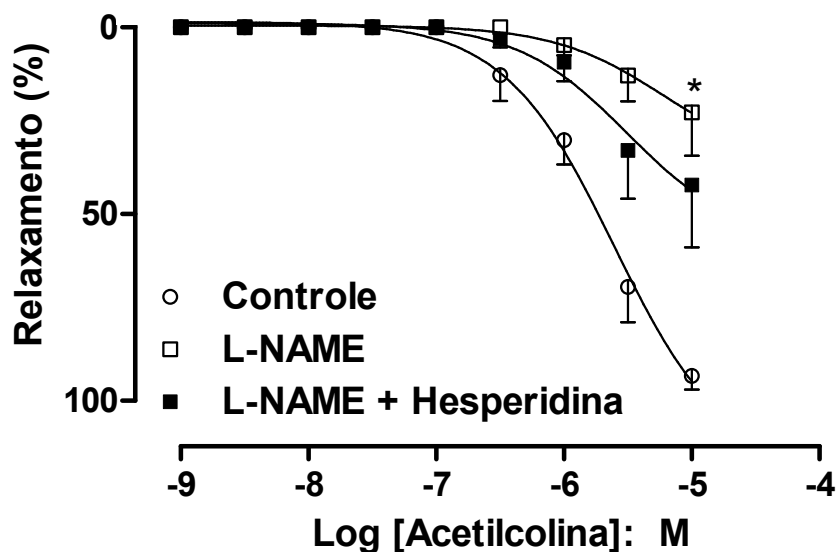


Figura 8. Curva concentração-efeito à acetilcolina em anéis de aorta de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.

A figura 8 mostra que a acetilcolina produziu relaxamento concentração-dependente nos anéis de aorta dos 3 grupos estudados. Não houve alteração significativa de potência (Figura 9A), entretanto, a resposta máxima para a acetilcolina foi reduzida na aorta dos animais tratados com L-NAME. A administração de Hesperidina preveniu parcialmente esta redução de relaxamento provocada pelo L-NAME (Figura 9B).

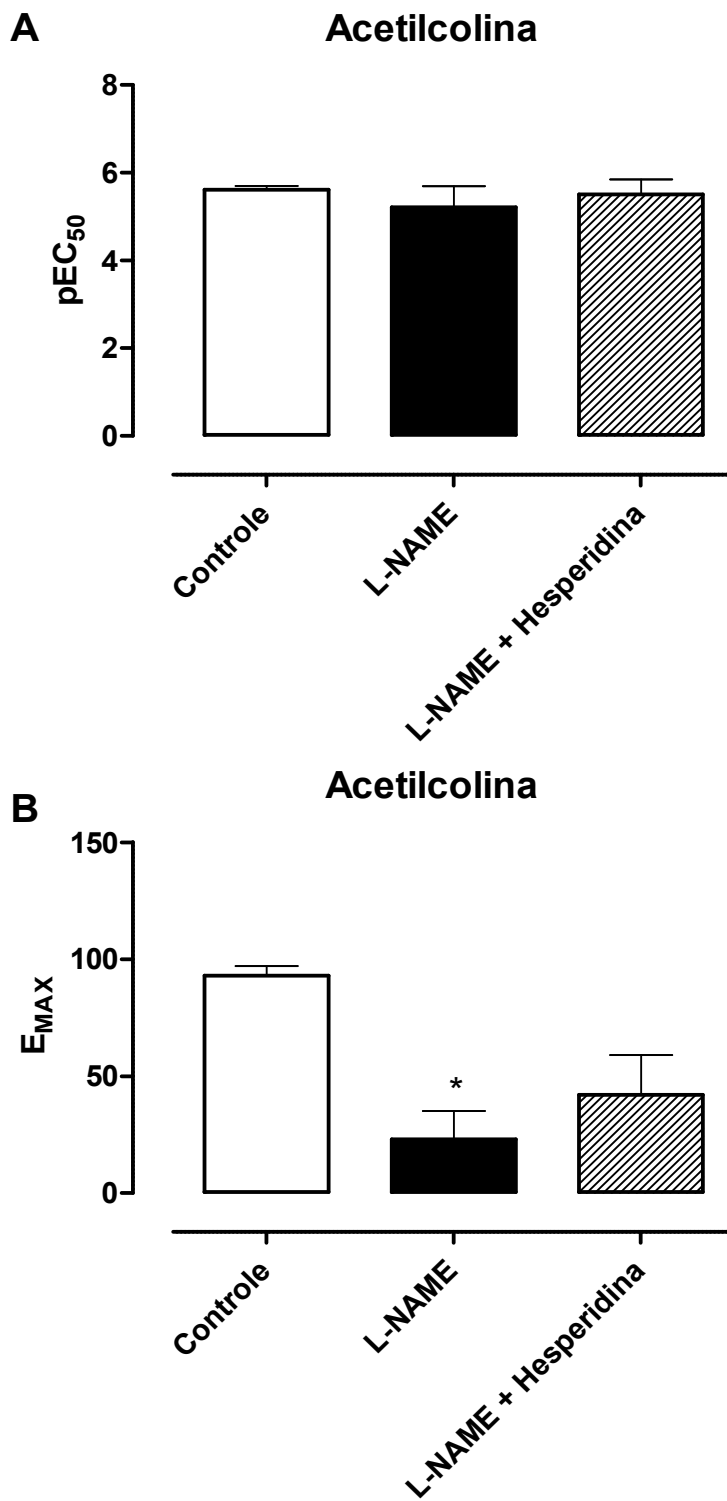


Figura 9. Potência (A) e resposta máxima (B) da acetilcolina em anéis de aorta de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.

