

**EFEITOS DA METFORMINA E DE ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3  
SOBRE PARÂMETROS AUTONÔMICOS E VASCULARES  
EM RATOS HIPERTENSOS**

**PHABLO WENDELL COSTALONGA OLIVEIRA**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Vitória, 2018**

PHABLO WENDELL COSTALONGA OLIVEIRA

**EFEITOS DA METFORMINA E DE ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 SOBRE  
PARÂMETROS AUTONÔMICOS E VASCULARES EM RATOS HIPERTENSOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Nazaré Souza Bissoli.

VITÓRIA

2018

Oliveira, Phablo Wendell Costalonga

Efeitos da metformina e de ácidos graxos ômega-3 sobre parâmetros autonômicos e vasculares em ratos hipertensos [Vitória] 2018.

110 p., 29,7 cm (UFES, Dr. Ciências Fisiológicas, 2018).

Orientadora: Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Hipertensão; 2. Metformina; 3. Ômega-3; 4. Controle Autonômico Cardíaco;  
5. Barorreflexo; 6. Reatividade Vascular; 7. Estresse Oxidativo; 8. Inflamação.

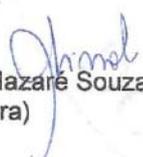


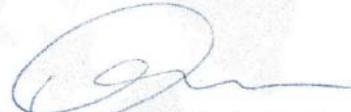
**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DO CANDIDATO AO  
TÍTULO DE DOUTOR PELO PPGCF/CCS/UFES**

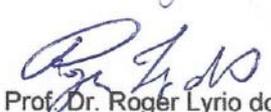
**Nº Matrícula do(a) Candidato(a): 2014140313**

A Comissão Julgadora que examinou a Tese de Doutorado, intitulada **“Efeitos da metformina e de ácidos graxos ômega-3 sobre parâmetros autonômicos e vasculares em ratos hipertensos”**, apresentada e defendida publicamente pelo aluno **Phablo Wendell Costalonga Oliveira**, no dia 18 de maio de 2018, às 14h00, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de Doutorado e, portanto, declara que o aluno faz jus à obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

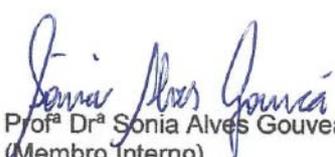
Vitória – ES, 18 de maio de 2018.

  
Profª Drª Nazare Souza Bissoli  
(Orientadora)

  
Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo  
(Membro Externo)

  
Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos  
(Membro Interno)

  
Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade  
(Membro Externo)

  
Profª Drª Sonia Alves Gouvea  
(Membro Interno)

  
Profª Drª Suely Gomes de Figueiredo  
(Membro Interno)

## DEDICATÓRIA

À Deus,

Que me sustentou até aqui. Que em meus momentos de solidão me fez sentir que eu não estava só. Eu senti a sua presença, foi real. Quando já não podia fazer mais nada por minhas próprias forças, você foi minha força e não me permitiu cair.

Que pela ciência possamos ajudar a sanar as dores dos que sofrem e auxiliar na construção de um mundo melhor. Que pela educação possamos transformar a nossa sociedade. Usa-me como instrumento de tua vontade. Se devemos amar uns aos outros, fazer ciência e educação é uma forma de amar as pessoas.

“Ainda que eu.. conhecesse.. toda a ciência, sem amor, eu nada seria” (1 Coríntios 13:2).

## AGRADECIMENTOS

A todos que de alguma forma tornaram possível esse trabalho.

À minha amiga e orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Nazaré Souza Bissoli, que a referencio nessa ordem, pela boa relação que criamos ao longo dessa caminhada, num esforço mutuo de melhora, pautado nos bons ideais e no olhar humano. Sou grato, pois isso fez toda a diferença. Obrigado pelos grandes ensinamentos e por toda a orientação.

A todos os companheiros de laboratório, que se sintam abraçados na exata medida do bem e da amizade que propagaram. Sou grato, e espero poder corresponder. E toda a “velha guarda” do laboratório: Karine, Aline, Izabela, Ana Raquel.

Agradeço a ex-aluna de iniciação científica, que passado o tempo agora está em rumo de se formar doutora, Glauciene Januário, pela parceria nessa caminhada.

Agradeço e expresso aqui meu carinho e admiração pela minha “irmã” de coração, Polyana Dalpiaz. Sua amizade é fundamental, sendo luz em dias nublados.

Aos Professores do PPGCF (Roger, Suely, Sônia, Hélder, Margareth, e os demais) e os de toda a vida (desde a alfabetização), e a todos que me ensinaram algo na vida.

A todos os funcionários que mantem esse programa de pós-graduação funcionando.

À população Brasileira, que mesmo talvez não sabendo, através de seus impostos, sustentam toda essa estrutura de ensino da qual eu felizmente usufruí. Que mesmo na crise que vive nosso país, com tantas demandas a serem atendidas, nós ainda estamos aqui, apesar das restrições e dificuldades que a educação e a ciência enfrentam no Brasil. Obrigado CAPES, CNPq, FAPES (0581/2015) e UFES.

E a todos os amigos e aqueles que de alguma forma torceram por mim.

O momento de defesa de uma Tese de doutorado é algo especial, mas de modo algum é capaz de expressar toda a vivencia e o aprendizado dessa jornada.

Aqui deixo a minha Tese, mas o que levo comigo é muito maior do que isso.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1	PREJUÍZO AUTONÔMICO NA HAS.....	18
1.2	DISFUNÇÃO VASCULAR NA HAS.....	22
1.3	TERAPÊUTICA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	26
<b>1.3.1</b>	<b>Metformina e seus efeitos no sistema cardiovascular.....</b>	<b>27</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Ácidos graxos ômega-3 e seus efeitos no sistema cardiovascular... </b>	<b>29</b>
1.4	O MODELO SHR E A HIPÓTESE A SER INVESTIGADA.....	32
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	34
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	35
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	35
3.3	TRATAMENTO DOS GRUPOS.....	35
3.4	DROGAS E TRATAMENTOS.....	36
3.5	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	36
3.6	ANESTESIA E EUTANÁSIA.....	38
3.7	PLETISMOGRAFIA DE CAUDA.....	38
3.8	MEDIDA DE GLICEMIA PLASMÁTICA.....	39
3.9	IMPLANTAÇÃO DE CATETERES NA ARTÉRIA E VEIA FEMORAL.....	39
3.10	AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA...	39
3.11	AVALIAÇÃO DO BARORREFLEXO ESPONTÂNEO.....	40
3.12	AVALIAÇÃO DO BARORREFLEXO INDUZIDO.....	40
3.13	AVALIAÇÃO DO CONTROLE AUTONÔMICO CARDÍACO.....	41
3.14	REATIVIDADE DO LEITO VASCULAR MESENTÉRICO.....	43
3.15	DOSAGEM DE TNF $\alpha$ POR ELISA.....	44
3.16	WESTERN BLOT.....	44
3.17	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
4.1	PESO, PRESSÃO ARTERIAL, FREQUÊNCIA CARDÍACA E GLICEMIA.....	46

4.2	CONTROLE AUTONÔMICO CARDÍACO.....	48
4.3	BARORREFLEXO ESPONTÂNEO.....	50
4.4	BARORREFLEXO INDUZIDO.....	50
4.5	RESPOSTA VASCULAR À NORADRENALINA.....	52
4.6	DOSAGEM DE TNF $\alpha$ PLASMÁTICO.....	55
4.7	EXPRESSÃO PROTEICA DE NOX2 E SOD1 NO CORAÇÃO.....	56
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
5.1	EFEITO DA METFORMINA SOBRE PARÂMETROS BASAIS E AUTONÔMICOS.....	60
5.2	EFEITO DOS ÔMEGAS-3 SOBRE PARÂMETROS BASAIS E AUTONÔMICOS.....	66
5.3	EFEITO DA METFORMINA SOBRE PARÂMETROS VASCULARES...	74
5.4	EFEITO DOS ÔMEGAS-3 SOBRE PARÂMETROS VASCULARES.....	79
5.5	EFEITOS DOS TRATAMENTOS SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TNF $\alpha$ E A EXPRESSÃO PROTEICA DE NOX2 E SOD1 NO CORAÇÃO.....	84
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS

<b>Quadro 1.</b> Classificação da pressão arterial em adultos por medida no consultório. Valores de referência no Brasil e nos EUA.....	17
<b>Tabela 1.</b> Peso corporal inicial e final, pressão arterial sistólica (PAS) inicial e final, e frequência cardíaca (FC) e glicemia ao final do período de tratamento de 30 dias.....	48
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros da reatividade vascular mesentérica: sensibilidade (-log EC50: pD2) e resposta máxima (R <sub>máx</sub> ) da curva dose-resposta à noradrenalina.....	55
<b>Figura 1.</b> Mecanismos básicos de controle autonômico cardíaco.....	21
<b>Figura 2.</b> Mecanismos básicos de função vascular.....	25
<b>Figura 3.</b> Resposta típica barorreflexa à redução e ao aumento de pressão arterial.....	41
<b>Figura 4.</b> Representação gráfica da avaliação do tônus simpático e parassimpático.....	42
<b>Figura 5.</b> Registro típico de reatividade vascular mesentérica à noradrenalina.	44
<b>Figura 6.</b> Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre a glicemia plasmática ao final do período de tratamento.....	46
<b>Figura 7.</b> Efeitos dos tratamentos sobre pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC).....	47
<b>Figura 8.</b> Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre o controle autonômico da frequência cardíaca.....	49
<b>Figura 9.</b> Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre a resposta barorreflexa espontânea (SBR <sub>e</sub> ).....	50
<b>Figura 10.</b> Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre a função barorreflexa induzida (SBR <sub>i</sub> ) em resposta a fenilefrina.....	51
<b>Figura 11.</b> Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre a função barorreflexa induzida (SBR <sub>i</sub> ) em resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS).....	52
<b>Figura 12.</b> Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre a curva dose-resposta de vasoconstrição induzida por noradrenalina (NOR) no leito vascular mesentérico, em ausência de inibidores farmacológicos.....	53

<b>Figura 13.</b> Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre a curva dose-resposta de vasoconstrição induzida por noradrenalina (NOR) no leito vascular mesentérico, em presença de L-NAME.....	53
<b>Figura 14.</b> Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre a curva dose-resposta de vasoconstrição induzida por noradrenalina (NOR) no leito vascular mesentérico, em presença de indometacina.....	54
<b>Figura 15.</b> Efeitos da metformina e dos ômega-3 nos níveis plasmáticos da citocina inflamatória TNF $\alpha$ .....	55
<b>Figura 16.</b> Efeitos da metformina e dos ômega-3 na expressão da proteína pró-oxidante NOX2 nos corações.....	56
<b>Figura 17.</b> Efeitos da metformina e dos ômega-3 na expressão de proteínas antioxidante SOD1 nos corações.....	57
<b>Figura 18.</b> Gráfico resumo do estudo, dos principais resultados e mecanismos propostos.....	90

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

- ACh – Acetilcolina
- ALA – Ácido alfa-linolênico.
- AMPK – Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina.
- ANGII – Angiotensina II.
- ARA – Ácido araquidônico.
- AVE – acidente vascular encefálico.
- BKCa – Canais para potássio de larga condutância ativados por cálcio.
- bpm – Batimentos por minuto.
- CAT – Catalase.
- COX – Ciclooxigenase.
- CV – Cardiovascular.
- CVLM – Bulbo ventrolateral caudal.
- DCV – Doenças cardiovasculares.
- DHA – Ácido docosahexaenoico.
- DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2.
- DMN – Núcleo motor dorsal.
- ECA – Enzima conversora de angiotensina.
- EDCF – Fatores constritores derivados do endotélio.
- EDHF – Fator hiperpolarizante derivado de endotélio.
- ELISA – *Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay*
- ELSA-Brasil – Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto.
- eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial.
- EPA – Ácido eicosapentaenoico.
- ERK – Quinase regulada por sinal extracelular.
- EUA – Estados Unidos da América.
- FC – Frequência cardíaca.
- FHS – Framingham *Heart Study*.
- GBD – *Global Burden of Disease, Injuries, and Risk Factor study*.
- GISSI – *Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardio*.
- GMPc – Monofosfato de guanossina 3'5' cíclico.
- GPX – Glutaciona peroxidase.

GSH – Glutathiona reduzida.

HAS – Hipertensão arterial sistêmica.

ICV – Intracerebroventricular.

IL6 – Interleucina 6.

IML – Coluna intermédio lateral.

INDO – Indometacina.

IP – Intervalo de pulso.

KV canais de potássio voltagem-dependentes (KV).

LA – Ácido linoleico.

L-NAME – N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster.

LOX – Lipoxigenase.

LPS – Lipopolissacarídeo.

LVM – Leito vascular mesentérico.

MLV – Musculo liso vascular.

MRFIT – *Multiple Risk Factor Intervention Trial*.

MSG – Glutamato monossódico.

MSNA – Atividade nervosa simpática muscular.

MSNA a atividade nervosa simpática muscular (MSNA)

MUFA – Ácidos graxos monoinsaturados.

NA – Núcleo ambíguo.

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido

NF $\kappa$ B – Fator nuclear *kappa* B.

NO – Óxido nítrico.

NOR – Noradrenalina.

NOS – Óxido nítrico sintase.

NOX – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido (NADPH) - oxidase.

NPS – Nitroprussiato de sódio.

NRF2 – Fator nuclear (semelhante ao fator nuclear eritróide 2) 2.

NTS – Núcleo do trato solitário.

PA – Pressão arterial.

PAD– Pressão arterial diastólica.

PAP – Pressão arterial pulsátil.

PAS – Pressão arterial sistólica.

PGF2 $\alpha$  – Prostaglandina F2 $\alpha$ .

PGH2 – Prostaglandina H2.  
PGI2 – Prostaciclina.  
PL – Fosfolipase.  
PLA2 – Fosfolipase A2.  
PUFA – Ácidos graxos poli-insaturados.  
ROS – Espécies reativas de oxigênio.  
RSNA – Atividade nervosa simpática renal.  
RVLM – Bulbo ventrolateral rostral.  
RVP – Resistência vascular periférica.  
SAD – Desnervação sino-aórtica.  
SBRe – Sensibilidade barorreflexa espontânea.  
SBRi – Sensibilidade barorreflexa induzida.  
SCV – Sistema cardiovascular.  
SHAM – Animal submetido a cirurgia fictícia.  
SHR – Ratos espontaneamente hipertensos.  
SHR-SP – Rato SHR susceptível à acidente vascular encefálico.  
SNA – Sistema nervoso autônomo.  
SOD – Superóxido dismutase.  
SPRINT – *Systolic Blood Pressure Intervention Trial*.  
SRAA – Sistema renina-angiotensina-aldosterona.  
TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa.  
TXA2 – Tromboxano A2.  
UKPDS – *United Kingdom Prospective Diabetes Study*.  
VFC – Variabilidade da frequência cardíaca.  
VIGITEL – Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico.  
VLC – Cadeia muito longa.

## RESUMO

Oliveira, P. W. C. Efeitos da Metformina e de Ácidos Graxos Ômega-3 sobre Parâmetros Autonômicos e Vasculares em Ratos Hipertensos. Tese de Doutorado (Ciências Fisiológicas). Departamento de Ciências Fisiológicas – Universidade Federal do Espírito Santo, 2018.

Introdução: Foram demonstrados efeitos benéficos da metformina e dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia muito longa (VLC-PUFA;  $\geq$  C20) da classe ômega-3 no sistema cardiovascular em humanos e modelos animais. Entretanto, seus efeitos são pouco conhecidos em relação à disfunção vascular e prejuízo autonômico relacionados à hipertensão arterial.

Objetivos: Nosso objetivo foi avaliar os efeitos crônicos da metformina e dos VLC-PUFA ômega-3 sobre a disfunção vascular e o prejuízo autonômico cardíaco relacionados à hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

Métodos: Foram utilizados ratos Wistar e SHR, machos, com 12 semanas de idade, sendo divididos em 4 grupos de acordo com o tratamento: WN (Wistar Normotenso); SC (SHR com tratamento Controlado [veículo/água]); SM (SHR tratado com Metformina 300 mg/kg/dia) e SO (SHR tratado com Ômega-3: Óleo de peixe concentrado em ômega-3 300 mg/kg/dia [33 % EPA, 22 % DHA], tratados por gavagem por 30 dias. Após o implante de cateteres na artéria e veia femoral, a sensibilidade do barorreflexo induzido foi testada em resposta a drogas vasoativas, fenilefrina e nitroprussiato de sódio, e o controle autonômico cardíaco foi avaliado por meio de bloqueios farmacológicos, atropina para teste da atividade parassimpática e atenolol para teste da atividade simpática. O barorreflexo espontâneo também foi avaliado em condição basal. Respostas vasoconstritoras à noradrenalina foram avaliadas no leito vascular mesentérico em um sistema *ex vivo*, na presença e ausência de inibidores farmacológicos: LNAME e indometacina. Os níveis plasmáticos da citocina inflamatória TNF $\alpha$  foram avaliados por ELISA. Proteínas cardíacas oxidante e antioxidante foram avaliadas por análises de Western blot.

Resultados: Nenhum dos tratamentos foi capaz de reduzir a pressão arterial nos animais hipertensos. A frequência cardíaca foi reduzida no SM, enquanto que a média do grupo SO foi numericamente menor que a do SC, mas sem diferença

estatística. O controle cardíaco parassimpático foi menor no grupo SC, enquanto que as médias dos grupos SM e SO foram numericamente maiores que a do SC, mas sem diferença estatística. O controle simpático foi maior no grupo SC e a metformina, mas não os ômega-3, foi capaz de o reduzir, igualando aos valores do grupo WN. A função barorreflexa foi menor no SC em todas as análises e a metformina promoveu uma melhora parcial. Por outro lado, os ômega-3 promoveram melhora do barorreflexo apenas quando induzido pelo nitroprussiato de sódio. A reatividade vascular mesentérica à noradrenalina foi maior no SC em relação ao WN e ambos os tratamentos promoveram uma atenuação dessa resposta. Essa diferença entre os grupos se mostrou estar relacionada a via dos prostanoídes, uma vez que o LNAME aumentou a resposta em todos os grupos de forma similar e a indometacina reduziu em muito a resposta nos animais hipertensos, aproximando os valores dos grupos tratados (SO e SM) ao do não tratado (SC). Ambos os tratamentos reduziram o TNF $\alpha$  e a metformina reduziu os níveis de NOX2 que estavam aumentados no SC.

Conclusões: A metformina e os VLC-PUFA ômega-3 têm potencial de melhorar parâmetros autonômicos e vasculares que se encontram prejudicados na hipertensão, mesmo sem promover redução da pressão arterial, o que parece estar relacionado a efeitos sobre a inflamação e estresse oxidativo. Esses achados abrem novas perspectivas para o futuro do uso da metformina e dos ômega-3 na hipertensão arterial.

Palavras-Chave: Hipertensão, Metformina, Ômega-3, Controle autonômico cardíaco, barorreflexo, reatividade vascular, estresse oxidativo, inflamação.

## ABSTRACT

Oliveira, P. W. C. Effects of Metformin and Omega-3 Fatty Acids on Autonomic and Vascular Parameters in Hypertensive Rats. PhD Thesis (Physiological Sciences). Department of Physiological Sciences – Federal University of Espírito Santo, 2018.

**Introduction:** Metformin and omega-3 very long chain polyunsaturated fatty acids (VLC-PUFA;  $\geq$  C20) have been shown beneficial effects on cardiovascular system in humans and animal models. However, little is known about its effects on mesenteric vascular dysfunction, autonomic imbalance and baroreflex dysfunction related to hypertension.

**Aims:** We aimed to evaluate the chronic effects of metformin and omega-3 VLC-PUFA on vascular dysfunction and cardiac autonomic impairment related to hypertension in spontaneously hypertensive rats (SHR).

**Methods:** Twelve-week-old male Wistar and SHR rats were divided into 4 groups according to the treatment: WN (Wistar Normotensive); SC (SHR with Control treatment [vehicle/water]); SM (SHR treated with Metformin 300 mg/kg/day) and SO (SHR treated with Omega-3: concentrated omega-3 fish oil 300 mg/kg/day [33 % EPA, 22 % DHA]), treated by gavage for 30 days. After catheter implantation in femoral artery and vein, the induced baroreflex sensitivity was tested in response to vasoactive drugs, phenylephrine and sodium nitroprusside, and cardiac autonomic control was evaluated using pharmacological blockades, atropine to test parasympathetic activity and atenolol to test sympathetic activity. Spontaneous baroreflex was also evaluated in basal condition. Norepinephrine vasoconstriction responses were evaluated in mesenteric vascular bed in an *ex vivo* system, in presence and absence of pharmacological inhibitors: LNAME and indomethacin. Plasmatic levels of inflammatory cytokine TNF $\alpha$  were evaluated by ELISA. Cardiac oxidant and antioxidant proteins were evaluated by Western blot analyses.

**Results:** None of the treatments was able to reduce blood pressure in hypertensive animals. Heart rate was reduced in SM whereas the mean of the SO group was numerically lower than that of SC, but without statistical difference. The parasympathetic cardiac control was lower in SC whereas the means of SM and SO groups were numerically higher than that of SC, but without statistical difference. The sympathetic control was higher in SC group and metformin, but not omega-3,

reduced it to WN values. Baroreflex function was lower in SC in all analysis and metformin promoted a partial improvement. On the other hand, omega-3 promoted baroreflex enhancement only when induced by sodium nitroprusside. Mesenteric vascular reactivity to noradrenaline was greater in SC than in WN and both the treatments promoted an attenuation of its response. This difference between the groups was shown to be related to the prostanoids pathway, since L-NAME increased the response in all groups in a similar way and indomethacin greatly reduced the response in hypertensive animals, approaching the values of the treated groups (SO and SM) to the untreated group values (SC). Both treatments reduced TNF $\alpha$  and metformin decreased NOX2 levels that were increased in SC.

Conclusions: Metformin and omega-3 VLC-PUFA have potential to improve autonomic and vascular parameters that are found impaired in hypertension, even without promoting blood pressure lowering, which seems to be related to effects on inflammation and oxidative stress. These findings open up new perspectives for future of metformin and omega-3 use in hypertension.

Keywords: Hypertension, Metformin, Omega-3, Cardiac autonomic control, baroreflex, vascular reactivity, oxidative stress, inflammation.

## 1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição caracterizada por níveis de pressão arterial (PA) acima dos níveis considerados adequados e que se matem assim em longo prazo (HARDISTY et al., 1920). Em alguns casos a hipertensão pode ser secundária a alguma outra condição orgânica (ex. hiperaldosteronismo, doenças renais) (GOLDBLATT et al., 1934). Contudo, a grande maioria dos casos de HAS (~95 %) não tem etiologia bem definida sendo classificada como hipertensão arterial primária ou essencial, uma doença multifatorial com participação de fatores ambientais e com grande herdabilidade (DOSH, 2001; HARDISTY et al., 1920).

Níveis elevados de PA se correlacionam com danos em órgãos-alvo, assim, os estudos mostram uma associação continua entre níveis crescentes de PA e um risco progressivamente maior para doenças cardiovasculares (DCV), o que foi observado em grandes estudos como o “*Multiple Risk Factor Intervention Trial*” (MRFIT) e o “*Framingham Heart Study*” (FHS), como revisado por Cutler (1996). Dessa forma, a relevância da pressão arterial elevada diz respeito às suas consequências sendo a hipertensão o maior fator de risco controlável (pelo manejo clínico) para DCV. De fato, a PA elevada contribui para 9,4 milhões do total de 17 milhões de mortes por DCV anualmente em todo o mundo (WHO, 2013).

Em consonância com o exposto acima, os dados do estudo “*Global Burden of Disease, Injuries, and Risk Factor study (GBD) 2015*” (GBD 2015 RISK FACTORS COLLABORATORS, 2016) demonstram que a hipertensão arterial vem se apresentando como o elemento de maior contribuição global para condições incapacitantes e para a mortalidade, sendo essenciais medidas de prevenção e tratamento efetivo (FOROUZANFAR et al., 2017). Além disso, conforme revisão de Andersson e Vasan (2018), apesar da prevalência de HAS ser crescente ao longo das faixas etárias, os valores de incidência de DCV entre 18-50 anos de idade vêm apresentando algumas tendências crescentes, o que pode estar apontando para uma possível epidemia de DCV a medida que essa geração vai envelhecendo.

A metanálise de Forouzanfar et al (2017) avaliando 844 estudos de 154 países mostrou uma projeção de que 3,5 bilhões dos adultos em todo o mundo apresentavam PAS acima do ideal ( $> 110-115$  mmHg) em 2015. Além disso, a estimativa de indivíduos hipertensos, PAS  $\geq 140$  mmHg ou PAD  $\geq 90$  mmHg, no ano de 2015 era de 1,13 bilhão de pessoas, quase o dobro do quantitativo de 1975

(NCD-RISC, 2017). No Brasil, entre um quarto a um terço da população de adultos tem hipertensão arterial, dependendo do estudo. Os dados do estudo “VIGITEL Brasil 2014”, avaliando a hipertensão autorreferida, demonstrou prevalência de um quarto da população adulta (BRASIL, 2015), enquanto que, no estudo “ELSA-Brasil”, avaliando 15103 servidores públicos, foi observada uma prevalência de aproximadamente um terço dos indivíduos (CHOR et al., 2015).

Os valores de pressão arterial para definição de normalidade ou de hipertensão varia de acordo com as entidades que fazem essa classificação em cada país/região, havendo atualizações periódicas de acordo com as evidências científicas disponíveis (MALACHIAS et al., 2016; WHELTON et al., 2017). O quadro 1 traz os valores de referência em humanos atualmente em uso no Brasil, segundo a 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial (MALACHIAS et al., 2016), e o comparativo com os valores utilizados nos Estados Unidos da América (EUA), segundo o “2017 High Blood Pressure Clinical Practice Guideline” (WHELTON et al., 2017), por ser a diretriz mais recentemente atualizada, onde houve uma redução de 10 mmHg no ponto de corte para classificação de hipertensão.

A mudança na diretriz dos EUA é suportada por estudos como o “*Systolic Blood Pressure Intervention Trial*” (SPRINT), onde de fato foi demonstrado que o aumento de rigor da meta terapêutica de 140 para 120 mmHg foi capaz de reduzir em 25 % os eventos CV e em 27 % a mortalidade (DRAWZ et al., 2017), portanto, parece pertinente que esses valores sejam revistos, avaliando os impactos positivos e negativos de uma mudança desse tipo, como redução de morbimortalidade, medicalização precoce, carga para o sistema de saúde, entre outros fatores.

**Quadro 1.** Classificação da pressão arterial em adultos por medida no consultório. Valores de referência no Brasil e nos EUA. Pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD).

7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial				2017 High BP Clinical Practice Guideline			
Classificação	PAS	-	PAD	Classificação	PAS	-	PAD
Normal	≤ 120	OU	≤ 80	Normal	< 120	E	< 80
Limítrofe	121 - 139		81-89	Elevada	120 - 129		
Hipertensão estágio 1	140 - 159		90-99	Hipertensão estágio 1	130 - 139	OU	80 - 89
Hipertensão estágio 2	160-179		100-109	Hipertensão estágio 2	≥ 140		
Hipertensão estágio 3	≥ 180		≥ 110	Sistólica isolada	≥160	E	Variável: ≤ 90 a ≤ 110
Sistólica isolada	≥ 140	E	< 90	Crise hipertensiva	> 180		
Crise hipertensiva	--	-	> 120				

Extraído de: MALACHIAS et al., 2016; WHELTON et al., 2017.

O controle da PA em nosso organismo é realizado por uma complexa rede de regulação de modo a promover uma homeostase adaptativa a partir de moléculas de sinalização e vias neuroendócrinas, incluindo o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), a função endotelial vascular e o sistema nervoso autônomo (CHOPRA et al., 2011). Com relação a HAS, enquanto que a hipertensão secundária tem mecanismos de base mais delimitados, a hipertensão primária envolve múltiplos elementos (DOSH, 2001).

A HAS se relaciona a um prejuízo dos mecanismos de controle da PA associado a alterações cardiovasculares tanto funcionais como estruturais, sendo que estas podem ser causadoras ou adaptativas (MAYET; HUGHES, 2003). Além disso, como revisado por Solak et al (2016), os estudos vêm apontando para uma importante participação do estresse oxidativo associado a inflamação nesse processo.

Dentre os mecanismos envolvidos na HAS, o SRAA tem importante implicação quanto a retenção de sódio e água, vasoconstrição, disfunção endotelial e remodelamento vascular, com ação pró-fibrótica e pró-inflamatória, relacionados ao estresse oxidativo e conseqüentemente a injúria cardiovascular, por meio de suas moléculas efetoras, como a angiotensina II (ANGII) produzida por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) (PACURARI et al., 2014; PATEL et al., 2017).

Outros importantes componentes envolvidos na HAS são a função vascular e o sistema nervoso autônomo (SNA), havendo um quadro de disfunção vascular (DINH et al., 2014) e prejuízo autonômico (CROWLEY, 2014; TSAI et al., 2013) na HAS, ambos fortemente relacionados a inflamação e estresse oxidativo, sendo elementos chave nessa doença e foco do presente estudo, portanto, serão detalhados a seguir.

### 1.1 PREJUÍZO AUTONÔMICO NA HAS

O ajuste da PA tem uma participação fundamental do SNA a partir do controle da frequência cardíaca (FC) e do tônus vascular. Esse controle da FC é dado pela estimulação simpática e parassimpática sobre o coração tanto de forma tônica (tônus autonômico) quanto de forma reflexa (GELLHORN, 1957; KOLLAI; KOIZUMI, 1981). O principal reflexo de manutenção da PA é o barorreflexo, que detecta oscilações pressóricas por meio de mecanorreceptores (barorreceptores) alojados

no seio carotídeo e no arco da aorta. O barorreflexo responde ao aumento de PA pela modulação negativa do fluxo nervoso simpático e ao mesmo tempo uma modulação positiva do fluxo nervoso vagal, o que leva a queda da FC, reduzindo o débito cardíaco e conseqüentemente a PA, havendo também redução na resistência vascular periférica (RVP), ao passo que uma queda da PA gera uma resposta barorreflexa inversa, promovendo aumento da FC e da RVP, elevando a PA (BALASZCZUK et al., 1987; SCHREIHOFER; GUYENET, 2002). Esse constante ajuste autonômico gera uma fisiológica variabilidade da frequência cardíaca (VFC) (LANFRANCHI, SOMERS, 2002).

A HAS tem como característica o desequilíbrio do controle autonômico caracterizado por insuficiência da atividade parassimpática e atividade simpática aumentada, juntamente a uma atenuação da resposta barorreflexa (BRISTOW et al., 1969; GRASSI et al., 1998), o que em conjunto favorece o aumento tônico da frequência cardíaca e a redução de sua variabilidade (MORCET et al., 1999; VIRTANEN et al., 2003). A grande relevância desse prejuízo autonômico, para além da PA elevada, se dá pelo fato de haver uma relação forte, gradual e independente entre a elevação da FC de repouso e a incidência de DCV (COONEY et al., 2010), bem como a redução do barorreflexo e da VFC são associados a risco cardiovascular (CV) aumentado (HEAD, 1995; TSUJI et al., 1996). Ademais, a hiperativação simpática por si só leva a dano CV independente de aumentos na PA (FISHER; PATON, 2012). Dessa forma, a avaliação da função autonômica se torna uma importante ferramenta para avaliação de risco CV na hipertensão arterial (LANTELME et al., 2002).

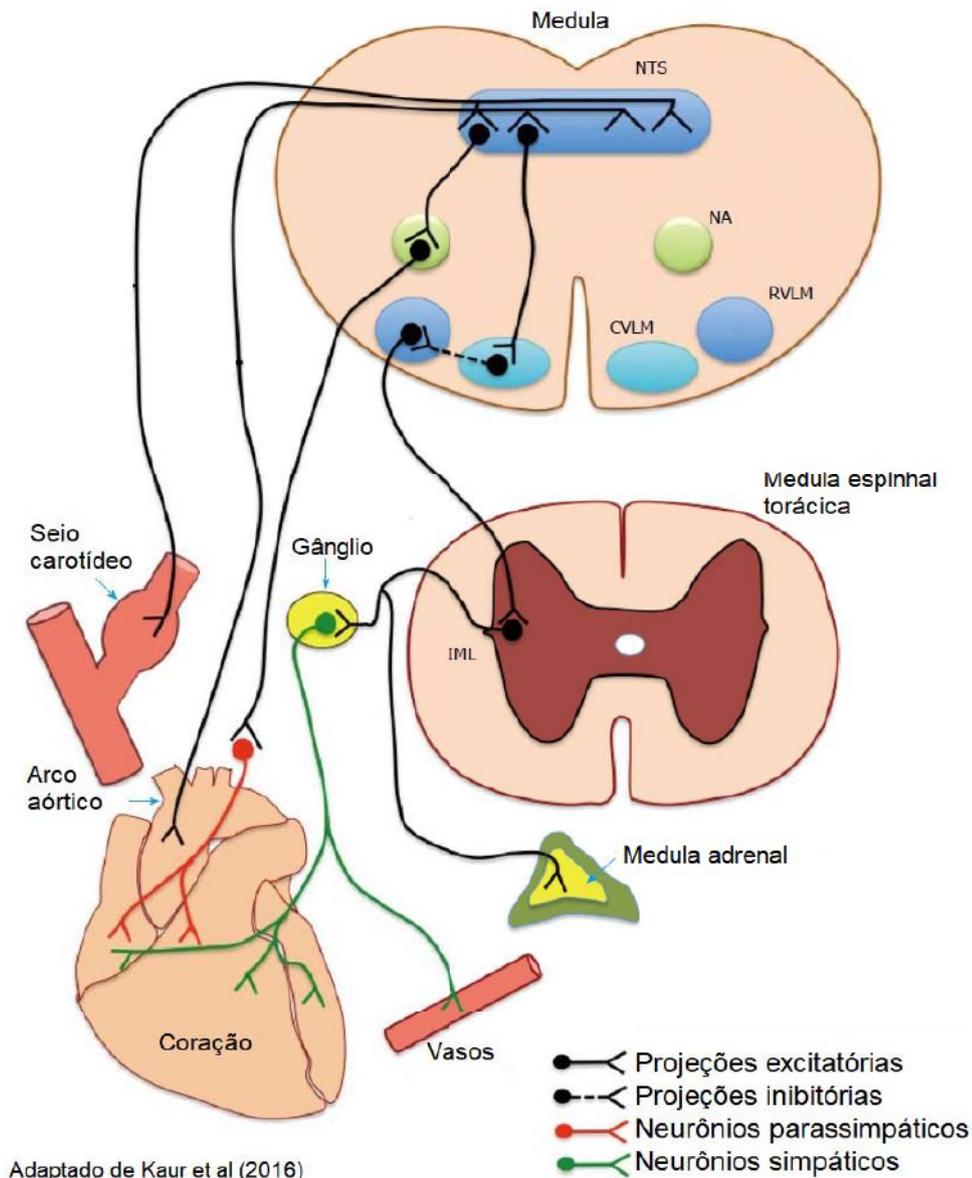
Esse controle autonômico do sistema CV envolve regiões do prosencéfalo com projeções hipotalâmicas para o tronco encefálico, havendo o processamento de sinais que chegam da periferia por vias aferentes vagal e glossofaríngea chegando ao núcleo do trato solitário (NTS), uma região de integração desse controle autonômico (BENARROCH, 1993; THAYER; LANE, 2009). O NTS se projeta para o bulbo ventrolateral caudal (CVLM), e este para o bulbo ventrolateral rostral (RVLM), e este para a coluna intermédio lateral (IML) que é a saída autonômica simpática. Por outro lado, o NTS também se projeta para o núcleo motor dorsal (DMN) e núcleo ambíguo (NA), a saída autonômica parassimpática (CHAN; SAWCHENKO, 1998; THAYER; LANE, 2009). Essa rede de controle autonômico CV está esquematizada na figura 1.

