



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO MELHORA A
FUNÇÃO ENDOTELIAL POR REDUZIR ESTRESSE OXIDATIVO
EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

GEÓRGIA DE ANDRADE LIMA LEAL

Prof. FABIANO ELIAS XAVIER

RECIFE 2015

GEÓRGIA DE ANDRADE LIMA LEAL



**SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO MELHORA A
FUNÇÃO ENDOTELIAL POR REDUZIR ESTRESSE OXIDATIVO
EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier

Recife, 2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Leal, Geórgia de Andrade Lima

Suplementação com ácido fólico melhora a função endotelial por reduzir estresse oxidativo em ratos espontaneamente hipertensos/ Geórgia de Andrade Lima Leal– Recife: O Autor, 2015.

58 folhas: gráfs.

Orientador: Fabiano Elias Xavier

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui bibliografia

- 1. Hipertensão 2. Ácido fólico 3. Endotélio I. Xavier, Fabiano Elias (orientador) II. Título**

616.132

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015- 230

GEÓRGIA DE ANDRADE LIMA LEAL



**SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO MELHORA A
FUNÇÃO ENDOTELIAL POR REDUZIR ESTRESSE OXIDATIVO
EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovado por:

Fabiano Elias Xavier - UFPE

Glória Isolina Boente Pinto Duarte - UFPE

Cristina de Oliveira Silva - UFPE

Leucio Duarte Vieira Filho - UFPE

Data: 28/07/2015

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde, que me permite buscar e realizar todos os meus sonhos.

À minha família, pela educação que me foi dada e vibração a cada vitória alcançada.

Ao meu namorado, por todo companheirismo durante essa trajetória.

Ao meu professor e orientador, Fabiano Elias Xavier, pela oportunidade e confiança. Serei imensamente grata.

À professora Glória Isolina, pela sinceridade nas palavras, que sempre servem de reflexão e amadurecimento.

Aos meus amigos do LRV e LFFCV que me receberam da melhor maneira possível, pela paciência e pela contribuição que deram para a minha formação. Agradeço de todo o coração a: Diego Queiroz, Hicla Moreira, Juliana Rocha, Francine Iane, Jean, Geórgia Félix, Odair Silva, Rebeca, Fabiano Ferreira, Marcelo, Jairo Teixeira, Leonardo Gomes, Jamerson, Luciana, professora Cristina e professor Alex.

Agradeço de forma especial à Fernanda Elizabethe por toda a ajuda prestada, pelos conselhos e pelo privilégio em ter sua amizade.

Aos funcionários, José Antônio e Cláudia pelos cuidados com os animais.

Ao secretário da Pós-graduação, Djalma Silva, sempre disponível em ajudar.

E por fim, a CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior), pelo apoio financeiro.

“Quando não conseguir correr atrás dos anos, trote. Quando não conseguir trotar, caminhe. Quando não conseguir caminhar, use uma bengala. Mas nunca se detenha”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de uma suplementação crônica com ácido fólico sobre a função vascular (mecanismos contráteis e de relaxamento) de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e os possíveis mecanismos envolvidos. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE. SHR machos com 4 meses de vida receberam ácido fólico na dose de 8mg/Kg, por dia, através de gavagem durante um período de 2 meses. Após o tratamento, estes animais foram submetidos a experimentos de reatividade vascular em anéis isolados de aorta e artérias mesentéricas de resistência (relaxamento à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio; contração à fenilefrina e noradrenalina), a experimentos de medida direta da pressão arterial e avaliação dos níveis plasmáticos de homocisteína. O relaxamento vascular dependente do endotélio mostrou-se aumentado em ambas as artérias dos animais tratados com ácido fólico quando comparado ao dos animais não-tratados. Incubação com tempol e apocinina em anéis de aorta e mesentérica de resistência aumentou o relaxamento vascular à acetilcolina no grupo não-tratado. No entanto, não houve alteração desse relaxamento no grupo tratado. Quanto ao relaxamento vascular ao nitroprussiato de sódio, não houve diferença significativa entre os grupos. Uma diminuição da hiper-reatividade vascular à fenilefrina e noradrenalina foi observada no grupo tratado com ácido fólico quando comparado com o grupo não-tratado. A pressão arterial e os níveis de homocisteína foram similares entre os grupos estudados. Dessa forma, estes resultados indicam que a suplementação crônica de ácido fólico foi capaz de melhorar a função vascular em SHR, ainda que a pressão arterial não tenha sido alterada. Nesse contexto, o nutriente parece aumentar a liberação de fatores vasorrelaxantes possivelmente por mecanismos que envolvem diminuição do estresse oxidativo.

Palavras Chaves: Hipertensão arterial, disfunção endotelial, ratos espontaneamente hipertensos, ácido fólico.

ABSTRACT

Thus, the present work was designed to evaluate the effect of folic acid supplementation on vascular function (contractile and relaxation mechanisms) of spontaneously hypertensive rats and the possible mechanisms involved. The procedures were approved by the ethics committee in animal experimentation of UFPE. Male spontaneously hypertensive rats (SHR) at 4 months of age received supplementation with folic acid by 2 months at a dose of 8mg/kg by oral gavage. The animals were subjected to experiments of arterial blood pressure measurement in conscious rats, vascular reactivity study and evaluation of homocysteine levels. The endothelium-dependent vascular relaxation was increased in resistance mesenteric and aorta arteries from folic acid treated animals compared to untreated animals. Incubation with tempol and apocynin in aortic rings and mesenteric resistance artery increased vascular relaxation to acetylcholine in the untreated group. However, there was no change in this relaxation in the treated group. The vascular relaxation to the sodium nitroprussiate, there was no significant difference between groups. A decrease of the vascular hyper-reactivity to norepinephrine and phenylephrine was observed in the group treated with folic acid as compared with the untreated group. Blood pressure and homocysteine levels were not significantly different between groups. The present study suggests that folic acid supplementation improve vascular function in SHR. From this perspective, folic acid appears to increase vasodilator factors release possibly through mechanisms involving oxidative stress reduced.

Keywords: Arterial hypertension, endothelial dysfunction, spontaneously hypertensive rats, folic acid.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-MTHF	5-metiltetrahidrofolato
AT1	Receptor de angiotensina II tipo 1
BH4	Tetrahidrobiopterina
Ca ²⁺	Cálcio
COX-2	Ciclooxigenase-2
DCV	Doenças cardiovasculares
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDCF	Fatores vasoconstritores derivados do endotélio
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
Hcy	Homocisteína
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
Na ⁺	Sódio
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PGI ₂	Prostaciclina
PKB	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C

RNA	Ácido ribonucléico
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
TGF	Fatores transformadores do crescimento
TxA ₂	Tromboxano A ₂
VCAM-1	Molécula 1 de adesão da célula vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial
Vitamina A	Retinol
Vitamina B1	Tiamina
Vitamina B12	Cobalamina
Vitamina B2	Riboflavina
Vitamina B3	Niacina
Vitamina B5	Ácido Pantotênico
Vitamina B7	Biotina
Vitamina B9	Ácido Fólico
Vitamina C	Ácido Ascórbico
Vitamina D	Calciferol
Vitamina E	Alpha-Tocopherol
Vitamina K	Naftoquinona
Vitaminaa B6	Piridoxina
• NO	Óxido nítrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1 O sistema vascular e sua contribuição para a resistência vascular periférica.....	5
2.1.1 O endotélio vascular e suas alterações decorrentes do processo hipertensivo	6
2.2 Vitaminas e as doenças cardiovasculares (DCVs)	9
2.2.1 Vitamina do complexo B	11
2.2.1.1 O ácido fólico e suas ações sobre o sistema cardiovascular	12
3 OBJETIVOS	16
3.1 Geral	16
3.2 Específicos.....	16
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
Artigo a ser submetido no periódico: <i>Experimental Physiology</i>	28
Abstract	29
Introduction	30
Methods	32
<i>Animals</i>	32
<i>Arterial blood pressure measurement in conscious rats</i>	32
<i>Vascular Reactivity Study</i>	33
<i>Vessel preparation</i>	33
<i>Experimental protocols</i>	34
Measurement of plasma levels of homocysteine.....	34
<i>Chemical compounds</i>	35
<i>Statistical analysis</i>	35
Results	36
<i>Vascular response to phenylephrine/noradrenaline and endothelium-dependent and - independent relaxations</i>	36
<i>Homocysteine levels</i>	37

Discussion	38
Acknowledgements	42
Conflict of interest.....	43
References	44
Legends for figures.....	50
5 CONCLUSÕES.....	58

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas a principal causa de morte no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que em 2030 mais de 23 milhões de pessoas morrerão por DCV (OMS, 2013). Dados do Ministério da Saúde mostram que as DCV são responsáveis por aproximadamente 30% das mortes por ano no Brasil (Brasil, 2011). Diversos fatores de riscos estão relacionados com o desenvolvimento destas condições clínicas, porém a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é o principal fator envolvido, com o surgimento de infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico e aterosclerose. (Egan & Zhao, 2013; Bonner *et al.*, 2013; Hernanz *et al.*, 2014).