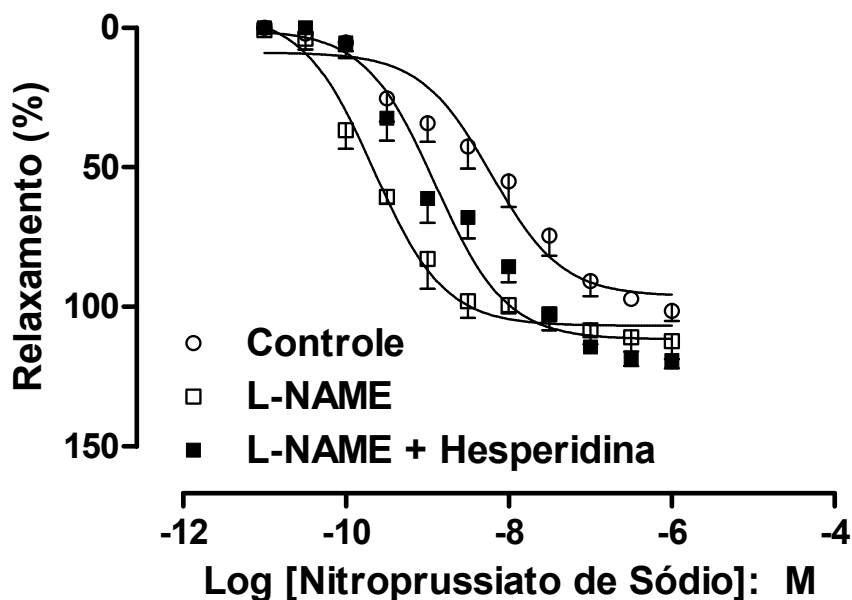


Figura 10. Curva concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais.

A figura 10 mostra que o nitroprussiato de sódio produziu relaxamento concentração-dependente nos anéis de aorta dos 3 grupos estudados. A potência de relaxamento ao nitroprussiato de sódio foi significativamente maior nos grupos L-NAME e L-NAME + Hesperidina. No entanto, o tratamento com a Hesperidina promoveu redução parcial da potência do nitroprussiato de sódio (Figura 11A). A resposta máxima para o nitroprussiato de sódio foi significativamente maior na aorta dos animais tratados com L-NAME + Hesperidina. O tratamento com L-NAME apenas não afetou a resposta máxima ao nitroprussiato de sódio (Figura 11B).

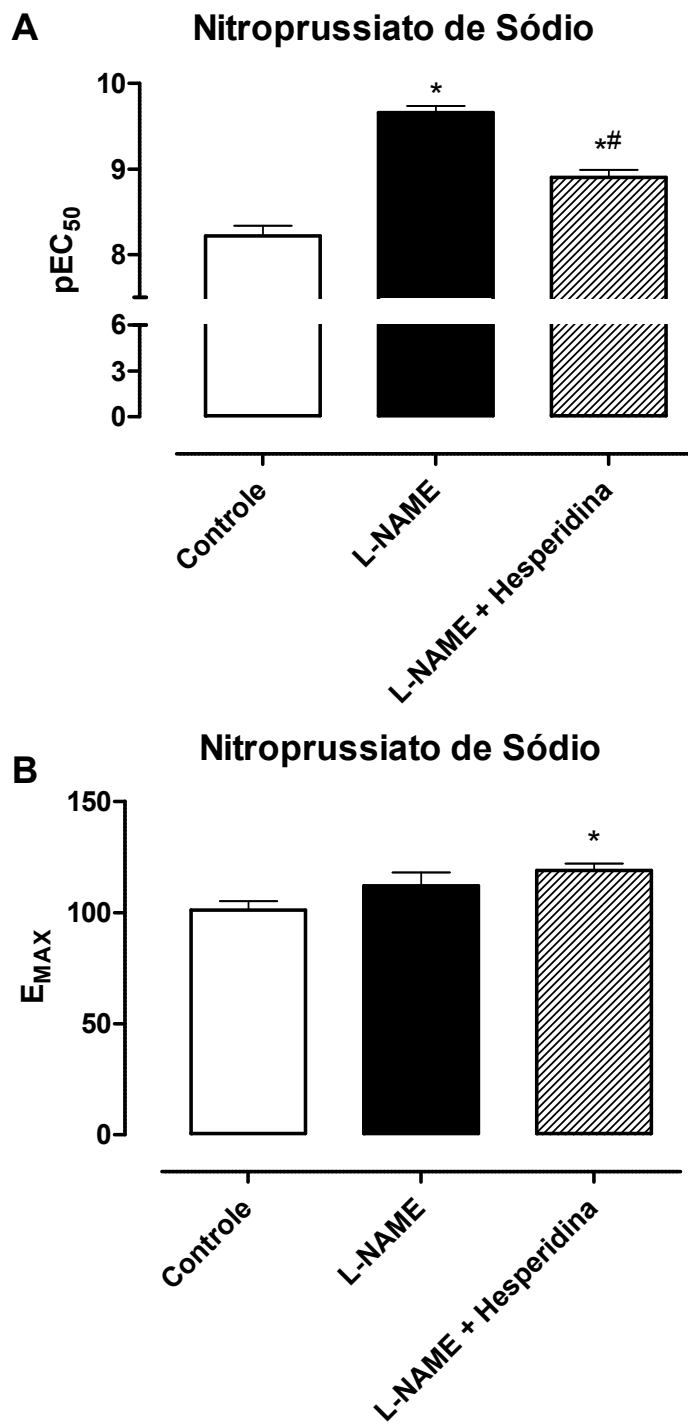


Figura 11. Potência (A) e resposta máxima (B) do nitroprussiato de sódio em anéis de aorta de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle e # $P < 0,05$ comparado ao grupo L-NAME.