Os estudos vêm mostrando que o estresse oxidativo, relacionado a elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), no cérebro é associado com hipertensão neurogênica, favorecendo a ativação do RVLM (NISHIHARA et al., 2012; TAI et al., 2005), que se relaciona com hiperatividade simpática e desequilíbrio autonômico (FISHER, PATON, 2012), promovendo depressão do barorreflexo por prejuízo na comunicação entre o NTS e o NA (TSAI et al., 2013). Como revisado por Datla e Griendling (2010), esse estresse oxidativo tem como grande fonte a enzima NADPH oxidase (NOX), em especial a isoforma NOX2, amplamente presente no sistema nervoso central, e também parece haver uma redução dos mecanismos antioxidantes locais, como a enzima superóxido dismutase (SOD) (CHAN et al., 2006; TAI et al., 2005). Ademais, em ratos hipertensos, foi observado que a aplicação de um antioxidante mimético da SOD no RVLM reduz a atividade simpática, PA e FC, semelhante ao encontrado pela manipulação experimental do RVLM induzindo a superexpressão tanto da SOD-CuZn, que é a isoforma 1 da SOD (SOD1) presente no interior das células, quanto da SOD-Mn, que é a isoforma 2 da SOD (SOD2) presente nas mitocôndrias (OLIVEIRA-SALES et al., 2010; TAI et al., 2005).

As evidências mais atuais apontam que a HAS tem importante componente inflamatório, o qual se associa ao estresse oxidativo, como revisado por Solak et al (2016). Foi demonstrado que um processo inflamatório sistêmico, envolvendo citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), pode levar conseqüentemente a um processo neuroinflamatório no RVLM, com aumento do estresse oxidativo local, e assim gerar hipertensão (WU et al., 2012, 2016). De fato, o TNF $\alpha$  é capaz de ativar o fator nuclear kappa B (NFkB), um fator de transcrição inflamatório (KE et al., 2007).

Em estudos, o uso de um inibidor de TNF $\alpha$  em nível central reduziu a PA via inibição do tônus simpático, com redução do estresse oxidativo no RVLM, em ratos com hipertensão renovascular (GALVÃO et al., 2016), e o uso de imunossupressor, associado a redução de TNF $\alpha$ , promoveu redução de atividade simpática e melhora do barorreflexo em ratos obesos (KHAN et al., 2017). Por outro lado, parece existir uma correlação inversa entre os níveis plasmáticos de TNF $\alpha$  e o tônus parassimpático, o qual é reduzido na HAS (DAS, 2000). Adicionalmente, a infusão aguda de TNF intracerebroventricular promoveu aumento da PA e FC, com redução do barorreflexo (ŽERA et al., 2016).

Diante do exposto, essa interação complexa e redundante entre inflamação, estresse oxidativo e prejuízo autonômico se mostra um dos desafios no manejo da HAS (CROWLEY, 2014; WINKLEWSKI et al., 2015), sendo o prejuízo autonômico um fator de risco cardiovascular por si só, o qual também contribui para o aumento da PA, envolvendo o aumento da RVP associada a hiperatividade simpática, o que é potencializado pela disfunção vascular presente na HAS (BRANDES, 2014; CHOPRA et al., 2011).



**Figura 1.** Mecanismos básicos de controle autonômico cardíaco. Adaptado de Kaur et al (2016). Circuito neuronal do arco barorreflexo. Barorreceptores no seio carotídeo e arco aórtico, levando sinal pelos nervos cranianos até centros medulares. O sinal é processado e uma resposta retorna pelas eferências do simpático e parassimpático. Núcleo do trato solitário (NTS); Núcleo ambíguo (NA); Bulbo ventrolateral caudal (CVLM); Bulbo ventrolateral rostral (RVLM): medula ventrolateral rostral; coluna intermédio lateral (IML).

## 1.1 DISFUNÇÃO VASCULAR NA HAS

O ducto vascular é o determinante da resistência que será oferecida a passagem do sangue, ou seja, a RVP, que em conjunto com o débito cardíaco, são os determinantes da PA. Os vasos de maior calibre (de condutância), como a aorta, contribuem pouco para RVP, ao passo que os de menor calibre (de resistência) são os grandes determinantes da RVP (MAYET; HUGHES, 2003). Dentre esses, relativo ao órgão mesentérico, o leito vascular mesentérico (LVM) é em sua maioria composto por vasos de resistência, contribuindo em muito na RVP e PA (TAHVANAINEN et al., 2006).

O controle do músculo liso vascular (MLV) entre o estado de relaxamento ou contração (tônus vascular) é em grande parte dependente do controle neural por meio da inervação simpática noradrenérgica nos vasos, onde a ativação de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos no MLV gera contração (THORIN, ATKINSON, 1994), assim como substâncias hormonais e humorais (ex. ANGI) também participam desse controle (CHOPRA et al., 2011). Por outro lado, há uma importante modulação local do tônus vascular realizada pelas células do endotélio vascular que atuam sobre as células subjacentes do MLV por meio da liberação de substâncias vasoativas, tanto em condição basal quanto em resposta a estímulos (OZKOR; QUYYUMI, 2011). Esses mecanismos são apresentados na figura 2.

Os principais mediadores endoteliais que promovem o relaxamento do MLV são: o óxido nítrico (NO) que é produzido pelas enzimas NO-sintases (NOS), a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) produzida pela ciclooxigenase (COX) e o fator hiperpolarizante derivado de endotélio (EDHF) que é o conjunto dos demais fatores produzidos por múltiplos mecanismos, com grande participação de canais para potássio e junções comunicantes (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009; MONCADA et al., 1988).

O principal estímulo fisiológico do endotélio para liberação desses fatores é o atrito do fluxo sanguíneo na parede vascular ("*shear stress*"), além dos agonistas vasoativos (ex. acetilcolina, histamina, bradicinina) (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989). Dentre eles, o NO é o que tem maior participação global no tônus vascular e controle da RVP, seguido pelo EDHF, o qual é mais importante em vasos de resistência do que em vasos de condutância (WOODMAN et al., 2000). Contudo, também podem ser liberados fatores constritores derivados do endotélio (EDCF) que

prejudicam o relaxamento vascular, como os produzidos pela COX (ex. Tromboxano A<sub>2</sub> – TXA<sub>2</sub>; Prostaglandinas H<sub>2</sub> e F<sub>2</sub> $\alpha$  - PGH<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) a partir do ácido araquidônico liberado das membranas celulares pela fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (KATO et al., 1990; VANHOUTTE; SHIMOKAWA, 1989).

A HAS tem como característica o aumento da PA relacionado a um aumento da RVP (BRANDES, 2014; LÜSCHER, 1992), o que se associa a prejuízo na função endotelial e disfunção vascular, com desequilíbrio entre fatores de relaxamento (NO, EDHF) e contração (EDCF) do MLV, favorecendo a vasoconstrição, tanto em humanos como em modelos animais (LI et al., 2007; LÜSCHER; VANHOUTTE, 1986). Dessa forma, há um aumento de responsividade a agentes vasoconstritores (CRISCIONE et al., 1990) e redução de resposta a agentes vasorelaxantes (LI et al., 2007). Portanto, o endotélio vascular alterado contribui com uma maior produção de EDCF que se contrapõem a ação dos mecanismos de relaxamento, os atenuando, e potencializando a vasoconstrição (LI; BUKOSKI, 1993). Essas alterações endoteliais, em geral, estão relacionadas a um processo que envolve estresse oxidativo e mediadores inflamatórios (DINH et al., 2014).

Dentre os mecanismos de disfunção vascular, como observado na HAS, o estresse oxidativo promove redução da biodisponibilidade do NO devido a sua reação com o ânion superóxido, um dos principais tipos de ROS, formando peroxinitrito (GRYGLEWSKI et al., 1986), além de poder reduzir a atividade da NOS por inativar o cofator BH<sub>4</sub> (YOKOYAMA; HIRATA, 2007). Assim, uma redução do NO leva a menor ativação da enzima guanilato ciclase e redução da geração de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) no MLV, com consequente redução dessa importante via de relaxamento vascular (MONCADA et al., 1988), além dos demais alvos do NO que também serão menos ativados, como canais para potássio de larga condutância ativados por cálcio (BKCa) (MISTRY, GARLAND, 1998) e o trocador Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (GUPTA et al., 1994).

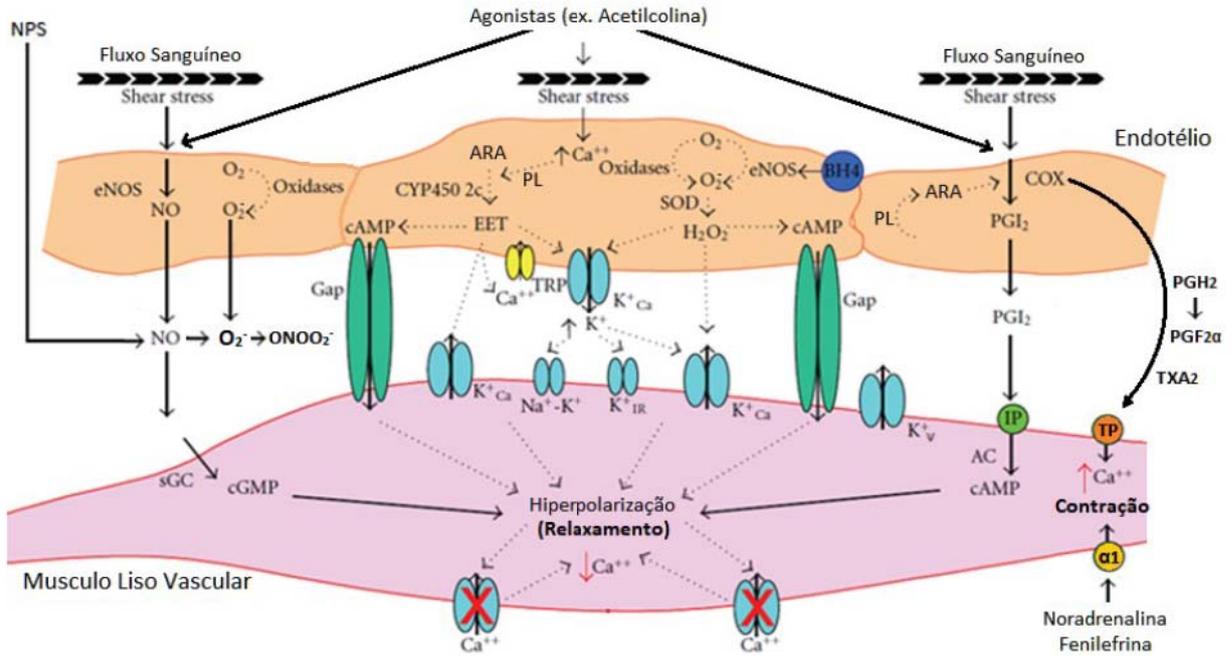
Além do prejuízo na via do NO, o peróxido de hidrogênio produzido via SOD, a partir do ânion superóxido, também pode ter ação vasoconstrictora em altas concentrações (LUCCHESI et al., 2005). A principal fonte vascular de ROS é a enzima NOX, em especial a isoforma NOX2 (GÖRLACH et al., 2000), e em contraposição ao estresse oxidativo vascular há um conjunto de enzimas antioxidantes, que incluem SOD, catalase e outras (WASSMANN et al., 2004), que não necessariamente estão reduzidas na hipertensão (NAKAZONO et al., 1991; WU

et al., 2001). Além da NOX, a própria NOS quando desacoplada leva a produção de ROS (YOKOYAMA; HIRATA, 2007). Um outro componente da disfunção vascular na HAS é o inflamatório, tanto em nível local quanto sistêmico, o qual também interage com as vias de estresse oxidativo (DINH et al., 2014).

Como observado na hipertensão, em diferentes modelos animais, tanto a via da COX estimula a via de estresse oxidativo envolvendo a NOX como a relação inversa também é verdadeira (MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013; TATE et al., 1984). Dessa forma, a via da COX tem uma importante participação na HAS prejudicando o relaxamento vascular pela produção de prostanoídes inflamatórios vasoconstritores que atuam como EDCF (LÜSCHER; VANHOUTTE, 1986; MILLER; VANHOUTTE, 1985). De fato, esses EDCF estão muito aumentados na hipertensão, sendo produzidos a partir do ácido araquidônico, principalmente por ação da isoforma 1 da COX (COX1), que normalmente está presente em maior quantidade, mas também pela isoforma 2 (COX2), referida como induzível (MATSUMOTO et al., 2016).

Foi observado que o TNF $\alpha$  estimula a produção de prostanoídes como o TXA<sub>2</sub> em células do MLV (YOUNG et al., 2000). De forma semelhante, o TNF $\alpha$  estimula a geração de ROS em células endoteliais (YANG; RIZZO, 2007) e também no MLV, com envolvimento da NOX (DE KEULENAER et al., 1998), sendo envolvido no estresse oxidativo e desenvolvimento de hipertensão (GUZIK et al., 2007). Além disso, a infusão intra-arterial de TNF $\alpha$  em pacientes saudáveis provocou prejuízo do controle vascular endotélio-dependente (CHIA et al., 2003), bem como reduziu a biodisponibilidade de NO e aumentou os prostanoídes vasoconstritores (NAKAMURA et al., 2000). Ademais, é conhecido que o TNF $\alpha$  pode ativar o fator de transcrição NF $\kappa$ B e levar a aumento da expressão de COX2, via pela qual os EDCF também são produzidos (KE et al., 2007).

Diante do exposto, a modulação desses componentes inflamatórios e de estresse oxidativo, em nível local e sistêmico, junto ao aumento de EDCF e prejuízo nas vias de NO e EDHF nos vasos, são grande desafio no manejo da HAS, envolvidos no aumento da RVP e PA, e contribuindo para o dano a órgãos-alvo. Portanto, a busca por novas terapêuticas, adicionais às já existentes, capazes de promover melhora nos parâmetros autonômicos e vasculares, que se encontram prejudicados na HAS, são foco de grande interesse e relevância.



Modificado de OZKOR e QUYYUMI (2011)

**Figura 2.** Mecanismos básicos de função vascular. Modificado de OZKOR & QUYYUMI (2011). O uso de um agonista de receptor  $\alpha_1$  adrenérgico no músculo liso vascular (MLV) promove vasoconstricção. Por outro lado, a tensão de cisalhamento, ou um agente vasodilatador como a acetilcolina, leva o endotélio vascular a liberar fatores que promovem relaxamento do MLV, mas também podem ser liberados fatores constritores derivados do endotélio (EDCF) que prejudicam o relaxamento (ex. Tromboxano A<sub>2</sub> - TXA<sub>2</sub>; Prostaglandinas H<sub>2</sub> e F<sub>2</sub> $\alpha$  - PGH<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ). Os fatores que promovem relaxamento incluem o óxido nítrico (NO) produzido pela NO-sintase endotelial (eNOS), a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) produzida pela ciclooxigenase (COX), e o fator hiperpolarizante derivado de endotélio (EDHF) que é o conjunto dos demais fatores de relaxamento produzidos por múltiplos mecanismos. O aumento na concentração de cálcio intracelular ativa a fosfolipase (PL) para liberar ácido araquidônico (ARA). O ARA é metabolizado pela ciclooxigenase (COX) formando prostanoides ou pode ser metabolizado pela citocromo P450 2C (CYP4502c) gerando ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) que podem estimular os canais de potássio ativados por cálcio (KCa) em células endoteliais e do músculo liso. Os EETs também podem ativar diretamente junções comunicantes tipo Gap e também podem atuar autócrinamente nas células endoteliais por ativação do canal receptor de potencial transitente (TRP) V4, que promove o influxo de cálcio, aumentando ainda mais a concentração de cálcio e ativando canais KCa que causam hiperpolarização e liberação de potássio para o espaço subendotelial. O aumento de potássio no interstício pode ativar canais KCa, canais de potássio retificadores de influxo (KIR), ou a bomba sódio/potássio ATPase em células do MLV, gerando hiperpolarização. A hiperpolarização do MLV leva a fechamento dos canais de cálcio promovendo queda na concentração de cálcio e consequente vasodilatação. A eNOS condicionalmente e as oxidases como a NADPH oxidase produzem ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), gerado por dismutação do superóxido pela superóxido dismutase (SOD), pode também causar hiperpolarização através da ativação de KCa no músculo liso ou por ativação de junções tipo Gap. Adenilciclase: AC; monofosfato cíclico de adenosina (AMPc); monofosfato cíclico de guanósina (GMPc); guanilato ciclase solúvel (GCs); Nitroprussiato de sódio (NPS), fármaco liberador de NO; receptor de prostaciclina (IP); receptor de tromboxano-prostanoide (TP).

### 1.3 TERAPÊUTICA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL

O manejo da hipertensão arterial envolve tanto medidas farmacológicas quanto não-farmacológicas (HOYER, 2012). Em relação a esta última, a abordagem sobre o estilo de vida e a dieta são importantes tanto nos pacientes hipertensos quanto para a prevenção da doença, levando em consideração questões como a adequação da ingestão de sódio e potássio, e a perda de excesso de peso (DICKEY; JANICK, 2001).

Com relação a abordagem farmacológica, a terapia anti-hipertensiva vem evoluindo nas últimas décadas, havendo disponível uma grande gama de medicamentos diferentes e múltiplas possibilidades de combinações, sendo os medicamentos de primeira linha: os inibidores da ECA, os bloqueadores dos receptores de ANGII, os bloqueadores dos canais para cálcio, os diuréticos tiazídicos (HOYER, 2012; MESSERLI et al., 2007) e também os bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, apesar de algumas controvérsias sobre seu benefício (MESSERLI et al., 2016).

Apesar dos avanços em seu tratamento, com o arsenal terapêutico atual, a maioria dos pacientes hipertensivos necessitam de duas ou mais drogas para conseguir controlar a pressão arterial, propiciando interações medicamentosas e o surgimento de efeitos adversos (MESSERLI et al., 2007), o que também pode envolver baixa adesão terapêutica. Além disso, mesmo alcançando-se controle adequado dos níveis pressóricos, muitas vezes o risco cardiovascular permanece elevado, o que parece estar relacionado com o prejuízo autonômico que se mantém (BROOK; JULIUS, 2000).

Diante do exposto, a busca por novas terapêuticas, adicionais às já existentes, é foco de grande interesse e relevância, como a investigação do potencial terapêutico de fármacos não anti-hipertensivos, a partir de seus efeitos pleiotrópicos (ZHOU et al., 2017), e também de substâncias de origem natural, como as que são presentes em alimentos (HUANG et al., 2013). Nesse contexto, a metformina e os ácidos graxos ômega-3 chamam a atenção pelos efeitos benéficos que vem apresentando em estudos, em diferentes condições de doenças, em humanos e em modelos experimentais, como exposto a seguir.

### 1.3.1 Metformina e seus efeitos no sistema cardiovascular

A metformina é um fármaco anti-hiperglicêmico que está há mais de 60 anos em uso na prática clínica, recomendada como droga de primeira linha para o controle da glicemia em pacientes com diabetes tipo 2 (DM2) (MARSHALL, 2017). Contudo, conforme revisado por Viollet et al (2012) e Foretz et al (2014), estudos desse fármaco em condições diferentes da DM2 vêm demonstrando a existência de efeitos pleiotrópicos positivos em condições diversas, assim como no câncer (ZI et al., 2018) e complicações do ovário policístico (JOHNSON, 2014). Além disso, é uma droga em geral bem tolerada e segura, a despeito de um potencial de gerar acidose láctica, o que é pouco comum e mais relevante em indivíduos com função renal comprometida, além de alguns efeitos gastrointestinais de menor relevância (MARSHALL, 2017).

Dentre os efeitos pleiotrópicos da metformina, sua ação CV vem ganhando destaque. Em pacientes com DM2 foi demonstrado que a metformina reduz o risco de eventos cardiovasculares e mortalidade, o que é suportado por grandes estudos, como o *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) (HOLMAN et al., 2008; SVENSSON et al., 2017; UKPDS, 1998). Contudo, GRIFFIN et al (2017) manifestaram incerteza sobre os efeitos benéficos da metformina sobre doenças cardiovasculares em indivíduos não diabéticos ou em risco de desenvolver diabetes, alegando a necessidade de investigações mais rigorosas para confirma-los, havendo estudos conflitantes sobre os efeitos CV da metformina (EL MESSAOUDI et al., 2011; LEXIS; VAN DER HORST, 2014; SASALI; LEAHY, 2003).

Em relação a pressão arterial, foi demonstrado um efeito de pequena redução da PA mesmo em indivíduos não-diabéticos, da ordem de 2 mmHg, e no subgrupo específico com reduzida tolerância a glicose, 5 mmHg (ZHOU et al., 2017). Por outro lado, a metformina também possui efeito de redução da PA em indivíduos diabéticos (SVENSSON et al., 2017), mas que não é maior do que o observado em outros tratamentos de redução de glicemia (KATAYAMA et al., 2018). De forma semelhante, também foi demonstrado que a metformina pode reduzir a PA em ratos hipertensos, independente da presença de diabetes mellitus, como no estudo de Hamidi Shishavan et al (2017).

Para além de uma pequena ação hipotensiva, foram demonstrados efeitos interessantes da metformina em relação a capacidade de melhora de prejuízo

autonômico, com melhora da VFC em pacientes diabéticos obesos tratados cronicamente com metformina (MANZELLA et al., 2004), e também uma ação protetiva endotelial (KINAAN et al., 2015), o que torna esse fármaco potencialmente interessante na hipertensão arterial, uma condição associada à prejuízo autonômico e disfunção vascular (BRISTOW et al., 1969; LÜSCHER; VANHOUTTE, 1986).

Petersen e Dibona (1996, 1997) observaram que a administração aguda de metformina em ratos hipertensos melhorou a responsividade do barorreflexo além de também ter reduzido a atividade nervosa simpática renal (RSNA), promovendo uma melhora momentânea sobre o prejuízo autonômico nesses animais. A melhora do barorreflexo também foi observada num modelo de acidente vascular encefálico, mediante tratamento crônico, em ratos muito jovens (GUO et al., 2017).

Alguns estudos em ratos demonstraram que a metformina tem efeito agudo de promoção de relaxamento vascular (PEULER et al., 1999), inclusive sendo demonstrado por outro estudo que essa ação direta de vasodilatação era via óxido nítrico (O'HORA et al., 2012). Em um estudo em anéis de aorta de ratos foi demonstrado que a metformina reduziu a vasoconstricção evocada pela fenilefrina atuando via proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que é o principal alvo de ação conhecido desse fármaco (SUNG; CHOI, 2012; VIOLLET et al., 2012). Além disso, a própria ativação da AMPK foi capaz de promover relaxamento vascular, tanto em vasos de condutância (aorta) como em vasos de resistência (vasos mesentéricos), atuando de forma semelhante à metformina (FORD et al., 2012).

Entre outros efeitos observados da metformina, alguns se relacionam com controle do estresse oxidativo e modulação de prostanoídeos, mas os estudos não são muito claros quanto aos mecanismos de ação. Sena et al (2011) observou reversão da disfunção vascular de relaxamento em anéis de aorta de ratos modelo de DM2, com redução do estresse oxidativo vascular e consequente aumento da biodisponibilidade de NO, bem como houve redução da citocina pró-inflamatória CCL2. Também foi observada diminuição da produção de ROS e aumento da ação do NO junto a melhora da relação PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> no leito vascular mesentérico de ratos modelo de obesidade (LOBATO et al., 2012). Um outro estudo evidenciou inclusive a possibilidade de a própria metformina ao ser metabolizada liberar NO (SEREZHENKOV et al., 2011).

Também foi observado que a metformina reduziu os níveis de prostanoídeos vasoconstrictores na aorta e leito vascular mesentérico em ratos modelo de

síndrome metabólica por alta carga de frutose, além de a metformina reduzir a PA que estava aumentada (PUYÓ et al., 2012). Em um estudo anterior realizado por nosso grupo, utilizando ratas normotensas modelo de deficiência de hormônios sexuais por ovariectomia, a metformina foi capaz de reverter o prejuízo no relaxamento vascular, reduzindo estresse oxidativo e melhorando a biodisponibilidade de NO, associado a reduzindo da superexpressão de NOX2, além de restaurar a expressão da NOS endotelial (eNOS) que estava reduzida (OLIVEIRA et al., 2014). Recentemente, Hamidi Shishavan et al (2017) estudando a metformina em ratos hipertensos, diabéticos e não-diabéticos, observaram melhora do relaxamento de anéis de aorta, envolvendo aumento de EDHF nos diabéticos e de NO e EDHF nos não diabéticos.

### **1.3.2 Ácidos graxos ômega-3 e seus efeitos no sistema cardiovascular**

Os mamíferos não são capazes de sintetizar o ácido alfa-linolênico (18:3 n-3, ALA) ômega-3 e nem o ácido linoleico (18:2 n-6, LA) ômega-6, sendo considerados nutrientes essenciais para a dieta humana, a partir dos quais os outros ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) de cadeia muito longa (VLC;  $\geq 20$  carbonos) podem ser formados. Como revisado por De Caterina (2011), uma pequena parte (1-5 %) do ALA é convertido em ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) e a partir desse uma pequena parcela em ácido docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA), ao passo que o ácido linoleico forma ácido araquidônico (20:4 n-6, ARA) em sua cascata de conversão.

Apesar de necessário ao organismo, a ingestão elevada de ômega-6 está associada a efeitos deletérios, o que pode ser contraposto pela ação dos ômega-3, sendo importante a proporção entre esses PUFAs na dieta (PATTERSON et al., 2012). De forma interessante, os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) ômega-9 também apresentam efeitos orgânicos benéficos (DELGADO et al., 2017), mas as maiores evidências de benefícios ainda pairam sobre os ômegas-3, como será exposto a seguir.

A ação dos ômega-3 no organismo pode se dar por ação direta em alvos orgânicos despertando respostas rápidas, ou por incorporação às membranas celulares, alterando sua fluidez, sendo daí liberados gradativamente e convertidos em moléculas sinalizadoras, como os eicosanoides, possuindo efeitos tanto gênicos quanto não-gênicos (DE CATERINA, 2011).

Por ação da fosfolipase A2 (PLA2) os fosfolípidos presentes nas membranas celulares são liberados e servem de substrato para COX, gerando prostanoídeos, e para a lipoxigenase (LOX), gerando leucotrienos, produtos que em conjunto são conhecidos como eicosanóides. O ARA, ômega-6, gera prostanoídeos da série 2, altamente inflamatórios e/ou vasoconstritores (ex. TXA2, PGF2 $\alpha$ ) e a PGI2 que tem perfil de vasodilatação, enquanto que os ômega-3, como substrato, competem com o ARA pela COX, e geram um perfil de eicosanóides de baixo potencial inflamatório e vasoconstritor (ex. TXA3, PGF3 $\alpha$ ) e PGI3 que é vasodilatador (BÄCK, 2017; PATTERSON et al., 2012), dessa forma, exercendo ação anti-inflamatória indireta.

Os ômega-3 também podem ser substrato na produção de moléculas anti-inflamatórias (resolvinas, protectinas e maresinas) e reduzir a expressão de proteínas pró-inflamatórias como NF $\kappa$ B e TNF $\alpha$  (KANG, WEYLANDT, 2008). Também há evidências de uma estimulação do “fator nuclear (semelhante ao fator nuclear eritróide 2) 2” (Nrf2), um fator de transcrição relacionado a expressão de enzimas antioxidantes, como a SOD, mas aparentemente sem interferência dos ômega-3 sobre catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX) (SAKAI et al., 2017).

Dentre os ômega-3, os VLC-PUFA EPA e DHA são os que têm sido consistentemente relacionados a benefícios à saúde, desde as primeiras observações mais robustas de efeitos protetivos cardiovasculares, observados em esquimós da Groenlândia (Inuits) com uma dieta rica em VLC-PUFA ômega-3 (BANG et al., 1971; DYERBERG et al., 1978, 1979), até os estudos mais atuais, mostrando efeitos sobre a doença de Alzheimer (FREUND-LEVI et al., 2006), doença renal crônica (HU et al., 2017), doenças inflamatórias e autoimunes (SIMOPOULOS, 2002), redução de triglicédeos (WEBER, RAEDERSTORFF, 2000) e efeitos positivos para a gestante e o feto (SWANSON et al., 2012).

Os ômega-3 são em geral seguros e bem tolerados, sendo necessária precaução quanto a sua ingestão junto a anticoagulantes, devido ao seu efeito antiplaquetário (PRYCE et al., 2016). Quanto ao câncer, a maioria dos estudos mostra um efeito positivo, mas há alguma controvérsia em casos específicos como um possível aumento de risco para o câncer de próstata (KHANKARI et al., 2016; MACLEAN et al., 2006; ZÁRATE et al., 2017). Além disso, há um risco real de contaminação por metais pesados e outros contaminantes nas fontes de origem marinha, acarretando risco para a saúde, como prejuízo cardiovascular e prejuízo no desenvolvimento fetal, contudo, os benefícios parecem superar os riscos (JAMES,

2013; PARK; MOZAFFARIAN, 2010). Os processos industriais podem retirar contaminantes nos suplementos, mas alguns transtornos gastrointestinais podem ocorrer pelo uso na forma de suplemento (ZÁRATE et al., 2017).

Em testes clínicos com os VLC-PUFA ômega-3 para prevenção secundária de DCV, o “*Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardio*” (GISSI), no estudo GISSI-Prevenzione, com sobreviventes de infarto do miocárdio recente, observou uma redução no desfecho primário de morte e eventos cardiovasculares (GISSI, 1999). Ainda nesse estudo, foi observada uma redução do risco de morte súbita, o que fortalece a hipótese de um efeito antiarrítmico proposto em outros estudos (MARCHIOLI et al., 2002; MURNAGHAN, 1981; SAVELIEVA et al., 2010). Ademais, no estudo GISSI-HF, em pacientes com insuficiência cardíaca, foi confirmada a redução da mortalidade observada no estudo GISSI-Prevenzione, embora a extensão da redução tenha sido menor (TAVAZZI et al., 2008).

De forma interessante, alguns estudos têm apontado para efeitos de modulação autonômica pelos ômega-3. Mediante a hipótese de que os efeitos antiarrítmico e de redução de morte súbita observados em pacientes pós-infarto do miocárdio resultaria de uma potencialização barorreflexa, Radaelli et al (2006) encontraram um aumento da função barorreflexa e da VFC em pacientes com insuficiência cardíaca estável pós-infarto do miocárdio ingerindo ômega-3. De outro lado, Christensen et al (2001) observaram melhora da VFC em pacientes com suspeita de doença isquêmica cardíaca. Corroborando a hipótese de efeitos autonômicos, muitos estudos também têm mostrado efeitos de redução da FC, o que pode ser importante dado que valores de FC elevados comumente se associam com pior desfecho cardiovascular (CHRISTENSEN, 2011; MOZAFFARIAN et al., 2005).

Com relação a hipertensão arterial, um estudo retrospectivo (baseado nos dados do “FINGEN study”) encontrou que mesmo em dose baixa os ômega-3 promoveram reduções clinicamente significativas da PA (~ 5 mmHg) em adultos com hipertensão sistólica isolada, o que potencialmente poderia reduzir o risco de doença cardiovascular (MINIHANE et al. 2016). Em homens saudáveis o consumo de VLC-PUFA ômega-3 reduziu a vasoconstrição a injeções de ANGII e noradrenalina em vasos do antebraço, desaparecendo esse efeito após 2 meses sem o tratamento (CHIN et al., 1993), e em pacientes com doença coronária aumentou a resposta de vasorelaxamento à ACh, com aumento da via do NO (TAGAWA et al., 1999). Em animais, uma dieta rica em PUFA com alto conteúdo de EPA e DHA foi capaz de

atenuar a PA em ratos hipertensos, além de melhorar a capacidade antioxidante plasmática (FRENOUX et al., 2001).

Em ratos com alta ingestão de frutose, o tratamento com ômega-3 reverteu o prejuízo de resposta de vasorelaxamento à acetilcolina, aumentando a expressão de eNOS e reduzindo o estresse oxidativo (NYBY et al., 2005). Além disso, os VLC-PUFA ômega-3 têm efeito agudo de relaxamento vascular, tanto em aorta quanto em mesentérica de ratos normotensos (LIMBU et al., 2018) e na aorta de SHR (ENGLER et al., 1994). Indiretamente relacionado aos ômega-3, foi demonstrado que o tratamento de ratos hipertensos com lecitina de ovos de galinhas alimentadas com dieta rica em ômega-3 promoveu redução da resposta a noradrenalina no leito vascular mesentérico o que foi associado com redução dos níveis plasmáticos de TNF $\alpha$  e um marcador de estresse oxidativo (NOWACKI et al., 2017), contudo, apesar dos efeitos terem sido imputados aos ômega-3, a lecitina tem efeitos próprios e também havia um alto conteúdo de outros PUFA, ômega-6, além de que foi utilizada uma dieta pobre em PUFA, o que pode ter alterado os animais não tratados, restando incerteza se esses efeitos foram mediados pelos ômega-3. Adicionalmente, Van Den Elsen et al (2014) demonstraram que os ômega-3 reduziram a produção de prostanoídes constritores em nível plasmático.