As causas e os mecanismos envolvidos na HAS não estão completamente esclarecidos. Sabe-se que a disfunção endotelial leva a um importante desequilíbrio na função vascular e é, portanto um grande contribuinte para o aumento nos níveis pressóricos (Yang *et al.*, 2002; Yang, 2011; Radenkovic *et al.*, 2013). É possível ainda inferir que o fator nutricional tenha participação importante no desenvolvimento da disfunção endotelial e da HAS (Belchior *et al.*, 2012; Motiwala, 2012). Em 2013, um estudo demonstrou que a deficiência de vitamina B9 por 4 semanas acarretou em aumento do estresse oxidativo e da pressão sistólica em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Pravenec *et al.*, 2013).

O papel das vitaminas nas DCV vem sendo foco de muitos estudos (Farbstein *et al.*; Liu *et al.*, 2013; Valdéz-Ramos, 2015). Algumas delas, como as vitaminas C e E são consideradas verdadeiros antioxidantes. Franco *et al.* (2003) mostraram que tanto a vitamina C quanto a vitamina E foram capazes de melhorar a função endotelial de ratos Wistar devido à diminuição da produção de ânions superóxidos. Outras vitaminas, como a D e a K também proporcionam benefícios ao sistema cardiovascular (Gunta *et al.*, 2013; McCabe *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2014;). No entanto, pouco se sabe a respeito dos benefícios das vitaminas do complexo B sobre esse sistema. Desta forma, estudos foram realizados para entender melhor a relação entre esse grupo de vitaminas, mais

especificamente o ácido fólico, também conhecido como vitamina B9 sobre a função vascular e cardíaca (Hara, 2011; Mahalle *et al.*, 2013; Roe *et al.*, 2013).

Em 2007, um grupo de pesquisadores estudou o efeito do ácido fólico na função barorreflexa de SHR. A função barorreflexa foi significativamente aumentada após administração do ácido fólico (Xiu-Juan *et al.*, 2007). Já em 2013, Roe *et al.* demonstraram que suplementação com ácido fólico por 4 semanas em ratos diabéticos foi capaz de restaurar a atividade da sintase de óxido nítrico (NOS) em cardiomiócitos e de melhorar a função cardíaca desses animais (Roe *et al.*, 2013).

O ácido fólico é bastante requisitado na redução dos níveis de homocisteína, aminoácido este que quando elevado no sangue está fortemente associado com um maior risco de desenvolvimento de DCV, devido a sua capacidade de gerar ânions superóxidos e favorecer ao aumento do estresse oxidativo (Kolling *et al.*, 2011; Qipshidze *et al.*, 2011; Cuevas *et al.*, 2014). Além disso, o ácido fólico parece estar envolvido com a regulação da NOS, enzima fundamental para a produção do óxido nítrico (Antoniades *et al.*, 2006). Também merecem destaque possíveis propriedades anticoagulantes desta vitamina, devido a sua capacidade em reduzir concentrações de fibrinogênio e de elevar concentrações de plasminogênio e antitrombina III (Mierzecki *et al.*, 2012). Há ainda relatos de que o ácido fólico parece auxiliar na vasodilatação, fato este de extrema importância para se investigar a possibilidade desta vitamina em melhorar a função endotelial e colaborar com a redução de eventos ateroscleróticos (Chambers *et al.*, 2000; Doshi *et al.*, 2001).

Para tal, a existência de um modelo de hipertensão essencial é fundamental neste processo de investigação. O SHR é uma linhagem de animais que cursa com alteração de todo o sistema cardiovascular. Estes animais apresentam quadro de hipertensão grave em torno dos 6 meses de vida, disfunção endotelial, prejuízo na função barorreflexa, aumento da atividade simpática e estresse oxidativo elevado (Tayebati *et al.*, 2012). Nesse sentido, foi avaliado se os efeitos de uma suplementação crônica com ácido fólico poderiam estar envolvidos com a melhora da função cardiovascular nestes animais.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é definida como a elevação crônica da pressão arterial, com valores iguais ou maiores que 140 mmHg para a pressão sistólica e 90 mmHg para pressão diastólica (Bolívar, 2013). Por ser uma comorbidade de alta prevalência que atinge milhões de pessoas em todo o mundo e por estar fortemente associada com um maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares (DCVs), a hipertensão se tornou um importante problema de saúde pública (WHO, 2013).

Fatores genéticos e ambientais, como alimentação e estilo de vida estão envolvidos com a fisiopatologia da HAS. Alterações no sistema renina-angiotensina, na função endotelial, na atividade simpática, na resistência à insulina, na redução da excreção renal de sódio (Na^+) e na produção de espécies reativas de oxigênio podem favorecer o desenvolvimento e/ou manutenção do estado hipertensivo (Sowers, 2004; Redon *et al.*, 2009; Palatini *et al.*, 2011; Leong *et al.*, 2015). O aumento do cálcio (Ca^{2+}) citossólico no músculo liso vascular provocado por alguns destes fatores resulta em maior vasoconstrição e consequente redução do lúmen do vaso (Vasdev *et al.*, 2011) o que acarreta aumento da resistência vascular periférica.

Ademais, fatores nutricionais também apresentam papel importante no desenvolvimento da HAS. A deficiência de alguns nutrientes no organismo pode resultar em disfunção endotelial e aumento da atividade simpática, com maior quantidade de catecolaminas circulantes no sangue (Nutter *et al.*, 1979; Pissaia *et al.*, 1980 Goodfellow *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 2003). Devido a essas alterações no sistema vascular em decorrência da deficiência nutricional, suplementação com alguns nutrientes pode ser uma alternativa eficaz tanto para auxiliar na prevenção quanto no tratamento da hipertensão (Houston, 2014).

Existem dois tipos de hipertensão: a hipertensão primária ou essencial e a hipertensão secundária. A primeira tem como característica não apresentar uma causa conhecida do aumento dos níveis pressóricos, enquanto a segunda, apresenta causa bem estabelecida, como as doenças renais e a gravidez (Risler *et al.*, 2005). Mudanças no débito cardíaco e na resistência vascular periférica são os determinantes do aumento da pressão arterial. Nos estágios iniciais da hipertensão, o débito cardíaco pode apresentar maior predomínio, no entanto, posteriormente, o aumento da resistência vascular

periférica se torna o principal responsável pela manutenção dos níveis elevados de pressão arterial (Foëx & Sear, 2004). Isto ocorre principalmente devido ao remodelamento vascular (Lee & Griendling, 2008).

O remodelamento arterial surge como uma das primeiras alterações provocadas pela hipertensão, principalmente nas artérias de menor calibre, como as artérias de resistência (Schiffrin, 2012). Alterações estruturais e funcionais nos vasos são observadas neste processo. A redução das fibras elásticas e o aumento na deposição de colágeno e calcificação tornam as artérias menos flexíveis e mais rígidas. Além disso, a disfunção endotelial contribui para causar mais prejuízo na função vascular. Com isso, ocorre uma diminuição na síntese e liberação de óxido nítrico ($\bullet$ NO) pelas células endoteliais e um aumento de fatores vasoconstritores produzidos por estas células (Safar *et al.*, 1998; Bauersachs & Widder, 2008; Aggarwal *et al.*, 2013). O endotélio também começa a liberar citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, que levam à proliferação das células do músculo liso vascular e deposição de matriz extracelular (Risler *et al.*, 2005; Lee & Griendling, 2008). Como resultado, a espessura da parede arterial aumenta e ocorre prejuízo no controle do tônus vascular, favorecendo a elevação da resistência vascular periférica e da pressão arterial (Oparil *et al.*, 2003; van Vark *et al.*, 2012).