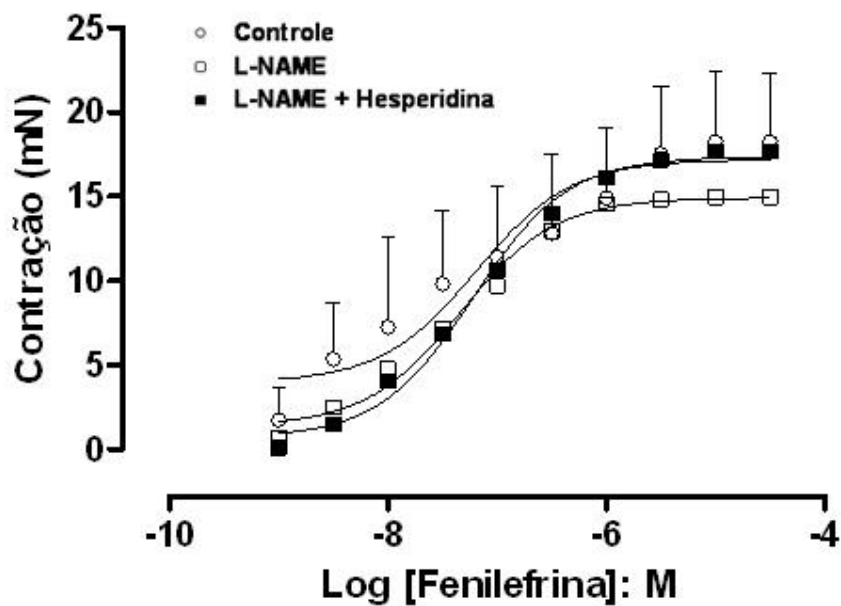


Figura 12. Curva concentração-efeito à fenilefrina em anéis de aorta de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais.

A figura 12 mostra que a fenilefrina produziu contração concentração-dependente nos anéis de aorta dos 3 grupos estudados. A figura 13 mostra que não houve alteração significativa nem da potência (Figura 13A) nem da resposta máxima à fenilefrina (Figura 13B) comparando os 3 grupos estudados.

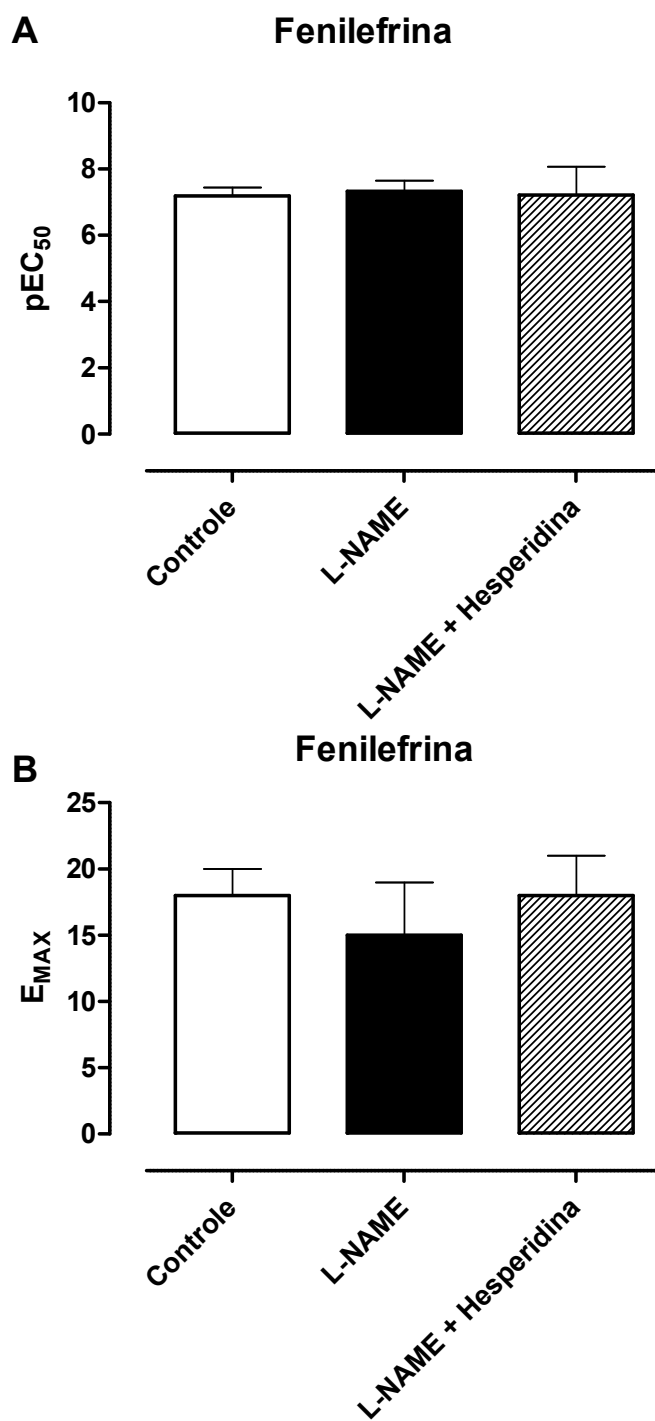


Figura 13. Potência (A) e resposta máxima (B) da fenilefrina em anéis de aorta de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais.