#### 1.4 O MODELO SHR E A HIPÓTESE A SER INVESTIGADA

No campo da pesquisa experimental, os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) servem como modelo animal adequado ao estudo da hipertensão essencial (FAZAN et al., 2001), manifestando quadro fisiopatológico compatível com o que é observado em humanos hipertensos, incluindo prejuízo autonômico com hiperativação simpática e insuficiência parassimpática em conjunto com prejuízo barorreflexo (CISTERNAS et al., 2010; JUDY; FARRELL, 1979; KLIPPEL et al., 2016), assim como o desenvolvimento de disfunção vascular envolvendo fatores constritores e prejuízo nos fatores relaxantes derivados do endotélio (LI et al., 2007; LÜSCHER; VANHOUTTE, 1986; PÚZSEROVÁ et al., 2010). Portanto, o SHR foi o modelo escolhido para realização de nosso estudo.

Com relação a metformina e os VLC-PUFA ômega-3, como exposto ao longo da introdução, os estudos vêm demonstrando que essas substâncias se relacionam com melhora sobre prejuízo autonômico e disfunção vascular, como demonstrado

em outros modelos/espécies, enquanto que os efeitos sobre a hipertensão em ratos SHR foram pouco explorados. Além disso, apresentam ação contrária à inflamação e ao estresse oxidativo, que são elementos relacionados a esses parâmetros.

Diante do exposto, nossa hipótese é que o tratamento crônico tanto com metformina quanto com os VLC-PUFA ômega-3 podem melhorar o prejuízo autonômico cardíaco e a disfunção vascular relacionados à HAS em ratos SHR, por meio de mecanismos tanto anti-inflamatório, envolvendo redução de  $TNF\alpha$ , quanto por melhora no balanço entre proteínas pró- e antioxidantes, envolvendo NOX2 e SOD1.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da metformina e dos VLC-PUFA ômega-3 na disfunção vascular e no prejuízo autonômico cardíaco relacionados à HAS em ratos SHR e verificar se os efeitos observados tinham relação com vias de inflamação e estresse oxidativo.

### 2.2 Objetivos Específicos

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos tratamentos sobre:

- A glicemia basal dos animais, por meio de aparelho glicômetro;
- A pressão arterial basal, por medida direta da pressão arterial pulsátil (PAP) via cateter na artéria femoral e conectado a um transdutor de pressão;
- A FC basal, a partir do intervalo de pulso (IP) no registro de PAP;
- O controle autonômico cardíaco, por meio de bloqueios farmacológicos das vias simpática e parassimpática, analisando as mudanças na FC;
- A função barorreflexa de modulação da FC, pela avaliação de sua atividade espontânea nos registros de PAP em repouso, e por meio da avaliação da resposta induzida por mudanças na PA por ação de drogas vasoativas;
- A reatividade vascular à noradrenalina num sistema *ex vivo* utilizando o leito vascular mesentérico isolado;
- A participação das vias do óxido nítrico e dos prostanoídes na reatividade vascular mesentérica, por meio de inibidores farmacológicos;
- Os níveis plasmáticos da citocina pró-inflamatória TNF $\alpha$ , utilizando o ensaio imunoenzimático ELISA;
- Vias pró- e antioxidante no tecido cardíaco, por meio da avaliação da expressão proteica de Nox2 e SOD1 pela técnica de western blot.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) e SHR, com 12 semanas de idade. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Todos os procedimentos experimentais estavam em conformidade com as diretrizes nacionais e internacionais sobre utilização de animais para fins científicos e foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (registro nº 022/2015). Os animais foram acomodados em gaiolas coletivas com livre acesso à água e ração, mantidos em ambiente com temperatura controlada (~ 22 °C) e ciclo claro-escuro de 12h.

#### 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram aleatoriamente separados em quatro grupos experimentais, de acordo com a espécie animal e o tratamento:

- 1) WN > Wistar Normotenso - tratamento controle (água/veículo)
- 2) SC > SHR - tratamento Controlado/inerte (água/veículo)
- 3) SM > SHR - tratamento com Metformina.
- 4) SO > SHR - tratamento com Óleo de peixe concentrado (33% EPA, 22% DHA).

Os animais foram separados nos grupos experimentais 3 dias antes do início dos tratamentos, sendo pesados e aferida a pressão arterial inicial em pletismógrafo caudal. Os valores de peso e pressão foram avaliados para verificar se estavam dentro do esperado para a idade e para as respectivas espécies.

#### 3.3 TRATAMENTO DOS GRUPOS

Todos os grupos foram tratados uma vez ao dia por via orogástrica (gavagem) por 30 dias. O grupo SM recebeu metformina 300 mg/Kg/dia, dosagem que já foi utilizada em experimentos anteriores de nosso grupo e que se mostrou efetiva

(OLIVEIRA et al, 2014). O grupo SO recebeu óleo de peixe concentrado em EPA e DHA na dose de 300 mg/Kg/dia (~165 mg/Kg/dia de EPA/DHA, 135 mg dos demais lipídeos do óleo de peixe), dose aproximada à que Rousseau-Ralliard et al (2009) utilizaram (240 mg/kg/dia), na qual foram observados efeitos sobre a FC em ratos SHR. Nesse estudo, os animais foram tratados por 8 semanas, mas, por meio de telemetria, foram observados efeitos com 4 semanas de tratamento. Além disso, foi utilizado o EPA e o DHA de forma isolada, portanto, como optamos por utilizar o óleo de peixe concentrado em EPA e DHA, ajustamos a dose para 300 mg/kg/dia.

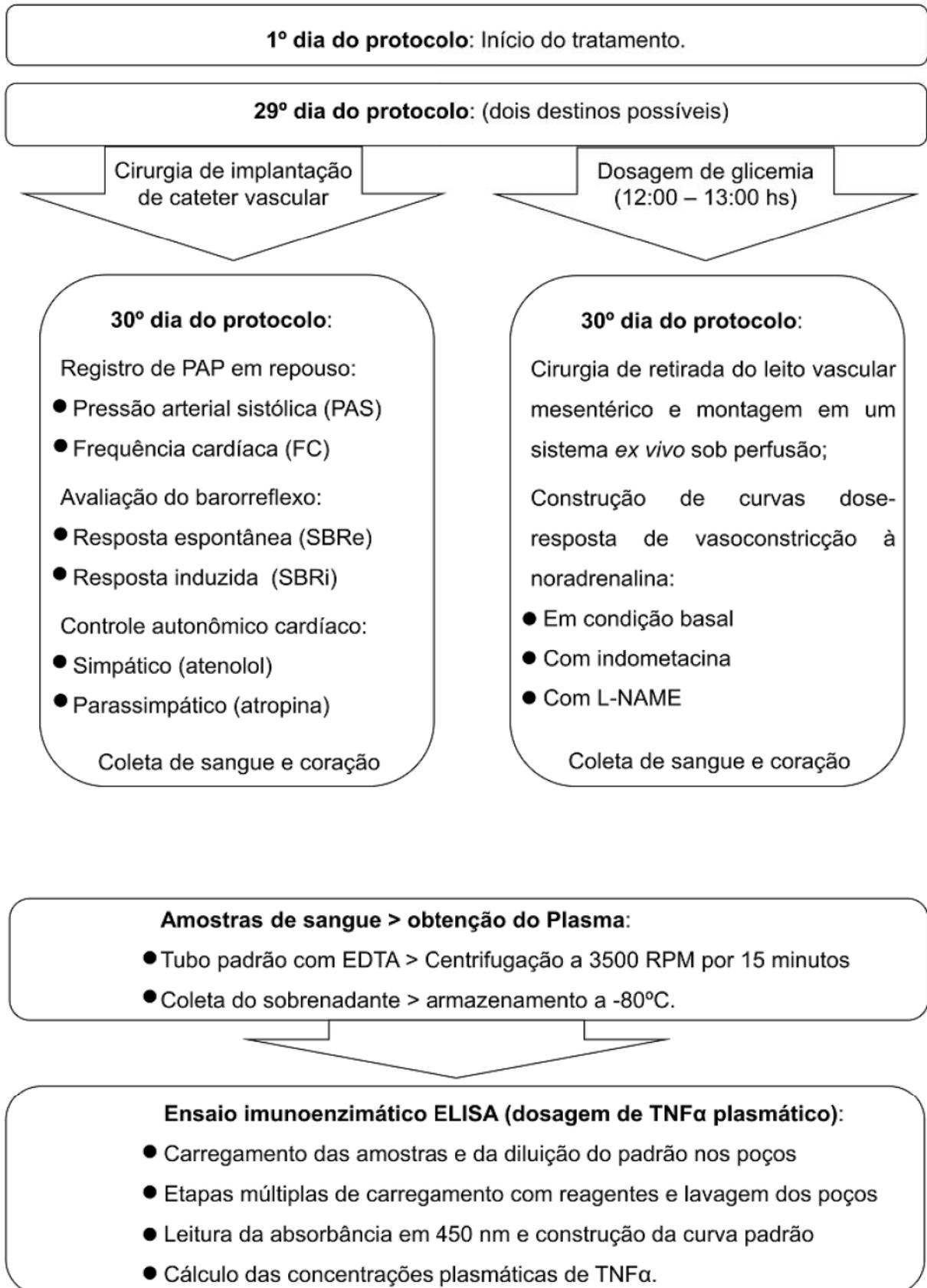
Os grupos WN e SC receberam o veículo (água). O óleo de peixe utilizado não possui veículo e não existe um tratamento placebo/inerte mais adequado para ser utilizado como controle nesse caso. Os óleos vegetais também podem apresentar efeitos sobre o sistema CV (RUEDA-CLAUSEN ET AL., 2007) e os inertes, como o óleo mineral, podem alterar o transito intestinal (PORTALATIN, WINSTEAD, 2012). Portanto, o tratamento com água também serviu como tratamento placebo/inerte (controle) em comparação ao óleo de peixe. O peso de todos os animais foi verificado ao longo do período de tratamento para ajuste da dose.

### 3.4 DROGAS E TRATAMENTOS

Glifage® - cloridrato de metformina (Merck S.A., Rio de Janeiro - RJ, Brasil). Ômega-3 [Óleo de peixe concentrado - 33% EPA, 22% DHA] Corabion® (Merck S.A., Rio de Janeiro – RJ, Brazil). Fenilefrina, atropina e L-NAME (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) Atenolol e indometacina (Farmácia Alquimia, Vitória, Brasil). Nitroprussiato de sódio e noradrenalina (Hipolabor, Belo Horizonte - MG, Brasil).

### 3.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Esquemática das etapas de maior relevância do protocolo experimental:



**Amostras de coração:**

- Armazenamento > congelamento a -80°C.

**Western Blot (avaliação da expressão proteica de Nox2 e SOD1):**

- Homogeneização de amostras de coração
- Eletroforese em SDS-PAGE (10%)
- Transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose
- Incubação com anticorpos anti-GAPDH, anti-Nox2 e anti-SOD1
- Incubação com anticorpos secundários conjugados a peroxidase
- Detecção das bandas utilizando substrato ECL
- Correção dos valores de Nox2 e SOD1 pelos valores da GAPDH.

### 3.6 ANESTESIA E EUTANÁSIA

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia geral com ketamina/xilazina (70/10 mg/kg de peso corporal, intraperitoneal). Após os protocolos experimentais, os animais foram submetidos a eutanásia por sobredose de anestésico. Foi realizada eutanásia por sobredose do anestésico utilizado nos procedimentos cirúrgicos (3 ou mais vezes a quantidade necessária para a anestesia geral), seguindo as diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013).

### 3.7 PLETISMOGRAFIA DE CAUDA

A PA foi avaliada nos animais no dia anterior ao início do tratamento, utilizando pletismografia de cauda. Após aquecimento em uma câmara apropriada (38 °C), os animais, acondicionados em contentores com abertura para respiração, receberam um “cuff” pneumático acoplados em suas caudas. Sob processo automatizado de insuflação e desinsuflação a PA foi registrada via um sistema conjunto transdutor/computador/software. Os valores de PA foram considerados como a média aritmética de 3 medidas consecutivas (mas intervaladas) com valores

condizentes. Os animais foram previamente adaptados ao sistema nos três dias anteriores.

### 3.8 MEDIDA DE GLICEMIA PLASMÁTICA

Os níveis de glicemia foram estimados a partir do sangue recolhido da extremidade da cauda dos ratos, utilizando tiras de glicose Accu-chek Active™ e um medidor de teste Accu-chek Active™. Foi realizada medida aleatória de glicemia, sem restrição alimentar prévia, mediante a possibilidade de o jejum interferir nos resultados dos testes experimentais cardiovasculares. Dessa forma, os animais foram alocados para medida da glicemia num horário padrão 12:00 – 13:00 hs, sem restrição alimentar, considerando que são animais noturnos e que a ingestão de alimento se dá principalmente à noite.

### 3.9 IMPLANTAÇÃO DE CATETERES NA ARTÉRIA E VEIA FEMORAL

Para realizar a exposição da artéria e veia femoral foi feita uma incisão inguinal. Os vasos foram isolados e uma extremidade de um cateter de polietileno (PE10-PE50 fundido) preenchido com solução salina heparinizada foi inserida na artéria e um outro cateter foi inserido na veia, ambos com a finalidade de acessar a circulação sistêmica, a fim de possibilitar o registro da pressão arterial e do intervalo de pulso (IP), e fornecer um acesso venoso para a aplicação de fármacos. A extensão do cateter fora do vaso foi conduzida pela região dorsal do animal de forma subcutânea para então ser exteriorizada próxima ao pescoço através de uma pequena incisão cutânea. Os cateteres foram bem fixados e então foi feita a sutura das incisões. Os animais foram adequadamente alocados para espera da recuperação da ação da anestesia.

### 3.10 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

Após um período de vinte e quatro horas da implantação do cateter, estando os animais conscientes, sem restrição de movimento e alocados em gaiolas individuais, foi realizada a conexão do cateter arterial previamente implantado a um transdutor de pressão (TSD104A - Biopac® Systems, Inc.) conectado a um sistema de

aquisição de dados (MP100 - Biopac ® Systems, Inc.). Após um período inicial de espera para permitir a adaptação do animal ao ambiente experimental (30 minutos), foi feito o registro da pressão artéria pulsátil dos animais durante 30 minutos. A partir desses registros foram realizadas as análises dos parâmetros basais de pressão arterial e frequência cardíaca em repouso.

### 3.11 AVALIAÇÃO DO BARORREFLEXO ESPONTÂNEO

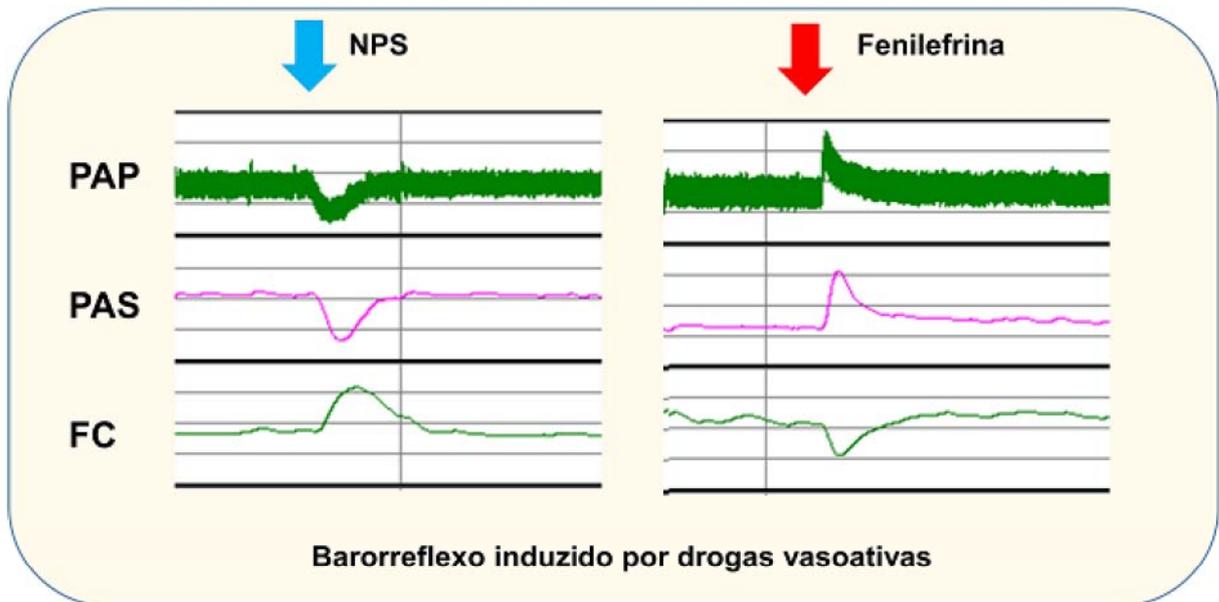
A partir dos registros de pressão arterial pulsátil a sensibilidade da função barorreflexa foi avaliada pela análise da mudança no IP em resposta às variações espontâneas da PA (SBRe), o método de sequencias, adaptado de Bertinieri et al (1985). O SBRe foi avaliado pelo método da sequência, identificando rampas de quatro ou mais sequências onde ocorreram progressivos aumentos ou reduções da PA em associação com mudanças do IP no mesmo sentido, ambos subindo ou ambos descendo. Como critério de inclusão, só foram contabilizadas rampas com coeficientes de correlação linear maiores que 0,8. Para o registro de cada animal foram calculadas as linhas de regressão linear das sequências encontradas e o sBRS foi calculado como a média das inclinações:  $SBRe = \Delta IP \cdot \Delta PA^{-1}$  (ms.mmHg<sup>-1</sup>).

### 3.12 AVALIAÇÃO DO BARORREFLEXO INDUZIDO

A avaliação da sensibilidade da função barorreflexa induzida (SBRi) foi realizada pela análise da mudança na FC em resposta a alterações transitórias da PA decorrentes da aplicação de drogas vasoativas. Adaptado de Sato et al (1999) e semelhante a Valenti et al (2011) e Chen et al (2015). Foram feitas injeções *in bolus* de drogas vasoativas através do cateter venoso, com intervalos de ao menos 15 min entre cada dose/droga. A drogas utilizadas foram o vasodilatador nitroprussiato de sódio (NPS, 50 µg / kg de peso corporal) e o agente vasoconstrictor fenilefrina (8 µg / kg de peso corporal), sendo as drogas aplicadas com uso de uma microseringa do tipo Hamilton, seguida por uma injeção de 0,2 mL de solução salina aplicada com uma seringa padrão para promover a entrada do fármaco na corrente sanguínea do animal através do cateter.

Como droga vasodilatadora o NPS reduz a pressão arterial provocando uma taquicardia reflexa mediada pelo barorreflexo. Por outro lado, como droga

vasoconstrictora a fenilefrina aumenta a pressão arterial provocando uma bradicardia reflexa mediada pelo barorreflexo. A figura 3 tra um registro típico dessa metodologia. A resposta de SBRi foi calculada como a inclinação da rampa de variação da FC, em batimentos por minuto (bpm), em resposta às mudanças na PA induzida pela aplicação das drogas vasoativas:  $SBRi = \Delta FC \cdot \Delta PA^{-1}$  (bpm.mmHg<sup>-1</sup>)



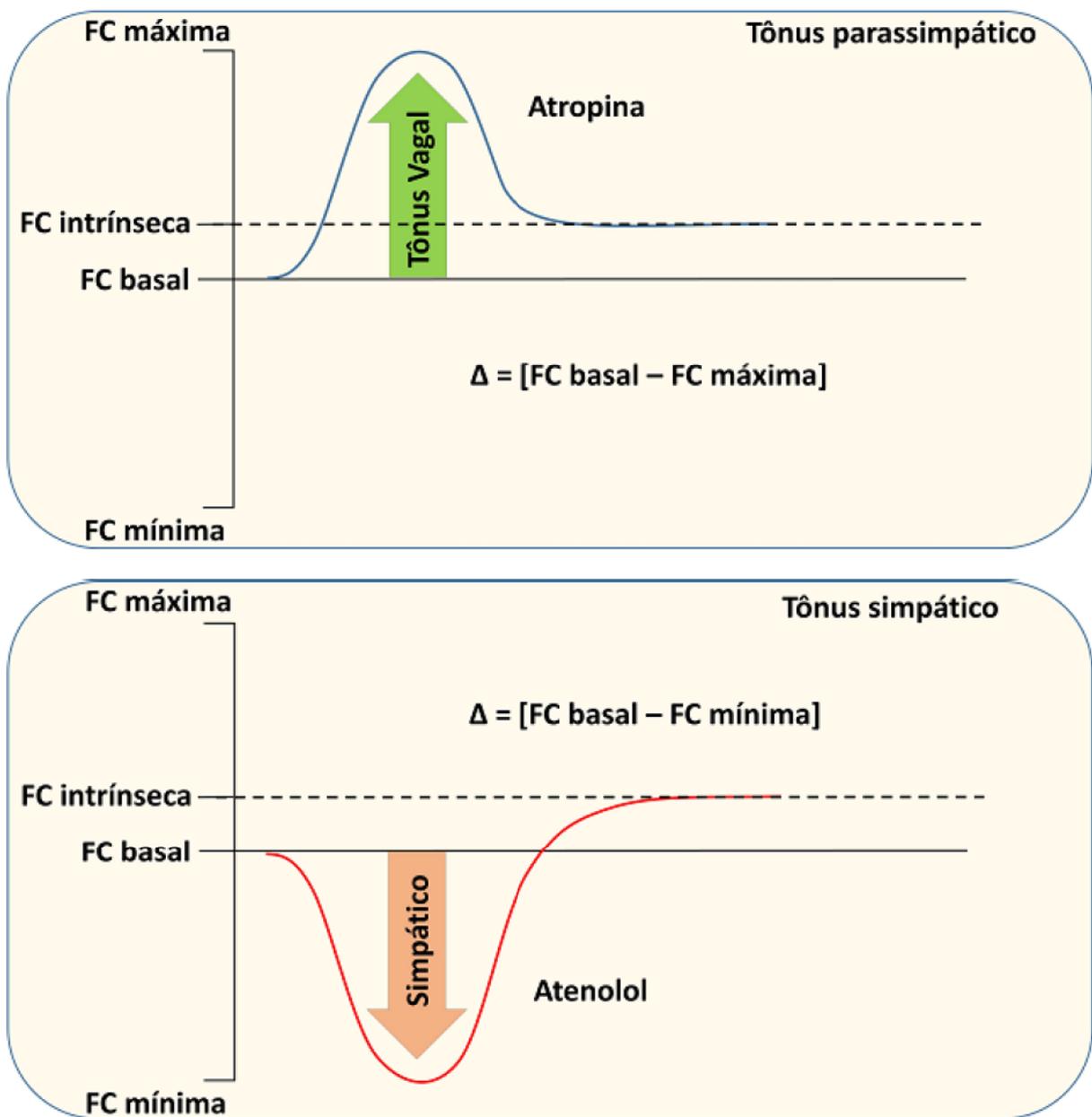
**Figura 3.** Resposta típica barorreflexa à redução e ao aumento de pressão arterial.

### 3.13 AVALIAÇÃO DO CONTROLE AUTONÔMICO CARDÍACO

Nos animais já preparados pelo implante dos cateteres, foi realizado o bloqueio farmacológico do sistema nervoso autônomo para avaliação do seu controle sobre a FC, adaptado de Chapleau e Sabharwal (2011) e semelhante a Huijing et al (2013). A participação de cada um dos componentes autonômicos foi avaliada pela diferença entre a FC basal inicial e a FC após o bloqueio farmacológico ( $\Delta FC$ ).

Para avaliação do controle do sistema nervoso parassimpático sobre a FC (tônus autonômico parassimpático cardíaco) foi utilizada a aplicação de um antagonista dos receptores muscarínicos colinérgicos em dose suficiente para promover um bloqueio consistente de forma sistêmica. Nesse caso a droga utilizada foi a atropina (2 mg/kg de peso corporal) aplicada por meio do cateter venoso.

Para avaliação do controle do sistema nervoso simpático sobre a FC (tônus autonômico simpático cardíaco) foi utilizado o atenolol (4 mg/kg de peso corporal), um antagonista  $\beta$ 1-adrenérgico altamente seletivo. Em ambos os casos, após a aplicação dos fármacos através dos cateteres foi aguardado um período de 10-15 minutos pós-injeção para a plena eficácia da ação farmacodinâmica com estabilização da resposta, permitindo avaliar a  $\Delta$ FC. Esta abordagem experimental fornece uma análise funcional do controle autonômico cardíaco através de ferramentas farmacológicas. A figura 4 traz um esquema do método.



**Figura 4.** Representação gráfica da avaliação do tônus simpático e parassimpático.

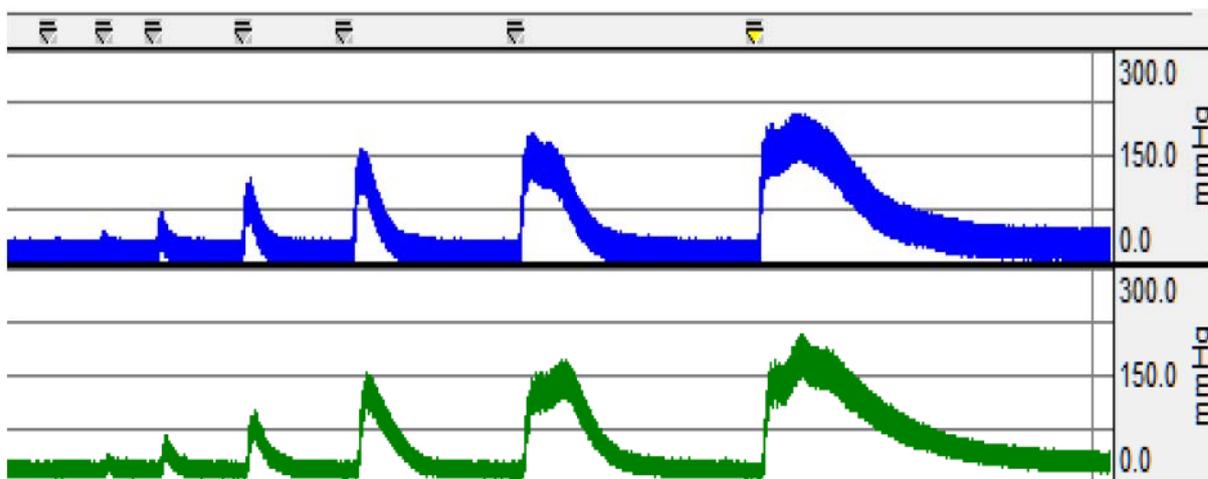
### 3.14 REATIVIDADE DO LEITO VASCULAR MESENTÉRICO

O leito vascular mesentérico (LVM) foi isolado e preparado segundo metodologia adaptada de McGregor (1965). Após anestesia, mediante laparotomia, a artéria mesentérica superior foi acessada e uma cânula de polietileno (PE50) foi inserida e fixada para acesso ao leito vascular mesentérico. O leito foi perfundido com solução nutritora, composta por: NaCl 130 mM; KCl 4,7 mM; MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1,17 mM; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 1,6 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18 mM; NaHCO<sub>3</sub> 14,9 mM; e Glicose 11,1 mM, sendo aerada com carbogênio (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) e mantida a 37 °C, com pH de 7,4. Por meio de uma bomba peristáltica (Hugo Sachs Electronics, Germany) foi realizada a perfusão do leito com fluxo pulsátil de aproximadamente 4,0 mL/min.

Após ser cuidadosamente removido e liberado das bordas do intestino e de outros tecidos, o leito foi colocado num banho isolado. A pressão de perfusão foi medida com o uso de um transdutor de pressão (TSD104A - Biopac® Systems, Inc.) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP100 - Biopac® Systems, Inc.) em interface com o software de aquisição e análise de dados AcqKnowledge 3.9.1 (Biopac systems, Inc.). Após um período inicial de estabilização (20-30 minutos), foi realizado o estudo da reatividade vascular, como descrito a seguir.

Foram obtidas curvas dose-resposta por injeções *in bolus*, no fluxo de perfusão, de doses (0,1 mL, 10<sup>-10</sup> > 10<sup>-2</sup> M) de noradrenalina (NOR). As respostas a NOR foram estudadas antes e após o uso de inibidores farmacológicos: para inibição inespecífica da classe de enzimas COX, foi utilizada a Indometacina (INDO: 10 µM), visando estudar a participação dos prostanoídes; E para inibição inespecífica da classe de enzimas NOS, foi utilizado o N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME: 100 µM), visando estudar a participação do óxido nítrico.

A figura 5 mostra um registro típico da reatividade vascular mesentérica.



**Figura 5.** Registro típico de reatividade vascular mesentérica à noradrenalina.

### 3.15 DOSAGEM DE TNF $\alpha$ POR ELISA

As concentrações plasmáticas de TNF $\alpha$  foram determinadas por ensaio imunoenzimático ELISA utilizando Kit comercial (Invitrogen, USA). Os procedimentos de realização do teste seguiram as instruções do fabricante, utilizando placa de 96 poços, realizando duplicata da dosagem de todas as amostras. Cada amostra de plasma foi diluída numa proporção 1:2 com o tampão de incubação do kit e então foram depositadas alíquotas de 100  $\mu$ L em cada poço. Junto às amostras dos animais foram também carregados poços com diluições seriadas da solução padrão com concentração conhecida para a construção da curva padrão. A leitura foi realizada em 450 nm e os valores das leituras das amostras dos animais foram transformados em unidade de concentração (pg/mL) pela correspondência à curva padrão. Os valores encontrados foram corrigidos pelo conteúdo total de proteína das amostras e expressos como % do grupo controle WN.

### 3.16 WESTERN BLOT

Os corações dos animais foram rapidamente coletados e então armazenados a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, após descongelamento, as amostras de coração foram homogeneizadas em meio a tampão de lise [Tris-HCL pH 7,4 (10 mM), PMSF (1 mM), NaVO<sub>3</sub> (1 mM), SDS (1 %), DTT (0,5 mM), EDTA (5 mM) e coquetel inibidor de protease (diluição 1:100)]. O método de Bradford foi utilizado para quantificação das proteínas totais nos homogenatos. Foi realizada eletroforese

em SDS-PAGE (10 %) com carregamento de 50 µg de proteína de cada amostra, cada uma em um poço. Foi realizada a transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com 5 % de leite em pó desnatado.

Após o bloqueio, cada uma das membranas foi incubada com um dos anticorpos primários para as proteínas de interesse. Foram utilizados anticorpos para as seguintes proteínas: gp91phox (Nox2) ([1:1000], BD Transduction Laboratories, EUA); e também Cu-Zn-SOD (SOD1) e GAPDH ([1:1000], [1:4000], Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

Na etapa seguinte, após processo de lavagem, as membranas foram então incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase ([1: 5000], Abcam, Inc., EUA) e posteriormente expostas a um substrato para quimioluminescência (ECL, Bio-Rad, Inc.), a partir da qual foi feita a detecção das bandas em um sistema especializado de captura de imagem (ChemiDoc XRS +, Bio-Rad, Inc.). Os sinais de *Western blot* foram quantificados utilizando o software Bio-Rad Image Lab 6.0. O valor do sinal das proteínas de interesse foi normalizado pelo sinal da proteína controle GAPDH e em cada gel os dados foram expressos como porcentual (%) do valor dos animais controle normotensos.

### 3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

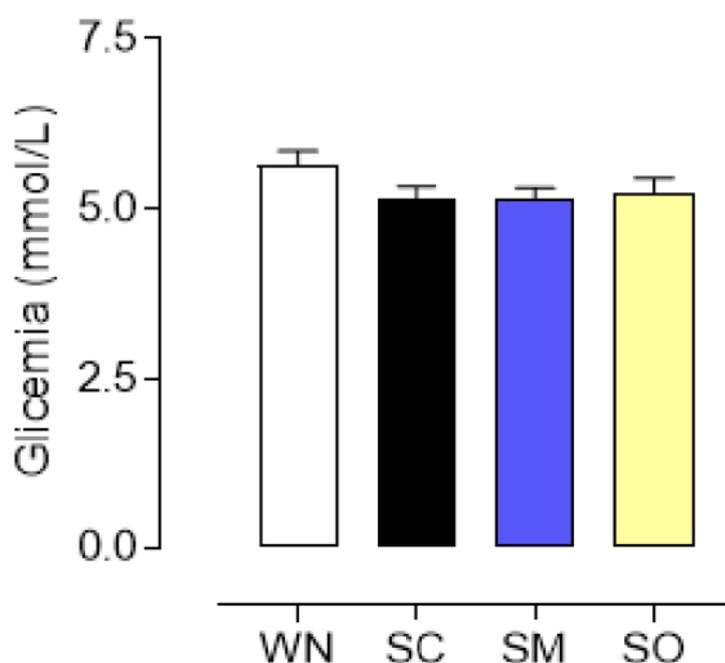
Os resultados do estudo são apresentados como a média ± erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados pelo método de análise de variância (ANOVA) de 2-vias, para as curvas dose-resposta, e ANOVA de 1-via para as demais análises, seguidos pelo pós-teste de Fisher de menor diferença significativa (LSD). Diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significantes. O software GraphPad Prism (versão 7.02, EUA) foi utilizado para realizar as análises. Os grupos WN e SC foram comparados ao SM e SO separadamente.