Modelos experimentais de hipertensão são largamente utilizados para tentar compreender melhor as causas e os mecanismos envolvidos na hipertensão; os SHR são certamente o modelo mais utilizado neste tipo de estudo por refletir a hipertensão essencial que ocorre em humanos (Levy *et al.*, 2009; Tayebati *et al.*, 2012). Trata-se de uma linhagem que surgiu na década de 1960 após sucessivos acasalamentos e que desenvolve hipertensão por volta de quatro a seis semanas de vida, porém só em torno dos seis meses de vida a hipertensão encontra-se estabilizada (Okamoto *et al.*, 1963; Dornas *et al.*, 2011; Tayebati *et al.*, 2012). Com uma pressão arterial média em torno de 180 à 200 mmHg, os SHRs exibem alta atividade do sistema nervoso simpático. Além disso, esses animais cursam com remodelamento vascular e por isso apresentam artérias mais enrijecidas com menor diâmetro da luz dos vasos (Pintérová *et al.*, 2011). Os SHRs também apresentam enorme dano da função endotelial, que é uma característica marcante nesse modelo, apresentando grande prejuízo no relaxamento vascular dependente do endotélio (Bernatova *et al.*, 2009). A redução na biodisponibilidade do $\bullet$ NO é uma das principais causas da disfunção endotelial nestes animais, que ocorre

devido ao estresse oxidativo, decorrente da maior geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou da redução nos sistemas endógenos de defesa antioxidante (Higashi *et al.*, 2009; Bakker *et al.*, 2014).

2.1 O sistema vascular e sua contribuição para a resistência vascular periférica

O sistema vascular é composto pelas artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veias. As grandes artérias agem como vasos elásticos de condução, as artérias menores regulam a distribuição do fluxo sanguíneo, a microcirculação determina em grande parte a resistência vascular e troca de fluidos, enquanto o sistema venoso assume um papel capacitivo e governa o retorno venoso para o coração. Com exceção dos capilares, três camadas compõem a parede destes vasos: a túnica íntima, a túnica média e a túnica adventícia (dela Paz *et al.*, 2009).

A túnica íntima é a mais interna e mais fina camada da parede vascular. É formada por uma camada de células endoteliais, uma camada subendotelial contendo tecido conjuntivo e de uma membrana basal. A primeira está em contato direto com o sangue e tem um importante papel no controle do tônus vascular, através da liberação de fatores contráteis e de relaxamento. Além disso, coagulação sanguínea e proliferação celular também são controladas por essa camada. A membrana basal é constituída de colágeno, elastina, fibronectina, laminina e proteoglicanos, os quais compõem a matriz extracelular. Esta membrana basal está em íntimo contato com a lâmina elástica interna, a qual é formada por uma malha compacta de elastina. (Gonzalez *et al.*, 2014; dela Paz *et al.*, 2009).

A túnica média é constituída pelas células musculares lisas e de uma matriz extracelular que inclui lâminas de fibras elásticas, fibras colágenas e proteoglicanos. Em circunstâncias fisiológicas o papel principal das células musculares lisas é de gerar força. Normalmente, o músculo liso vascular, que constitui a maior parte da parede do vaso sanguíneo está num estado de ativação contínua, cuja força gerada é finamente regulada por uma variedade de fatores intrínsecos e extracelulares. As fibras elásticas permitem ao vaso a capacidade de se esticar e voltar ao seu tamanho original. Esta é a camada mais espessa presente nas artérias. Nas veias, a camada média se encontra mais desorganizada, sendo inclusive quase inexistente nas vênulas. Esta característica torna as veias mais finas e sensíveis quando comparadas com as artérias. Esta camada está

limitada exteriormente pela lâmina elástica externa e internamente pela lâmina elástica interna (Taylor *et al.*, 2009).

A túnica adventícia é a mais externa. É formada por tecido conjuntivo, responsável por dar o suporte estrutural necessário ao vaso. Além do colágeno, também estão presentes os fibroblastos, fibras elásticas e terminações nervosas. Em vênulas e veias, esta camada compõe a maior parte do vaso, diferente das artérias e arteríolas em que ocupa a metade da parede do vaso (Majesky *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2014).

2.1.1 O endotélio vascular e suas alterações decorrentes do processo hipertensivo

O endotélio vascular é considerado o maior órgão endócrino do corpo. Localizado entre a parede do vaso sanguíneo e a corrente sanguínea, esta camada constitui uma interface dinâmica entre o sangue e o resto do corpo (Endemann & Schiffrin, 2004). Ele regula o tônus, o crescimento e a apoptose das células musculares lisas, a agregação plaquetária e a adesão de leucócitos à parede vascular. Todas estas funções são realizadas graças às ações combinadas de vários fatores por ele liberados, como o óxido nítrico ($\bullet$ NO) (Furchgott & Zawadzki, 1980; Palmer *et al.*, 1987), a prostaciclina (PGI_2) (Moncada *et al.*, 1977), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Félétou & Vanhoutte, 1988; Taylor & Weston, 1988), a endotelina-1 (ET-1) (Yanagisawa *et al.*, 1988), o tromboxano A_2 (TxA_2) (Taddei & Vanhoutte, 1993), os diversos fatores de crescimento (PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; VEGF, fator de crescimento endotelial VEGF; fatores transformadores do crescimento, TGF, etc.), as moléculas de adesão leucocitária (VCAM-1, molécula de adesão de células vasculares; ICAM-1, molécula de adesão intercelular e selectinas E e P), dentre outros.

Na presença de fatores de risco cardiovascular como o diabetes, a hiperlipidemia, o tabagismo e a hipertensão arterial, o equilíbrio hemodinâmico e/ ou humoral do endotélio se modifica, alterando o padrão fisiológico de produção dos diversos fatores endoteliais. Sob estas circunstâncias se produz um desequilíbrio entre os diferentes fatores endoteliais e estas células deixam de exercer um papel homeostático e passam a contribuir para as alterações cardiovasculares associadas a doenças com fatores de risco cardiovascular, como a diabetes mellitus, a aterosclerose e a hipertensão arterial. Este processo, chamado de disfunção endotelial, se caracteriza pela redução de fatores vasodilatadores e predominância da liberação de fatores

vasoconstritores, fatores de crescimento, tendência à agregação plaquetária, maior adesão de leucócitos e desenvolvimento de trombose (Mombouli & Vanhoutte, 1999).

Inúmeros estudos, tanto em humanos como em animais experimentais, têm demonstrado a existência de disfunção endotelial na hipertensão. Existe uma ampla discussão sobre se a disfunção endotelial precede a hipertensão ou se é consequência do estado hipertensivo. Ainda hoje não se sabe ao certo quem seria causa ou consequência, mas sabe-se que existe de fato uma importante interrelação entre os dois fatores (Dharmashankar & Widlansky, 2010; Helbing *et al.*, 2014; Bernatova, 2014). Estudo recente publicado por Ramos-Alves *et al* (2012), mostrou que em prole de ratas diabéticas com três meses de vida já existia presença de disfunção endotelial representada por um prejuízo no vasorrelaxamento dependente do endotélio à acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência, no entanto, esse prejuízo vascular não era acompanhado de hipertensão arterial (Ramos-Alves *et al.*, 2012).

A redução na biodisponibilidade de óxido nítrico é uma importante característica da disfunção endotelial na hipertensão. Isso pode ser decorrente principalmente devido a redução das defesas antioxidantes e uma maior liberação de espécies reativas de oxigênio, bem como por alteração na atividade da eNOS que culminam com formação de estresse oxidativo (Davel *et al.*, 2011). O prejuízo no relaxamento dependente do endotélio, que caracteriza a disfunção endotelial, pode variar de acordo com o leito vascular, sendo este um importante fator na determinação da disfunção endotelial envolvida com a hipertensão. A redução do óxido nítrico é principalmente uma característica da disfunção endotelial de artérias maiores, como as de condutância, enquanto que em artérias menores, como as mesentéricas de resistência, a disfunção endotelial tem como característica marcante, uma importante redução do fator hiperpolarizante dependente do endotélio (Sunano & Sekiguchi, 2003). Um estudo de Dal-Ros *et al* (2008), demonstrou que hipertensão induzida por angiotensina II esteve associada com prejuízo no relaxamento mediado por EDHF em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar (Dal-Ros *et al.*, 2008).