5.2 Avaliação do estado oxidativo

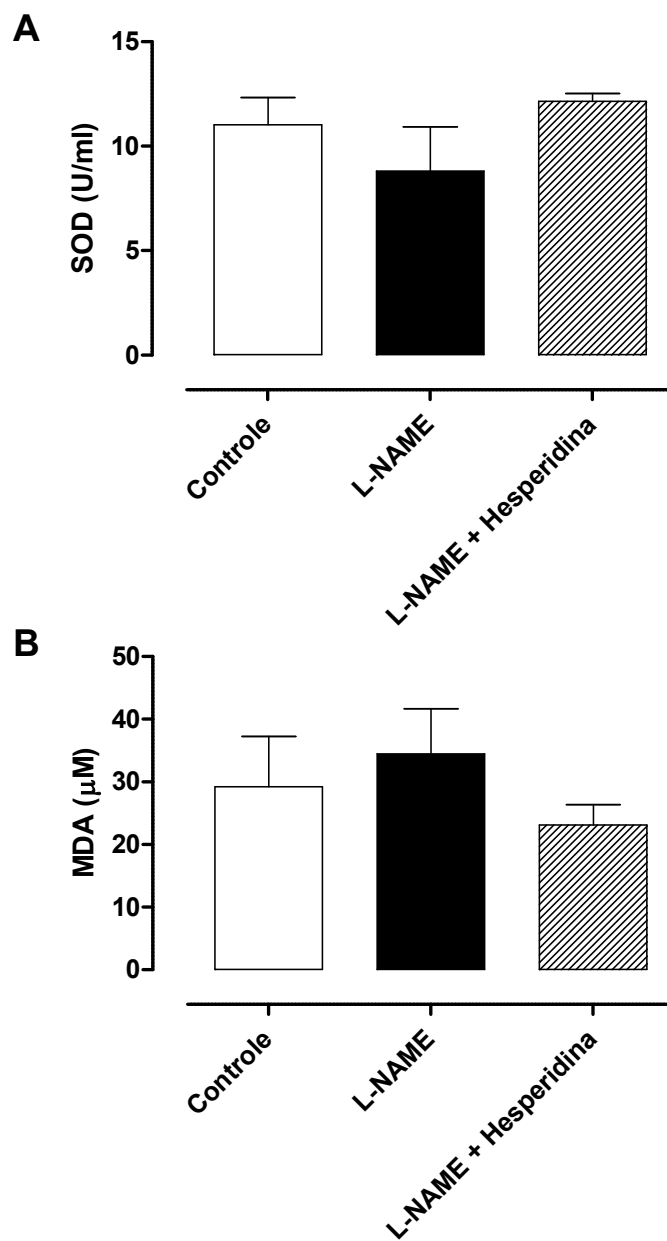


Figura 14. Atividade plasmática da SOD (A) e índice de peroxidação lipídica avaliado pela concentração plasmática de MDA (B) em amostras de plasma de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média \pm E.P.M para 3 ou 4 animais.

A figura 14 mostra a atividade da SOD e a concentração de MDA dosados no plasma dos grupos estudados. Não houve alteração significativa da atividade da SOD ou da concentração de MDA em nenhum dos 3 grupos estudados.

5.3 Avaliação da função renal e hepática

A figura 15 mostra os níveis plasmáticos de ureia e albumina, como marcadores da função renal e hepática dos 3 grupos estudados. Não houve alteração significativa dos níveis plasmáticos de ureia e albumina em nenhum dos 3 grupos estudados.

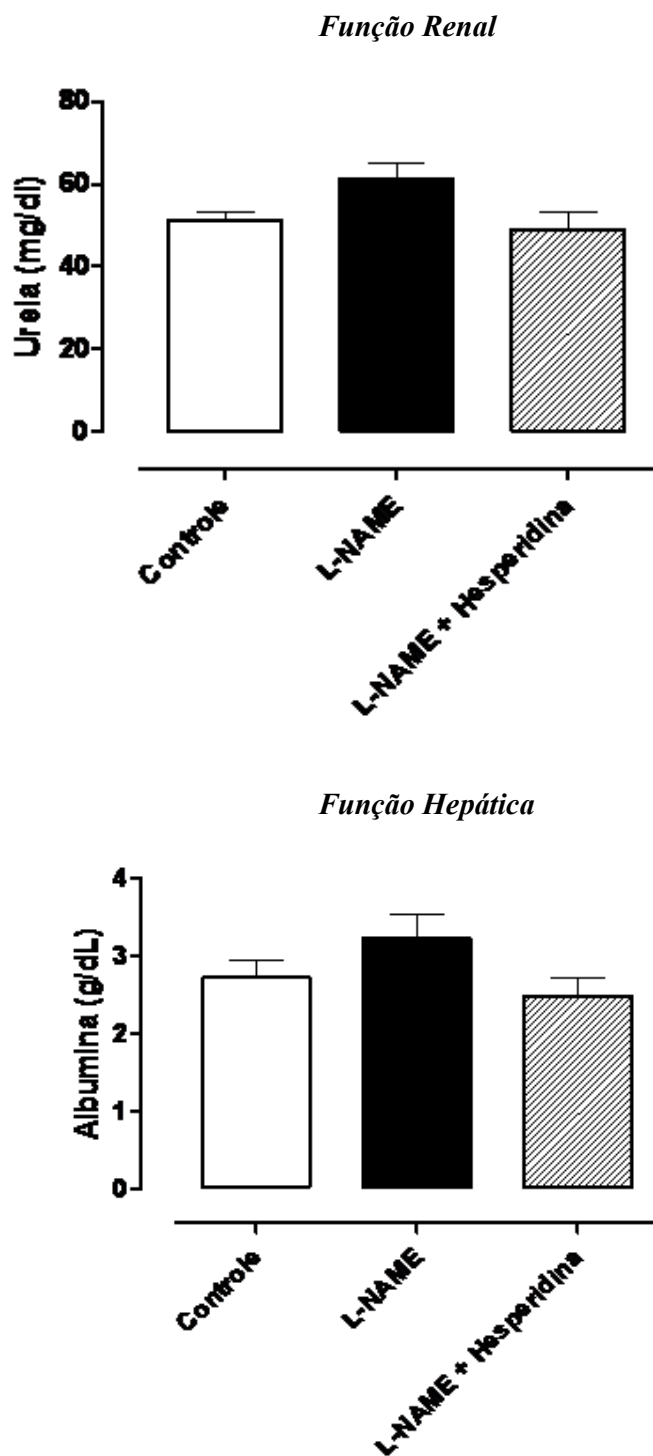


Figura 15. Concentração plasmática de ureia e albumina em amostras de plasma de ratos controle ou submetidos à administração aguda de L-NAME ou L-NAME + Hesperidina. Os dados representam a média + E.P.M para 3 ou 4 animais.