## 4. RESULTADOS

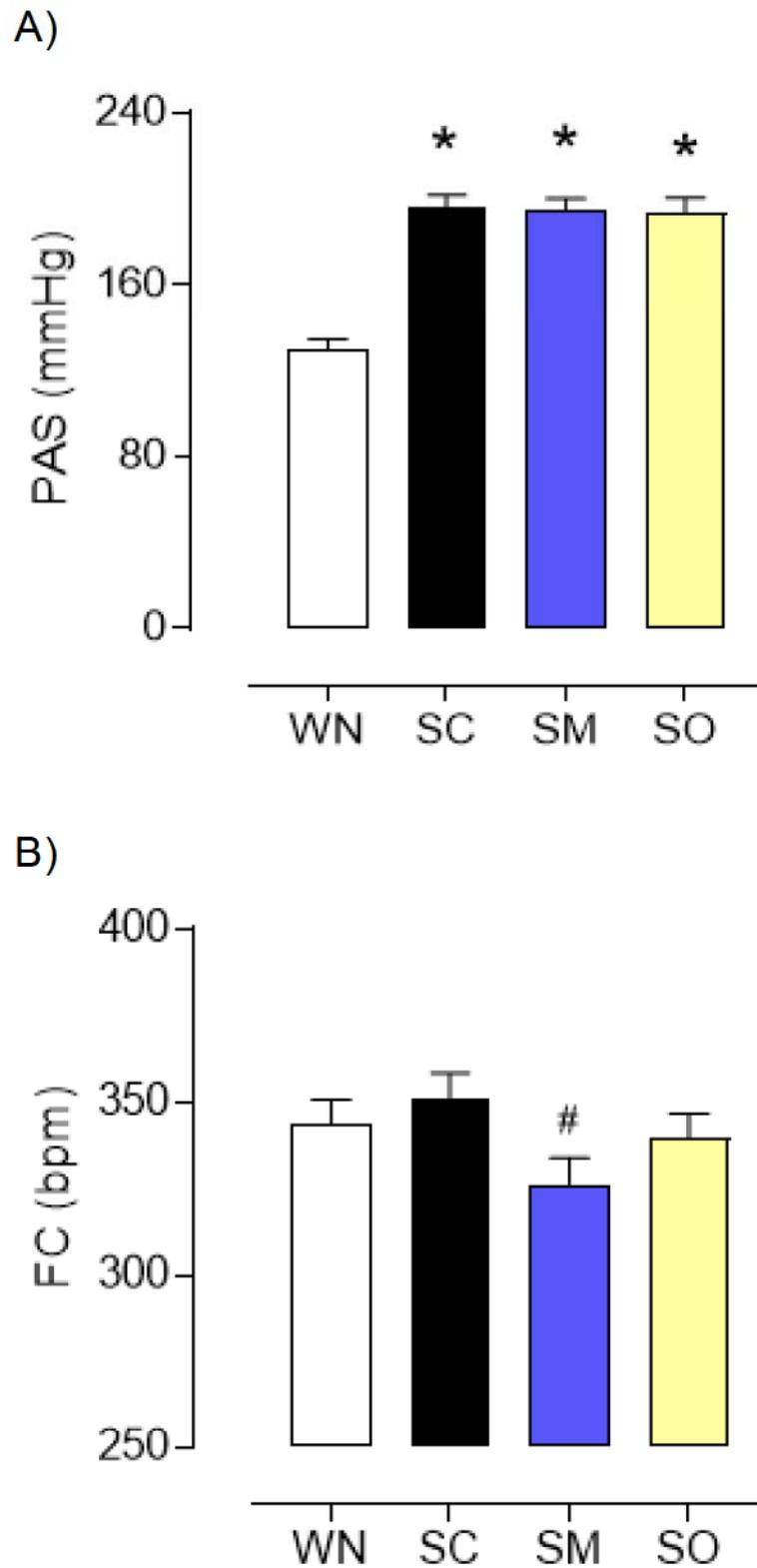
### 4.1 PESO, PRESSÃO ARTERIAL, FREQUÊNCIA CARDÍACA E GLICEMIA

No que diz respeito a glicemia plasmática, os animais SHR são um modelo de hipertensão arterial e não de diabetes. Dessa forma, a metformina não modificou a glicemia no grupo SM, condizente com seu mecanismo de ação anti-hiperglicêmico, mas não hipoglicemiante, utilizado no controle da diabetes mellitus. De modo semelhante, não foram observadas alterações no grupo SO, evidenciando que os efeitos cardiovasculares observados ao longo desse estudo, por parte de ambos os tratamentos, não estão relacionados a alterações na glicêmica (Figura 6, Tabela 1).

Como esperado, os animais SHR apresentaram maior pressão arterial de repouso em comparação com o grupo normotenso e os tratamentos não foram capazes de reduzir a PA (Figura 7A, Tabela 1). Em relação a frequência cardíaca, seus valores em repouso foram menores no grupo SM comparativamente ao SC, enquanto que a média do grupo SO foi numericamente menor que a do SC, mas sem diferença estatística (Figura 7B, Tabela 1).



**Figura 6.** Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre a glicemia plasmática ao final do período de tratamento. Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM.  $n=6$ . Os grupos WN e SC foram comparados ao SM e SO separadamente.



**Figura 7.** Efeitos dos tratamentos sobre pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC). (A) PAS e (B) FC. Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs WN; # $p < 0,05$  vs SC.  $n=11-17$ . Os grupos WN e SC foram comparados ao SM e SO separadamente.

Na tabela 1 mostramos os resultados relacionados aos grupos estudados em relação ao peso corporal inicial e final, pressão arterial sistólica inicial (por pletismografia) e final (medida direta), e frequência cardíaca e glicemia ao final do período de tratamento de 30 dias. Tanto no início do tratamento, quanto ao final os ratos SHR, tratados ou não, apresentaram peso corporal menor do que os apresentados pelo grupo WN, relativo a diferença de espécie.

**Tabela 1.** Peso corporal inicial e final, pressão arterial sistólica (PAS) inicial e final, e frequência cardíaca (FC) e glicemia ao final do período de tratamento de 30 dias.

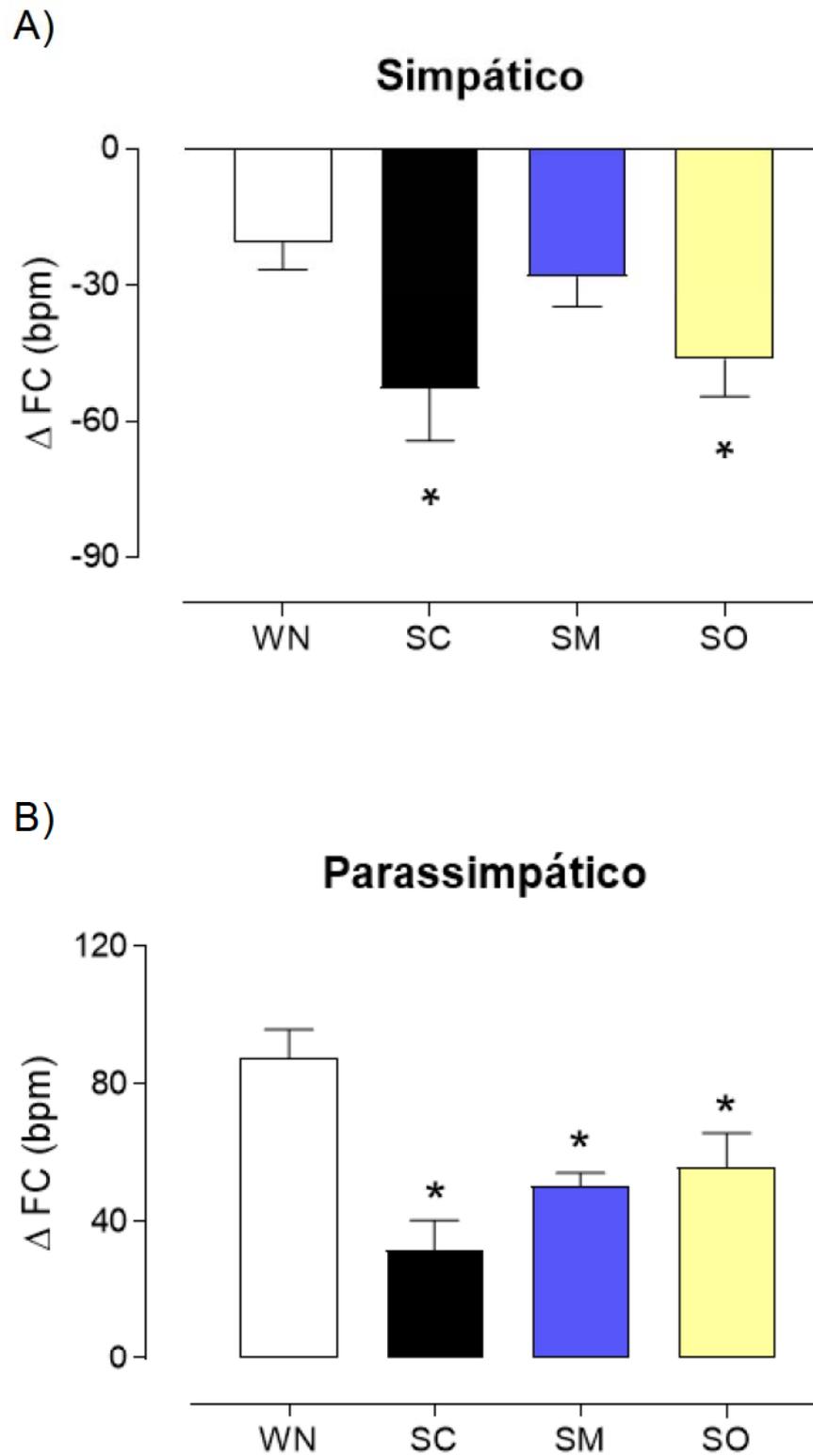
Parâmetros	WN	SC	SM	SO
Peso inicial (g)	379,5 ± 7,0	244,6 ± 3,4*	238,5 ± 3,5*	244,3 ± 3,4*
Peso Final (g)	455,6 ± 7,9	283,8 ± 3,5*	269,2 ± 3,5*	284,2 ± 3,2*
PAS inicial (mmHg)	135,0 ± 2,6	205,7 ± 5,3*	208,6 ± 3,7*	205,0 ± 4,4*
PAS final (mmHg)	129,9 ± 4,5	195,5 ± 6,1*	194,4 ± 5,5*	193,4 ± 6,9*
FC (bpm)	343,9 ± 6,8	351,4 ± 7,0	326,4 ± 7,4 <sup>#</sup>	339,9 ± 6,9
Glicemia (mmol/L)	5,65 ± 0,20	5,15 ± 0,18	5,13 ± 0,17	5,25 ± 0,20

Valores expressos como média ± EPM. \* p < 0,05 vs WN; <sup>#</sup> p < 0,05 vs SC. n=11-17. Comparação estatística realizada entre os grupos na mesma linha.

#### 4.2 CONTROLE AUTONÔMICO CARDÍACO

Para melhor compreender os efeitos observados sobre a FC, os componentes do controle autonômico da FC foram estudados. Foi demonstrado que o controle autonômico cardíaco simpático está aumentado no grupo SC em relação ao WN, o que foi atenuado no SM, igualando os valores do grupo WN, mas não foi modificado no grupo SO (Figura 8A).

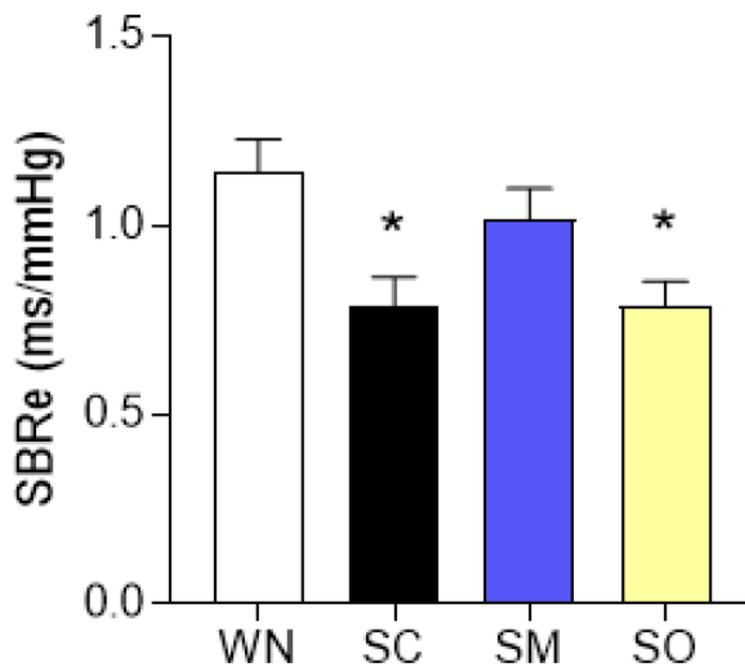
Quanto ao tônus parassimpático, o grupo SC apresentou valores reduzidos em comparação ao WN, enquanto que as médias dos grupos SM e SO foram numericamente maiores que a do SC, mas sem diferença estatística (Figura 8B).



**Figura 8.** Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre o controle autonômico da frequência cardíaca. Avaliação do controle (A) simpático e (B) parassimpático. Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs WN.  $n=5-10$ . Os grupos WN e SC foram comparados ao SM e SO separadamente.

#### 4.3 BARORREFLEXO ESPONTÂNEO

A sensibilidade da função barorreflexa foi avaliada pela análise de resposta espontânea do barorreflexo (SBRe). A resposta observada foi menor no grupo SC em comparação ao WN, evidenciando o prejuízo nos animais hipertensos, e o tratamento com metformina foi capaz de igualar a resposta do SM à do WN, ao passo que não houve mudança no grupo SO (Figura 9).

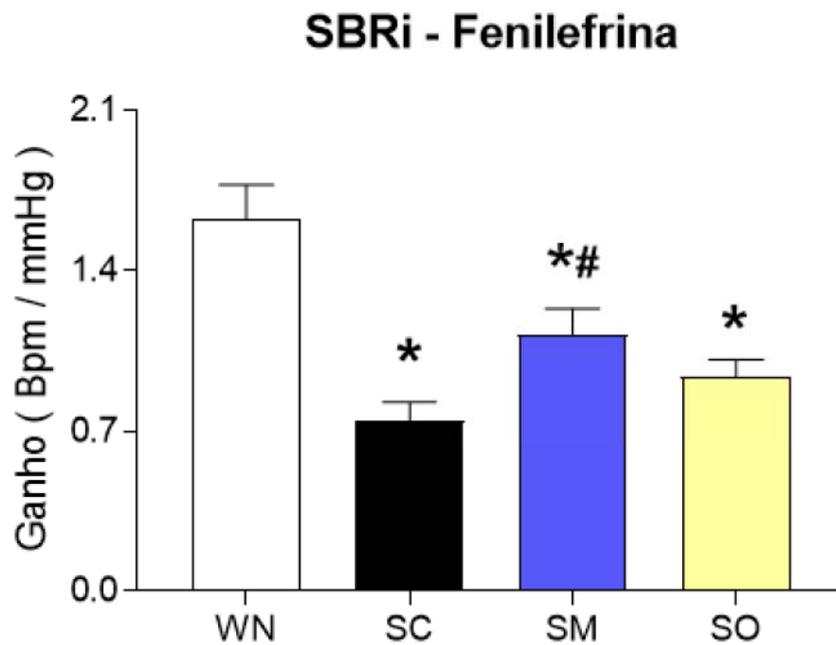


**Figura 9.** Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre a resposta barorreflexa espontânea (SBRe). Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs WN.  $n=11-17$ . Os grupos WN e SC foram comparados ao SM e SO separadamente.

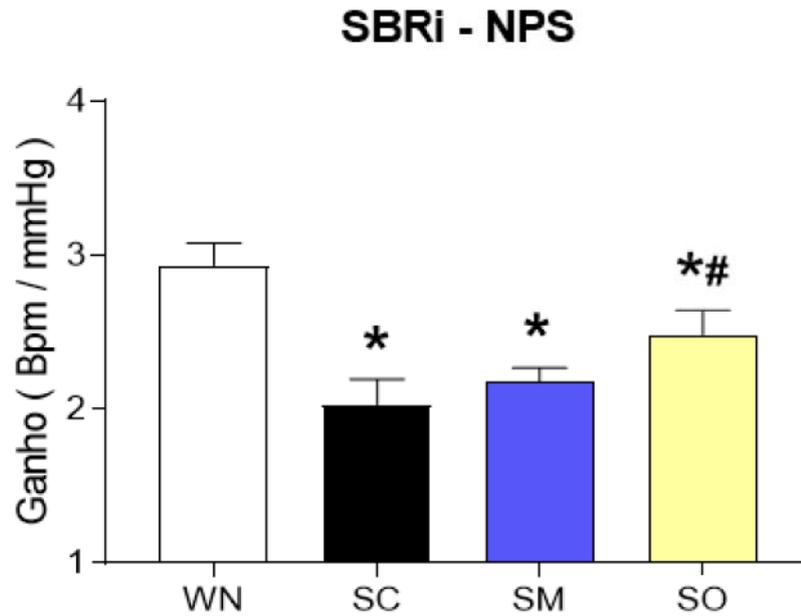
#### 4.4 BARORREFLEXO INDUZIDO

Para uma avaliação mais completa da resposta barorreflexa foi realizado o teste de ativação barorreflexa induzida pelo uso de drogas vasoativas (SBRi). Os animais hipertensos apresentaram uma resposta reflexa reduzida em comparação aos animais normotensos, tanto na resposta de bradicardia ao agente vasoconstritor fenilefrina (Figura 10), quanto na resposta de taquicardia ao agente vasodilatador NPS (Figura 11). Esse resultado é condizente com o observado na SBRe.

Entre os grupos tratados, a metformina foi capaz de aumentar a resposta à fenilefrina sem modificar a resposta ao NPS. Ao contrário, o tratamento com os VLC-PUFA ômega-3 não alterou a resposta à fenilefrina, mas aumentou a resposta ao NPS. Tomados em conjunto, esses dados demonstram um prejuízo global do barorreflexo no grupo SC, tanto na resposta de bradicardia quanto na resposta de taquicardia, e uma melhora parcial desses parâmetros promovida pelos tratamentos.



**Figura 10.** Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre a função barorreflexa induzida (SBRi) em resposta a fenilefrina. Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs WN; # $p < 0,05$  vs SC.  $n=11-17$ . Os grupos WN e SC foram comparados ao SM e SO separadamente.

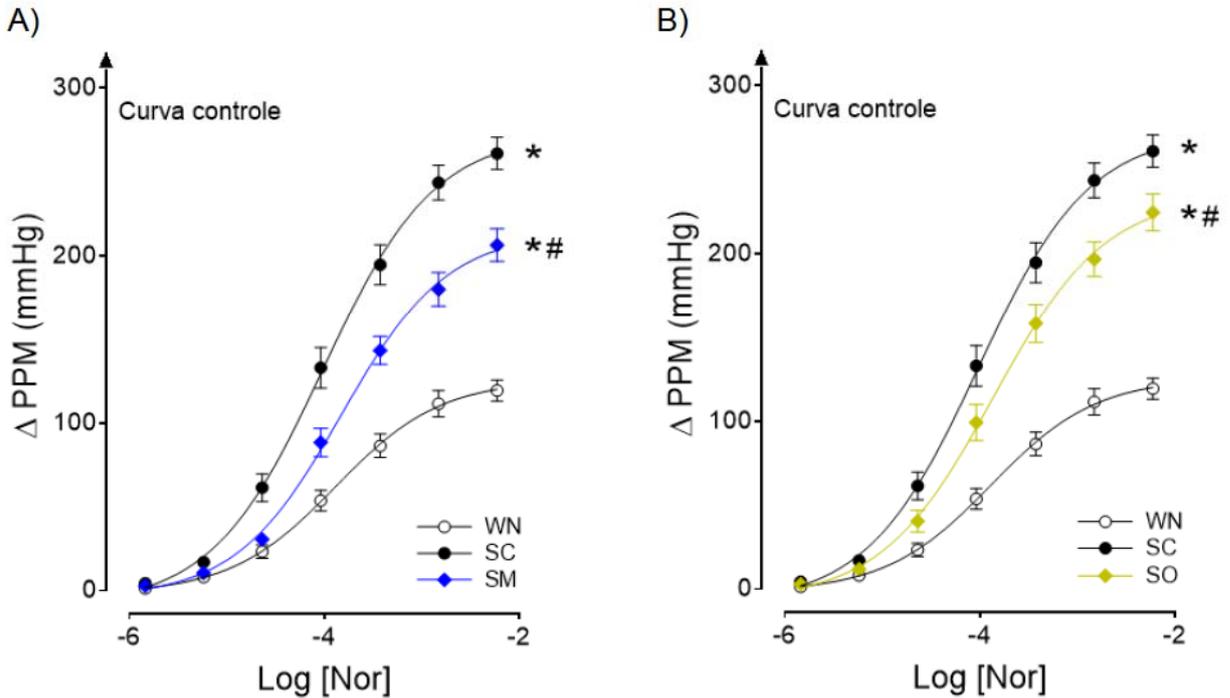


**Figura 11.** Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre a função barorreflexa induzida (SBRI) em resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS). Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs WN; # $p < 0,05$  vs SC.  $n=11-17$ . Os grupos WN e SC foram comparados ao SM e SO separadamente.

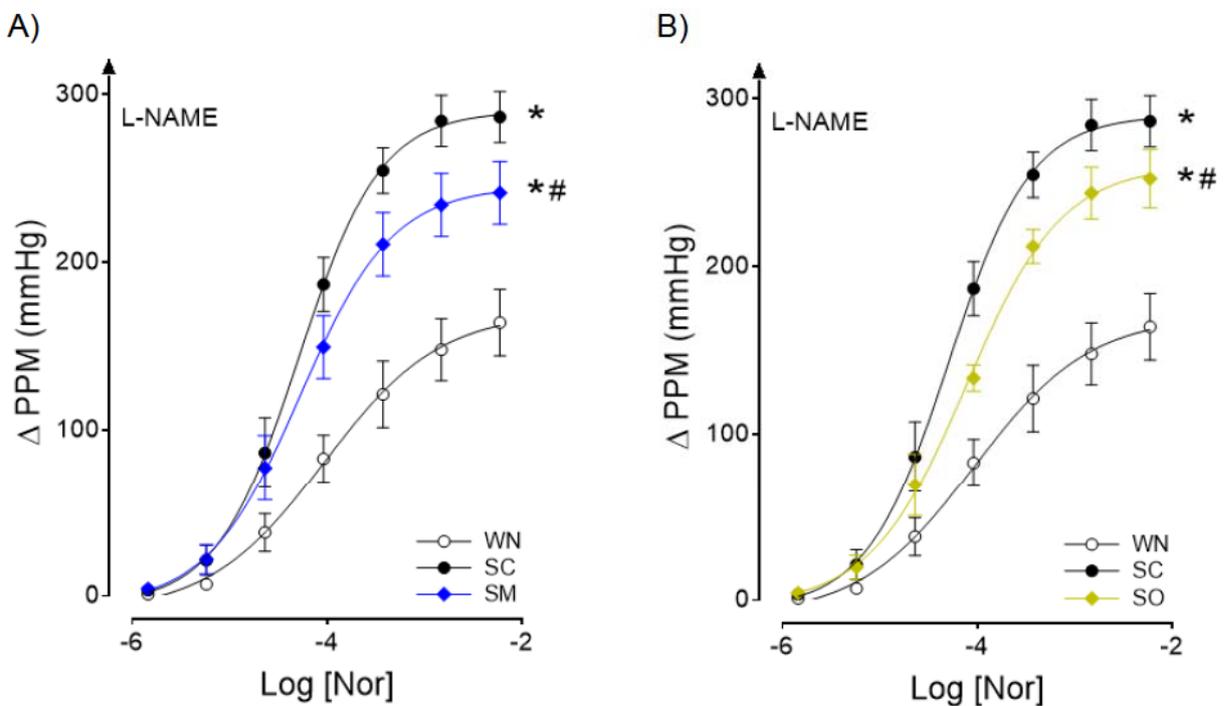
#### 4.5 RESPOSTA VASCULAR À NORADRENALINA

Condizente com a fisiopatologia da hipertensão arterial, os animais do grupo SC apresentaram uma resposta vasoconstrictora muito maior que a do grupo normotenso, no estudo de reatividade no leito vascular mesentérico (Figura 12, Tabela 2).

Entre os grupos tratados, a metformina foi capaz de atenuar consideravelmente essa resposta aumentada. De forma semelhante, os ômega-3 também promoveram uma moderada atenuação da resposta. Não houve diferença no  $pD_2$  entre os grupos (Tabela 2). Sob inibição na NOS pelo L-NAME a resposta de todos os grupos foi aumentada, mas as diferenças entre os grupos não desapareceram (Figura 13, Tabela 2).



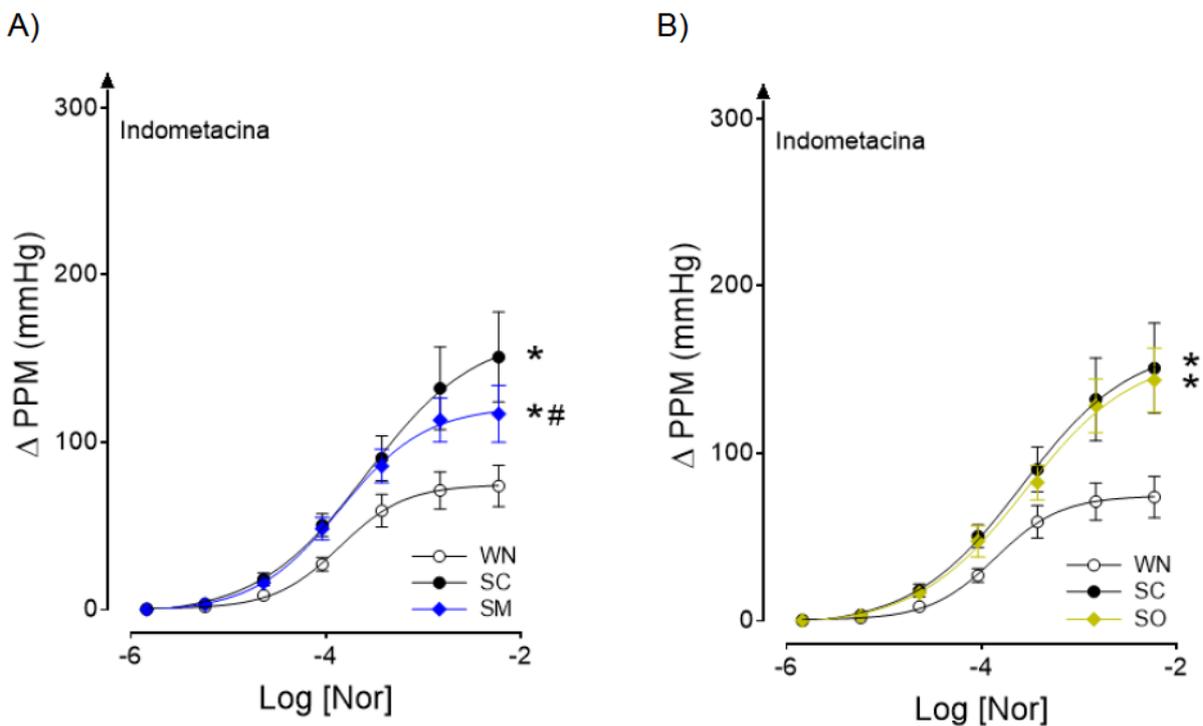
**Figura 12.** Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre a curva dose-resposta de vasoconstrição induzida por noradrenalina (NOR) no leito vascular mesentérico, em ausência de inibidores farmacológicos. Comparação dos grupos WN e SC ao grupo tratado com (A) metformina e (B) ômega-3. Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM.  $n=13-15$  por grupo. \* $p < 0,05$  vs WN; # $p < 0,05$  vs SC.



**Figura 13.** Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre a curva dose-resposta de vasoconstrição induzida por noradrenalina (NOR) no leito vascular mesentérico, em presença de L-NAME. Comparação dos grupos WN e SC ao grupo tratado com (A) metformina e (B) ômega-3. Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM.  $n=5-7$  por grupo. \* $p < 0,05$  vs WN; # $p < 0,05$  vs SC.

Sob inibição da COX pela indometacina a resposta de todos os grupos foi reduzida, mas principalmente nos animais hipertensos (Figura 14, Tabela 2). Entre eles, o grupo SC foi o que teve uma queda ainda maior, evidenciando que a resposta aumentada pela hipertensão tinha uma grande participação de produtos da COX, possivelmente prostanoídes vasoconstrictoras.

Em relação ao grupo SM, o efeito da indometacina reduziu em muito sua diferença para o grupo SC, indicando que parte do efeito da metformina é por melhora no balanço de prostanoídes, porém outros mecanismos poderiam explicar essa pequena diferença residual. Por outro lado, para o grupo SO a indometacina extinguiu por completo sua diferença de resposta em relação ao grupo SC, indicando que esse seja o mecanismo primordial pelo qual exerceu seus efeitos.



**Figura 14.** Efeitos da metformina e dos ômega-3 sobre a curva dose-resposta de vasoconstrição induzida por noradrenalina (NOR) no leito vascular mesentérico, em presença de indometacina. Comparação dos grupos WN e SC ao grupo tratado com (A) metformina e (B) ômega-3. Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM.  $n=8$  por grupo. \* $p < 0,05$  vs WN; # $p < 0,05$  vs SC.

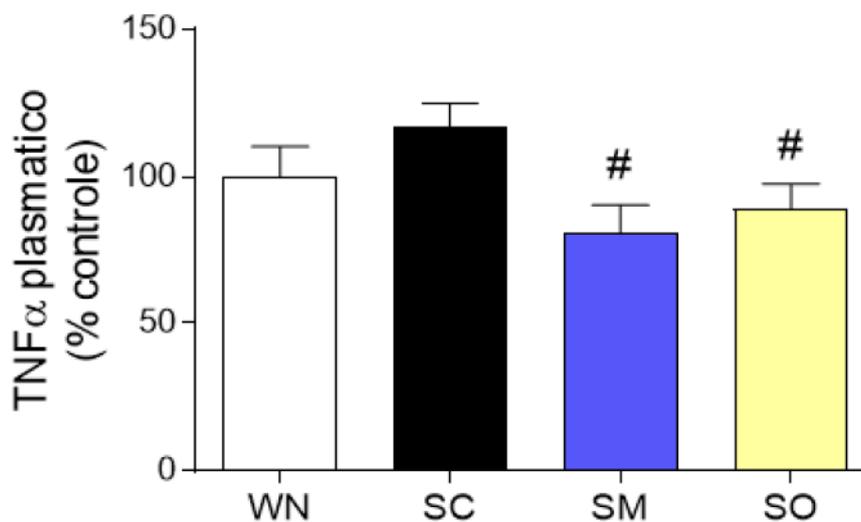
**Tabela 2.** Parâmetros da reatividade vascular mesentérica: sensibilidade (-log EC50: pD2) e resposta máxima (Rmáx) da curva dose-resposta à noradrenalina.

Parâmetros	WN	SC	SM	SO
Rmáx (curva controle)	119 ± 6	261 ± 10*	206 ± 10*#	224 ± 11*#
Rmáx (L-NAME)	164 ± 20	287 ± 15*	241 ± 18*#	252 ± 17*#
Rmáx (índometacina)	74 ± 12	150 ± 27*	117 ± 17*#	143 ± 19*
pD2 (curva controle)	3,88 ± 0,11	4,02 ± 0,09	3,82 ± 0,09	3,86 ± 0,10
pD2 (L-NAME)	4,03 ± 0,23	4,30 ± 0,09	4,28 ± 0,14	4,12 ± 0,11
pD2 (índometacina)	3,86 ± 0,15	3,59 ± 0,28	3,85 ± 0,15	3,55 ± 0,22

Valores expressos como média ± EPM. \* p < 0,05 vs WN; # p < 0,05 vs SC. n=5-15. Comparação estatística realizada entre os grupos na mesma linha.

#### 4.6 DOSAGEM DE TNF $\alpha$ PLASMÁTICO

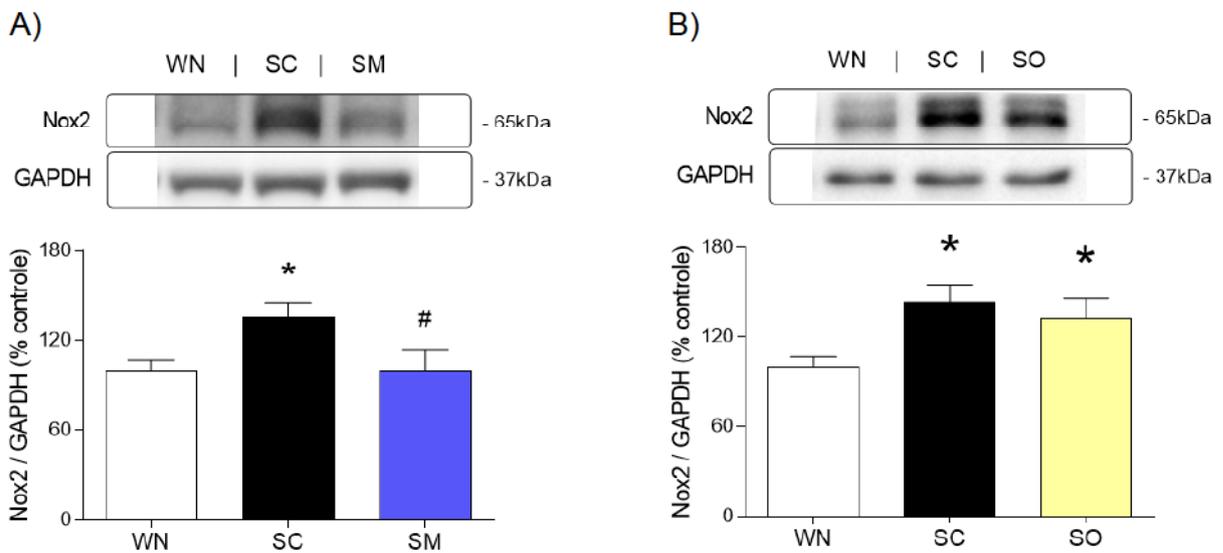
A dosagem da citocina inflamatória TNF $\alpha$  demonstrou que tanto o tratamento com metformina e com os VLC-PUFA ômega-3 foram capazes de reduzir os seus níveis em comparação ao grupo SC (Figura 15).