A redução na produção e liberação de fatores vasodilatadores derivados do endotélio na condição de hipertensão é resultado principalmente de um aumento do estresse oxidativo e as principais fontes envolvidas com a liberação aumentada das

espécies reativas de oxigênio no processo hipertensivo são as mitocôndrias e a enzima NADPH oxidase (Dharmashankar & Widlansky, 2010).

A NADPH oxidase apresenta tanto expressão quanto atividade aumentada nos SHR, sendo esta enzima uma peça chave no desenvolvimento da disfunção endotelial e hipertensão arterial desses animais. Inibidores desta enzima, como a apocinina, são capazes de reduzir o estresse oxidativo e melhorar o estado hipertensivo dos SHR (Unger & Patil, 2009). Um estudo realizado por Unger & Patil (2009) mostrou que administração crônica de apocinina foi capaz de prevenir o desenvolvimento de disfunção endotelial e hipertensão devido inibição na produção exagerada das EROs bem como pelo aumento na biodisponibilidade de $\bullet\text{NO}$ em um modelo animal de resistência a insulina que exibe disfunção endotelial e hipertensão (Unger & Patil, 2009). Com estresse oxidativo aumentado, a produção de ânions superóxidos pode também levar ao desacoplamento da enzima eNOS e consequentemente a geração de mais EROs (Maia *et al.*, 2014).

Ademais, produtos do metabolismo das ciclooxigenases são grandes responsáveis pela ativação dessas fontes geradoras de EROs. Aortas de SHR apresentam expressão aumentada de COX-2, sendo esse um dos grandes contribuintes para a lesão vascular nesse modelo (Hernanz *et al.*, 2012). Inibidores das ciclooxigenases podem diminuir o estresse oxidativo e melhorar com isso a disfunção endotelial presente na condição de hipertensão (Tian *et al.*, 2012).

Assim como redução dos fatores vasodilatadores, aumento na produção de fatores contráteis derivados do endotélio é um importante responsável pelo prejuízo no relaxamento vascular dependente do endotélio observada na hipertensão e em SHR (Taddei *et al.*, 2001).

Os EDCF, como a endotelina e a angiotensina II, também contribuem com a disfunção endotelial na hipertensão não só por reduzir a biodisponibilidade de óxido nítrico, mas também devido estimulação da agregação plaquetária, proliferação das células musculares lisas do vaso e adesão de monócitos (Ishikawa *et al.*, 2007; González *et al.*, 2014; Gomolak & Didion, 2014). O sistema renina angiotensina gera um dos mais importantes fatores vasoconstritores e está comumente ativado nas condições de hipertensão. Sendo assim, o estímulo dos receptores para angiotensina II com

consequente aumento na produção dessa substância vasoativa é um fator que apresenta forte influência na disfunção endotelial do estado hipertensivo (Nagai *et al.*, 2011).

A angiotensina II contribui para lesão vascular por estar associada com a ativação da NADPH oxidase e por consequência uma maior produção de EROs (Ding *et al.*, 2015). Essas substâncias aumentadas ao reagir com o $\bullet\text{NO}$, geram peroxinitrito, uma espécie pró-inflamatória que provoca lesão vascular (Touyz, 2004). Somado a isso, o sistema renina angiotensina tem importante participação no desenvolvimento e manutenção da hipertensão de modelos experimentais, como dos SHR. Esses animais possuem uma expressão aumentada de receptores para angiotensina II do tipo AT1 em artérias mesentéricas de resistência quando comparado com ratos controles normotensos (Bhatt *et al.*, 2014).

Rackelhoff *et al* (2000), demonstrou que ao tratar os SHR com enalapril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), ocorria redução na pressão arterial, enfatizando o papel do sistema renina angiotensina no desenvolvimento da hipertensão nesse modelo experimental. Corroborando com os achados de Rackelhoff a respeito da participação desse sistema na hipertensão e disfunção endotelial, Zhou *et al* (2003), ao bloquear os receptores para angiotensina em um modelo que exhibe diminuição na biodisponibilidade de $\bullet\text{NO}$, demonstraram que ocorria uma diminuição na produção de EROs e uma melhora significativa da função endotelial. A angiotensina II além de atuar a favor do estresse oxidativo, também apresenta características pró-inflamatórias e pró-fibróticas que corroboram com a disfunção endotelial (Dikalov & Nazarewicz, 2013). Todos esses fatores contribuem com lesão vascular e consequente desequilíbrio na regulação do tônus dos vasos e desenvolvimento de hipertensão (Taddei *et al.*, 2001).

2.2 Vitaminas e as doenças cardiovasculares (DCVs)

As vitaminas são consideradas compostos orgânicos e são divididas em hidrossolúveis e lipossolúveis, dependendo da sua solubilidade em água e em lipídeos, respectivamente. As hidrossolúveis incluem as vitaminas do complexo B e a vitamina C, já as lipossolúveis incluem as vitaminas A, D, E e K (Afolayan *et al.*, 2014). Os benefícios promovidos por esses nutrientes são diversos; no sistema cardiovascular seus benefícios incluem, dentre outros, melhora da função vascular em doenças onde esta

função está prejudicada, como na HAS, na aterosclerose, na diabetes, etc (Najafpour Boushehri *et al.*, 2011; Hara *et al.*, 2011).

A vitamina E é uma molécula lipofílica de grande importância para o sistema cardiovascular. Conhecida por possuir propriedades antioxidantes, essa vitamina também é capaz de modular a expressão de genes e a função de proteínas (Takitani *et al.*, 2014). Pode atuar através da inibição da proteína quinase C (PKC) e da proteína quinase B (PKB), resultando em diminuição da proliferação e sobrevida celular (Packer *et al.*, 2001; Kempná *et al.*, 2004). Desta forma, a redução na proliferação das células do músculo liso vascular seria um fator responsável pela diminuição na formação de processos ateroscleróticos. Outra via de sinalização que essa vitamina pode atuar é através da diminuição da atividade da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), interferindo também na proliferação e sobrevida das células. Ademais, outras importantes características dessa vitamina que a torna promissora para o sistema cardiovascular são suas propriedades antitrombóticas, antiinflamatórias e vasodilatadoras (Farbstein *et al.*, 2010).

A vitamina C possui característica hidrofílica e assim como a vitamina E tem também importantes ações no sistema cardiovascular. Atua no plasma como antioxidante e estimula a proliferação das células endoteliais ao mesmo tempo em que inibe a proliferação do músculo liso vascular (Chen *et al.*, 2001). Um dos maiores benefícios da vitamina C é a melhora da função endotelial, que ocorre devido a uma maior liberação de •NO (Farbstein *et al.*, 2010). Um estudo realizado por Ulker *et al.* (2003) demonstrou que o tratamento com vitamina C e E foi capaz de melhorar a função vascular de SHR. Essa melhora ocorreu devido à redução de EROs, pela modulação da atividade da eNOS e atividade da NADPH oxidase, que resultaram em aumento na biodisponibilidade de •NO (Ulker *et al.*, 2003).

Quanto à vitamina D, seus receptores estão localizados em diversos locais do organismo, incluindo células endoteliais e células do músculo liso vascular (Gangula *et al.*, 2013). A deficiência dessa vitamina está envolvida com a disfunção endotelial e o remodelamento vascular (Kienreich *et al.*, 2013). Alguns dos seus benefícios em relação às doenças cardiovasculares podem ser citados como: propriedades antiinflamatórias, melhora da função endotelial e da sensibilidade à insulina, redução do estresse oxidativo, supressão do sistema renina-angiotensina, diminui da agregação plaquetária e

das moléculas de adesão endotelial. (Liu *et al.*, 2013; Valdéz-Ramos *et al.*, 2015). Por isso, níveis baixos de vitamina D podem ser considerados fator de risco para eventos como infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, aterosclerose e diabetes (Kienreich *et al.*, 2013).

A vitamina K tem papel importante na regulação de proteínas de coagulação. Pode estar relacionada a fator anticoagulante, com alteração na sensibilidade à insulina e ao metabolismo de glicose. Bem como outras vitaminas, a vitamina A apresenta efeito antioxidante, além de atuar também na sensibilidade à insulina e na diferenciação e crescimento celular (Valdéz-Ramos *et al.*, 2015).