6. DISCUSSÃO

A hipertensão arterial é um problema de saúde pública, associada a desordens orgânicas. Diversos trabalhos associam estas desordens à ação das espécies reativas de oxigênio. Por esta razão, o consumo de substâncias antioxidantes torna-se cada vez mais comum para a prevenção de danos teciduais decorrentes do estresse oxidativo. Neste estudo, o objetivo foi avaliar o efeito protetor da hesperidina, administrada concomitantemente ao bloqueio da síntese de NO nas primeiras 24 horas após a administração das drogas. Dados da literatura mostram que, em ratos, após 1 semana do bloqueio da síntese de NO ocorre grande aumento da pressão arterial e esta se mantém elevando durante períodos subsequentes de estudo (RIBEIRO et al., 1992; ZANFOLIN et al., 2006). No nosso estudo, pudemos observar que apenas 24 horas após o bloqueio com o L-NAME ocorreu redução significativa da resposta máxima induzida pela acetilcolina, sem afetar sua potência. Este resultado é o esperado, uma vez que o NO é potente vasodilatador e o bloqueio agudo (*in vitro*) ou crônico da síntese de NO acarreta em redução da vasodilatação induzida por acetilcolina (PRIVIERO et al., 2005; PRIVIERO et al., 2007). Por outro lado, a administração concomitante da hesperidina preveniu a redução da resposta máxima à acetilcolina, sugerindo um papel protetor da hesperidina. Corroborando nossos dados, estudo recente mostra que um dos metabólitos da hesperidina, a hesperitina 7-O – glicoronida, tem efeito vasodilatador e atividade antiinflamatória, diminuindo a expressão de moléculas de adesão e proteínas quimioatrativas de monócitos (YAMAMOTO et al., 2013a). Similarmente, outro estudo mostrou que a administração crônica de hesperidina por 8 semanas preveniu a hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos, efeito associado a uma atividade antioxidante e antiinflamatória, uma vez que inibiu a expressão gênica de NADPH oxidase e da sintase do tromboxano A₂, respectivamente (YAMAMOTO et al., 2013b).

Por outro lado, o relaxamento independente de endotélio, induzido pelo SNP (doador de NO) foi significativamente mais potente na aorta dos animais que receberam L-NAME isoladamente quando comparado ao grupo controle. Controversamente, estudos mostram que em situações onde há redução dos níveis basais de NO por causas patológicas ou induzidas por fármaco ocorre a redução ou não há alteração de potência e/ou resposta máxima aos

diferentes doadores de NO utilizados experimentalmente (BRAGA et al., 2015; ZECCHIN et al., 2007; PRIVIERO et al., 2007). No entanto, é possível que o bloqueio da síntese do NO tenha produzido um aumento da sensibilidade da sGC ao estímulo exógeno de NO gerado pelo doador de NO e é possível que à medida que o organismo se adapta à deficiência de NO, a sensibilidade da sGC volte aos seus níveis basais mantendo a resposta ao doador de NO igual ao observado em grupos controles. Por outro lado, a hesperidina preveniu parcialmente o aumento da potência do SNP, o que sugere que este aumento da potência nos animais do grupo L-NAME esteja associado às alterações da biodisponibilidade de NO.

Além das respostas relaxantes, neste estudo também avaliamos a contração induzida pela fenilefrina. Observamos que não houve alteração nas respostas contráteis de nenhum dos grupos estudados. Os dados da literatura são controversos em relação às respostas contráteis e quadros de redução da biodisponibilidade de NO. Ao contrário do nosso trabalho, estudo recente mostrou que a resposta contrátil à fenilefrina foi significativamente aumentada em ratos obesos, e este aumento foi prevenido pelo tratamento com a curcumina, devido às suas ações antioxidantes (MAHMOUD et al., 2014). As divergências encontradas na literatura podem variar em função do tempo de tratamento de cada estudo. Neste trabalho, é possível que a ausência de alteração funcional para a contração induzida por fenilefrina seja devido ao curto período/tempo de administração da droga.

A fim de avaliar alterações no estado oxidativo após 24 horas da administração das drogas, fizemos a dosagem da atividade plasmática da SOD e dos níveis plasmáticos de MDA (que reflete a peroxidação lipídica e, portanto, é utilizado como marcador da atividade pró-oxidante). Não houve alteração significativa dos níveis plasmáticos de MDA e da atividade da SOD. Diversos estudos correlacionam a redução dos níveis de NO disponível para as funções fisiológicas com o nível de estresse oxidativo. Em ratos espontaneamente hipertensos, a atividade da SOD encontra-se reduzida, bem como o estado antioxidante total (PRIVIERO et al., 2009). Dados similares mostram que substâncias com ação antioxidante reduzem a expressão das subunidades de NADPH oxidase, o que é sugestivo de níveis aumentados do estresse oxidativo (YAMAMOTO et al., 2013b). No entanto, no nosso estudo, embora o efeito da administração do L-NAME tenha sido feito para dose única e com duração de 24 horas, é possível observar uma tendência de aumento da concentração de MDA plasmático,

bem como a redução da atividade plasmática da SOD, e esta tendência não é observada quando os animais são tratados concomitantemente com a hesperidina. Portanto, é possível que este dado tendencioso de uma alteração no estado oxidativo, seja apenas o começo das respostas que levam ao quadro de estresse oxidativo. No entanto, a ausência de alteração no estado oxidativo durante este período de 24 horas sugere que o efeito protetor da hesperidina esteja associado a outros efeitos deste composto, além de seu efeito antioxidante. Como estudos anteriores demonstraram, além da atividade antioxidante, este composto possui efeito antiinflamatório e vasodilatador (YAMAMOTO et al., 2013a, 2013b).