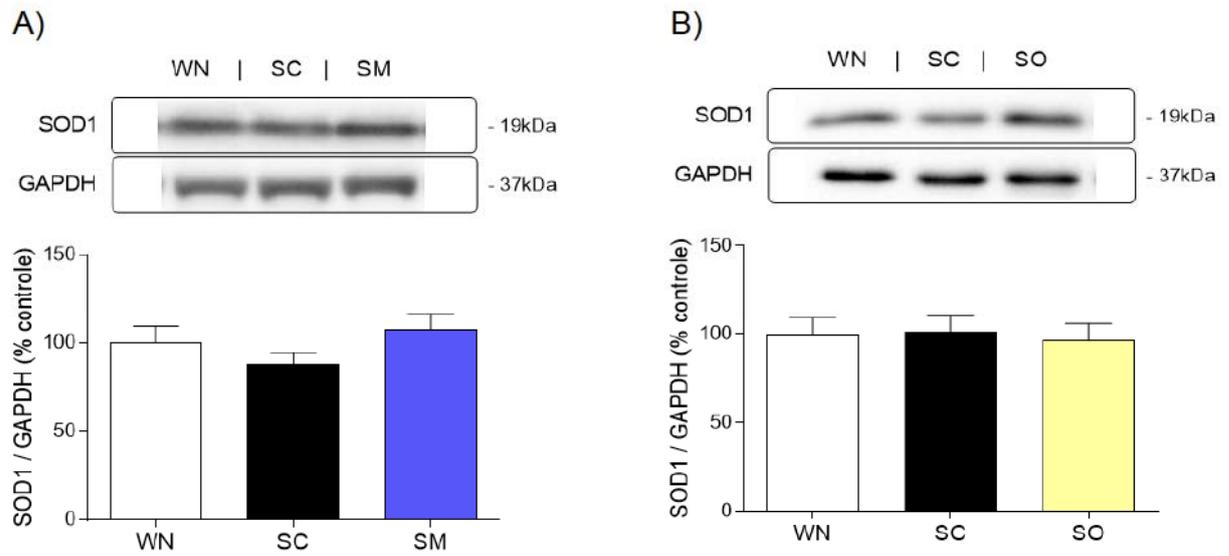
**Figura 15.** Efeitos da metformina e dos ômega-3 nos níveis plasmáticos da citocina inflamatória TNF $\alpha$ . Os dados são expressos como a média ± EPM. n=6 por grupo. #p < 0,05 vs SC. Os grupos WN e SC foram comparados ao SM e SO separadamente

#### 4.7 EXPRESSÃO PROTEICA DE NOX2 E SOD1 NO CORAÇÃO

A avaliação da expressão proteica da subunidade Nox2 da NADPH oxidase tipo II (NOX2) por *western blot* evidenciou um aumento da NOX2, enzima pró-oxidante, no grupo SC (Figura 16). O tratamento com metformina foi capaz de reduzir os níveis dessa proteína igualando ao grupo WN, enquanto que os ômega-3 não foram capazes de alcançar o mesmo efeito. Quanto a superóxido dismutase (SOD) Cu-Zn-SOD (SOD1), não houve diferença entre WN e SC e nenhum dos tratamentos gerou alteração (Figura 17). A análise da expressão proteica foi realizada em géis diferentes para comparação dos grupos WN e SC com os grupos SM (WN – SC – SM) e SO (WN – SC – SO), visto que serão submetidos para publicação separadamente, cada um destes em um artigo diferente.



**Figura 16.** Efeitos da metformina e dos ômega-3 na expressão da proteína pró-oxidante NOX2 nos corações. Comparação dos grupos WN e SC ao grupo tratado com (A) metformina e (B) ômega-3. Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM.  $n=6$  por grupo. \* $p < 0,05$  vs WN; # $p < 0,05$  vs SC. Os dados apresentados na figura A e B foram extraídos de géis diferentes.



**Figura 17.** Efeitos da metformina e dos ômega-3 na expressão de proteínas antioxidante SOD1 nos corações. Comparação dos grupos WN e SC ao grupo tratado com (A) metformina e (B) ômega-3. Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM.  $n=6$  por grupo. Os dados apresentados na figura A e B foram extraídos de géis diferentes.

## 5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que em ratos hipertensos, não diabéticos, a metformina oral crônica promoveu melhora parcial sobre o prejuízo autonômico, com redução do tônus simpático cardíaco para níveis semelhantes aos de animais normotensos e melhorando a resposta barorreflexa, levando a redução da FC e dos níveis de NOX2 e TNF $\alpha$ , além de reduzir a disfunção vascular relacionada a prostanoídes vasoconstritores. Por outro lado, os VLC-PUFA ômega-3 também promoveram melhora parcial sobre o prejuízo autonômico, melhorando a resposta barorreflexa, reduzindo TNF $\alpha$ , além de reduzir a disfunção vascular relacionada a prostanoídes vasoconstritores. Nenhum dos tratamentos promoveu alteração na PA e glicemia.

No presente estudo, tivemos como foco de nossas análises os efeitos dos tratamentos propostos sobre ratos SHR, adultos jovens, como modelo animal de hipertensão arterial essencial. Em relação aos ratos SHR, comparados aos ratos normotensos, foi observada PA elevada, como esperado. A FC do SC foi numericamente superior à do WN, mas sem diferença estatística. Dado semelhante foi apresentado por Krieger et al (1999), ao compilar dados de dois estudos de sua equipe (Gava et al., 1995; Negrão et al., 1992), onde, em comparação aos ratos normotensos, os ratos SHR apresentavam tônus simpático elevado, mesmo com valores semelhantes de FC em repouso aos valores dos controles normotensos. Por outro lado, também já foi demonstrado que a FC pode estar aumentada nesses animais (KLIPPEL et al., 2016), dessa forma, diferenças nas metodologias, idade dos animais e condições experimentais podem levar a essa diferença de resultados, uma vez que a FC nesses animais pode inclusive sofrer alteração mediante estresse (SHENG-GANG et al., 1996). Em nosso estudo, a análise do controle autonômico da FC demonstrou controle simpático aumentado e parassimpático reduzido, e também a resposta barorreflexa estava reduzida, o que é uma característica da hipertensão arterial e já foi demonstrado em ratos SHR quando esses parâmetros são comparados aos controles normotensos (KLIPPEL et al., 2016).

Nos nossos resultados, em relação a disfunção vascular nos ratos SHR, a reatividade vascular à noradrenalina estava aumentada do grupo SC em comparação ao WN, o que pelo bloqueio com indometacina foi evidenciado envolver prostanoídes vasoconstritores, assim como foi demonstrado por Matsumoto et al

(2016) estudando a artéria femoral de ratos normotensos WKY e SHR, onde a resposta aumentada à noradrenalina também foi abolida pela indometacina, evidenciando a disfunção vascular envolvendo EDCF na hipertensão. Por outro lado, o prejuízo em vias de relaxamento vascular, envolvendo NO e EDHF, também parece ter envolvimento na disfunção vascular, como observado por Li et al (2007) em vasos mesentéricos de ratos SHR. Em relação a proteína NOX2, essa estava elevada no coração dos SHR. O aumento da expressão de NOX2 em SHR também foi demonstrado por Alvarez et al (2008) em corações e por Troiano et al (2016) em aorta, assim como Briones et al (2011) encontraram aumento de sua atividade em células musculares lisas vasculares. De fato, vem sendo demonstrado um importante papel dessa proteína pró-oxidante no desenvolvimento da hipertensão, como revisado por Datla e Griendling (2010). Em nível central, foi demonstrado que o estresse oxidativo no NTS e NA, mediado pela NOX, leva a prejuízo no barorreflexo (TSAI et al., 2013), assim como o estresse oxidativo no RVLM também está relacionado à hipertensão neurogênica nos animais SHR por aumento de atividade simpática (NISHIHARA et al., 2012).

Quanto a dosagem plasmática de TNF $\alpha$ , o valor encontrado no grupo SC, apesar de numericamente superior, não foi diferente do grupo WN, o que, apesar de ter sido demonstrado poder estar aumentado em ratos SHR e participando do desenvolvimento da hipertensão (CHOU et al., 1998), também foi demonstrado que pode não estar aumentado (NOWACKI et al., 2017). Essa divergência pode estar relacionada a fatores experimentais como inclusive a idade dos animais, como demonstrado por Chou et al (1998), onde a diferença entre os ratos SHR e os normotensos WKY só foi detectada com 14-17 semanas, mas não antes disso. Em nosso caso, os animais terminavam o período de tratamento com 16 semanas, talvez um período de transição, onde posteriormente essa diferença começaria a ser evidenciada. De todo modo, foi demonstrado que o TNF $\alpha$  podem estar associado com o prejuízo CV observado na hipertensão (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2008), além de poder interferir no controle autonômico, levando a neuroinflamação e estresse oxidativo no RVLM, aumentando o tônus simpático (GALVÃO et al., 2016; WU et al., 2012, 2016), e prejudicando o barorreflexo (ŽERA et al., 2016).

Os dados sobre os efeitos da metformina e de VLC-PUFA ômega-3 sobre os animais hipertensos, que são o foco do presente trabalho, serão discutidos a seguir, detalhadamente.

## 5.1 EFEITO DA METFORMINA SOBRE PARÂMETROS BASAIS E AUTONÔMICOS

Em relação a PA, nossos resultados estão em acordo com os achados de Muntzel et al (1999) em animais SHR de 12 semanas de idade. Nesse estudo foram utilizadas duas condições experimentais, o consumo de dieta normal em sódio (NaCl: 0,3 %) ou com teor elevado (NaCl: 8,0 %), sendo testada a ação do tratamento com metformina na água de beber por 4 semanas, iniciando com uma dose de 350 mg/kg/dia gradativamente aumentada durante as 2 primeiras semanas até chegar em 500 mg/kg/dia, e assim até o fim do tratamento. Nesse estudo, ao fim do período de tratamento, mesmo com uma dose superior à que utilizamos em nosso trabalho, não foi observada alteração da pressão arterial em registro de 24h por rádio-telemetria, mesmo após analisar separadamente o período de 12h de luminosidade e o de 12h de escuridão.

De forma interessante, nesse estudo de Muntzel et al (1999), a metformina foi capaz de contrapor o incremento na PA causado dieta de alto teor de sódio. Ao avaliar a elevação na PA que ocorre naturalmente no “despertar” do sono, novamente a metformina não teve interferência sobre os valores nos ratos SHR com dieta normal, mas foi capaz de inibir a resposta aumentada nos SHR em dieta com alto teor de sódio. Ao serem colocados em um contentor de acrílico, normalmente utilizado para pletismografia, o estímulo de estresse promoveu aumento na PA de forma semelhante em todos os grupos, e o tratamento não interferiu nisso. Adicionalmente, ao avaliar a PA por meio de cateter arterial, nos animais anestesiados, as diferenças entre os grupos pelo tratamento com metformina foram semelhantes às observadas no registro de 24h por telemetria.

A FC também foi avaliada no estudo de Muntzel et al (1999), sendo observada nos registros de 24h uma redução da FC já a partir dos primeiros dias de tratamento, em ambos os grupos tratados com metformina, independente da dieta, o que foi mantido durante o período de tratamento, chegando ao final com uma redução da FC da ordem de 13-14 bpm nos grupos que receberam metformina. Ao avaliar a elevação na FC que ocorre naturalmente no “despertar” do sono, a metformina foi capaz de atenuar essa elevação, apenas no grupo com dieta normal. Uma possível explicação discutida pelos autores para o efeito do sódio sobre a PA seria via

aumento de atividade simpática, dessa forma, os efeitos da metformina estariam vinculados a um antagonismo à elevação da atividade simpática. De fato, a metformina conseguiu reduzir a FC em ambos os grupos, o que fortalece essa hipótese, contudo, no grupo de alta ingestão de sódio esse efeito foi observado mesmo sem que a dieta tivesse alterado a FC. De todo modo, nossos resultados corroboram os desse estudo, uma vez que encontramos a redução da FC em ratos SHR sem haver redução da PA. E, como discutiremos abaixo, nossos resultados evidenciam efeito sobre o tônus simpático cardíaco. Ademais, ambos utilizamos ratos SHR, de mesma idade, e tempo e dose semelhantes.

Fazendo um paralelo com um estudo realizado em humanos, He et al (2012) estudando 360 humanos hipertensos obesos não-diabéticos, recebendo terapia anti-hipertensiva convencional, tratados durante 24 semanas, onde metade dos pacientes recebeu metformina 500 mg/dia, não encontraram diferença na PA pela metformina. Por outro lado, Hamidi Shishavan et al (2017) encontraram um resultado diferente do que observamos em nosso estudo. Eles utilizaram ratos SHR em duas condições, intacto e com diabetes mellitus tipo 1 induzida por injeção de estreptozotocina com 7 semanas de idade. O tratamento com metformina começou com 8 semanas de idade, 300 mg/kg/dia na água de beber e durou 12 semanas. Ao final desse período, por meio de pletismografia, observaram uma redução na PA tanto nos diabéticos (~42 mmHg) quanto nos não-diabéticos (~37 mmHg). Esse efeito não foi relacionado a alterações glicêmicas, pois o tratamento não foi capaz de alterar nem a glicemia de jejum (3h de jejum), por meio de glicômetro, nem a hemoglobina glicada, em nenhum dos grupos. Aqui, o maior tempo de tratamento é um fator plausível de explicar a diferença de nossos resultados, assim como a administração na água de beber ao invés de gavagem. Contudo, um ponto que já vem sendo discutido na literatura científica é a idade de início de tratamento.

De fato, enquanto em nosso estudo e no de Muntzel et al (1999) foram utilizados ratos SHR com 12 semanas de idade, tratados por 4 semanas e sem obter redução na PA, Bhalla et al (1996) utilizando ratos SHR com 6-8 semanas de idade tratados por 4 semanas, mesmo numa dose menor, 200 mg/kg/dia, via subcutânea, dividida em duas aplicações, observaram redução da PA, ao passo que o mesmo tratamento em ratos normotensos não teve nenhum efeito. De forma semelhante, Verma et al (1994) utilizando ratos SHR com 5 semanas, realizando o mesmo protocolo de tratamento que Muntzel et al (1999), observaram redução na PA, o que

não ocorreu no grupo controle normotenso. Dessa forma, os efeitos de redução da PA pela metformina, além de dependerem de fatores como a idade de início do tratamento, parecem estar relacionados ao processo fisiopatológico da HAS, uma vez que, esse efeito não foi visto da mesma forma nos animais normotensos. E mesmo no estudo de Muntzel et al. (1997), onde o tratamento agudo foi capaz de promover curta redução de PA nos ratos normotensos, a magnitude da redução foi superior nos animais hipertensos, como veremos em detalhes mais à frente. Além disso, tanto nesse estudo de Verma et al (1994) quanto no de Hamidi Shishavan et al (2017), foram observados os efeitos cardiovasculares com redução de PA sem que houvesse nenhuma mudança na glicemia devido ao tratamento, semelhante ao que achamos em nossos estudos, o que parece evidenciar que os efeitos CV da metformina, em diferentes condições experimentais, não está vinculado a efeitos sobre a glicemia.

Anteriormente ao estudo onde Muntzel et al (1999) avaliaram o efeito do tratamento crônico da metformina, Muntzel et al (1997) haviam investigado o efeito de uma dose aguda. Nesse estudo foi utilizada uma dose de 100 mg/kg de metformina em ratos SHR de 250-330 g, conscientes, após o implante de cateter arterial e venoso 48h antes. Foi observada uma rápida queda da PA pela injeção de metformina via cateter venoso, sendo mais consistente nos SHR (~26 mmHg) do que nos ratos controle normotensos (~9 mmHg). Ademais, essa queda de pressão foi acompanhada de um aumento na FC, tanto nos SHR (~49 bpm) quanto de igual magnitude nos normotensos. Analisando criticamente essa relação entre a PA e a FC, podemos supor que tenha ocorrido uma ativação barorreflexa em resposta a queda na PA causada pela metformina, e dessa forma, havendo uma mudança na FC de semelhante magnitude entre SHR e normotensos, para uma queda de PA que foi mais robusta nos SHR, também ficaria evidenciada a atenuação barorreflexa presente nos SHR. De todo modo, esses dados demonstraram o efeito redutor de PA pela metformina em tratamento agudo.

Petersen e DiBona (1996, 1997) realizaram protocolo semelhante de dose aguda em ratos SHR e também observaram queda na PA, mas, de forma contrária a Muntzel et al. (1997), observaram redução da FC, o que pode estar relacionado com o fato de terem realizado seus estudos pouco tempo após o último procedimento envolvendo anestesia, ao passo que Muntzel et al. (1997) realizaram os experimentos 48h após o último procedimento que envolveu anestesia. No primeiro

estudo (Petersen; DiBona, 1996), os animais (~282 g) receberam o implante de um cateter intracerebroventricular (ICV) e após uma semana foram anestesiados e receberam um implante para registro da atividade nervosa simpática renal (RSNA) juntamente com cateter na artéria e veia femoral. Alguns ratos tiveram interrupção da sinalização dos barorreceptores mediante desnervação sino-aórtica (SAD) e desses alguns também tiveram interrupção da sinalização parassimpática por vagotomia. Foi aguardado 60 minutos de estabilização e então feitos registros de 10 minutos para cada situação. Foi feita a aplicação de metformina pelo cateter venoso em doses de 1-100 mg/kg, produzindo de forma rápida e reversível uma resposta dose-dependente de redução da PA, FC e RSNA, a qual não foi influenciada pela SAD, nem SAD + vagotomia, nem pela inibição da COX por aplicação de indometacina e nem pela inibição da NOS por aplicação de L-NAME. Por outro lado, uma dose cumulativa de 0,25-1 mg de metformina ICV promoveu esses mesmos efeitos observados pela dose de 100 mg/kg via cateter venoso. Em conjunto esses dados sugerem uma ação da metformina em nível central e que independem de sua ação sobre mecanismos de glicemia visto que produziu esses efeitos mesmo de forma aguda e em baixíssima dose, numa aplicação central. Além disso, esse efeito parece ser independente do barorreflexo, do parassimpático, de prostanoídes e de óxido nítrico. Assim, parece haver uma ação central de inibição simpática pelo uso agudo, o que talvez não fosse mantido num tratamento crônico.

De forma semelhante ao estudo anterior, Petersen e DiBona (1997), realizaram o implante do cateter ICV em ratos SHR (300-350 g) que posteriormente foram anestesiados e receberam um implante para registro da atividade nervosa simpática renal juntamente com cateter na artéria e veia femoral. Após 4h de recuperação da anestesia, foram injetadas doses de 1mg de metformina ICV e feito o registro por 60 minutos. Foi observada uma redução de PA entre 20-40 minutos após a aplicação, que desapareceu ao final de 60 minutos. Por outro lado, houve uma consistente redução da FC e RSNA basais. Posteriormente os animais foram submetidos a um protocolo de indução de estresse que provocava aumento na PA, FC e RSNA, o que foi atenuado nos animais que receberam metformina, fortalecendo a hipótese de que a metformina tenha um efeito de antagonismo do sistema nervoso simpático. Mas novamente, os efeitos observados foram mediante tratamento agudo.

Tomados em conjunto os estudos de Petersen e DiBona (1996, 1997) e de Muntzel et Al (1999) a metformina parece ter um real efeito de redução da FC basal,

tanto pelo tratamento de forma crônica quanto de forma aguda, o que por si só já seria um indicativo de melhora no balanço simpato-vagal, o que é ainda reforçado pela demonstração de redução conjunta da atividade do nervo simpático renal nos estudos de Petersen e Dibona (1996, 1997). Nesse sentido, os resultados de nosso estudo corroboram os achados desses estudos e fortalecem a hipótese de uma melhora no balanço simpato-vagal envolvendo redução da influência simpática tônica sobre a FC, pois o grupo SM apresentou redução da FC comparado ao SC, ao mesmo tempo em que igualou os valores do grupo WN em relação ao controle autonômico cardíaco simpático, que estava aumentado no grupo SC. Tomados em conjunto, isso demonstra uma melhora do equilíbrio autonômico cardíaco pela metformina. De fato, os efeitos observados por Petersen e Dibona (1996) ocorreram mesmo em animais que sofreram desnervação sino-aórtica e vagotomia, evidenciando que não envolviam o barorreflexo e nem uma resposta vagal, mas sim uma atenuação da influência simpática tônica. Além disso, essa hipótese também é reforçada pelos achados de Petersen e Dibona (1997) quanto a atenuação da resposta simpática ao estresse provocada pela metformina, inibindo o aumento tanto da FC quanto da atividade do nervo simpático renal.

De forma interessante, esses efeitos discutidos anteriormente, em relação a FC e ao controle autonômico da FC em repouso e em resposta a estímulo de estresse, não são os únicos efeitos desse tipo observados nos estudos. Petersen e Dibona (1997) também observaram que a metformina produziu uma melhora da resposta barorreflexa nesses ratos SHR após uma administração aguda intracerebroventricular (ICV) de metformina. Nesse sentido, os dados de nosso estudo não apenas corroboram esses achados, mas vão além, demonstrando um efeito sustentado ao longo de um tratamento crônico via oral. Por outro lado, em um estudo em humanos, avaliando 120 indivíduos obesos com diabetes tipo 2, tratados com metformina 850 mg duas vezes por dia durante 4 meses, Manzella et al (2004) demonstraram um resultado de modificações na VFC indicando redução da atividade simpática cardíaca e melhor equilíbrio simpático-vagal, além de ter reduzido a glicemia de jejum, a insulinemia e o índice HOMA de resistência à insulina.

Mais recentemente, o efeito da metformina também foi avaliado sobre ratos que passaram por procedimento de lesão isquêmica induzida por oclusão da artéria cerebral média permanente, utilizando ratos de uma linhagem hipertensa e propensa a desenvolver acidente vascular encefálico (AVE), ratos SHR-SP (GUO et al., 2017).

A idade dos animais não foi informada na respectiva publicação, contudo, os animais chegaram ao final do período de tratamento com peso próximo a 120 gramas, evidenciando serem extremamente jovens, como pode ser observado na curva de peso para idade de ratos SHR-SP apresentada por Naruse et al (2002). Guo et al (2017) realizaram o tratamento crônico com doses de 10-300 mg/kg/dia, onde foi observado que a metformina foi capaz de atenuar os danos causados pelo AVE o que foi relacionado como sendo mediado pela melhora barorreflexa induzida pela metformina, de modo que uma atividade parassimpática aumentada, relacionada ao barorreflexo promoveria essa neuroproteção. Na avaliação desses animais antes da indução do AVE, após as 3 semanas de tratamento, foi observado que a metformina não promoveu alteração da PA nem da FC em repouso. Além disso, a resposta barorreflexa, testada em resposta a fenilefrina (5-10 mg/kg), foi aumentado nos animais tratados nas doses de 30 e 100 mg/kg/dia de metformina, mas não na dose de 300 mg/kg. Adicionalmente, a metformina foi capaz de reduzir TNF $\alpha$  no soro dos animais tratados, o que não foi observado nos animais com desnervação sino-aórtica, evidenciando que esse efeito era relacionado com o barorreflexo.

Os dados de Guo et al (2017) parecem corroborar os dados de Petersen e Dibona (1996, 1997) quanto ao barorreflexo, contudo utilizando um tratamento crônico, assim como o que usamos em nosso trabalho. Dessa forma, nossos dados também parecem corroborar os de Guo et al (2017) nesse quesito, porém, os ratos desse estudo eram extremamente jovens, e novamente entramos na questão da idade de início de tratamento desses animais, bem como a idade com que foram avaliados ao final do tratamento. Dessa forma, nossos dados não apenas corroboram os achados desse estudo, mas evidenciam que esses efeitos ocorrem mesmo em animais adultos, com um processo de hipertensão já bem estabelecido, o que não era conhecido. Ademias, tanto nossos dados, e os estudos de Muntzel et al (1999) e Petersen e Dibona (1996, 1997), demonstraram uma redução da FC, seja pelo tratamento crônico ou agudo, o que não foi demonstrado por Guo et al (2017), demonstrando que em possíveis fatores de divergência, a idade parece ser um importante fator explicativo.

Tomados em conjunto os estudos de Petersen e Dibona (1996, 1997) e Muntzel et al. (1997) com tratamento agudo, juntamente aos dados de Muntzel et Al (1999) e os nossos dados em animais tratados cronicamente, e ainda os dados de Guo et al (2017) em ratos extremamente jovens, podemos concluir que, de modo

geral, a metformina tem real potencial de redução da FC que parece envolver a atenuação do tônus simpático cardíaco, bem como é capaz de promover melhora da resposta barorreflexa em ratos hipertensos. A relevância desses efeitos da metformina se dá pelo fato de haver uma relação forte, gradual e independente entre a elevação da FC de repouso e a incidência de DCV (COONEY et al., 2010), bem como a redução do barorreflexo e da VFC são associados a risco CV aumentado (HEAD, 1995; TSUJI et al., 1996). Ademais, a hiperativação simpática por si só leva a dano CV independente de aumentos na PA (FISHER; PATON, 2012), de forma que a função autonômica tem relação com o risco CV na hipertensão arterial (LANTELME et al., 2002).

## 5.2 EFEITO DOS ÔMEGAS-3 SOBRE PARÂMETROS BASAIS E AUTONÔMICOS

Em ratos SHR, observamos que os VLC-PUFA promoveram melhora na resposta barorreflexa, sem alterar a PA e glicemia. Em relação a PA, nossos resultados estão em acordo com o estudo de Bačová et al (2013), que utilizaram ratos SHR com 12 meses de idade e os trataram com éster etílico de ômega-3 (65 % DHA + EPA) na dose de 200 mg/kg/dia durante 2 meses. Nesse estudo, mesmo um tratamento de 2 meses, como dose razoavelmente próxima a que nós utilizamos, não foi capaz de reduzir a PA nos SHR machos e nem nas ratas normotensas Wistar, contudo foi capaz de reduzir a PA nos ratos normotensos Wistar e nas fêmeas SHR, o que o autor sugere ser uma diferença sexual envolvendo a metabolização do ácido araquidônico (ARA), sendo mais favorável a vasodilatação nas fêmeas e mais favorável a vasoconstrição no macho, o que é respaldado pelos seus dados onde o tratamento com os ômega-3 aumentou o conteúdo eritrocitário e plasmático de ARA nas ratas SHR, mas não nos machos.

Ao contrário de nossos achados, Dlugosova et al (2009) utilizando ratos SHR com 1 ano de idade, realizaram o tratamento com ômega-3 (EPA/DHA) 30 mg/dia durante 2 meses. Foi observada uma redução na PA da ordem de ~31 mmHg, e mesmo em um grupo de ratos normotenso que foram tratados, também houve redução de ~9 mmHg. Mano et al (1995) utilizaram ratos SHR e SHR-SP iniciando com 4 semanas de idade e tratados até 16 semanas de idade, com óleo de peixe adicionado na dieta num total de 5 % do peso (17 % EPA; 10 % DHA). Nos ratos SHR-SP, após 4 semanas de tratamento, estando com 8 semanas de idade, os

ômega-3 promoveram redução de 9 mmHg na PA, medida por pletismografia, e após 12 semanas de tratamento, estando com 16 semanas de idade, a redução foi de 18 mmHg. E também nos animais SHR e nos pares normotensos WKY foram observadas reduções. Esses dados, em contraposição aos nossos e aos de Bačová et al (2013) parecem indicar que nesses ratos a idade de início do tratamento pode ser um fator fundamental para os efeitos de redução de PA, tanto em idades precoces (4 semanas), onde a hipertensão ainda está se desenvolvendo, como em idades avançadas (1 ano), onde o organismo talvez já esteja muito comprometido. Além disso, os tempos de tratamentos maiores também parecem influenciar, apesar de Dlugosova et al (2009) ter utilizado uma dose (30 mg/dia) bem inferior à que nós e a maioria dos outros estudos utilizaram.

Em um estudo muito esclarecedor, Rousseau-Ralliard et al (2009) utilizou ratos SHR tratados com de éster etílico de EPA ou DHA 240 mg/dia, na dieta, durante 8 semanas. Esses animais iniciaram o tratamento com 14 semanas de idade e o terminaram com 22 semanas de idade, sendo realizado o registro de PA por telemetria durante esse período. Foi observado que o tratamento com EPA não promoveu alteração de PA, enquanto que o DHA promoveu uma pequena redução da PA sistólica a partir da sexta semana até a oitava. Por outro lado, o EPA produziu pequenos aumentos na FC, ao passo que o DHA, promoveu pequenas reduções na FC, mas, em ambos os casos, essas alterações foram pontuais, não se mantendo durante todo o período de tratamento, mas já se manifestando com 4 semanas de tratamento. Além disso, o EPA promoveu aumento da pressão de pulso, o que pode ser indesejado. Esses efeitos foram acompanhados por uma redução de catecolaminas adrenais, mas sem alteração da noradrenalina no coração, tanto por EPA e DHA, além de que o DHA promoveu redução do intervalo QT do eletrocardiograma, semelhante ao que faz um fármaco betabloqueador, indicando uma ação inibitória simpática. Esses dados talvez expliquem os resultados conflitantes observados, como discutido acima, afinal, a maioria dos estudos utilizam uma mistura EPA/DHA em diferentes proporções, assim como utilizamos em nosso estudo, e aparentemente esses ácidos graxos podem ter efeitos antagônicos. Talvez isso explique por que apesar de a FC no SO ser numericamente inferior à do SC, não alcançou diferença estatística. Por outro lado, nesse mesmo sentido, o SO apresentou um controle parassimpático da FC numericamente superior ao do SC, mas novamente sem significância, porém, Rousseau-Ralliard et al (2009) propõe

uma ação de atenuação simpática pelos ômega-3 ao invés de potencialização parassimpática.

De forma interessante, em um estudo em camundongos com 6 semanas de idade, Kim et al (2015) observaram um aumento da liberação de catecolaminas pelo tratamento com ômega-3, tanto sistemicamente quanto no coração, e além disso, alguns dos efeitos metabólicos observados nesse trabalho pelo tratamento com os ômega-3 foram demonstrados estarem relacionados a atividade vagal, demonstrando que eles podem ter atuação em vias parassimpáticas. Esse efeito foi observado após o tratamento dos camundongos por 10 semanas, tanto para animais que foram tratados com EPA quanto para outros que foram tratados com DHA, independente de terem sido tratados com baixa dose (1,2 % na dieta) ou alta dose (2.4% na dieta). Nesse estudo foram utilizados para o tratamento óleo de peixe enriquecido em DHA (DHA 25 %, EPA 8 %) ou óleo de peixe enriquecido em EPA (EPA 28 %, DHA 12 %).

Interessante notar que em nosso estudo houve uma maior resposta de estimulação do coração com aumento de FC frente ao NPS, e nesse estudo de Kim et al (2015) fica demonstrado que os ômega-3 podem aumentar noradrenalina no coração. Ao mesmo tempo, um aumento de liberação de noradrenalina poderia estar tamponando a atividade vagal sobre o coração, e talvez explique por que não observamos redução significativa na FC, apesar de os valores numéricos da FC do SO serem menores que do SC. De todo modo, os dados de Kim et al (2015) em camundongos também conflitam com os dados de Rousseau-Ralliard et al (2009) em SHR, pois ambos utilizaram EPA e DHA de forma isolada, mas acharam resultado divergente quanto ao aumento de catecolaminas observado por Kim et al (2015), mas não por Rousseau-Ralliard et al (2009), além de que o primeiro vincula seus achados à atividade adrenérgica e com participação vagal, e o segundo encontra resultados cardiovasculares que propõe serem relacionados a uma atenuação simpática.

Grande parte dos estudos envolvendo os efeitos cardiovasculares dos ômega-3 foram realizados em humanos, dessa forma, apesar da disparidade de espécie frente ao nosso estudo em ratos, é necessário traçar um paralelo de comparação respeitando essa disparidade. Nesse sentido, diferente de nossos resultados em ratos SHR, Minihane et al (2016) num estudo retrospectivo (baseado nos dados do FINGEN *study*) analisando humanos hipertensos, que foram tratados com

suplementação de ômega-3 em dose de 0,7-1,8 g/dia durante 8 semanas, observou uma pequena redução da PA (~5 mmHg), o que, apesar de discreto, potencialmente poderia reduzir o risco de doença cardiovascular. Assim como também Geleijnse et al (2002), avaliando 90 ensaios clínicos randomizados, encontraram que a ingestão de óleo de peixe em doses altas pode ter uma ação de redução da PA, em especial nos idosos e hipertensos (GELEIJNSE et al., 2002). Skulas-Ray et al (2012), também em humanos, mas normotensos, encontraram redução da PA pelos ômega-3, diferente de nossos resultados em ratos SHR.

Nesse estudo de Skulas-Ray et al (2012) foram avaliados 26 indivíduos adultos, tratando-se de um estudo clínico randomizado cruzado, duplo-cego, com controle placebo, onde foram testadas doses de 0,85 e 3,4 g/dia de EPA/DHA durante 8 semanas de tratamento, utilizando 6 semanas de não-uso (“washout”) entre os testes, já que se tratava de um estudo pareado. Foram observadas redução de ~2 mmHg na PA e ~4 bpm na FC, apenas na maior dose, em condição de repouso. Posteriormente foram realizados testes de indução de estresse psíquico e fisiológico, os quais promovem movimento de subida na PA e FC, onde foi observado que a dose alta reduziu em 2 mmHg a PA durante os testes, com redução na FC de ~2 e ~4 bpm, na menor e na maior dose, respectivamente. Além disso, também foi observado que na alta dose o volume de ejeção e débito cardíaco foram reduzidos durante esses testes, mas sem redução na resistência periférica total, como observado por meio de cardiografia de impedância torácica.

Esses dados de Skulas-Ray et al (2012), para além de uma redução de PA, demonstram redução de FC e parâmetros hemodinâmicos cardíacos frente a estresse psíquico e fisiológico, o que potencialmente poderia refletir uma modulação do controle autonômico cardíaco ou uma ação direta na eletrofisiologia cardíaca, de modo que os autores colocam essas gorduras como uma terapia adjuvante atraente para indivíduos com DCV, pois podem facilmente serem incorporadas a esquemas terapêuticos com múltiplas drogas, sem maiores riscos. Esses dados são de grande valia na comparação com os nossos dados obtidos em ratos SHR, como será discutido mais à frente, em especial a FC e o controle autonômico, enquanto que os achados em relação a PA são divergentes.