2.2.1 Vitamina do complexo B

Oito diferentes tipos de vitaminas formam o complexo B: B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9 e B12. Elas são encontradas principalmente em vegetais, mas também são ricas em fontes animais, dependendo do tipo específico da vitamina. Por ser um grupo de vitaminas solúveis em água, seu excesso é facilmente excretado na urina (Fratoni *et al.*, 2015). Assim como outros grupos vitamínicos, o complexo B possui benefícios para o sistema cardiovascular (Mierzecki *et al.*, 2012; Hara, 2011).

Vitaminas do complexo B podem desempenhar importante função anticoagulante, ao reduzir concentrações de fibrinogênio e aumentar os níveis de plasminogênio e antitrombina III (Mierzecki *et al.*, 2012). Um estudo realizado em 2007 por Hron *et al.*, mostrou que a deficiência de vitamina B6 está associada com risco aumentado de desenvolver trombose venosa (Hron *et al.*, 2007).

É importante destacar que as vitaminas do complexo B, sobretudo as vitaminas B6, B9 e B12 apresentam grande importância no metabolismo da homocisteína (Hcy), aminoácido este que constitui um importante fator de risco para DCV. Uma deficiência deste complexo vitamínico pode simplesmente aumentar as concentrações de Hcy. Suplementação com esse grupo de vitamina, principalmente a vitamina B9, também conhecida como ácido fólico, pode estar associada com um menor risco de desenvolver DCV (Hara, 2011; Mahalle *et al.*, 2013).

2.2.1.1 O ácido fólico e suas ações sobre o sistema cardiovascular

O ácido fólico pode ser chamado também de ácido pteroilglutâmico e apresenta fórmula molecular $C_{19}H_{19}N_7O_6$ (Verhaar *et al.*, 2002; Czeozot, 2008). Para se tornar biologicamente ativo, o ácido fólico precisa sofrer um processo de redução *in vivo* e se transformar em diidrofolato e tetraidrofolato, após receber adição de átomos de hidrogênio nas posições 7, 8 e 5, 6, 7 e 8, respectivamente (Czeozot, 2008; Whitsett *et al.*, 2013). No entanto, para que o ácido fólico chegue até os tecidos, este é transportado pela circulação sanguínea sob a forma de 5-metil-tetraidrofolato conjugado a proteínas ligantes de baixa afinidade, como a albumina (Brito *et al.*, 2012).

O ácido fólico é fundamental em processos que requerem intensa multiplicação celular, como é o caso do tecido hematopoiético e funciona como coenzima em processos de oxidação e transferência de radical metila (Chen *et al.*, 2007; Visentin *et al.*, 2014). Por não ser produzido pelo organismo, o ácido fólico precisa ser ingerido através dos alimentos, já que é considerado um nutriente essencial, devido a sua participação na síntese de DNA (ácido desoxirribonucléico) e RNA (ácido ribonucléico) (Moens *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2013). No entanto, o ácido fólico encontrado nos alimentos possui alta sensibilidade ao calor e por isso grande parte desse nutriente é perdida no cozimento. Devido a isto, quadro de deficiência em ácido fólico pode ser facilmente instalado e suplementação com essa vitamina se torna necessária (Sanjoaquin *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2012; Mierzecki *et al.*, 2012). A suplementação conduz, não apenas a supressão do quadro de deficiência, mas vantagens que são de extrema importância na saúde do organismo (Tawkol *et al.*, 2005)

No sistema cardiovascular, a suplementação com ácido fólico parece possuir grandes benefícios e ao que tudo indica esses efeitos acontecem por mudanças na via do •NO, já que esta vitamina parece aumentar a produção deste vasodilatador. Os principais mecanismos de atuação do ácido fólico no aumento da biodisponibilidade do •NO acontece através da enzima eNOS e pela via da Hcy (Brown *et al.*, 2001; Torrens, 2006).

A Hcy quando em níveis elevados no sangue pode causar importante prejuízo na função vascular (Chen *et al.*, 2015). O mecanismo pelo qual a hiperhomocisteinemia provoca disfunção endotelial não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que o aumento deste aminoácido pode estar associado a uma maior produção de EROs e

possivelmente também à redução das defesas antioxidantes (Hsu, 2013). Sendo assim, é possível inferir que a biodisponibilidade de •NO esteja diminuída nesta situação devido ao aumento do estresse oxidativo (Kondziella *et al.*, 2008). Corroborando estes resultados, prejuízo no vasorrelaxamento dependente do endotélio é uma característica importante encontrada em situações de hiperhomocisteinemia (Yi *et al.*, 2014; Yildirim *et al.*, 2015). Somados a isso, níveis elevados deste aminoácido estão relacionados também com aumento da agregação plaquetária, aumento da síntese de TxA₂, proliferação do músculo liso vascular, inativação de substâncias anticoagulantes, além de ativação do sistema nervoso simpático (Brown *et al.*, 2001; Racek *et al.*, 2005; Yildirim *et al.*, 2015). Portanto, a homocisteína se mostra um importante fator contribuinte para a fisiopatologia da HAS e isso se deve principalmente devido a participação deste aminoácido no remodelamento vascular, disfunção endotelial e estresse oxidativo (Yildirim *et al.*, 2015).

Um estudo realizado por Mendes *et al.* (2014) em ratos normotensos, mostrou que a hiperhomocisteinemia induzida por tratamento com metionina esteve associada com aumento da pressão sistólica, pressão diastólica e pressão arterial média nesses animais (Mendes *et al.*, 2014). Esta correlação da homocisteína com a hipertensão é de grande valia para a melhor compreensão desta comorbidade que apesar dos inúmeros estudos ainda não está completamente esclarecida (Yildirim *et al.*, 2015). Apesar dos SHRs possuírem um grave quadro hipertensivo, alguns estudos mostram que essa situação parece ser independente dos níveis de homocisteína, devido esse modelo possuir níveis normais do aminoácido (Joseph *et al.*, 2002; Devi *et al.*, 2006; Kondziella *et al.*, 2008). No entanto, hiperhomocisteinemia induzida nesse modelo mostra que ocorre uma exacerbação do estado hipertensivo acompanhada de um aumento do estresse oxidativo e alteração do metabolismo de glicose desses animais (Pravenec *et al.*, 2013).

Por outro lado, fatores nutricionais podem ser capazes de modificar os níveis deste aminoácido (Wernimont *et al.*, 2011). A suplementação com ácido fólico é a principal forma de tratamento da hiperhomocisteinemia, além disso, deficiência dessa vitamina está relacionada com aumento nos níveis deste aminoácido no sangue (Stanger *et al.*, 2002; Kondziella *et al.*, 2008). Um estudo realizado em 2002 mostrou que a hiperhomocisteinemia provocada por uma dieta deficiente em ácido fólico prejudicou o relaxamento induzido pela acetilcolina em artérias coronárias e carótidas (Symons,

2002). A Hcy é necessária para a formação de outro aminoácido, a metionina, que é fundamental em determinados processos fisiológicos do organismo (Steed & Tyagi, 2011). O ácido fólico, através da sua forma ativa, a 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), participa desse processo por doar um grupamento metil necessário para que ocorra a metilação da Hcy em metionina, reduzindo com isso os níveis de Hcy no sangue (Kolling *et al.*, 2011; Mahalle *et al.*, 2013). Um estudo realizado por Kolling *et al.* (2011) em ratos wistar mostrou que a administração de Hcy nesses animais induziu aumento da produção de EROs e diminuição nas defesas antioxidantes, no entanto, quando administrado a Hcy juntamente com o ácido fólico, a vitamina B9 foi capaz de prevenir os efeitos causados pelo Hcy (Kolling *et al.*, 2011).

O ácido fólico também parece atuar na enzima eNOS. Para que esta enzima exerça sua função na produção de •NO, é necessária a participação de cofatores. O mais importante e fundamental desses cofatores é a tetrahydrobiopterina (BH₄) (Moens *et al.*, 2008). Em condições normais de BH₄, a eNOS encontra-se no estado acoplado, desempenha bem a sua função e produz •NO, no entanto em uma situação de deficiência desse cofator, ocorre desacoplamento da eNOS, com prejuízo no seu funcionamento (Hong *et al.*, 2014). No estado desacoplado, a eNOS ao invés de produzir •NO, produz radicais livres e favorece o aumento do estresse oxidativo (Stroes *et al.*, 2000). Estudos têm mostrado uma redução nos níveis de BH₄ na hipertensão e a administração deste cofator está relacionado com uma melhora no relaxamento dependente do endotélio e inibição do remodelamento vascular (Whitsett, 2013; Hernanz, 2014). O ácido fólico parece atuar aumentando a biodisponibilidade da BH₄, favorecendo com isso o acoplamento da eNOS e o subsequente aumento na produção de •NO (Zhang *et al.*, 2014).