Adicionalmente, avaliamos a função renal e hepática dos ratos através da dosagem sérica de uréia e albumina, respectivamente. Durante o período estudado, não houve alteração expressiva nos níveis séricos de uréia e/ou albumina, sugerindo que ao menos no início do bloqueio da síntese de NO e da administração da hesperidina, a função renal e hepática são preservadas e que a administração da hesperidina não causa lesão/disfunção para estes órgãos. Os dados da literatura mostram que a hesperidina tem efeito protetor para os rins (KAMEL et al., 2014; SAHU et al., 2013; ANANDAN; SUBRAMANIAN, 2012) bem como para o fígado (MAHMOUD, 2014; LI et al., 2014; ELSHAZLY; MAHMOUD, 2014), sugerindo que se o tratamento fosse prolongado, a administração de hesperidina poderia ter um efeito protetor benéfico para os rins e fígado contra os efeitos do bloqueio da síntese de NO sobre estes órgãos.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos dados mostram que a hesperidina preveniu parcialmente a redução do relaxamento vascular induzido pela inibição da síntese de NO, efeito que não parece estar ligado às suas propriedades antioxidantes. É possível que seja devido à sua atividade antiinflamatória e/ou vasodilatadora. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos protetores envolvidos na ação da hesperidina sobre os danos vasculares produzidos em 24 horas de inibição da síntese de NO.

REFERÊNCIAS

- AMEER, B.; WEINTRAUB, R. A.; JOHNSON, J. V.; YOST, R. A.; ROUSEFF, R. L. Flavone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. **Clinic Pharmacology and Therapeutics**, v.60, n. 1, p. 34-40, 1996.
- ANANDAN, R.; SUBRAMANIAN, P. Renal protective effect of hesperidin on gentamicin-induced acute nephrotoxicity in male Wistar albino rats. **Redox Rep**, v. 17, n. 5, p. 219-226, 2012.
- ANITHA NANDHINI, A. T.; THIRUNAVUKKARASU, V.; ANURADHA, C. V. Potential role of kinins in the effects of taurine in high-fructose-fed rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 82, n. 1, 2004.
- BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BEHLING, E.; SENDÃO, M.; FRANCESCATO, H.; ANTUNES, L.; BIANCHI, M. Flavonóide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BENAVENTE-GÁRCIA, O; CASTILLO, J; MARIN, FR; ORTUÑO, A; DEL RIO, J. A. Uses and Properties of Citrus Flavonoids. **J. Agric. Food Chem**, v. 45, p. 4505-4515, 1997.
- BENAVENTE-GÁRCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, n. 15, p.6185-6205, 2008.
- BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.47, n. 3, p. 233-261, 1996.
- BIVALACQUA, T. J., CHAMPION, H. C.; USTA, M. F. et al. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. **PNAS**, v. 101, n. 24, p. 9121 -9126, 2004.
- BORENSTEIN, M. **Manual de Hipertensão**. Organizadora – Porto Alegre: Editora Sagra Luzzalto, cap. 3, 1999.
- BRAGA, V. A.; COUTO, G. K.; LAZZARIN, M. C.; ROSSONI, L. V.; MEDEIROS, A. Aerobic Exercise Training Prevents the Onset of Endothelial Dysfunction via Increased Nitric Oxide Bioavailability and Reduced Reactive Oxygen Species in an Experimental Model of Menopause. **PLoS One**, v.10, n.4, p. e0125388, 2015.
- BULOW, J; MADSEN, J; HOJGAARD L. Reversibility of the effects on local circulation of high lipid concentrations in blood. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 50, n. 3, p. 291-296, 1990.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 22, n. 55, p. 749-760, 1997.

SBC - SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão.** v. 1, p. 1-40, 2010.

CHANG, S; HYPOLITE, J. A.; DISANTO, M. E. et al. Increased basal phosphorylation of detrusor smooth muscle myosin in alloxan-induced diabetic rabbit is mediated by upregulation of Rho-kinase beta and CPI-17. **Am. J. Physiol.**, v. 290, n.3, p. F650-656, 2006.

CHANG, S; HYPOLITE, J. A; ZDERIC, S. A. et al. Increased corpus cavernosum smooth muscle tone associated with partial bladder outlet obstruction is mediated via Rho-kinase. **Am. J. Physiol.**, v. **289**, n. **2**, p. **R1124- 1130**, 2005.

CHITALEY, K; WEBB, R. C.; DORRANCE, A. M. et al. Decreased penile erection in DOCA-salt and stroke prone-spontaneously hypertensive rats. **Int. J. Impot. Res.**, v. 13, n.5, p. 16-20, 2001

DE GROOT, H. Reactive oxygen species in tissue injury. **Hepatogastroenterology**, v.41, n. 4, p.328-332, 1994.

DONNELLY, R; REED, M. J.; AZHAR, S; REAVEN, G. M. Expression of the major isoenzyme of protein kinase-C in skeletal muscle, nPKC theta, varies with muscle type and in response to fructose-induced insulin resistance. **Endocrinology**, v.135, n. 6, p. 2369, 1994.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T. et.al. Flavonóides: Potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007

DUBICK, M. A.; OMAYE, S. T. Modification of atherogenesis and heart disease by grape wine and tea polyphenols. In: WILDMAN, R. E. C. (org). **Handbook of Nutraceutical and Functional Food.** Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 143-153.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

ELSHAZLY, S. M.; MAHMOUD, A. A. Antifibrotic activity of hesperidin against dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol**, v. 387, n. 6, p. 559-567, 2014.

ERLUND, I.; MERIRINNE, E.; ALFTHAN, G.; ARO, A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanonas naringenina and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. **J. Nutr.**, v.131, n. 2, p. 235-241, 2001.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenina. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutr. Res.**, v. 24, n. 10, p. 851- 874, 2004.

GRACE, P. A. Ischaemia-reperfusion injury. **Br. J. Surgery**, v. 81, n.5, p. 637-647, 1994.