De forma divergente, anteriormente a esse estudo de Skulas-Ray et al (2012), Monahan et al (2004) estudaram humanos jovens (18-35 anos), também normotensos, tratados por 1 mês com 10 g dia de ômega-3 (50 % EPA+DHA) em

forma de capsulas, e não observaram mudanças na PA e na FC de repouso, semelhante ao observado em nosso estudo. Nesse estudo também foi avaliada a atividade nervosa simpática muscular (MSNA) em repouso e após testes de estresse fisiológico, nos mesmo indivíduos, antes e após o tratamento. O tratamento não alterou a MSNA de repouso, contudo, no teste de estresse, onde houve aumento da PA, FC e MSNA, foi observada que o tratamento aumentou potencializou o aumento da MSNA, parecendo favorecer a resposta simpática ao estresse, o que parece se contrapor ao observado por Skulas-Ray et al (2012).

Em contrapartida a Monahan et al (2004) que encontrou resposta aumentada ao estímulo de estresse e Skulas-Ray et al (2012) que encontraram resposta atenuada frente ao estresse, Clark et al (2016) em um estudo envolvendo 14 jovens ( $25 \pm 1$  anos) e 15 idosos ( $64 \pm 2$  anos) demonstrou não haver alteração da resposta fisiológica cardíaca ao exercício pelo tratamento com ômega-3. Esses indivíduos eram aparentemente saudáveis e receberam 4g de óleo de peixe por dia durante 12 semanas, sem apresentarem nenhuma alteração de PA e FC de repouso. Apesar de não alterar a resposta de FC ao exercício, o tratamento atenuou o aumento de PA induzido pelo exercício, o que parece indicar uma atenuação da resposta simpática vascular frente ao estímulo do exercício.

Na metanálise desenvolvida por Mozaffarian et al (2005), com enfoque na FC, avaliando estudos controlados e randomizados em humanos, foi observado um efeito de redução da FC pelos ômega-3, em especial nos estudos com duração de 12 semanas ou mais, o que parece ser devido a sua capacidade cumulativa no organismo. Além disso, esse efeito foi relacionado como sendo maior nos indivíduos que tinham maior FC de repouso, dessa forma, considerando que uma FC aumentada possa estar relacionada a alteração na eletrofisiologia cardíaca ou aumento da atividade simpática e/ou redução da atividade parassimpática, esse efeito dos ômega-3 de redução da FC nesses indivíduos parece indicar sua ação sobre ao menos um desses parâmetros.

Talvez, as diferenças nas respostas frente ao estresse observada nesses dois estudos (MONAHAN et al., 2004; SKULAS-RAY et al., 2012) seja devido a menor dose usada no estudo de 2012, apesar de ter tratado pelo dobro do tempo, em relação ao estudo de 2004, o que indicaria um efeito dose- e/ou tempo-dependente. De fato, já no estudo de Skulas-Ray et al (2012), ao testar 2 doses diferentes, foi possível observar um efeito dose-dependente. Por outro lado, em nosso estudo a

resposta barorreflexa a queda de pressão causada pelo NPS parece demonstrar um aumento da capacidade de resposta simpática pelo barorreflexo, o que vai de encontro a esse achado de Monahan et al (2004), sugerindo que os ômega-3 poderiam promover uma maior capacidade de resposta simpática sem, entretanto, promover nenhum aumento na atividade simpática tônica, já que não houve aumento de FC basal, mas ao contrário, até mesmo uma redução no estudo de Monahan et al (2004), e um valor de FC numericamente menor, mas sem diferença estatística, em nosso estudo, o que será melhor discutido mais à frente.

Para além dos estudos em ratos e humanos, Billman e Harris (2011) utilizaram cachorros, machos e fêmeas, tratados com éster etílico de EPA/DHA nas doses de 1, 2 e 4 g/dia, durante 3 meses. Esses suplementos foram semelhantes aos utilizados no robusto estudo GISSI-Prevenzione realizado em humanos (GISSI, 1999). Esses cachorros foram submetidos a infarto do miocárdio por oclusão coronária durante 20 minutos. Além disso, foram implantados equipamentos capazes de promover oclusão coronária aguda, para utilização em testes posteriores. A primeira avaliação eletrocardiográfica cardíaca foi realizada 3-4 semanas após a indução do infarto e depois foi iniciado o tratamento, sendo que desde 1 semana antes do infarto até o fim dos experimentos foi ofertada ração isenta de ômega-3. O grupo controle em que foi realizada cirurgia fictícia (grupo SHAM) recebeu a dose de 4g/dia, e o tratamento placebo foi óleo de milho. Não foram observadas diferenças nos dados analisados entre os machos e as fêmeas, quanto a FC e a VFC, nem antes e nem depois do tratamento, dessa forma, as análises de efeito do tratamento foram feitas utilizando os dados de ambos os sexos, conjuntamente.

Nos animais infartados, foi observado um efeito dose-independente de redução na FC e aumento na VFC e no índice de atividade vagal (calculado a partir da VFC), em condição de repouso, após o tratamento com ômega-3, mas sem alteração no grupo tratado com placebo (BILLMAN; HARRIS, 2011). Essa redução na FC e aumento na VFC também foi observada nos animais SHAM tratados. Dessa forma, os dados sobre os efeitos dos ômega-3 nos demais testes foram agrupados entre não tratados e tratados (todas as doses no mesmo grupo). Nesses testes, frente a oclusão carótida aguda ou a exercício físico, ambos promovendo movimento de elevação na FC e redução no índice vagal (derivado da VFC), o tratamento com n-3 PUFAs não alterou a resposta autonômica em comparação com a linha de base antes dos testes. Contudo, foi observada uma recuperação da FC mais rápida após

o exercício além de um menor pico de FC durante o exercício. Ao analisar esses dados em conjunto, os autores propõem que os efeitos dos omega-3 se dão tanto por ação sobre o sistema nervoso autonômico quanto por alteração no controle cardíaco intrínseco. De todo modo, a VFC é um parâmetro que se relaciona com a atividade barorreflexa e em nosso estudo foi observado aumento da resposta barorreflexa frente a queda de pressão por ação do NPS no grupo SO.

A redução de FC observada em humanos (MOZAFFARIAN et al., 2005; SKULAS-RAY et al., 2012) e em cachorros, evidenciam o potencial dos omega-3 em reduzir a FC em repouso, o que talvez não tenha alcançado diferença estatística em nosso estudo devido a diferença entre as espécies, bem como a maior dose e tempo de tratamento utilizados por Billman e Harris (2011), além de que os cães eram normotensos e em nosso estudo foram utilizados ratos SHR, hipertensos. Junto a isso, os dados de Rousseau-Ralliard et al (2009) não apenas demonstraram efeito de redução de FC, mas também de aumento de FC, ao utilizar separadamente EPA e DHA, demonstrando que na maioria dos estudos, assim como no nosso, a utilização de uma mistura de EPA/DHA pode gerar achados divergentes pelo fato de cada um desses ácidos graxos terem ações diferentes e até mesmo antagônicas. Ademais, mesmo nos estudos em humanos, ambos normotensos, os resultados foram diferentes (MONAHAN et al., 2004; SKULAS-RAY et al., 2012), mas claro, considerando também as diferenças metodológicas, como abordado anteriormente.

Dentre o prejuízo autonômico observado na hipertensão arterial, a função barorreflexa, a qual se relaciona ao controle da FC, também é relatada por estar comprometida na hipertensão arterial tanto em humanos como em modelos animais como o SHR (THRASHER, 2005), assim como foi observado em nossos resultados. Nesse contexto, em nosso estudo, os ômega-3 promoveram melhora no reflexo quando em resposta à ação hipotensora do NPS. Apesar dos ômega-3 serem muito citados quanto a um possível efeito autonômico, embasado principalmente em estudos que avaliaram a VFC, o efeito específico sobre o barorreflexo foi pouco estudado. O estudo de maior relevância nesse sentido é o de Radaelli et al (2006). Nesse estudo foram avaliados 25 pacientes (24 homens, 1 mulher) com insuficiência cardíaca sistólica após infarto crônico, com fração de ejeção menor que 40 %. Esses pacientes foram tratados durante 4 meses com ômega-3 ( $\geq 85$  % EPA/DHA) na dose de 2 g/dia (15 pacientes com ômega-3 e 10 com placebo), sendo observado um aumento da função barorreflexa ao final. De forma similar, Christensen et al (2001)

também observaram melhora da VFC. Nesse estudo foram avaliados 291 pacientes encaminhados para angiografia coronária com suspeita de cardiopatia isquêmica. Esses pacientes preencheram um questionário alimentar para avaliar a ingestão de peixe e vinho. Assim foi observado que apenas o consumo de ômega-3, mas não de vinho, estava independentemente associado de forma positiva à VFC. Anterior a esses dois estudos, Weisser et al (1990) avaliaram 10 indivíduos adultos normotensos (6 mulheres, 4 homens, entre 21 a 35 anos) tratados com 6 g/dia de ômega-3 (3,6 g EPA; 2,4 g DHA) durante 6 semanas. Ao final do tratamento ao avaliar a resposta barorreflexa em resposta a injeção de noradrenalina, foi observada uma resposta aumentada em comparação aos resultados de antes do tratamento.

Tomados em conjunto, os estudos citados (CHRISTENSEN et al., 2001; RADAELLI et al., 2006; WEISSER et al., 1990), em humanos, fortalecem a hipótese de uma ação autonômica dos ômega-3, o que parece estar relacionado ao menos em parte ao barorreflexo, e, apesar da diferença de espécie, é corroborado por nossos dados em ratos SHR, com o aumento de resposta barorreflexa ao NPS. Ademais, Losurdo et al (2015), estudando ratas Wistar de 2 meses de idade, em um modelo de deprivação hormonal por ovariectomia, realizaram o tratamento com ômega-3 ( $\geq 85\%$  EPA/DHA) na dose de 0,8 g/kg/dia durante 2 meses por gavagem. Nesse estudo, a ovariectomia promoveu redução da resposta barorreflexa e o tratamento foi capaz de promover uma melhora parcial dessa resposta. Por outro lado, Geelen et al (2003) avaliaram 84 indivíduos aparentemente saudáveis que receberam capsulas de óleo de peixe numa dose de 3,5 g/dia durante 12 semanas, realizando eletrocardiogramas e registro de PA, antes e após a intervenção, avaliando o barorreflexo por análise espectral. Nesse estudo não foi observada mudança na VFC nem na resposta barorreflexa.

A grande relevância dessa ação de melhora autonômica produzida pelos ômega-3, que em nosso estudo foi significativamente evidenciada no aumento da resposta barorreflexa ao NPS, se dá pelo fato de a redução do barorreflexo e da VFC serem associados a risco cardiovascular (CV) aumentado (HEAD, 1995; TSUJI et al., 1996), de modo que a função autonômica se relaciona com o risco CV na hipertensão arterial (LANTELME et al., 2002).

### 5.3 EFEITO DA METFORMINA SOBRE PARÂMETROS VASCULARES

Em nosso estudo, observamos que a metformina reduziu a disfunção vascular relacionada a prostanoídes vasoconstritores em ratos SHR. Semelhante a nossos resultados, mas em um modelo experimental diferente, Verma et al (1996) utilizou ratos Sprague-Dawley, parte deles recebendo dieta com 66 % de frutose e a outra parte dieta padrão. Desses animais, parte era tratada com metformina 500 mg/kg/dia por 10 semanas, iniciando o tratamento com 6 semanas de idade (grupos: controle; controle + metformina; frutose; frutose + metformina). Ao final, foi avaliada a reatividade à noradrenalina em anéis da artéria mesentérica superior, e tanto nos ratos com dieta de frutose quanto nos ratos com dieta controle, que receberam metformina, a resposta foi reduzida, o que se repetiu mesmo com a retirada do endotélio. Apesar da maior dose e tempo de tratamento, esses resultados se assemelhando ao que observamos em ratos SHR.

Puyó et al (2012) realizaram um estudo em ratos Sprague–Dawley com 6 semanas de idade, recebendo frutose 10 % na água de beber durante 9 semanas. O tratamento com metformina 50 mg/kg/dia na água de beber foi realizado durante essas 9 semanas (grupos: controle; controle + metformina; frutose; frutose + metformina). A metformina promoveu redução na PA (~8 mmHg) e glicemia, que estavam elevados pela frutose, mas não conseguiu reduzir a insulinemia. Além disso, a metformina promoveu redução de PGF2 $\alpha$  e TXA2, melhorando a relação PGI2/TXA2, tanto na aorta quanto na mesentérica dos ratos tratados com frutose. Apesar de se tratar de um modelo experimental diferente, essa melhora no balanço de prostanoídes observada por Puyó et al (2012) parece representar um mecanismo comum da metformina, pelo qual observamos a melhora da disfunção vascular nos SHR, mesmo nossos animais sendo normoglicêmicos. Contudo, não observamos redução na PA, talvez por termos utilizado um menor tempo de tratamento, entre outros fatores. Ademais, no estudo de Puyó et al (2012) não houve redução da glicemia, que estava elevada, demonstrando que esses efeitos da metformina parecem não depender de alterações na insulinemia.

Lobato et al (2012) realizaram um estudo com ratos Wistar, em que parte deles receberam injeção subcutânea de glutamato monossódico (MSG) no período neonatal, para o desenvolvimento de obesidade. Com 16 semanas de idade, parte dos ratos foi tratada com metformina 300 mg/kg/dia durante 15 dias, por gavagem

(grupos: controle; MSG; MSG + metformina). Os ratos obesos não apresentaram alteração de PA e glicemia, e a metformina também não promoveu alteração nesses parâmetros. Contudo a insulina e o índice HOMA estavam aumentados nos ratos obesos e isso foi revertido pela metformina. Em relação a reatividade no leito vascular mesentérico, o tratamento restaurou o relaxamento à acetilcolina que estava reduzido nos ratos obesos, e aumentou a resposta ao NPS para acima dos valores do grupo controle. A resposta à NOR estava aumentada nos ratos obesos, o que mostrou envolver prostanoídes vasoconstritores, e a metformina corrigiu essas alterações. Além disso, o tratamento reduziu o estresse oxidativo vascular e melhorou a relação PGI/TXA2 que estava aumentada.

No supracitado estudo de Lobato et al (2012) o tratamento promoveu melhora tanto na resposta de constrição quanto na de relaxamento no LVM. Relacionando isso aos nossos resultados, devemos considerar que, em última instância, a melhora no relaxamento também se reflete sobre a resposta de vasoconstrição, logo, podem ser tomados em conjunto como mecanismo pelo qual a metformina possivelmente promoveu a melhora que observamos no SHR, novamente sendo demonstrado o envolvimento da via dos prostanoídes nesses efeitos. A redução de estresse oxidativo também parecem participar dos efeitos da metformina nesse estudo de Lobato et al (2012), talvez sendo algo consequente à via dos prostanoídes, uma vez que tanto nos resultados do artigo supracitado quanto em nosso estudo, bastou a inibição da COX pela indometacina para corrigir a disfunção vascular. Ademais, nesse estudo a insulinemia estava alterada e a metformina normalizou esse parâmetro, mas como visto no estudo de Puyó et al (2012), a ação vascular da metformina parece não depender de ação sobre a insulinemia.

Alguns estudos em ratos demonstraram que a metformina tem efeito agudo de promoção de relaxamento vascular, como o de Peuler et al (1999), utilizando anéis de artéria caudal de ratas Sprague–Dawley adultas, onde não apenas demonstrou a capacidade de relaxamento pela exposição aguda à metformina (0,24 a 22 mM), mas que esse efeito permanece mesmo após a retirada do endotélio e envolve canais de potássio voltagem-dependentes (KV). Posteriormente, num experimente na artéria ilíaca de porcos, foi demonstrado que a exposição do vaso à metformina (1 µg/mL) causou dilatação e que esse efeito foi abolido pelo uso de L-NAME, evidenciando que a vasodilatação relacionada à metformina pode também envolver a via do óxido nítrico (O'HORA et al., 2012). Além disso, em um estudo em anéis de

aorta, de ratos Sprague–Dawley de 8 semanas, foi demonstrado que a incubação com metformina (2 mM), por 30 minutos, reduziu a vasoconstrição evocada pela fenilefrina atuando via proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (SUNG; CHOI., 2012), proteína essa que é o principal alvo de ação conhecido da metformina (VIOLLET et al., 2012).

Ford et al (2012) realizaram um estudo utilizando ratos SHR e normotensos WKY com 20-24 semanas de idade. Foram avaliados os efeitos vasculares promovidos por um ativador da AMPK, o AICAR em vasos isolados. Foi observado que esse ativador promoveu relaxamento tanto nos vasos dos SHR quanto dos normotensos. Na aorta esse relaxamento foi maior no SHR que no normotenso, e em segmentos de mesentérica a resposta máxima foi semelhante, mas apenas no SHR o L-NAME inibiu parcialmente o relaxamento. Num segundo protocolo experimental, utilizando os animais anestesiados, foi realizada a inserção de cateter na artéria carótida para medida hemodinâmica, e o AICAR, foi aplicado agudamente via intraperitoneal, em ausência e em presença de L-NAME. Nos SHR, a aplicação aguda do ativador da AMPK promoveu redução na FC, e o L-NAME não interferiu nisso. A ativação da AMPK não interferiu na FC dos normotensos. PA foi reduzida nos SHR pela ativação da AMPK, e esse efeito foi parcialmente inibido em presença de L-NAME. Além disso, foi demonstrado que nos animais SHR a AMPK estava menos fosforilada. A fosforilação é necessária para ativação da AMPK.

Os achados (FORD et al., 2012; O'HORA et al., 2012; PEULER et al., 1999; SUNG; CHOI., 2012) são interessantes quanto a ação aguda da metformina e o envolvimento de seu principal alvo direto de ação, a proteína AMPK. É provável, que os efeitos que observamos em nosso estudo, assim como os demais estudos aqui discutidos tenham sido mediados pela ativação da AMPK, até porque, como apresentado acima, os efeitos agudos da metformina se assemelham muito aos efeitos agudos da ativação da AMPK por outras substâncias. Contudo, os efeitos do tratamento crônico talvez não sejam os mesmos observados pelo uso agudo, até porque os efeitos agudos são observados mediante concentrações muito elevadas, 0,24 a 22 mM (PEULER et al., 1999), mas também não é possível descartar que participem dos efeitos crônicos. Ademais, é interessante notar que um outro estudo evidenciou inclusive a possibilidade de a própria metformina ao ser metabolizada liberar como produto o óxido nítrico (SEREZHENKOV et al., 2011).

Bhalla et al (1996) utilizando cultura de células de MLV de aorta de SHR incubadas 24 h com metformina observou um efeito de atenuação do aumento de cálcio intracelular em resposta a agonistas vasoconstritores (trombina e vasopressina). Além disso, ao serem expostas a concentrações crescentes de L-arginina houve aumento progressivo da produção de NO nas células de MLV, tanto nas tratadas quanto nas não tratadas com metformina, o que o autor apresenta como sendo possivelmente por ação da citocromo P-450, uma vez que o endotélio, principal local de expressão da eNOS, não estava presente. Contudo, nas células tratadas com metformina a produção de NO foi maior em relação às não tratadas, em algumas das concentrações de L-arginina que foram testadas. Em nosso estudo, o uso da indometacina foi capaz de explicar a maior parte do efeito de melhora promovido pela metformina, envolvendo prostanoídes. Contudo, apesar dos resultados de Bhalla et al (1996) serem relativos a efeito agudo e obtidos em células de aorta, não podemos descartar a possibilidade de que esse seja um mecanismo adicional da metformina e que possa ter participado dos efeitos que observamos em SHR, para além da ação sobre os prostanoídes.

No estudo de Sena et al (2011) foi avaliado o efeito da metformina em ratos Goto-Kakizaki, modelo animal de diabetes mellitus tipo 2. Esses ratos foram tratados com dieta normal ou rica em gordura durante 4 meses, até completarem 6 meses de idade. O tratamento com metformina foi realizado durante a últimas 4 semanas na dose de 60 mg/kg/dia na água de beber. A metformina não alterou a glicemia nos Wistar controle, mas reduziu nos ratos diabéticos. O tratamento restaurou o relaxamento à acetilcolina nos anéis de aorta dos ratos diabéticos com melhora da biodisponibilidade de óxido nítrico, reduzindo o estresse oxidativo e a citocina pró-inflamatória CCL2 na aorta, sem promover nenhum desses efeitos nos Wistar controle. Esse estudo traz uma importante demonstração que em ratos normoglicêmicos a metformina não promoveu alteração na glicemia, mas apenas nos ratos diabéticos, apesar de a dose ter sido inferior à que utilizamos em nosso estudo. Novamente é demonstrada a capacidade da metformina melhorar a função vascular, nesse caso, reduzindo estresse oxidativo e melhorando biodisponibilidade de NO. Contudo, a presença de diabetes é um quadro específico onde esses efeitos podem ter sido relacionados diretamente a correção da glicemia. Contudo, a redução de uma citocina inflamatória talvez seja um mecanismo inerente a metformina, independente da diabetes, uma vez que encontramos redução de TNF $\alpha$  nos SHR.

Em um estudo anterior realizado por nosso grupo, utilizamos ratas Wistar normotensas, com 8 semanas de idade. Como modelo de deficiência de hormônios sexuais, foi realizada ovariectomia nesses animais, e três semanas após iniciamos o tratamento com metformina 300 mg/kg/dia durante 2 semanas. O tratamento foi capaz de reverter o prejuízo no relaxamento do leito vascular mesentérico à ACH, reduzindo estresse oxidativo vascular e melhorando a biodisponibilidade de NO, associados a redução da superexpressão de NOX2, além de restaurar a expressão da NOS endotelial (eNOS) que estava reduzida (OLIVEIRA et al., 2014). Em conjunto com os resultados do presente estudo, isso amplia a compreensão dos múltiplos efeitos vasculares da metformina. Além disso, é interessante notar que o mesmo efeito de redução da NOX2 que observamos nos vasos dessas ratas também encontramos nos ratos SHR, nos corações. Esse parece ser um mecanismo comum da metformina, que talvez independa do modelo experimental e do tecido estudado.

Mais recentemente, no estudo de Hamidi Shishavan et al (2017), utilizando ratos SHR diabéticos e não-diabéticos, além da observação de redução de PA pela metformina (300 mg/kg/dia, 12 semanas), discutido anteriormente, também foi observada melhora do relaxamento de anéis de aorta à ACH, envolvendo aumento de EDHF nos diabéticos e aumento de NO e EDHF nos não diabéticos. Ademais, esses efeitos ocorreram mesmo sem o tratamento promover nenhuma alteração na hemoglobina glicada e glicemia de jejum, em nenhum dos grupos. Esses dados são interessantes, pois são os mais próximos do que realizamos, por serem em SHR e com a mesma dose. Contudo, o tempo de tratamento muito maior e o vaso estudado foi a aorta. De todo modo, a melhora do relaxamento vascular com aumento de NO e EDHF observados nesse estudo fortalecem a ideia que a ação da metformina sobre esses fatores tenha tipo participação na redução de resposta à NOR que encontramos em nosso estudo. Além disso, também não foi observada alteração de glicemia, assim como em nosso estudo, contudo houve redução da PA, o que nós não encontramos, talvez pelo maior tempo de tratamento ou mesmo por terem começado o tratamento mais precocemente.

Dentre os estudos discutidos, pouco foi esclarecido quanto aos mecanismos pelos quais a metformina melhora a função vascular. De modo geral, foi observado a melhora do relaxamento vascular prejudicado e/ou a atenuação da resposta vasoconstrictora aumentada. Alguns dos mecanismos, dependendo do modelo

experimental, envolveram melhora da via do NO e redução de estresse oxidativo, mas na maioria dos estudos foi demonstrada a ação da metformina sobre os prostanoídes, assim como observado em nosso trabalho. Nesse sentido, Kim e Choi (2012), estudando células de MLV, observaram que a metformina, por meio da ativação da AMPK, reduz a ativação do NFκB, e assim reduz a expressão de COX2. Essa descoberta parece apontar o provável mecanismo pelo qual a metformina interferiu na via dos prostanoídes e atenuou a disfunção vascular nos SHR, inclusive porque foi demonstrado que a AMPK se encontra menos ativada nesses animais (FORD et al., 2012). De todo modo, nós investigamos a resposta vascular a NOR, restando outros moduladores do tônus vascular responsáveis pela hipertensão no SHR, o que talvez explique porque não encontramos redução na PA mesmo com os resultados positivos que encontramos.

#### 5.4 EFEITO DOS ÔMEGAS-3 SOBRE PARÂMETROS VASCULARES

Em nosso estudo, observamos que o tratamento com VLC-PUFA ômega-3 reduziu a disfunção vascular relacionada a prostanoídes vasoconstritores em ratos SHR. Em relação a estudos em humanos, Chin et al (1993) demonstraram que as respostas vasoconstritoras, do antebraço de indivíduos saudáveis, às infusões locais de ANGII e noradrenalina foram suprimidas após o tratamento prévio com os ômega-3. Em outro estudo, em vasos sanguíneos obtidos de pacientes submetidos à operação de revascularização coronária, o pré-tratamento do vaso com EPA e DHA diminuiu a resposta contrátil à noradrenalina, tanto em condições normais e inflamatórias (DACI et al., 2017). Tagawa et al (1999) observaram aumento na resposta de relaxamento vascular à ACH, com aumento da via do NO, em pacientes com doença coronária tratados com EPA (1,8 g/dia) por 6 semanas. Esses dados são interessantes, tanto porque demonstraram resultados semelhantes ao nosso, respeitando a diferença de espécie e outras questões metodológicas, contudo, também apontam para um dos principais efeitos atribuídos aos ômega-3, que são seus efeitos protetivos em paciente com doença coronariana (BÄCK, 2017).

Van Den Elsen et al (2014) realizaram um estudo utilizando ratos SHR de 12 semanas de idade, ofertando uma dieta contendo 4 % de óleo de atum (27,8 % DHA; 7% EPA) durante 12 semanas. Ao final, a PA foi reduzida e o relaxamento de anéis de carótida em resposta à metacolina foi aumentado, além de reduzir o nível

plasmático de TXA<sub>2</sub>. Como discutido anteriormente, em última instância, a melhora no relaxamento também se reflete sobre a resposta de vasoconstricção, logo, podem ser tomados em conjunto como mecanismo pelo qual os VLC-PUFA ômega-3 possivelmente promoveram a melhora que observamos nos SHR, envolvendo redução de prostanoídes vasoconstrictores e melhora na capacidade de relaxamento vascular.

Em outro estudo, Villalpando et al (2015, 2017) utilizou ratos Sprague-Dawley normotensos com 4 meses de idade suplementados com Marinol 4.5 % na dieta (2 % EPA/DHA), durante 8 semanas. Esses animais foram orquiectomizados 2 semanas após começar a dieta. A orquiectomia não modificou a PA dos animais e o tratamento com ômega-3 também não modificou a PA em nenhum dos tratados. Contudo, mesmo sem promover modificação da PA o tratamento foi capaz de melhorar a função vascular nos animais orquiectomizados tanto na aorta (VILLALPANDO et al., 2015) quanto nos vasos mesentéricos (VILLALPANDO et al., 2017), de modo que foi capaz de inibir o aumento de prostanoídes na aorta (TXA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) e na mesentérica (TXa<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>), além de restaurar a produção de NO que estava reduzida e inibir o estresse oxidativo com aumentando da capacidade antioxidante na aorta e no soro sanguíneo, e mudando o balanço de prostanoídes na mesentérica para um perfil pró-vasodilatação. Adicionalmente não houve alteração da glicemia basal nos animais.

Em outro estudo, Nyby et al (2005) utilizou ratos CD:IGS, normotensos, alimentados com dieta 60 % frutose e para parte deles 4,4 % de óleo de peixe junto a frutose, durante 8 semanas. Nesses animais a frutose elevou a PA, a insulinemia e a presença de peróxido de hidrogênio plasmático. O óleo de peixe preveniu o aumento da PA e do peróxido, mas sem efeito sobre a insulinemia. Estudando a função vascular em segmentos de mesentérica, foi observado uma redução da sensibilidade à ACh, o que foi revertido pelo tratamento. Além disso, a eNOS estava reduzida no coração e na aorta, o que foi revertido pelo tratamento. Em outro estudo, Hui et al (1989) avaliaram ratos Sprague-Dawley de 160-180g em um modelo de hipertensão arterial por infusão de ANGII. Os ratos eram tratados com injeções subcutâneas de ômega-6 (LA puro 100 mg/kg/dia) ou éster etílico de ômega-3 (32 % EPA; 27 % DHA; 300 mg/kg/dia) durante 3 semanas, e além disso, parte desses animais também recebeu indometacina intraperitoneal na dose de 3,5 mg/kg/dia. Após a primeira semana foi implantada a bomba de infusão de ANGII.

Ambos os ômega-3 atenuaram o aumento na PA pela ANGII, e o uso de indometacina foi capaz de anular parcialmente esse efeito, reduzindo os níveis de prostanoídes vasodilatadores.

De modo geral, como observado em nossos dados e nos outros estudos (VAN DEN ELSEN et al., 2014; VILLALPANDO et al., 2015, 2017), a melhora da disfunção vascular vinculada a ação sobre a via dos prostanoídes parece ser um mecanismo comum dos VLC-PUFA ômega-3, que talvez independa do modelo experimental e do tecido estudado, pois foi semelhante ao observado em nosso estudo e no de Van Den Elsen et al (2014), em SHR, e mesmo num modelo experimental diferente, como esse de Villalpando et al (2015, 2017), onde, em dois tipos de vaso, o resultado foi semelhante ao visto nos SHR, mesmo com a grande diferença nos tempos de tratamento (4, 12 e 8 semanas, respectivamente). Além disso, Hui et al (1989) demonstraram *in vivo* essa ação mediada por prostanoídes, apesar de surpreendentemente também terem observado efeito semelhante pelo tratamento com ômega-6. Por outro lado, a via dos prostanoídes não foi investigada no estudo de Nyby et al (2005), restando uma lacuna nessa compreensão, apesar de, novamente, ter sido demonstrado a melhora da disfunção vascular pelos ômega-3, o que nesse caso ainda parece ter envolvido melhora na via do NO, e, de forma interessante, esses efeitos se manifestaram mesmo com o tratamento não tendo corrigido a insulinemia aumentada desses animais.

De forma interessante, os ômega-3 também apresentam potencial de relaxamento vascular agudo. Engler et al (1994), estudando anéis de aorta de ratos SHR e normotensos WKY, com 16-17 semanas de idade, observou que a exposição aguda desses segmentos de vasos tanto ao EPA quanto ao DHA promoveu relaxamento vascular, mesmo em ausência de endotélio. Limbu et al (2018), estudando os efeitos de vasodilatação do EPA e DHA em aorta e mesentérica de ratos normotensos, com 8-12 semanas de idade, verificou que esse efeito se dá sem envolvimento da NOS e da COX, de forma quase totalmente independente do endotélio, sendo mediado principalmente por ação direta dos ômega-3 em canais BKCa no MLV. Esses mecanismos são interessantes na compreensão da ação vascular dos VLC-PUFA ômega-3, contudo, talvez não sejam os mesmos pelo qual observamos os efeitos crônicos, até porque estes parecem envolver a via da COX.

Um outro estudo avaliou o efeito de um tratamento complexo, o qual envolvia os ômega-3. Nowacki et al (2017) alimentaram galinhas com uma dieta rica em

PUFA (3% de óleo de peixe, 3 % de óleo de linhaça) com alto teor de ômega-3. Da gema dos ovos dessas galinhas foi extraída a lecitina (10,8 % ômega-3, dos quais, 7,1 % DHA), a qual foi utilizada para tratar ratos SHR de 7 semanas de idade, durante 12 semanas, sendo misturada na ração (média diária de consumo de 1,5 g de lecitina por rato, o que corresponde a ~162 mg de ômega-3). Esse tratamento promoveu redução da resposta vasoconstrictora à noradrenalina no leito vascular mesentérico, o que foi estatisticamente correlacionado com redução dos níveis plasmáticos de TNF $\alpha$ . Além disso, o tratamento promoveu redução de um marcador de estresse oxidativo (nitrotirosina) no soro sanguíneo, tanto nos SHR quanto nos controle normotensos WKY, apesar de que esse parâmetro não estava aumentado nos SHR.

Apesar de nesse estudo de Nowacki et al (2017) os efeitos observados terem sido imputados aos ômega-3, como os próprios autores discutem, a lecitina por si só tem efeitos próprios e também havia presença de PUFA ômega-6, além de que foi utilizada uma ração pobre em PUFA, o que pode ter alterado os animais não tratados, restando incerteza se esses efeitos foram mediados pelos ômega-3. Contudo, de forma surpreendente, os resultados da reatividade vascular nesses animais são muito semelhantes ao que encontramos em nosso estudo, assim como também a redução nos níveis de TNF $\alpha$ . Talvez nossos resultados ajudem a reforçar a hipótese de que esses achados de Nowacki et al (2017) são realmente relacionados aos ômega-3 presentes nessa lecitina. Por outro lado, nesse estudo o tratamento promoveu redução de FC tanto nos SHR quanto nos controles normotensos WKY, e nos SHR também promoveu redução na PA, diferente de nossos resultados. Isso talvez evidencie que, para os efeitos vasculares e de redução de TNF $\alpha$ , a idade de início de tratamento (7 semanas vs 12 semanas) e o tempo de tratamento (12 semanas vs 4 semanas) talvez não tenham tanta importância quanto para os efeitos sobre a FC e PA. De todo modo, Nowacki et al (2017) também encontraram uma correlação entre os níveis de TNF $\alpha$  e os valores de FC, nesses animais.

Fazendo um paralelo com os VLC-PUFA ômega-3 (EPA/DHA), Abeywardena e Head (2001) utilizando uma dieta com 5% de ômega-3 ALA (fonte vegetal) durante 12 semanas em ratos SHR de 16 semanas de idade, não observaram melhora no relaxamento em segmentos de aorta. Além disso, Nunes et al (2014) observaram que o tratamento com óleo de linhaça, rico em ômega-3 ALA, durante 2 semanas,

em ratos normotensos (Wistar), aumentou a resposta de contração à fenilefrina em segmentos de aorta, por amplificação da via COX, com aumento de prostanoídes vasoconstritores e da expressão de COX2, e geração de estresse oxidativo (NUNES et al., 2014). Por outro lado, no estudo de Al-Bishri (2013), em ratos Wistar de 8 semanas de idade tornados hipertensos por injeções de ciclosporina, o tratamento com dieta contendo 10 % de semente de linhaça (assada e amassada), fonte de ALA, atenuou o aumento na PA desde a quarta semana de tratamento até a medida ao final das 8 semanas. Dessa forma, enquanto os resultados de melhora da função vascular se mostram consistentes mediante os estudos com VLC-PUFA ômega-3, os resultados para o ômega-3 ALA, de origem vegetal, não se mostram da mesma forma.