Um estudo realizado em 2006 por Antoniades *et al.* mostrou que a forma ativa do ácido fólico, a 5-MTHF, foi capaz de melhorar a função endotelial de pacientes com doença arterial coronariana por aumentar a biodisponibilidade da BH₄ e melhorar a atividade da eNOS (Antoniades *et al.*, 2006). No entanto, o ácido fólico parece não atuar apenas na melhora da atividade da eNOS através do aumento da BH₄. Um estudo realizado em 2002 por Hyndman *et al.*, mostrou que a 5-MTHF se liga diretamente ao sítio ativo da BH₄ na eNOS, comportando-se como um análogo do cofator. Os autores atribuíram a isto, o fato da 5-MTHF possuir uma estrutura muito semelhante ao da BH₄.

Essa capacidade de interação entre a forma ativa do ácido fólico e a enzima eNOS permite o acoplamento desta enzima independente da BH₄ (Hyndman *et al.*, 2002).

Modelos de hipertensão, como os SHRs apresentam comumente estresse oxidativo aumentado e a BH₄ é um cofator que sofre facilmente oxidação em situações como essa com consequente redução na sua biodisponibilidade (Alp & Channon, 2004; Bendall *et al.*, 2014). Ademais, o ácido fólico parece possuir algum efeito na eNOS que por sua vez depende da BH₄ para a produção do •NO. Apesar dos reais mecanismos de atuação do ácido fólico em torno da Hcy e da eNOS não serem completamente compreendidos, possíveis efeitos desta vitamina diante da eNOS e da redução da Hcy pode sugerir um provável papel antioxidante do ácido fólico (Wang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). O ácido fólico, portanto pode vir a se tornar um importante aliado na terapêutica das alterações vasculares encontradas na condição de hipertensão e com isso exercer um grande papel na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares (Verhaar *et al.*, 2002). Para isso, um número maior de pesquisas envolvendo ácido fólico e HAS são necessárias. Portanto, o uso dos SHRs é de extrema importância para se investigar de que maneira suplementação com ácido fólico pode corroborar com a melhoria do quadro de disfunção endotelial encontrado nesses animais, assim como compreender melhor os principais mecanismos envolvidos nesta situação.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito da suplementação crônica com ácido fólico sobre a função vascular em ratos espontaneamente hipertensos e os possíveis mecanismos envolvidos.

3.2 Específicos

- Investigar o efeito do tratamento com ácido fólico sobre a pressão arterial e frequência cardíaca;

- Avaliar a ação do fármaco sobre mecanismos contráteis e de relaxamento em artérias aorta e mesentérica de resistência;

- Investigar o efeito da suplementação com ácido fólico sobre os níveis plasmáticos de homocisteína.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFOLAYAN, A. J.; WINTOLA, O. A. Dietary supplements in the management of hypertension and diabetes - a review. **Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.**, n. 11, p. 248-258, 2014.
- AGGARWAL, S.; GROSS, C. M.; SHARMA, S.; FINEMAN, J. R.; BLACK, S. M. Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling. **Compr. Physiol.**, n. 3, p. 1011-1034, 2013.
- ALP, N. J.; CHANNON, K. M. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, n. 24, p. 413-420, 2004.
- ANTONIADES, C.; SHIRODARIA, C.; WARRICK, N. CAI, S.; DE BONO, J.; LEE, J.; LEESON, P.; NEUBAUER, S.; RATNATUNGA, C.; PILLAI, R.; REFSUM, H.; CHANNON, K. M. 5-methyltetrahydrofolate rapidly improves endothelial function and decreases superoxide production in human vessels: effects on vascular tetrahydrobiopterin availability and endothelial nitric oxide synthase coupling. **Circulation.**, n. 114, p. 1193-1201, 2006.
- BAKKER, E. N.; GROMA, G.; SPIJKERS, L. J.; DE VOS, J.; VAN WEERT, A.; VAN VEEN, H.; EVERTS, V.; ARRIBAS, S. M.; VANBAVEL, E. Heterogeneity in arterial remodeling among sublines of spontaneously hypertensive rats. **PLoS. One.**, n. 9, p. e107998, 2014.
- BAUERSACHS, J.; WIDDER, J. D. Endothelial dysfunction in heart failure. **Pharmacol. Rep.**, n. 60, p. 119-126, 2008.
- BELCHIOR, A. C.; ANGELI, J. K.; FARIA, T. D. E. O.; SIMAN, F. D. SILVEIRA, E. A.; MEIRA, E. F.; COSTA, C. P.; VASSALLO, D. V.; PADILHA, A. S. Post-weaning protein malnutrition increases blood pressure and induces endothelial dysfunctions in rats. **PLoS. One.**, n. 7, p. e34876, 2012.
- BENDALL, J. K.; DOUGLAS, G.; MCNEILL, E.; CHANNON, K. M.; CRABTREE, M. J. Tetrahydrobiopterin in cardiovascular health and disease. **Antioxid. Redox. Signal.**, n. 20, p. 3040-3077, 2014.
- BERNATOVA, I.; CONDE, M. V.; KOPINCOVA, J.; GONZÁLEZ, M. C.; PUZSEROVA, A.; ARRIBAS, S. M. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: focus on methodological aspects. **J. Hypertens. Suppl.**, n. 27, p. S27-31, 2009.
- BERNATOVA, I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? **Biomed. Res. Int.**, n. 2014, p. 598271, 2014.
- BHATT, S. R.; LOKHANDWALA, M. F.; BANDAY, A. A. Vascular oxidative stress upregulates angiotensin II type I receptors via mechanisms involving nuclear factor kappa B. **Clin. Exp. Hypertens.**, n. 36, p. 367-373, 2014.

BOLÍVAR, J. J. Essential hypertension: an approach to its etiology and neurogenic pathophysiology. **Int. J. Hypertens.**, n. 2013, p. 547809, 2013.

BÖNNER, G.; BAKKIS, G. L.; SICA, D.; WEBER, M. A.; WHITE, W. B.; PEREZ, A.; CAO, C.; HANDLEY, A.; KUPFER, S. Antihypertensive efficacy of the angiotensin receptor blocker azilsartan medoxomil compared with the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril. **J. Hum. Hypertens.**, n. 27, p. 479-486, 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças cardiovasculares causam quase 30% das mortes no país. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares-causam-quase-30-das-mortes-no-pais>>. Acesso em: 06 Outubro 2015.

BRITO, A.; HERTRAMPF, E.; OLIVARES, M.; GAITÁN, D.; SÁNCHEZ, H.; ALLEN, L. H.; UAUY, R. Folate, vitamin B12 and human health. **Rev. Med. Chil.**, n. 140, p. 1464-1475, 2012.

BROWN, A. A.; HU, F. B. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, n. 73, p. 673-686, 2001.

CHAMBERS, J. C.; UELAND, P. M.; OBEID, O. A.; WRIGLEY, J.; REFSUM, H.; KOONER, J. S. Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: An effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine. **Circulation.**, n. 102 p. 2479-2483, 2000.

CHEN, K. J.; SHAW, N. S.; PAN, W. H.; LIN, B. F. Evaluation of folate status by serum and erythrocyte folate levels and dietary folate intake in Taiwanese schoolchildren. **Asia. Pac. J. Clin. Nutr.**, n. 16, p. 572-578, 2007.

CHEN, S.; WU, P.; ZHOU, L.; SHEN, Y.; LI, Y.; Song H. Relationship between increase of serum homocysteine caused by smoking and oxidative damage in elderly patients with cardiovascular disease. **Int. J. Clin. Exp. Med.**, n. 8, p. 4446-4454, 2015.

CUEVAS, A. M.; GERMAIN, A. M. Diet and endothelial function. **Biol. Res.**, n. 37, p. 225-230, 2004.

CZECZOT, H. Folic acid in physiology and pathology. **Postepy. Hig. Med. Dosw.**, n. 62, p. 405-419, 2008.