GRASSI, D.; LIPPI, C.; NECOZIONE, S. et al. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81, n. 3, p. 611-614, 2005.

HARTSHORNE, D. J. Biochemistry of the contractile proteins in smooth muscle. In: JOHNSON L.R. (Org) **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press, 1987. p. 423-482.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol.**, v.32, n.7, p. 1141-1148, 1983.

HOOPER, L.; KROON, P.A.; RIMM, E. B. et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 88, n.1, p. 38-50, 2008.

JENKINS, R. R. Free radical chemistry: Relationship to exercise. **Sports Medicine**, v. 5, n. 3, p. 156-170, 1988.

JIMENEZ, J. P; CALIXTO, F. S. Grape products and cardiovascular disease risk factors. **Nutr Research Reviews**, v. 21, n.2, p. 158-173, 2008.

JIN, L.; YING, Z.; HILGERS, R. H.; et al. Increased RhoA/Rho-kinase signaling mediates spontaneous tone in aorta from angiotensin II-induced hypertensive rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 318, n.1, p. 288 - 295, 2006.

JOINT NATIONAL COMMITTEE. **The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure**. Bethesda: NHLBI, 1997, p. 98-4080.

KAMEL, K. M.; ABD EL-RAOUF, O. M.; METWALLY, S. A.; ABD EL-LATIF, H. A.; EL-SAYED M. E. Hesperidin and rutin, antioxidant citrus flavonoids, attenuate cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 28, n. 7, p.312-319, 2014.

KNEKT, P.; KUMPULAINEN, J.; JÄRVINEN, R. et al. Flavonoid intake and risk of chronic disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, n. 3, p. 560-568, 2002.

KRIEGER, E.; FRANCHINI, K.; KRIEGER, J. Fisiopatogenia da Hipertensão Arterial. **Medicina**, v. 29, p. 181-192, 1996.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HO, C. Y.; FOSMIRE, M. A. The effect of dietary fat saturation on plasma and hepatic lipoproteins in the rat. **J. Nutr.**, v.114, n.9, p.1675-1682, 1984.

KUROWSKA, E. M.; MANTHEY, J. A. Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamster with diet-induced hypercholesterolemia. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 10, p. 2879-2886, 2004.

- LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Resumo: Radicais livres, antioxidante e nutrição. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.
- LI, G.; CHEN, M. J.; WANG, C. et al. Protective effects of hesperidin on concanavalin A-induced hepatic injury in mice. **Int. Immunopharmacol.**, v. 21, n. 2, p. 406-411, 2014.
- LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonóides. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 17, p. 18-22, nov/dez 2000.
- MAHMOUD, A. M. Hesperidin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by upregulation of PPAR γ and abrogation of oxidative stress and inflammation. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 92, n. 9, p.717-724, 2014.
- MAHMOUD, M. F.; EL BASSOSSY, H. M. Curcumin attenuates fructose-induced vascular dysfunction of isolated rat thoracic aorta rings. **Pharm. Biol.**, v. 52, n. 8, p.972-977, 2014.
- MANTHEY, J. A.; GUTHRIE, N.; GROHMANN, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, n. 2, p. 135- 153, 2001.
- MINETTO, C. N. Flavonóides na doença cardiovascular. **Alimentação Humana**, v. 15, n. 3, p. 61-65, 2009.
- NOBE, K.; YAMAZAKI, T.; KUMAI, T. et al. Alterations of glucose-dependent and - independent bladder smooth muscle contraction in spontaneously hypertensive and hyperlipidemic rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.324, n. 2, p. 631-642, 2008.
- NOBE, K.; YAMAZAKI, T.; TSUMITA, N. et al. Glucose-dependent enhancement of diabetic bladder contraction is associated with a rho kinase-regulated protein kinase C pathway. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 328, n. 3, p. 940-950, 2009.
- NOBRE, F.; COELHO, E.; LOPES, P.; GELEILETE, T. Hipertensão arterial sistêmica primária. **Medicina**, v. 46, n. 3, p. 256-272, 2013.
- PAL, Y. B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**, v. 74, n.1, p. 139-162, 1994.

- PANDOLFI, A.; DE FILIPPIS, E. A. Chronic hyperglycemia and nitric oxide bioavailability play a pivotal role in pro-atherogenic vascular modifications. **Genes Nutr.**, v. 2, n. 2, p. 195 - 208, 2007.
- PANDOLFI, A.; GRILLI, A.; CILLI, C. et al. Phenotype modulation in cultures of vascular smooth muscle cells from diabetic rats: association with increased nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation. **J. Cell Physiol.**, v. 196, n. 2, p. 378 - 385, 2003.
- PETERS, S. L.; SCHMIDT, M.; MICHEL, M. C. Rho kinase: a target for treating urinary bladder dysfunction?. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 27, n. 9, p. 492-497, 2006.
- PINTO, P. C.; FELIZ, T.; RODRIGUES, L. M. Acerca do impacto da administração transdérmica de um inibidor da NO-sintetase (L-NAME) – uma abordagem preliminar. **Rev. Lusófona de Ciências e Tecnológica da Saúde**, v. 2, p. 246-252, 2009.
- PRIVIERO, F. B.; BARACAT, J. S.; Teixeira, C. E.; CLAUDINO, M. A.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Mechanisms underlying relaxation of rabbit aorta by BAY 41-2272, a nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase activator. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 32, n. 9, p. 728-734, 2005.
- PRIVIERO, F. B.; TEIXEIRA, C. E.; TOQUE, H. A. et al. Vasorelaxing effects of propranolol in rat aorta and mesenteric artery: a role for nitric oxide and calcium entry blockade. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 33, n. 5-6, p.448-455, 2006.
- PRIVIERO, F. B.; TEIXEIRA, C. E.; CLAUDINO, M. A.; DE NUCCI, G.; ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Vascular effects of long-term propranolol administration after chronic nitric oxide blockade. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 571, n. 2-3, p. 189-196, 2007.
- PRIVIERO, F. B.; ZEMSE, S. M.; TEIXEIRA, C. E.; WEBB, R. C. Oxidative stress impairs vasorelaxation induced by the soluble guanylyl cyclase activator BAY 41-2272 in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Hypertens.**, v. 22, n.5, p. 493-499, 2009.
- RAJASEKAR, P.; PALANISAMY, N.; ANURADHA, C. V. Increase in nitric oxide and reductions in blood pressure, protein kinase C beta II and oxidative stress by L-carnitine: a study in the fructose-fed hypertensive rat. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 29, n.8, p. 517-530, 2007.
- RAJASEKARAN, M.; WILKES, N.; KUNTZ, S.; ALBO, M. Rho-kinase inhibition suppresses bladder hyperactivity in spontaneously hypertensive rats. **Neurourol. Urodyn.**, v. 24, n.3, p. 295-300, 2005.
- RAMIREZ-TORTOZA, C.; ANDERESSEN, O. M.; GARDNER, P. T.; MORRICE, P. C.; WOOD, S. G.; DUTHIE, S. J.; COLLINS, A. R.. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 31, n. 8, p. 1033-1037, 2001.