Apesar de terem sido evidenciados efeitos dos ômega-3 sobre canais de potássio (LIMBU et al., 2018), pela exposição vascular aguda, e mesmo melhora na via do NO pelo tratamento crônico (NYBY et al., 2005; TAGAWA et al., 1999; VILLALPANDO et al., 2015, 2017), em nosso estudo, assim como o observado por Van Den Elsen et al (2014) e Villalpando et al (2015, 2017), e também por Hui et al (1989) em estudo *in vivo*, a via dos prostanoídes parece ser a principal envolvida nos efeitos vasculares dos VLC-PUFA ômega-3 no tratamento crônico. De fato, esses ácidos graxos, pelas suas vias de metabolização bem conhecidas, têm a capacidade de modular favoravelmente o perfil dos prostanoídes produzidos, como revisado por Patterson et al (2012) e Bäck (2017), podendo serem metabolizados tanto pela COX1 quanto pela COX2, competindo com o ARA, o que poderia explicar os resultados que encontramos.

De forma complementar ao mecanismo discutido acima, Matsumoto et al (2009) também demonstrara que um tratamento com EPA (300 mg/kg/dia, 4 semanas), em ratos diabéticos, não apenas restaurou as vias de relaxamento (NO e EDHF), mas reduziu os prostanoídes vasoconstritores e também o potencial vasoconstrictor do ARA, o que foi relacionado a um efeito de inibição da quinase regulada por sinal extracelular (ERK), o que levou a redução da ativação de NFkB, e conseqüentemente, redução da expressão de COX2. Nesse ponto, os ômega-3 parecem melhorar a via dos prostanoídes não apenas ao servir de substrato para COX, mas também por interferência na via inflamatória mediada pelo NFkB. Esta última via também proposta como o mecanismo de ação da metformina, talvez por isso a semelhança dos resultados que observamos por ambos os tratamentos na

reatividade vascular. De todo modo, nós investigamos a resposta vascular a NOR, restando outros moduladores do tônus vascular responsáveis pela hipertensão no SHR, o que talvez explique porque não encontramos redução na PA mesmo com os resultados positivos que encontramos.

## 5.5 EFEITOS DOS TRATAMENTOS SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TNF $\alpha$ E A EXPRESSÃO PROTEICA DE NOX2 E SOD1 NO CORAÇÃO

No contexto de envolvimento de processo inflamatório e estresse oxidativo no desenvolvimento da HAS (SOLAK et al., 2016), avaliamos a citocina TNF $\alpha$  como mediador inflamatório sistêmico, por dosagem plasmática, e a expressão proteica de proteínas pró- e antioxidante, NOX2 e SOD1, respectivamente, no tecido cardíaco.

O TNF $\alpha$  é uma citocina altamente inflamatória que tem importante contribuição no prejuízo do sistema CV observado na HAS (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2008). Em nosso estudo, o grupo tratado com metformina teve uma redução dos níveis dessa citocina, indicando uma ação anti-inflamatória, o que pode estar relacionado aos efeitos cardiovasculares que encontramos. Como discutido anteriormente, Kim e Choi (2012) demonstraram que a metformina tem a capacidade de por meio da ativação da AMPK, reduzir a ativação do NF $\kappa$ B, o qual é fator de transcrição para o TNF $\alpha$ . No estudo de Ashabi et al (2015) em ratos com isquemia cerebral o pré-tratamento com metformina reduziu a expressão de TNF $\alpha$  e COX2. No mesmo sentido, Zhu et al (2015) encontraram redução nos níveis de TNF $\alpha$  e outras citocinas inflamatórias pelo tratamento com metformina em ratos machos Sprague-Dawley sob isquemia cerebral.

No que diz respeito ao estresse oxidativo, a enzima NOX é uma das maiores fontes orgânicas de ROS e contribui no desenvolvimento da HAS, destacadamente a NOX2 (DATLA, GRIENGLING, 2010). No presente trabalho, a metformina foi capaz de reduzir a expressão de NOX2 para valores semelhantes aos dos controles normotensos. Em um estudo anterior de nosso grupo, também encontramos este efeito em vasos mesentéricos de ratas normotensas ovariectomizadas (OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, também foi demonstrado que a incubação com metformina foi capaz de inibir a atividade da NOX em podócitos (PIWKOWSKA et al., 2010). Esses resultados vão em direção a redução de ROS observada nos estudos de Lobato et

al (2012) e Sena et al (2011). De fato, como revisado por Song e Zou (2012), a AMPK parece exercer efeito regulatório sobre a NOX no sistema CV.

Dentre as defesas antioxidantes, a primeira linha é baseada nas enzimas SOD (SOD1: citoplasmática; SOD2: mitocondrial; SOD3 extracelular), CAT e GPX, sendo a SOD1 a distribuída de forma mais abrangente (IGHODAROAB; AKINLOYEB, 2017). Em nosso estudo a expressão da SOD1 não foi modificada pela metformina. Prasad et al (2017), num estudo em camundongos de 8-10 semanas de idade, demonstraram que a metformina, em duas doses diferentes (100 e 200 mg/kg/dia, intraperitoneal, por 4 semanas), igualmente reduziu a toxicidade cerebrovascular induzida pela fumaça de cigarro, por meio de mecanismos antioxidantes, restaurando a expressão de NRF2 (fator de transcrição da maquinaria antioxidante) e a ativação da AMPK, que estavam reduzidos, mas sem dependência entre esses fatores. Ashabi et al (2015) demonstraram que o pré-tratamento com metformina (200 mg/kg/dia, gavagem, por 2 semanas a até 24 hs antes da isquemia) em ratos Wistar adultos em que foi induzida isquemia cerebral, aumentou o nível de NRF2 e restaurou os níveis de CAT e glutathiona reduzida (GSH), além de impedir o aumento de NFkB, TNF $\alpha$  e COX2. Por outro lado, Allard et al (2016) demonstraram que o tratamento prolongado com metformina (1% na ração) por 6 meses reduziu os níveis de NRF2 em camundongos de idade avançada. Observando esses estudos, talvez a diferença em relação a nossos resultados se deva ao modelo animal utilizado. Por outro lado, Alvarez et al (2008) demonstraram que a atividade da SOD nos corações de ratos SHR não é diferente de ratos normotensos nessa faixa etária de nossos ratos, e Mihailovic-Stanojevic et al (2016) também não encontraram diferenças na atividade da SOD nos rins e fígado de SHR, talvez por isso o tratamento não tenha tido efeito sobre isso, uma vez que os estudo anteriores demonstraram efeito sob condições de alteração.

Quanto aos VLC-PUFA ômega-3, nossos dados mostraram que o tratamento promoveu redução dos níveis de TNF $\alpha$ , indicando uma ação anti-inflamatória, o que pode ajudar a explicar os resultados CV encontrados. Como discutido anteriormente, Matsumoto et al (2009) demonstrara que o EPA tem a capacidade de por meio da inibição da ERK, reduzir a ativação do NFkB, o qual é fator de transcrição para o TNF $\alpha$ . Esse mesmo efeito do EPA também foi observado em condição de indução de inflamação por lipopolissacarídeos (LPS) em monócitos humanos, sendo observada inibição do NFkB e consequentemente do TNF $\alpha$  (ZHAO et al., 2004). Do

mesmo modo, o DHA isoladamente também foi capaz de inibir a ativação do NFkB e a expressão gênica do TNF $\alpha$  e COX2 induzidos por LPS em cultura celular (WONG et al., 2009).

Em nosso estudo, os ômega-3 não foram capazes de interferir na expressão de NOX2 e SOD1. Yuan et al (1998) realizaram um estudo em ratos SHR e normotensos WKY com 5 semanas de idade, tratados durante 9 semanas com uma dieta contendo 5 % de óleo de peixe menhaden (rico em EPA/DHA) e, surpreendentemente, o tratamento reduziu a atividade da SOD e GPX nos corações dos SHR. Por outro lado, Lucena et al (2015) trataram ratos Wistar com óleo de peixe (1 g/kg/dia, por 60 dias, desde 21 dias de idade) e observaram em amostras de pâncreas redução de ROS e da NOX, aumento de SOD1 e SOD2, sem alteração de GPX e CAT, sem promover alteração na glicemia e insulinemia. No estudo de Garrel et al (2012) o tratamento com EPA/DHA (0,5 % na dieta) foi realizado durante 5 semanas em filhotes de 3 semanas de idade nascidas de ratas que tiveram dieta pobre em ômega-3, onde foi observado aumento da SOD2, mas não da SOD1 e nem de outras enzimas antioxidantes, além de que a peroxidação lipídica foi aumentada em tecidos periféricos. Shen et al (2018) em um estudo utilizando ratos sprague-Dawley (12 semanas de idade), implementaram um modelo de aterosclerose por dieta de alto teor de colesterol (1 % da dieta) durante 6 semanas com adição de L-NAME (3 mg/mL) na água de beber nas duas últimas semanas. O grupo tratado recebeu ômega-3 (5 mg/kg/dia) durante as 6 semanas. Ao final a geração de ROS e a atividade e expressão proteica da NOX foram reduzidos no cérebro. Contudo, Yang et al (2007) realizaram um estudo em que o DHA administrado posteriormente a uma isquemia (60 minutos após, aplicação de 250-500 nmols de DHA, intraperitoneal) num modelo de isquemia/reperfusão cerebral, promoveu aumento da expressão de COX2 e da geração de produtos de peroxidação lipídica, com redução da GSH, sem promover nenhum efeito nos animais SHAM (YANG et al., 2007).

Dos estudos supracitados, apenas um é possível fazer comparação direta ao nosso, pelo fato de ter utilizado ratos SHR e a dosagem também ter sido feita no coração. Nesse sentido, uma importante diferença que separa nossos resultados se relaciona a idade precoce de início do tratamento no estudo de Yuan et al (1998), além de um tempo maior de tratamento, o que parece ter gerado efeito negativo sobre a SOD e a GPX. Em nosso estudo, contudo, não encontramos alteração na

SOD1. Por outro lado, os outros estudos demonstram uma consistente melhora sobre proteínas antioxidantes. De fato, em outro estudo, Lucena et al (2015) encontraram aumento na SOD1 e SOD2, mas no pâncreas, em ratos normotensos, tratados com uma dose muito maior (1 g/dia) e por muito mais tempo (60 dias). Do mesmo modo, no estudo de Shen et al (2018) a espécie e tempo são muito diferentes do nosso, contudo, é interessante que, mesmo esses autores tendo usado uma dose muito inferior à nossa, foram encontrados resultados positivos. Nesse contexto, os benefícios dos ômega-3 parecem envolver uma complexa interação de fatores, onde os ômega-3 não foram capazes de exercer benefício em relação a NOX e SOD1 nos SHR. Apesar disso, muitos estudos vêm mostrando a capacidade dos ômega-3 de estimular as vias antioxidantes, em outros modelos experimentais e/ou espécies, aparentemente por estimulação do NRF2 (SAKAI et al., 2017).

Os efeitos dos tratamentos sobre os níveis plasmáticos de TNF $\alpha$  e, no caso da metformina, também sobre a expressão de NOX2, também ajudam a explicar os resultados que observamos na reatividade vascular. Nesse sentido, os resultados de nosso estudo apontaram para uma participação de prostanoídes vasoconstritores na resposta aumentada à NOR nos SHR, e ambos os tratamentos foram capazes de promover melhora interferindo nesses prostanoídes. Como discutido anteriormente, para a metformina, a ativação da AMPK parece ser o mecanismo mais provável, uma vez que a AMPK se relaciona com menor ativação de NF $\kappa$ B (KIM; CHOI, 2012) e conseqüentemente menor expressão de COX2 (ASHABI et al., 2015), reduzindo a formação de prostanoídes vasoconstritores. Por outro lado, a metformina foi capaz de reduzir a expressão de NOX2, o que pode colaborar na redução do estresse oxidativo relacionado à disfunção vascular. De fato, para além de redução de biodisponibilidade de NO (GRYGLEWSKI et al., 1986), dentre outros efeitos, o estresse oxidativo pode estimular a via da COX (ONODERA et al., 2015), portanto, podendo participar do prejuízo que observamos relacionado aos prostanoídes, assim como observado por Tian et al (2012) em ratos com hipertensão renovascular.

De forma semelhante à metformina, os VLC-PUFA ômega-3 parecem também atuar sobre o NF $\kappa$ B, o que aparentemente envolve uma redução da atividade da ERK (MATSUMOTO et al., 2009). Em ambos os casos, a redução nos níveis de TNF $\alpha$  que observamos em nosso estudo dão suporte a isso, uma vez que, o TNF $\alpha$  é capaz de ativar o NF $\kappa$ B (KE et al., 2007), e este, como fator de transcrição para moléculas inflamatórias, também parece ter participação na expressão de TNF $\alpha$

(ZHAO et al., 2004). Contudo, para os efeitos vasculares que observamos pelo tratamento com os ômega-3, talvez o seu papel como substrato para a COX seja tão relevante quanto seus efeitos sobre NFkB e TNF $\alpha$ , uma vez que pode exercer efeito anti-inflamatório por melhora no balanço de prostanoídes (VAN DEN ELSEN et al., 2014; VILLALPANDO et al., 2015, 2017), o que envolve a competição com o ARA (BÄCK, 2017). Dessa forma, os ômega-3 podem atuar independentemente de qualquer possível ação sobre o NFkB ou modulação na expressão da COX2, inclusive, porque também podem ser metabolizados pela própria COX2 (GROEGER et al., 2010). Além disso, esse próprio efeito sobre os prostanoídes pode, independentemente de uma ação direta sobre NFkB, reduzir o estímulo para a síntese de COX2, por reduzir o estímulo mediado pelos prostanoídes inflamatórios (BAGGA et al., 2003).

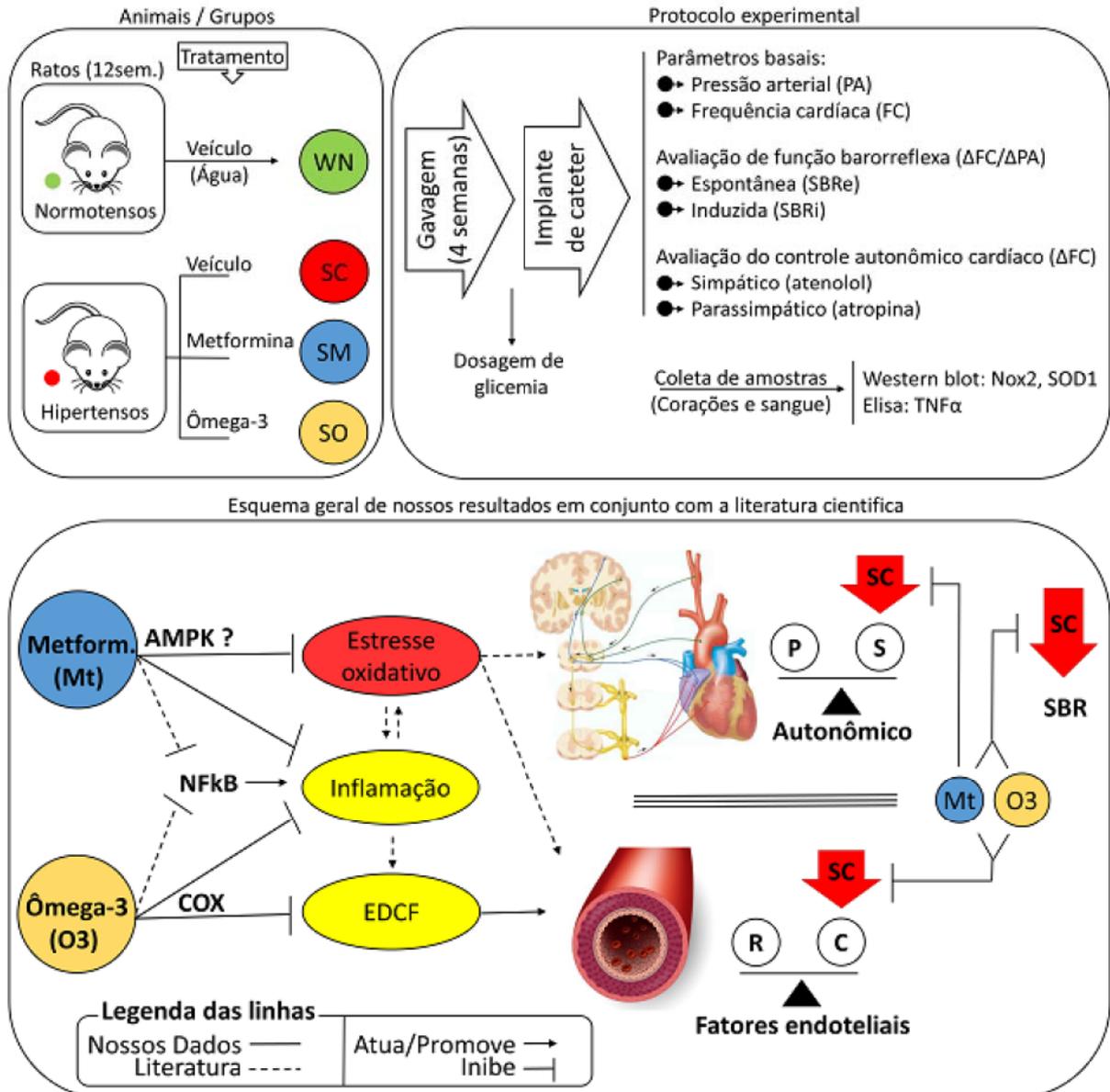
Em nosso estudo, o tratamento com metformina foi capaz de reduzir o tônus simpático dos SHR para níveis semelhantes aos observados nos ratos normotensos, o que possivelmente promoveu a redução na FC desses animais. Além disso, efeito semelhante de melhora foi observado quanto a resposta barorreflexa espontânea e em resposta a fenilefrina. Esses mecanismos autonômicos têm sua origem no sistema nervoso central, com importante controle no tronco cerebral envolvendo regiões chave como o NTS, o NA e RVLM (BENARROCH, 1993; CHAN; SAWCHENKO, 1998; THAYER; LANE, 2009). O mecanismo pelo qual a metformina exerceu esses efeitos pode estar relacionado a sua capacidade de redução da expressão da NOX2, uma vez que, o estresse oxidativo nessas regiões centrais está relacionado ao prejuízo autonômico observado nos ratos SHR (NISHIHARA et al., 2012; TAI et al., 2005) e em outros modelos animais de hipertensão (GALVÃO et al., 2016; TSAI et al., 2013).

Outro possível mecanismo pelo qual a metformina exerceu seus efeitos pode ser pela sua ação anti-inflamatória, com redução do TNF $\alpha$ . Esse também é provavelmente o mecanismo pelo qual os ômega-3 exerceram seus efeitos sobre o barorreflexo. Foi demonstrado que um processo inflamatório sistêmico mediado por TNF $\alpha$  pode levar conseqüentemente a um processo neuroinflamatório no RVLM com aumento do estresse oxidativo local (WU et al., 2012, 2016), o que pode envolver ativação do NFkB (KE et al., 2007). De todo modo, o estresse oxidativo relacionado a inflamação pode então levar a prejuízo do controle autonômico. Essa influência da inflamação sobre esses mecanismos relacionados à hipertensão fica evidente em

estudos como o que demonstrou que um inibidor de TNF $\alpha$  em nível central reduziu a PA via inibição do tônus simpático, com redução do estresse oxidativo no RVLM, em ratos com hipertensão renovascular (GALVÃO et al., 2016). De forma ainda mais direta, foi demonstrado que a infusão aguda de TNF intracerebroventricular foi capaz de promover aumento da PA e FC, com redução do barorreflexo, em ratos normotensos, Sprague-Dawley (ŽERA et al., 2016). Além disso, em outro estudo, em ratos obesos, os quais apresentavam prejuízo autonômico, com hiperatividade simpática e redução da resposta barorreflexa, o uso de um imunossupressor promoveu redução nos níveis de TNF $\alpha$ , e isso foi associado a melhora nesses parâmetros autonômicos (KHAN et al., 2017). Adicionalmente, em relação aos ômega-3, além da redução de TNF $\alpha$ , outro mecanismo pelo qual podem ter atuado nessas regiões centrais é pela sua ação anti-inflamatória por modulação do balanço dos prostanoídes, ao servir de substrato para a COX, como revisado por Layé et al (2018).

Em relação ao TNF $\alpha$  e os efeitos vasculares dos tratamentos, foi observado que o TNF $\alpha$  estimula a produção de prostanoídes como o TXA2 em células do MLV (YOUNG et al., 2000). De forma semelhante, o TNF $\alpha$  estimula a geração de ROS em células endoteliais (YANG; RIZZO, 2007) e também no MLV, com envolvimento da NOX (DE KEULENAER et al., 1998), sendo envolvido no estresse oxidativo e desenvolvimento de hipertensão (GUZIK et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que a infusão intra-arterial de TNF $\alpha$  em pacientes saudáveis provocou prejuízo do controle vascular endotélio-dependente (CHIA et al., 2003), bem como reduziu a biodisponibilidade de NO e aumentou os prostanoídes vasoconstritores (NAKAMURA et al., 2000). Ademais, é possível que esses mecanismos inflamatórios levem a aumento da expressão de COX2, via pela qual os EDCF também são produzidos (KE et al., 2007), de modo que uma ação anti-inflamatória poderia explicar a melhora na via dos prostanoídes que observamos na função vascular.

Portanto, as ações dos tratamentos sobre vias de inflamação, e no caso da metformina, sobre via de estresse oxidativo, parecem estar relacionadas aos efeitos vasculares e autonômicos observados em nosso estudo. Apesar de os efeitos dos tratamentos poderem variar de acordo com o tecido, tomamos o tecido cardíaco como um representante dos efeitos sistêmicos dos tratamentos, o que pode ser uma limitação de nosso estudo.



**Figura 18.** Gráfico resumo do estudo, dos principais resultados e mecanismos propostos. O estresse oxidativo pode interferir no sistema nervoso central alterando o controle autonômico cardíaco, com redução da atividade parassimpática (P), aumento da atividade simpática (S) e redução da sensibilidade barorreflexa (SBR), além de ter potencial de alterar a função vascular favorecendo a constrição (C) e/ou prejudicando o relaxamento (R). A inflamação pode levar a aumento do estresse oxidativo, ampliando esses efeitos, podendo também favorecer a formação de fatores constritores derivados do endotélio (EDCF). O tratamento com metformina (Mt) contrapõe o estresse oxidativo por redução de proteína pró-oxidante, o que talvez seja mediado pela ativação da Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK). Ambos os tratamentos reduzem inflamação, o que pode ser mediado por inibição do fator nuclear kappa B (NFkB), além de o ômega-3 (O3) também servir como substrato para a ciclooxigenase (COX) levando a atenuação de prostanoídeos vasoconstritores e inflamatórios. Dessa forma, os tratamentos inibiram parcialmente os efeitos da hipertensão sobre parâmetros autonômicos e vasculares.

## 6. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos demonstraram que o tratamento crônico tanto com metformina quanto com os VLC-PUFA ômega-3 promoveram efeitos benéficos sobre a disfunção vascular e o prejuízo autonômico cardíaco relacionados à HAS em ratos SHR, apresentando uma ação anti-inflamatória sistêmica e de melhora do perfil de prostanoídes nos vasos mesentéricos, e, em particular, a metformina também teve uma ação de contraposição à geração de estresse oxidativo. Esses efeitos foram alcançados sem nenhuma mudança na PA e na glicemia basal. Tomados em conjunto, esses dados demonstraram que a metformina e os VLC-PUFA ômega-3 apresentam um potencial benéfico sobre algumas das alterações cardiovasculares associadas à hipertensão arterial, o que possivelmente poderia se estender a outras condições do sistema CV.

## REFERÊNCIAS:

Abeywardena MY, Head RJ. Dietary polyunsaturated fatty acid and antioxidant modulation of vascular dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2001; 65(2):91-97.

Al-Bishri WM. Favorable effects of flaxseed supplemented diet on liver and kidney functions in hypertensive Wistar rats. *J Oleo Sci*. 2013; 62(9):709-715.

Allard JS, Perez EJ, Fukui K, Carpenter P, Ingram DK, de Cabo R. Prolonged metformin treatment leads to reduced transcription of Nrf2 and neurotrophic factors without cognitive impairment in older C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*. 2016; 301:1-9.

Alvarez MC, Caldiz C, Fantinelli JC, Garciarena CD, Console GM, Chiappe de Cingolani GE, Mosca SM. Is Cardiac Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats the Cause or the Consequence of Oxidative Stress? *Hypertens Res*. 2008; 31(7):1465-1476.

Andersson C, Vasan RS. Epidemiology of cardiovascular disease in young individuals. *Nat Rev Cardiol*. 2018; 15(4):230-240.

Ashabi G, Khalaj L, Khodagholi F, Goudarzvand M, Sarkaki A. Pre-treatment with metformin activates Nrf2 antioxidant pathways and inhibits inflammatory responses through induction of AMPK after transient global cerebral ischemia. *Metab Brain Dis*. 2015; 30(3):747-754.

Bäck, M. Omega-3 fatty acids in atherosclerosis and coronary artery disease. *Future Sci OA*. 2017; 3(4): FSO236.

Báčová B, Seč P, Certik M, Tribulova N. Intake of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Increases Omega-3 Index in Aged Male and Female Spontaneously Hypertensive Rats. *ISRN Nutr*. 2013; 2013:209360.

Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(4):1751-1756.

Balaszczuk AM, Arranz CT, Martinez Seeber A. Baroreceptor mechanisms in rat. *Arch Int Physiol Biochim*. 1987; 95(2):167-171.

Bang HO, Dyerberg J, Nielsen AB. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *Lancet*. 1971; 1(7710):1143-1145.

Benarroch EE. The central autonomic network: functional organization, dysfunction, and perspective. *Mayo Clin Proc*. 1993; 68(10):988-1001.

Bertinieri G, di Rienzo M, Cavallazzi A, Ferrari AU, Pedotti A, Mancia G. A new approach to analysis of the arterial baroreflex. *J Hypertens Suppl*. 1985; 3(3):S79-81.

Bhalla RC, Toth KF, Tan E, Bhatta RA, Mathias E, Sharma RV. Vascular effects of metformin: possible mechanisms for its antihypertensive action in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens*. 1996; 9:570–576.

Billman GE, Harris WS. Effect of dietary omega-3 fatty acids on the heart rate and the heart rate variability responses to myocardial ischemia or submaximal exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300(6):H2288-2299.

Brandes RP. Endothelial dysfunction and hypertension. *Hypertension*. 2014; 64(5):924-928.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 152 p.

Briones AM, Tabet F, Callera GE, Montezano AC, Yogi A, He Y, Quinn MT, Salaices M, Touyz RM. Differential regulation of Nox1, Nox2 and Nox4 in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR. *J Am Soc Hypertens*. 2011; 5(3):137-153.

Bristow JD, Honour AJ, Pickering GW, Sleight P, Smyth HS. Diminished baroreflex sensitivity in high blood pressure. *Circulation*. 1969; 39(1):48-54.

Brook RD, Julius S. Autonomic imbalance, hypertension, and cardiovascular risk. *Am J Hypertens*. 2000; 13(6 Pt 2):112S-122S.

Chan RK, Sawchenko PE. Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: implications for understanding baroreceptor reflex circuitry. *J Neurosci*. 1998; 18(1):371-387.

Chan SH, Tai MH, Li CY, and Chan JY. Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutases and catalase contributes to oxidative stress and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40(11):2028-2039.

Chapleau MW, Sabharwal R. Methods of assessing vagus nerve activity and reflexes. *Heart Fail Rev*. 2011; 16(2):109-127.

Chen LJ, Cheng MF, Ku PM, Cheng JT. Cerebral klotho protein as a humoral factor for maintenance of baroreflex. *Horm Metab Res*. 2015; 47(2):125-132.

Chia S, Qadan M, Newton R, Ludlam CA, Fox KA, Newby DE. Intra-arterial tumor necrosis factor-alpha impairs endothelium-dependent vasodilatation and stimulates local tissue plasminogen activator release in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23(4):695-701.

Chin JP, Gust AP, Nestel PJ, Dart AM. Marine oils dose-dependently inhibit vasoconstriction of forearm resistance vessels in humans. *Hypertension*. 1993; 21(1):22-28.

Chopra S, Baby C, Jacob JJ. Neuro-endocrine regulation of blood pressure. *Indian J Endocrinol Metab.* 2011; 15 Suppl 4:S281-288.

Chor D, Pinho Ribeiro AL, Sá Carvalho M, Duncan BB, Andrade Lotufo P, Araújo Nobre A, Aquino EM, Schmidt MI, Griep RH, Molina Mdel C, Barreto SM, Passos VM, Benseñor IJ, Matos SM, Mill JG. Prevalence, awareness, treatment and influence of socioeconomic variables on control of high blood pressure: results of the ELSA-Brasil Study. *PLOS One.* 2015; 10(6):e0127382.

Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension.* 1998; 31(2):643-648.

Christensen JH, Skou HA, Fog L, Hansen V, Vesterlund T, Dyerberg J, Toft E, Schmidt EB. Marine n-3 fatty acids, wine intake, and heart rate variability in patients referred for coronary angiography. *Circulation.* 2001; 103(5):651-657.

Christensen JH. Omega-3 polyunsaturated Fatty acids and heart rate variability. *Front Physiol.* 2011; 2:84.

Cisternas JR, Valenti VE, Alves TB, Ferreira C, Petenusso M, Breda JR, Pires AC, Tassi N, de Abreu LC. Cardiac baroreflex is already blunted in eight weeks old spontaneously hypertensive rats. *Int Arch Med.* 2010; 3:2.

Clark CM, Monahan KD, Drew RC. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation attenuates blood pressure increase at onset of isometric handgrip exercise in healthy young and older humans. *Physiol Rep.* 2016; 4(14): e12875.

Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Resolução Normativa CONCEA nº 13 de 20/09/2013. Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Experimentação Animal - CONCEA. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Brasília, 2013.

Cooney MT, Vartiainen E, Laatikainen T, Juolevi A, Dudina A, Graham IM. Elevated resting heart rate is an independent risk factor for cardiovascular disease in healthy men and women. *Am Heart J.* 2010; 159(4):612-619.e3.

Criscione L, Nellis P, Riniker B, Thomann H, Burdet R. Reactivity and sensitivity of mesenteric vascular beds and aortic rings of spontaneously hypertensive rats to endothelin: effects of calcium entry blockers. *Br J Pharmacol.* 1990; 100(1):31-36.

Crowley SD. The cooperative roles of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20(1):102-120.

Cutler JA. High blood pressure and end-organ damage. *J Hypertens Suppl.* 1996; 14(6):S3-6.

Daci A, Özen G, Uyar İ, Civelek E, Yildirim FİA, Durman DK, Teskin Ö, Norel X, Uydeş-Doğan BS, Topal G. Omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce vascular tone and inflammation in human saphenous vein. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2017; 133:29-34.

Das UM. Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2000; 63(6):351-362.

Datla SR, Griendling KK. Reactive Oxygen Species, NADPH Oxidases and Hypertension. *Hypertension*. 2010; 56(3):325–330.

De Caterina R. n-3 fatty acids in cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2011; 364(25):2439-2450.

De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, and Griendling KK. Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J*. 1998; 329 (Pt 3): 653–657.

Delgado GE, Krämer BK, Lorkowski S, März W, von Schacky C, Kleber ME. Individual omega-9 monounsaturated fatty acids and mortality-The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *J Clin Lipidol*. 2017; 11(1):126-135.e5.

Dickey RA, Janick JJ. Lifestyle modifications in the prevention and treatment of hypertension. *Endocr Pract*. 2001; 7(5):392-399.

Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:406960.

Dlugosova K, Okruhlicova L, Mitasikova M, Sotnikova R, Bernatova I, Weismann P, Slezak J, Tribulova N. Modulation of connexin-43 by omega-3 fatty acids in the aorta of old spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol*. 2009; 60(3):63-69.

Dosh SA. The diagnosis of essential and secondary hypertension in adults. *J Fam Pract*. 2001; 50(8):707-712.

Drawz PE, Pajewski NM, Bates JT, Bello NA, Cushman WC, Dwyer JP, Fine LJ, Goff DC Jr, Haley WE, Krousel-Wood M, McWilliams A, Rifkin DE, Slinin Y, Taylor A, Townsend R, Wall B, Wright JT, Rahman M. Effect of intensive versus standard clinic-based hypertension management on ambulatory blood pressure – results from the SPRINT ambulatory blood pressure study. *Hypertension*. 2017; 69(1):42-50.

Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet*. 1978; 2(8081):117-119.

Dyerberg J, Bang HO. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet*. 1979; 2(8140):433-435.

El Messaoudi S, Rongen GA, de Boer RA, Rixen NP. The cardioprotective effects of metformin. *Curr Opin Lipidol*. 2011; 22(6):445-453.

Engler MB, Engler MM, Ursell PC. Vasorelaxant properties of n-3 polyunsaturated fatty acids in aortas from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *J Cardiovasc Risk*. 1994; 1(1):75-80.

Fazan Jr. R, SilvaVJD, Salgado HC. Modelos de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*. 2001, 8: 19-29.