DAL-ROS, S.; BRONNER, C.; SCHOTT, C.; KANE, M. O.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V. B.; CHATAIGNEAU, T. Angiotensin II-induced hypertension is associated with a selective inhibition of endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in the rat mesenteric artery. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, n. 328, p. 478-486, 2009.

DAVEL, A. P.; WENCESLAU, C. F.; AKAMINE, E. H.; XAVIER, F. E.; COUTO, G. K.; OLIVEIRA, H. T.; ROSSONI, L. V. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, n. 44, p. 920-932, 2011.

DELA PAZ, N. G.; D'AMORE, P. A. Arterial versus venous endothelial cells. **Cell. Tissue. Res.**, n. 335, p. 5-16, 2009.

DEVI, S.; KENNEDY, R. H.; JOSEPH, L.; SHEKHAWAT, N. S.; MELCHERT, R. B.; Joseph, J. Effect of long-term hyperhomocysteinemia on myocardial structure and function in hypertensive rats. **Cardiovasc. Pathol.**, n. 15, p. 75-82, 2006.

DHARMASHANKAR, K.; WIDLANSKY, M. E. Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. **Curr. Hypertens. Rep.**, n. 12, p. 448-55, 2010.

DIKALOV, S. I.; NAZAREWICZ, R. R. Angiotensin II-induced production of mitochondrial reactive oxygen species: potential mechanisms and relevance for cardiovascular disease. **Antioxid. Redox. Signal.**, n. 19, p. 1085-1094, 2013.

DING, K.; WANG, Y.; JIANG, W.; ZHANG, Y.; YIN, H.; FANG, Z. Granule-containing serum inhibits angiotensin II-induced proliferation, reactive oxygen species production, and inflammation in human mesangial cells via an NADPH oxidase 4-dependent pathway. **BMC. Complement. Altern. Med.**, n. 15, p. 81, 2015.

DORNAS, W. C.; SILVA, M. E. Animal models for the study of arterial hypertension. **J. Biosci.**, n. 36, p. 731-737, 2011.

DOSHI, S. N.; MCDOWELL, I. F.; MOAT, S. J.; LANG, D.; NEWCOMBE, R. G.; KREDAN, M. B.; LEWIS, M. J.; GOODFELLOW, J. Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, n. 21, p. 1196–1202, 2001.

EGAN, B. M.; ZHAO, Y. Different Definitions of Prevalent Hypertension Impact: The Clinical Epidemiology of Hypertension and Attainment of Healthy People Goals. **J. Clin. Hypertens. (Greenwich)**, n. 15, p. 154-161, 2013.

ENDEMANN, D. H.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial dysfunction. **J. Am. Soc. Nephrol.**, n. 15, p. 1983-1992, 2004.

FARBSTEIN, D.; KOZAK-BLICKSTEIN, A.; LEVY, A. P. Antioxidant vitamins and their use in preventing cardiovascular disease. **Molecules**, n. 15, p. 8098-8110, 2010.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, n. 93, p. 515-524, 1988.

FÖEX, P.; SEAR, J. W. Hypertension: pathophysiology and treatment. **Critical. Care. & Pain**, n. 4, p. 71-75, 2004.

FRANCO, M. C. P.; AKAMINE, H. E.; DIMARCO, G. S.; CASARINI, D. E.; FORTES, Z. B.; et al. NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in the intrauterine undernourished rats: involvement of the renin–angiotensin system. **Cardiovas. Res.**, n. 59, p. 767–775, 2003.

FRANCO, M. D. O. C.; AKAMINE, E. H.; APARECIDA DE OLIVEIRA, M.; FORTES, Z. B.; TOSTES, R. C.; CARVALHO, M. H.; NIGRO, D. Vitamins C and E improve endothelial dysfunction in intrauterine-undernourished rats by decreasing vascular superoxide anion concentration. **J. Cardiov. Pharmacol.**, n. 42, p. 211-217, 2003.

FRATONI, V.; BRANDI, M. L. B vitamins, homocysteine and bone health. **Nutrients**, n. 7, p. 2176-2192, 2015.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.**, n. 288, p. 373-376, 1980.

GANGULA, P. R.; DONG, Y. L.; AL-HENDY, A.; RICHARD-DAVIS, G.; MONTGOMERY-RICE, V.; HADDAD, G.; MILLIS, R.; NICHOLAS, S. B.; MOSEBERRY, D. Protective cardiovascular and renal actions of vitamin D and estrogen. **Front. Biosci. (Schol Ed).**, n. 5, p. 134-148, 2013.

GOMOLAK, J. R.; DIDION, S. P. Angiotensin II-induced endothelial dysfunction is temporally linked with increases in interleukin-6 and vascular macrophage accumulation. **Front. Physiol.**, n. 5, p. 396, 2014.

GONZÁLEZ, J.; VALLS, N.; BRITO, R.; RODRIGO, R. Essential hypertension and oxidative stress: **New. insights. World. J. Cardiol.**, n. 6, p. 353-366, 2014.

GOODFELLOW, J.; BELLAMY, M. F.; GORMAN, S. T.; BROWNLEE, M.; RAMSEY, M. W; et al. Endothelial function is impaired in fit young adults of low birth weight. **Cardiovas. Res.**, n. 40, p. 600–606, 1998.

GUNTA, S. S.; THADHANI, R. I.; MAK, R. H. The effect of vitamin D status on risk factors for cardiovascular disease. **Nat. Rev. Nephrol.**, n. 9, p. 337-347, 2013.

HARA, A.; SASAZUKI, S.; INOUE, M.; SHIMAZU, T.; IWASAKI, M.; SAWADA, N.; YAMAJI, T.; ISHIHARA, J.; ISO, H.; TSUGANE, S. Use of vitamin supplements and risk of total cancer and cardiovascular disease among the Japanese general population: a population-based survey. **BMC. Public. Health.**, n. 11, p. 540, 2011.

HELBING, T.; OLIVIER, C.; BODE, C.; MOSER, M.; DIEHL, P. Role of microparticles in endothelial dysfunction and arterial hypertension. **World. J. Cardiol.**, n. 6, p. 1135-1139, 2014.

HERNANZ, R.; BRIONES, A. M.; SALAICES, M.; ALONSO, M. J. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. **Clin. Sci. (Lond).**, n. 126, p. 111-121, 2014.

HERNANZ, R.; MARTÍN, Á.; PÉREZ-GIRÓN, J. V.; PALACIOS, R.; BRIONES, A. M.; MIGUEL, M.; SALAICES, M.; ALONSO, M. J. Pioglitazone treatment increases COX-2-derived prostacyclin production and reduces oxidative stress in hypertensive rats: role in vascular function. **Br. J. Pharmacol.**, n. 166, p. 1303-19, 2012.

HIGASHI, Y.; NOMA, K.; YOSHIZUMI, M.; KIHARA, Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. **Circ. J.**, n. 73, p. 411-418, 2009.

HONG, W. K.; SHIM, K. Y.; BAIK, S. K.; KIM, M. Y.; CHO, M. Y.; JANG, Y. O.; PARK, Y. S.; HAN, J.; KIM, G.; CHO, Y. Z.; HWANG, H. W.; LEE, J. H.; CHAE, M. H.; KWON, S. O. Relationship between tetrahydrobiopterin and portal hypertension in patients with chronic liver disease. **J. Korean. Med. Sci.**, n. 29, p. 392-399, 2014.

HOUSTON, H. The role of nutrition and nutraceutical supplements in the treatment of hypertension. **World. J. Cardiol.**, n. 6, p. 38-66, 2014.