- RIBEIRO, M. O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S. M.; ZATZ, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension**, v. 20, n. 3, p.298-303, 1992.
- RICE-EVAN, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci.**, v. 2, p. 152-159, 1997.
- ROMERO, F. J.; BOSCH-MORELL, F.; ROMERO, M. J.; JAREÑO, E. J.; ROMERO, B.; MARÍN, N.; ROMÁ, J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. **Environ. Health Perspect.**, v. 106, n.5, p. 1229-1234, 1998.
- SAHU, B. D.; KUNCHA, M.; SINDHURA, G. J; SISTLA, R. Hesperidin attenuates cisplatin-induced acute renal injury by decreasing oxidative stress, inflammation and DNA damage. **Phytomedicine**, v.20, n. 5, p.453-460, 2013.
- SANBONGI, C.; SUZUKI, N.; SAKANE, T. Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans in vitro. **Cell Immunol.**, v. 177, n.2, p. 129-136, 1997.
- SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismo de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v.10, n. 4, p. 308-313, 2004.
- SHAH, D. I.; SINGH, M. Involvement of Rho-kinase in experimental vascular endothelial dysfunction. **Mol. Cell Biochem.**, v. 283, n. 1-2, p. 191-199, 2006.
- SIES, H. **Chemistry International**. Ed. England, v. 25, p. 1058-1071, 1986.
- SIVAM, G. Analysis of flavonoids. In: HURST, W. J. (ed.). **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 350.
- SOUZA, L. F. **Radicais Livres e poluição aquática**. Slideplayer.com.br/slide/1584529. Acesso em: 21/03/2015 as15h00min.
- VINCENTINO, A. R. R.; SOUSA, F. M.; Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 384-387, 2007.
- WAIB, P. H.; BURINI, R. C. Fundamentos bioquímicos da modulação do tono muscular. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 56, n.5, p. 407-412, 1991.
- WALLE, T.; WALGREN, R. A.; WALLE, U. K.; GALIJATOVIC, A.; VAIDYANATHAN, J. B. Understanding the bioavailability of flavonoids through studies in Caco-2 cells. In: RICE-EVANS C.; PACKER L. (Orgs.). **Flavonoids in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 2003. p. 349-362.
- WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 27, n. 1-4, p. 201-206, 2003.

XAVIER-VIDAL, R.; MIDAL, K. A hipertensão arterial e a hipertrofia cardíaca com ênfase no uso experimental de bloqueadores da síntese do óxido nítrico: uma breve revisão. **Revista Unimar**, v. 19, n. 2, p.593-610, 1997.

YAMADA, M.; TANABE, F.; ARAI, N et al. Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 70, n. 6, p. 1386-1394, 2006.

YAMAMOTO, M.; JOKURA, H.; HASHIZUME, K. et al. Hesperidin metabolite hesperetin-7-O-glucuronide, but not hesperetin-3'-O-glucuronide, exerts hypotensive, vasodilatory, and anti-inflammatory activities. **Food Funct.**, v. 4, n. 9, p.1346-1351, 2013a.

YAMAMOTO, M.; JOKURA, H.; SUZUKI, A.; HASE, T.; SHIMOTOYODOME, A. Effects of continuous ingestion of hesperidin and glucosyl hesperidin on vascular gene expression in spontaneously hypertensive rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol**, v. 59, n. 5, p.470-473, 2013b.

YAMAMOTO, M.; SUZUKI, A.; HASE, T. Short- term effect of glucosyl hesperidin and hesperitina on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 54, p. 95-98, 2008.

YANG, H. L.; CHEN, S. C.; KUMAR, K. J. S. et al. Antioxidant and anti inflammatory potential of hesperitina metabolites obtained from hesperitina administered rat serum: an ion vivo approach. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, n.1, p. 522-552, 2012.

YING, Z.; JIN, L.; DORRANCE, A. M.; WEBB, R. C. Increased expression of mRNA for regulator of G protein signaling domain-containing Rho guanine nucleotide exchange factors in aorta from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Hypertens.**, v. 17, p. 981-985, 2004.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Óxido Nítrico, doenças cardiovasculares e exercícios físico. **Arq. Bras. Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. e264 –e270, 2006.

ZANFOLIN M.; FARO, R.; ARAUJO, E. G.; GUARALDO, A. M.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart, and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 47, n. 3, p.391-395, 2006.

ZECCHIN, H. G.; PRIVIERO, F. B.; SOUZA, C. T. et al. Defective insulin and acetylcholine induction of endothelial cell-nitric oxide synthase through insulin receptor substrate/Akt signaling pathway in aorta of obese rats. **Diabetes**, v.56, n. 4, p.1014-1024, 2007.