- Féletou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 117(4):139-155.
- Fisher JP, Paton JF. The sympathetic nervous system and blood pressure in humans: implications for hypertension. *J Hum Hypertens*. 2012; 26(8):463-475.
- Ford RJ, Teschke SR, Reid EB, Durham KK, Kroetsch JT, Rush JW. AMP-activated protein kinase activator AICAR acutely lowers blood pressure and relaxes isolated resistance arteries of hypertensive rats. *J Hypertens*. 2012; 30(4):725-733.
- Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*. 2014; 20(6):953-966.
- Forouzanfar MH, Liu P, Roth GA, Ng M, Biryukov S, Marczak L, Alexander L, Estep K, Hassen Abate K, Akinyemiju TF, et al. Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mmHg, 1990-2015. *JAMA*. 2017; 317(2):165-182.
- Frenoux JM, Prost ED, Belleville JL, Prost JL. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*. 2001; 131:39-45.
- Freund-Levi Y, Eriksdotter-Jönhagen M, Cederholm T, Basun H, Faxén-Irving G, Garlind A, Vedin I, Vessby B, Wahlund LO, Palmblad J. Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized double-blind trial. *Arch Neurol*. 2006; 63(10):1402-1408.
- Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989; 3(9):2007-2018.
- Galvão, AC. A inibição central do TNF- $\alpha$  reduz a pressão arterial via inibição do tônus simpático em ratos com hipertensão renovascular. 2016. 93 f Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.
- Garrel C, Alessandri JM, Guesnet P, Al-Gubory KH. Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012; 44(1):123-131.
- Gava NS, Vêras-Silva AS, Negrão CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training attenuates cardiac  $\beta$ -adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995; 26(pt 2):1129-1133.
- GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016; 388(10053): 1659-1724.
- Geelen A, Zock PL, Swenne CA, Brouwer IA, Schouten EG, Katan MB. Effect of n-3 fatty acids on heart rate variability and baroreflex sensitivity in middle-aged subjects. *Am Heart J*. 2003; 146(2):E4.

Geleijnse JM, Giltay EJ, Grobbee DE, Donders AR, Kok FJ. Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *J Hypertens*. 2002; 20(8):1493-1499.

Gellhorn E. The influence of baroreceptor reflexes on the reactivity of the autonomic nervous system. *Experientia*. 1957; 13(6):259-260.

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension, I: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischaemia. *J Exp Med*. 1934; 59:347-379.

Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res*. 2000; 87(1):26-32.

Gortan Cappellari G, Losurdo P, Mazzucco S, Panizon E, Jevnicar M, Macaluso L, Fabris B, Barazzoni R, Biolo G, Carretta R, Zanetti M. Treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental menopause. *J Nutr Biochem*. 2013; 24(1):371-379.

Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, Lanfranchi A, Mancia G. Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension*. 1998; 31(1):68-72.

Griffin SJ, Leaver JK, Irving GJ. Impact of metformin on cardiovascular disease: a meta-analysis of randomised trials among people with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2017; 60(9):1620-1629.

Groeger AL, Cipollina C, Cole MP, Woodcock SR, Bonacci G, Rudolph TK, Rudolph V, Freeman BA, Schopfer FJ. Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids. *Nat Chem Biol*. 2010; 6(6):433-441.

Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI). Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet*. 1999; 354:447-455. [Errata, *Lancet*. 2001; 357:642, 2007;369:106.].

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986; 320(6061):454-456.

Guo JM, Zhang L, Niu XC, Shu H, Wang L, Su DF, Zhang Y, Liu AJ, Zhu DQ, Xu JJ. Involvement of arterial baroreflex and nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit pathway in the protection of metformin against stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2017; 798:1-8.

Gupta S, McArthur C, Grady C, Ruderman NB. Stimulation of vascular Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *Am J Physiol*. 1994; 266(5 Pt 2):H2146-2151.

Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*. 2007; 204(10):2449-2460.

Hamidi Shishavan M, Henning RH, van Buiten A, Goris M, Deelman LE, Buikema H. Metformin Improves Endothelial Function and Reduces Blood Pressure in Diabetic Spontaneously Hypertensive Rats Independent from Glycemia Control: Comparison to Vildagliptin. *Sci Rep*. 2017; 7(1):10975.

Hardisty RH. Arterial Hypertension. *Can Med Assoc J*. 1920; 10(8):757-760.

He H, Zhao Z, Chen J, Ni Y, Zhong J, Yan Z, Li Y, Liu D, Pletcher MJ, Zhu Z. Metformin-based treatment for obesity-related hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Hypertens*. 2012; 30(7):1430-1439.

Head GA. Baroreflexes and cardiovascular regulation in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995; 26 Suppl 2:S7-16.

Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008; 359(15):1577-1589.

Hoyer J. [Non-pharmacological and pharmacological treatment of arterial hypertension: current situation. *Herz*. 2012; 37(7):728-734.

Hu J, Liu Z, Zhang H. Omega-3 fatty acid supplementation as an adjunctive therapy in the treatment of chronic kidney disease: a meta-analysis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2017; 72(1):58-64.

Huang WY, Davidge ST, Wu J. Bioactive natural constituents from food sources-potential use in hypertension prevention and treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013; 53(6):615-630.

Hui R, St-Louis J, Falardeau P. Antihypertensive Properties of Linoleic Acid and Fish Oil Omega-3 Fatty Acids Independent of the Prostaglandin System. *Am J Hypertens*. 1989; 2:610-617

Huijing Xia, Srinivas Sriramula, Kavaljit H. Chhabra, Eric Lazartigues. Brain ACE2 shedding contributes to the development of neurogenic hypertension. *Circ Res*. 2013; 113(9): 1087–1096.

Ighodaroab OM, Akinloyeb AO. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 2017.

James D. Risks and benefits of seafood consumption - Globefish Research Programme. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Volume 8. 2013.

Johnson NP. Metformin use in women with polycystic ovary syndrome. *Ann Transl Med*. 2014; 2(6):56.

Judy WV, Farrell SK. Arterial baroreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1979; 1(6):605-614.

Kang JX, Weylandt KH. Modulation of inflammatory cytokines by omega-3 fatty acids. *Subcell Biochem*. 2008; 49:133-143.

Katayama S, Hatano M, Issiki M. Clinical features and therapeutic perspectives on hypertension in diabetics. *Hypertens Res*. 2018; 41(4):213-229.

Kato T, Iwama Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T, Satake T. Prostaglandin H2 may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension*. 1990; 15(5):475-481.

Kaur M, Chandran DS, Jaryal AK, Bhowmik D, Agarwal SK, Deepak KK. Baroreflex dysfunction in chronic kidney disease. *World J Nephrol*. 2016; 5(1):53-65.

Ke J, Long X, Liu Y, Zhang YF, Li J, Fang W, Meng QG. Role of NF-kappaB in TNF-alpha-induced COX-2 expression in synovial fibroblasts from human TMJ. *J Dent Res*. 2007; 86(4):363-367.

Khan SA, Sattar MZA, Abdullah NA, Rathore HA, Ahmad A, Abdulla MH, Johns EJ. Improvement in baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in obese Sprague Dawley rats following immunosuppression. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017; 221(4):250-265.

Khankari NK, Murff HJ, Zeng C, Wen W, Eeles RA, Easton DF, Kote-Jarai Z, Al Olama AA, Benlloch S, et al. Polyunsaturated fatty acids and prostate cancer risk: a Mendelian randomisation analysis from the PRACTICAL consortium. *Br J Cancer*. 2016; 115(5):624-631.

Kim M, Goto T, Yu R, Uchida K, Tominaga M, Kano Y, Takahashi N, Kawada T. Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. *Sci Rep*. 2015; 5:18013.

Kim SA, Choi HC. Metformin inhibits inflammatory response via AMPK-PTEN pathway in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 425(4):866-872.

Kinaan M, Ding H, Triggle CR. Metformin: An Old Drug for the Treatment of Diabetes but a New Drug for the Protection of the Endothelium. *Med Princ Pract*. 2015; 24(5):401-415.

Klippel BF, Duemke LB, Leal MA, Friques AG, Dantas EM, Dalvi RF, Gava AL, Pereira TM, Andrade TU, Meyrelles SS, Campagnaro BP, Vasquez EC. Effects of Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Front Physiol*. 2016; 7:211.

Kollai M, Koizumi K. Cardiovascular reflexes and interrelationships between sympathetic and parasympathetic activity. *J Auton Nerv Syst*. 1981; 4(2):135-148.

Krieger EM, Brum PC, Negrão CE. State-of-the-Art lecture: influence of exercise training on neurogenic control of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999; 34(4 Pt 2):720-723.

Lanfranchi PA, Somers VK. Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002; 283(4):R815-826.

Lantelme P, Khettab F, Custaud MA, Rial MO, Joanny C, Gharib C et al. Spontaneous baroreflex sensitivity: toward an ideal index of cardiovascular risk in hypertension? *J Hypertens*. 2002; 20: 935–944.

Layé S, Nadjar A, Joffre C, Bazinet RP. Anti-Inflammatory Effects of Omega-3 Fatty Acids in the Brain: Physiological Mechanisms and Relevance to Pharmacology. *Pharmacol Rev*. 2018; 70(1):12-38.

Lexis CP, van der Horst IC. Metformin for cardiovascular disease: promise still unproven. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014; 2(2):94-95.

Li J, Bukoski RD. Endothelium-dependent relaxation of hypertensive resistance arteries is not impaired under all conditions. *Circ Res*. 1993; 72(2):290-296.

Li J, Zhou Z, Jiang DJ, Li D, Tan B, Liu H, Li YJ. Reduction of NO- and EDHF-mediated vasodilatation in hypertension: role of asymmetric dimethylarginine. *Clin Exp Hypertens*. 2007; 29(7):489-501.

Li SG, Lawler JE, Randall DC, Brown DR. Sympathetic nervous activity and arterial pressure responses during rest and acute behavioral stress in SHR versus WKY rats. *J Auton Nerv Syst*. 1997; 62(3):147-154.

Limbu R, Cottrell GS, McNeish AJ. Characterisation of the vasodilation effects of DHA and EPA, n-3 PUFAs (fish oils), in rat aorta and mesenteric resistance arteries. *PLoS One*. 2018; 13(2):e0192484.

Lobato NS, Filgueira FP, Hagihara GN, Akamine EH, Pariz JR, Tostes RC, Carvalho MH, Fortes ZB. Improvement of metabolic parameters and vascular function by metformin in obese non-diabetic rats. *Life Sciences*. 2012; 90(5-6):228-235.

Losurdo P, Grillo A, Panizon E, Zanetti M, Bardelli M, Biolo G, Fabris B, Carretta R. Baroreflex sensitivity and central hemodynamics after omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in an animal model of menopause. *Vascul Pharmacol*. 2015; 71:65-69.

Lucchesi PA, Belmadani S, Matrougui K. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *J Hypertens*. 2005; 23(3):571-579.

Lucena CF, Roma LP, Graciano MF, Veras K, Simões D, Curi R, Carpinelli AR. Omega-3 supplementation improves pancreatic islet redox status: in vivo and in vitro studies. *Pancreas*. 2015; 44(2):287-295.

Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1986; 8(4):344-348.

Lüscher TF. Heterogeneity of endothelial dysfunction in hypertension. *Eur Heart J*. 1992; 13 Suppl D:50-55.

MacLean CH, Newberry SJ, Mojica WA, Khanna P, Issa AM, Suttorp MJ, Lim YW, Traina SB, Hilton L, Garland R, Morton SC. Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *JAMA*. 2006; 295(4):403-415.

Malachias MVB, Souza WKSB, Plavnik FL, Rodrigues CIS, Brandão AA, Neves MFT, et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol*. 2016; 107(3Supl.3):1-83

Mano MT, Bexis S, Abeywardena MY, McMurchie EJ, King RA, Smith RM, Head RJ. Fish oils modulate blood pressure and vascular contractility in the rat and vascular contractility in the primate. *Blood Press*. 1995; 4(3):177-186.

Manzella D, Grella R, Esposito K, Giugliano D, Barbagallo M, Paolisso G. Blood pressure and cardiac autonomic nervous system in obese type 2 diabetic patients: effect of metformin administration. *Am J Hypertens*. 2004; 17(3):223-227.

Marchioli R, Barzi F, Bomba E, Chieffo C, Di Gregorio D, Di Mascio R, Franzosi MG, Geraci E, Levantesi G, Maggioni AP, Mantini L, Marfisi RM, Mastrogiuseppe G, Mininni N, Nicolosi GL, Santini M, Schweiger C, Tavazzi L, Tognoni G, Tucci C, Valagussa F; GISSI-Prevenzione Investigators. Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation*. 2002; 105(16):1897-903.

Marshall SM. 60 years of metformin use: a glance at the past and a look to the future. *Diabetologia*. 2017; 60(9):1561-1565.

Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Pérez-Girón JV, García-Redondo L, Esteban V, Redondo JM, Alonso MJ, Briones AM, Salaices M. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18(1):51-65.

Matsumoto T, Nakayama N, Ishida K, Kobayashi T, Kamata K. Eicosapentaenoic Acid Improves Imbalance between Vasodilator and Vasoconstrictor Actions of Endothelium-Derived Factors in Mesenteric Arteries from Rats at Chronic Stage of Type 2 Diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 329(1):324-334.

Matsumoto T, Watanabe S, Iguchi M, Ando M, Oda M, Nagata M, Yamada K, Taguchi K, Kobayashi T. Mechanisms Underlying Enhanced Noradrenaline-Induced Femoral Arterial Contractions of Spontaneously Hypertensive Rats: Involvement of Endothelium-Derived Factors and Cyclooxygenase-Derived Prostanoids. *Biol Pharm Bull*. 2016; 39(3):384-393.

Mayet J, Hughes A. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. *Heart*. 2003; 89(9):1104-1109.

McGregor DD. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor response in the perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol.* 1965; 177:21-30.

Messerli FH, Rimoldi SF, Bangalore S, Bavishi C, Laurent S. When an Increase in Central Systolic Pressure Overrides the Benefits of Heart Rate Lowering. *J Am Coll Cardiol.* 2016; 68(7):754-762.

Messerli FH, Williams B, Ritz E. Essential hypertension. *Lancet.* 2007; 370(9587):591-603.

Mihailovic-Stanojevic N, Miloradović Z, Ivanov M, Bugarski B, Jovović D, Karanović D, Vajić UJ, Komes D, Grujić-Milanović J. Upregulation of Heme Oxygenase-1 in Response to Wild Thyme Treatment Protects against Hypertension and Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016:1458793.

Miller VM, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. *Am J Physiol.* 1985; 248(4 Pt 2):H432-437.

Minihane AM, Armah CK, Miles EA, Madden JM, Clark AB, Caslake MJ, Packard CJ, Kofler BM, Lietz G, Curtis PJ, Mathers JC, Williams CM, Calder PC. Consumption of Fish Oil Providing Amounts of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid That Can Be Obtained from the Diet Reduces Blood Pressure in Adults with Systolic Hypertension: A Retrospective Analysis. *J Nutr.* 2016; 146(3):516-523.

Mistry DK, Garland CJ. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 1998; 124(6):1131-1140.

Monahan KD, Wilson TE, Ray CA. Omega-3 fatty acid supplementation augments sympathetic nerve activity responses to physiological stressors in humans. *Hypertension.* 2004; 44(5):732-738.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension.* 1988; 12(4):365-372.

Morcret JF, Safar M, Thomas F, Guize L, Benetos A. Associations between heart rate and other risk factors in a large French population. *J Hypertens.* 1999; 17(12 Pt 1):1671-1676.

Mozaffarian D, Geelen A, Brouwer IA, Geleijnse JM, Zock PL, Katan MB. Effect of fish oil on heart rate in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Circulation.* 2005; 112(13):1945-1952.

Muntzel MS, Abe A, Petersen JS. Effects of adrenergic, cholinergic, and ganglionic blockade on acute depressor responses to metformin in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 281:618-623.

Muntzel MS, Hamidou I, Barrett S. Metformin attenuates salt-induced hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1999; 33(5):1135-1140.

Murnaghan MF. Effect of fatty acids on the ventricular arrhythmia threshold in the isolated heart of the rabbit. *Br J Pharmacol*. 1981; 73:909-915.

Nakamura M, Yoshida H, Arakawa N, Saitoh S, Satoh M, Hiramori K. Effects of tumor necrosis factor-alpha on basal and stimulated endothelium-dependent vasomotion in human resistance vessel. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000; 36(4):487-492.

Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(22):10045-10048.

Naruse M, Tanabe A, Sato A, Takagi S, Tsuchiya K, Imaki T, Takano K. Aldosterone breakthrough during angiotensin II receptor antagonist therapy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2002; 40(1):28-33.

Navarro-González JF, Mora C, Muros M, Jarque A, Herrera H, García J. Association of tumor necrosis factor-alpha with early target organ damage in newly diagnosed patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2008; 26(11):2168-2175.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *Lancet*. 2017; 389(10064):37-55.

Negrão CE, Moreira ED, Santos MCLM, Farah VMA, Krieger EM. Vagal function impairment after exercise training. *J Appl Physiol*. 1992; 72:1749-1753.

Nishihara M, Hirooka Y, Matsukawa R, Kishi T, Sunagawa K. Oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla modulates excitatory and inhibitory inputs in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2012; 30(1):97-106.

Nowacki D, Martynowicz H, Skoczyńska A, Wojakowska A, Turczyn B, Bobak Ł, Trziszka T, Szuba A. Lecithin derived from  $\omega$ -3 PUFA fortified eggs decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Sci Rep*. 2017; 7(1):12373.

Nunes DO, Almenara CC, Broseghini-Filho GB, Silva MA, Stefanon I, Vassallo DV, Padilha AS. Flaxseed oil increases aortic reactivity to phenylephrine through reactive oxygen species and the cyclooxygenase-2 pathway in rats. *Lipids Health Dis*. 2014; 13:107.

Nyby MD, Matsumoto K, Yamamoto K, Abedi K, Eslami P, Hernandez G, Smutko V, Berger ME, Tuck ML. Dietary fish oil prevents vascular dysfunction and oxidative stress in hyperinsulinemic rats. *Am J Hypertens*. 2005; 18(2 Pt 1):213-219.

O'Hora TR, Markos F, Wiernsperger NF, Noble MI. Metformin causes nitric oxide-mediated dilatation in a shorter time than insulin in the iliac artery of the anesthetized pig. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012; 59(2):182-187.

Oliveira PW, de Sousa GJ, Caliman IF, Lamas AZ, Santos de Medeiros AR, de Andrade TU, de Abreu GR, de Figueiredo SG, Bissoli NS. Metformin ameliorates ovariectomy-induced vascular dysfunction in non-diabetic Wistar rats. *Clin Sci (Lond)*. 2014; 127(4):265-275.

Oliveira-Sales EB, Colombari DS, Davisson RL, Kasparov S, Hirata AE, Campos RR, Paton JF. Kidney-induced hypertension depends on superoxide signaling in the rostral ventrolateral medulla. *Hypertension*. 2010; 56(2):290-296.

Onodera Y, Teramura T, Takehara T, Shigi K, Fukuda K. Reactive oxygen species induce Cox-2 expression via TAK1 activation in synovial fibroblast cells. *FEBS Open Bio*. 2015; 5:492-501.

Ozkor MA; Quyyumi AA. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor and Vascular Function. *Cardiol Res Pract*. 2011; 2011:156146.

Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *Int J Inflamm*. 2014; 2014:689360.

Park K, Mozaffarian D. Omega-3 fatty acids, mercury, and selenium in fish and the risk of cardiovascular diseases. *Curr Atheroscler Rep*. 2010; 12(6):414-422.

Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother*. 2017; 94:317-325.

Patterson E, Wall R, Fitzgerald G, Ross RP, Stanton C. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *J Nutr Metab*. 2012; 2012: 539426.

Petersen JS, DiBona GF. Acute sympathoinhibitory actions of metformin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1996; 27:619-625.

Petersen JS, DiBona, GF. Effects of central metformin administration on responses to air-jet stress and on arterial baroreflex function in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens*. 1997; 15(3):285-291.

Peuler JD, Lee JM, Smith JM. 4-aminopyridine antagonizes the acute relaxant action of metformin on adrenergic contraction in the ventral tail artery of the rat. *Life Sciences*. 1999, 65(23):287-293.

Piwkowska A, Rogacka D, Jankowski M, Dominiczak MH, Stepinski JK, Angielski S. Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, 393:268-273.

Portalatin M, Winstead N. Medical management of constipation. *Clin Colon Rectal Surg*. 2012; 25(1):12-19.

Prasad S, Sajja RK, Kaiser MA, Park JH, Villalba H, Liles T, Abbruscato T, Cucullo L. Role of Nrf2 and protective effects of Metformin against tobacco smoke-induced cerebrovascular toxicity. *Redox Biol*. 2017; 12:58-69.

Pryce R, Bernaitis N, Davey AK, Badrick T, Anoopkumar-Dukie S. The Use of Fish Oil with Warfarin Does Not Significantly Affect either the International Normalised Ratio or Incidence of Adverse Events in Patients with Atrial Fibrillation and Deep Vein Thrombosis: A Retrospective Study. *Nutrients*. 2016; 8(9). pii: E578.

Puyó AM, Borroni JS, Boudou S, Santander Y, Carranza A, Donoso AS, Peredo HA. Metformin reduces vascular production of vasoconstrictor prostanoids in fructose overloaded rats. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2012; 32(1 Pt 2):9-14.

Púzserová A, Kopincová J, Bernátová I. [Endothelial (dys)function in the experimental model of primary hypertension]. *Cesk Fysiol*. 2010; 59(1):4-14.

Radaelli A, Cazzaniga M, Viola A, Balestri G, Janetti MB, Signorini MG, Castiglioni P, Azzellino A, Mancina G, Ferrari AU. Enhanced baroreceptor control of the cardiovascular system by polyunsaturated Fatty acids in heart failure patients. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48(8):1600-1606.

Radosinska J, Bacova B, Knezl V, Benova T, Zurmanova J, Soukup T, Arnostova P, Slezak J, Gonçalvesova E, Tribulova N. Dietary omega-3 fatty acids attenuate myocardial arrhythmogenic factors and propensity of the heart to lethal arrhythmias in a rodent model of human essential hypertension. *J Hypertens*. 2013; 31(9):1876-1885.

Rousseau-Ralliard D, Moreau D, Guiland JC, Raederstorff D, Grynberg A. Docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, lowers ambulatory blood pressure and shortens interval QT in spontaneously hypertensive rats in vivo. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009; 80(5-6):269-277.

Rueda-Clausen CF, Silva FA, Lindarte MA, Villa-Roel C, Gomez E, Gutierrez R, Cure-Cure C, López-Jaramillo P. Olive, soybean and palm oils intake have a similar acute detrimental effect over the endothelial function in healthy young subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007; 17(1):50-57.

Sakai C, Ishida M, Ohba H, Yamashita H, Uchida H, Yoshizumi M, Ishida T. Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells. *PLoS One*. 2017; 12(11):e0187934.

Sasali A, Leahy JL. Is metformin cardioprotective? *Diabetes Care*. 2003; 26(1):243-244.

Sato MA, Menani JV, Lopes OU, Colombari E. Commissural NTS lesions and cardiovascular responses in aortic baroreceptor-denervated rats. *Hypertension*. 1999; 34(4 Pt 2):739-743.

Savelieva I, Kourliouros A, Camm J. Primary and secondary prevention of atrial fibrillation with statins and polyunsaturated fatty acids: review of evidence and clinical relevance. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2010; 381:1-13. [Erratum, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2010; 381:383.].

Schreihof AM, Guyenet PG. The baroreflex and beyond: control of sympathetic vasomotor tone by GABAergic neurons in the ventrolateral medulla. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002; 29(5-6):514-521.

Sena CM, Matafome P, Louro T, Nunes E, Fernandes R, Seiça RM. Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 2011; 163(2):424-437.

Serezhenkov VA, Kuznetsov IS, Romantsova TI, Kuznetsova MI, Vanin AF. Antidiabetes drug metformin is a donor of nitric oxide: ESR measurement of efficiency. *Biofizika*. 2011; 56(6):1125-1133.

Shen J, Rastogi R, Guan L, Li F, Du H, Geng X, Ding Y. Omega-3 fatty acid supplement reduces activation of NADPH oxidase in intracranial atherosclerosis stenosis. *Neurol Res*. 2018; 24:1-9.

Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*. 2002; 21(6):495-505.

Skulas-Ray AC, Kris-Etherton PM, Harris WS, West SG. Effects of marine-derived omega-3 fatty acids on systemic hemodynamics at rest and during stress: a dose-response study. *Ann Behav Med*. 2012; 44(3):301-308.

Solak Y, Afsar B, Vaziri ND, Aslan G, Yalcin CE, Covic A, Kanbay M. Hypertension as an autoimmune and inflammatory disease. *Hypertens Res*. 2016; 39(8):567-573.

Song P, Zou MH. Regulation of NAD(P)H oxidases by AMPK in cardiovascular systems. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(9): 1607-1619.

Sung JY, Choi HC. Metformin-induced AMP-activated protein kinase activation regulates phenylephrine-mediated contraction of rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 421(3):599-604.

Svensson E, Baggesen LM, Johnsen SP, Pedersen L, Norrelund H, Buhl ES, Haase CL, Thomsen RW. Early Glycemic Control and Magnitude of HbA1c Reduction Predict Cardiovascular Events and Mortality: Population-Based Cohort Study of 24,752 Metformin Initiators. *Diabetes Care*. 2017; 40(6):800-807.

Swanson D, Block R, Mousa SA. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Adv Nutr*. 2012; 3(1):1-7.

Tagawa H, Shimokawa H, Tagawa T, Kuroiwa-Matsumoto M, Hirooka Y, Takeshita A. Long-term treatment with eicosapentaenoic acid augments both nitric oxide-mediated and non-nitric oxide-mediated endothelium-dependent forearm vasodilatation in patients with coronary artery disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999; 33(4):633-640.

Tahvanainen A, Taurio J, Mäki-Jouppi J, Kööbi P, Mustonen J, Kähönen M, Sand J, Nordback I, Pörsti I. Increased wall tension in response to vasoconstrictors in isolated mesenteric arterial rings from patients with high blood pressure. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006; 99(6):440-449.

Tai MH, Wang LL, Wu KL, Chan JY. Increased superoxide anion in rostral ventrolateral medulla contributes to hypertension in spontaneously hypertensive rats via interactions with nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 2005; 38(4):450-462.

Tate RM, Morris HG, Schroeder WR, Repine JE. Oxygen metabolites stimulate thromboxane production and vasoconstriction in isolated saline-perfused rabbit lungs. *J Clin Invest*. 1984; 74(2):608-613.

Tavazzi L, Maggioni AP, Marchioli R, et al. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, doubleblind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008; 372:1223-1230.

Thayer JF, Lane RD. Claude Bernard and the heart-brain connection: further elaboration of a model of neurovisceral integration. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009; 33(2):81-88.

Thorin E, Atkinson J. Modulation by the endothelium of sympathetic vasoconstriction in an in vitro preparation of the rat tail artery. *Br J Pharmacol*. 1994; 111(1):351-357.

Thrasher TN. Baroreceptors, baroreceptor unloading, and the long-term control of blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288(4):R819-827.

Tian XY, Wong WT, Leung FP, Zhang Y, Wang YX, Lee HK, Ng CF, Chen ZY, Yao X, Au CL, Lau CW, Vanhoutte PM, Cooke JP, Huang Y. Oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2-derived prostaglandin f(2 $\alpha$ ) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 16(4):363-373.

Troiano JA, Potje SR, Graton ME, Cavalari P, Pereira AA, Vale GT, Nakamune AC, Sumida DH, Tirapelli CR, Antoniali C. Decreased reactive oxygen species production and NOX1, NOX2, NOX4 expressions contribute to hyporeactivity to phenylephrine in aortas of pregnant SHR. *Life Sci*. 2016; 144:178-184.

Tsai CY, Su CH, Baudrie V, Laude D, Weng JC, Chang AY, Chan JY, Elghozi JL, Chan SH. Visualizing oxidative stress-induced depression of cardiac vagal baroreflex by MRI/DTI in a mouse neurogenic hypertension model. *Neuroimage*. 2013; 82:190-199.

Tsuji H, Larson MG, Venditti FJ Jr, Manders ES, Evans JC, Feldman CL, Levy D. Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events. The Framingham Heart Study. *Circulation*. 1996; 94(11):2850-2855.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*. 1998; 352(9131):854-865.

Valenti VE, De Abreu LC, Sato MA, Saldiva PH, Fonseca FL, Giannocco G, Riera AR, Ferreira C. Central N-acetylcysteine effects on baroreflex in juvenile spontaneously hypertensive rats. *J Integr Neurosci*. 2011; 10(2):161-176.

van den Elsen LW, Spijkers LJ, van den Akker RF, van Winssen AM, Balvers M, Wijesinghe DS, Chalfant CE, Garssen J, Willemsen LE, Alewijnse AE, Peters SL. Dietary fish oil improves endothelial function and lowers blood pressure via suppression of sphingolipid-mediated contractions in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2014; 32(5):1050-1058.

Vanhoutte PM, Shimokawa H. Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. *Circulation*. 1989; 80(1):1-9.

Verma S, Bhanot S, McNeill JH. Decreased vascular reactivity in metformin-treated fructose-hypertensive rats. *Metabolism*. 1996; 45(9):1053-1055.

Verma S, Bhanot S, McNeill JH. Metformin decreases plasma insulin levels and systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1994; 267:H1250-H1253.

Villalpando DM, Navarro R, del Campo L, Largo C, Muñoz D, Tabernero M, Baeza R, Otero C, García HS, Ferrer M. Docosahexaenoic Acid Supplemented Diet Influences the Orchidectomy-Induced Vascular Dysfunction in Rat Mesenteric Arteries. *PLoS One*. 2017; 12(1): e0168841.

Villalpando DM, Navarro R, Del Campo L, Largo C, Muñoz D, Tabernero M, Baeza R, Otero C, García HS, Ferrer M. Effect of Dietary Docosahexaenoic Acid Supplementation on the Participation of Vasodilator Factors in Aorta from Orchidectomized Rats. *PLoS One*. 2015; 10(11):e0142039.

Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 122(6):253-270.

Virtanen R, Jula A, Kuusela T, Helenius H, Voipio-Pulkki LM. Reduced heart rate variability in hypertension: associations with lifestyle factors and plasma renin activity. *J Hum Hypertens*. 2003; 17(3):171-179.

Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*. 2004; 44(4):381-386.

Weber P, Raederstorff D. Triglyceride-lowering effect of omega-3 LC-polyunsaturated fatty acids--a review. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2000; 10(1):28-37.

Weisser B, Struck A, Göbel BO, Vetter H, Düsing R. Fish oil and baroreceptor function in man. *Klin Wochenschr*. 1990; 68 Suppl 20:49-52.

Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE Jr, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, MacLaughlin EJ, Muntner P, Ovbiagele B, Smith SC Jr, Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA Sr, Williamson JD, Wright JT Jr. 2017 ACC / AHA / AAPA / ABC / ACPM / AGS / APhA / ASH / ASPC / NMA / PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*. 2017. pii: HYP.0000000000000066.

Winklewski PJ, Radkowski M, Wszedybyl-Winklewska M, Demkow U. Brain inflammation and hypertension: the chicken or the egg? *J Neuroinflammation*. 2015; 12:85.

Wong SW, Kwon MJ, Choi AM, Kim HP, Nakahira K, Hwang DH. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J Biol Chem*. 2009; 284(40):27384-392.

Woodman OL, Wongsawatkul O, Sobey CG. Contribution of nitric oxide, cyclic GMP and K<sup>+</sup> channels to acetylcholine-induced dilatation of rat conduit and resistance arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000; 27(1-2):34-40.

World Health Organization (WHO). A Global Brief on Hypertension: Silent killer, global public health crisis. World Health Organization. 2013.

Wu KL, Chan SH, Chan JY. Neuroinflammation and oxidative stress in rostral ventrolateral medulla contribute to neurogenic hypertension induced by systemic inflammation. *J Neuroinflammation*. 2012; 9:212.

Wu KL, Wu CW, Chao YM, Hung CY, Chan JY. Impaired Nrf2 regulation of mitochondrial biogenesis in rostral ventrolateral medulla on hypertension induced by systemic inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2016; 97:58-74.

Wu R, Millette E, Wu L, de Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001; 19(4):741-748.

XY, Wong WT, Leung FP, Zhang Y, Wang YX, Lee HK, Ng CF, Chen ZY, Yao X, Au CL, Lau CW, Vanhoutte PM, Cooke JP, Huang Y. Oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2-derived prostaglandin f(2 $\alpha$ ) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 16(4):363-373.

Yang B, Rizzo V. TNF- $\alpha$  potentiates protein-tyrosine nitration through activation of NADPH oxidase and eNOS localized in membrane rafts and caveolae of bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292(2):H954-962.

Yang DY, Pan HC, Yen YJ, Wang CC, Chuang YH, Chen SY, Lin SY, Liao SL, Raung SL, Wu CW, Chou MC, Chiang AN, Chen CJ. Detrimental effects of post-treatment with fatty acids on brain injury in ischemic rats. *Neurotoxicology*. 2007; 28(6):1220-1229.

Yokoyama M, Hirata K. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling: Is it a physiological mechanism of endothelium-dependent relaxation in cerebral artery? *Cardiovasc Res*. 2007; 73(1):8-9.

Young W, Mahboubi K, Haider A, Li I, Ferreri NR. Cyclooxygenase-2 is required for tumor necrosis factor- $\alpha$ - and angiotensin II-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000; 86(8):906-914.

Yuan YV, Kitts DD, Godin DV. Variations in dietary fat and cholesterol intakes modify antioxidant status of SHR and WKY rats. *J Nutr*. 1998; 128(10):1620-1630

Zárate R, El Jaber-Vazdekis N, Tejera N, Pérez JA, Rodríguez C. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clin Transl Med*. 2017; 6(1):25.

Żera T, Nowiński A, Kwiatkowski P. Centrally administered TNF increases arterial blood pressure independently of nitric oxide synthase. *Neuropeptides*. 2016; 58:67-72.

Zhao Y, Joshi-Barve S, Barve S, and Chen LH. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF- $\alpha$  expression by preventing NF- $\kappa$ B activation. *J Am Coll Nutr.* 2004; 23: 71–78.

Zhou L, Liu H, Wen X, Peng Y, Tian Y, Zhao L. Effects of metformin on blood pressure in nondiabetic patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens.* 2017; 35(1):18-26.

Zhu XC, Jiang T, Zhang QQ, Cao L, Tan MS, Wang HF, Ding ZZ, Tan L, Yu JT. Chronic metformin preconditioning provides neuroprotection via suppression of NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory pathway in rats with permanent cerebral ischemia. *Mol Neurobiol.* 2015; 52(1):375-385.

Zi F, Zi H, Li Y, He J, Shi Q, Cai Z. Metformin and cancer: An existing drug for cancer prevention and therapy. *Oncol Lett.* 2018; 15(1):683-690.