- HRON, G.; LOMBARDI, R.; EICHINGER, S.; LECCHI, A.; KYRLE, P. A.; CATTANEO, M. Low vitamin B6 levels and the risk of recurrent venous thromboembolism. **Haematologica**, n. 92, p. 1250-1253, 2007.
- HSU, H. C.; CHIOU, J. F.; WANG, Y. H.; CHEN, C. H.; MAU, S. Y.; HO, C. T.; CHANG, P. J.; LIU, T. Z.; CHEN, C. H. Folate deficiency triggers an oxidative-nitrosative stress-mediated apoptotic cell death and impedes insulin biosynthesis in RINm5F pancreatic islet β -cells: relevant to the pathogenesis of diabetes. **PLoS. One**, n. 8, p. e77931, 2013.
- HYNDMAN, M. E.; VERMA, S.; ROSENFELD, R. J.; ANDERSON, T. J.; PARSONS, H. G. Interaction of 5-methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin on endothelial function. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, n. 282, p. H2167-2172, 2002.
- ISHIKAWA, M.; SEKIZUKA, E.; YAMAGUCHI, N.; NAKADATE, H.; TERAOKA, S.; GRANGER, D. N.; MINAMITANI, H. Angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to platelet-leukocyte-endothelial cell interactions in the cerebral microvasculature. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, n. 292, p. H2306-2315, 2007.
- JOSEPH, J.; WASHINGTON, A.; JOSEPH, L.; KOEHLER, L.; FINK, L. M.; HAUSER-JENSEN, M.; KENNEDY, R. H. Hyperhomocysteinemia leads to adverse cardiac remodeling in hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, n. 283, p. H2567-2574, 2002.
- JUAN, X.; MING, F.; JUN, A.; YONG, K.; LIANG, Y.; FENG, D. Clonidine, moxonidine, folic acid, and mecobalamin improve baroreflex function in stroke-prone, spontaneously hypertensive rats. **Acta. Pharmacol. Sin.**, n. 28, p. 1550-1558, 2007.
- KEMPNA, P.; REITER, E.; AROCK, M.; AZZI, A.; ZINGG, J. M.; Inhibition of HMC-1 mast cell proliferation by vitamin E: involvement of the protein kinase B pathway. **J. Biol. Chem.**, n. 279, p. 50700-50709, 2004.
- KIENREICH, K.; TOMASCHITZ, A.; VERHEYEN, N.; PIEBER, T.; GAKSCH, M.; GRÜBLER, M. R.; PILZ, S. Vitamin D and cardiovascular disease. **Nutrients**, n. 5, p. 3005-3021, 2013.
- KOLLING, J.; SCHERER, E.; CUNHA, A.; CUNHA, M.; WYSE, A. Homocysteine Induces Oxidative-Nitrative Stress in Heart of Rats: Prevention by Folic Acid. **Cardiovasc. Toxicol.**, n. 11, p. 67-73, 2011.
- KONDZIELLA, D.; ZETTERBERG, H.; HAUGEN, E.; FU, M. Hypertension in spontaneously hypertensive rats occurs despite low plasma levels of homocysteine. **Physiol. Res.**, n. 57, p. 487-490, 2008.
- LEE, M. Y.; GRIENDLING, K. K. Redox signaling, vascular function, and hypertension. **Antioxid. Redox. Signal.**, n. 10, p. 1045-1059, 2008.
- LEONG, X. F.; NG, C. Y.; JAARIN, K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. **Biomed. Res. Int.**, n. 2015, p. 528757, 2015.
- LEUNG, K. Y.; DE CASTRO, S. C.; CABREIRO, F.; GUSTAVSSON, P.; COPP, A. J.; GREENE, N. D. Folate metabolite profiling of different cell types and embryos

suggests variation in folate one-carbon metabolism, including developmental changes in human embryonic brain. **Mol. Cell. Biochem.**, n. 378, p. 229-236, 2013.

LEVY, A. S.; CHUNG, J. C.; KROETSCH, J. T.; RUSH, J. W. Nitric oxide and coronary vascular endothelium adaptations in hypertension. **Vasc. Health. Risk. Manag.**, n. 5, p. 1075-1087, 2009.

LIU, Y.; LIU, Y. Q.; MORITA, T.; SUGIYAMA, K. Effects of betaine supplementation and choline deficiency on folate deficiency-induced hyperhomocysteinemia in rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)**, n. 58, p. 69-77, 2012.

LIU, Z. M.; WOO, J.; WU, S. H.; HO, S. C. The role of vitamin D in blood pressure, endothelial and renal function in postmenopausal women. **Nutrients**, n. 5, p. 2590-2610, 2013.

LIU, Z. M.; WOO, J.; WU, S. H.; HO, S. C. The role of vitamin D in blood pressure, endothelial and renal function in postmenopausal women. **Nutrients**, n. 5, p. 2590-2610, 2013.

MAHALLE, N.; KULKARNI, M. V.; GARG, M. K.; NAIK, S. S. Vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia as correlates of cardiovascular risk factors in Indian subjects with coronary artery disease. **J. Cardiol.**, n. 61, p. 289-294, 2013.

MAIA, A. R.; BATISTA, T. M.; VICTORIO, J. A.; CLERICI, S. P.; DELBIN, M. A.; CARNEIRO, E. M.; DAVEL, A. P. Taurine supplementation reduces blood pressure and prevents endothelial dysfunction and oxidative stress in post-weaning protein-restricted rats. **PLoS. One**, n. 9, p. e105851, 2014.

MAJESKY, M. W.; DONG, X. R.; HOGLUND, V.; MAHONEY, W. M. J. R.; DAUM, G. The adventitia: a dynamic interface containing resident progenitor cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, n. 31, p. 1530-1539, 2011.

MARTINS, D.; MENG, Y. X.; TAREEN, N.; ARTAZA, J.; LEE, J. E.; FARODOLU, C.; GIBBONS, G.; NORRIS, K. The Effect of Short Term Vitamin D Supplementation on the Inflammatory and Oxidative Mediators of Arterial Stiffness. **Health. (Irvine Calif)**, n. 6, p. 1503-1511, 2014.

MCCABE, K. M.; BOOTH, S. L.; FU, X.; SHOBEIRI, N.; PANG, J. J.; ADAMS, M. A.; HOLDEN, R. M. Dietary vitamin K and therapeutic warfarin alter the susceptibility to vascular calcification in experimental chronic kidney disease. **Kidney. Int.**, n. 83, p. 835-844, 2013.

MENDES, R. H.; MOSTARDA, C.; CANDIDO, G. O.; MORAES-SILVA, I. C.; D'ALMEIDA, V.; BELLÓ-KLEIN, A.; IRIGOYEN, M. C.; RIGATTO, K. Moderate hyperhomocysteinemia provokes dysfunction of cardiovascular autonomic system and liver oxidative stress in rats. **Auton. Neurosci.**, n. 180, p. 43-7, 2014.

MIERZECKI, A.; KLODA, K.; JASTRZEBSKA, M.; CHELSTOWSKI, K.; HONCZARENKO, K.; WOJCIECHOWSKA, M.; NARUSZEWICZ, M. Is there an effect of folic acid supplementation on the coagulation factors and C-reactive protein concentrations in subjects with atherosclerosis risk factors? **Postepy. Hig. Med. Dosw. (online)**, n. 66, p. 696-701, 2012.

MOENS, A. L.; VRINTS, C. J.; CLAEYS, M. J.; TIMMERMANS, J. P.; CHAMPION, H. C.; KASS, D. A. Mechanisms and potential therapeutic targets for folic acid in cardiovascular disease. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, n. 294, p. H1971-1977, 2008.

MOMBOULI, J. V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, n. 31, p. 61-74, 1999.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A & VANE, J. R. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. **Lancet.**, n. 1, p. 18-20, 1977.

MOTIWALA, S.; WANG, T. Vitamin D and cardiovascular risk. **Curr. Hypertens. Rep.**, n. 14, p. 209-218, 2012.

NAGAI, M.; TERAOKA, S.; VITAL, S. A.; RODRIGUES, S. F.; YILMAZ, G.; GRANGER, D. N. Role of blood cell-associated angiotensin II type 1 receptors in the cerebral microvascular response to ischemic stroke during angiotensin-induced hypertension. **Exp. Transl. Stroke. Med.**, n. 3, p. 15, 2011.

NAJAFPOUR BOUSHEHRI, S.; YUSOF, R. M.; NASIR MOHAMMAD TAIB, M.; MIRZAEI, K.; YAZDEKHAHI, N.; AKBARZADEH, S. Effect of vitamin supplementation on serum oxidized low-density lipoprotein levels in male subjects with cardiovascular disease risk factors. **Iran. J. Basic. Med. Sci.**, n. 15, p. 958-964, 2012.

NUTTER, D. O.; MURRAY, T. G.; HEYMSFIELD, S. B. The effect of chronic protein-calorie undernutrition in the rat on myocardial function and cardiac function. **Circ. Res.**, n. 45, p. 151-161, 1979.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Circ. J.**, n. 27, p. 282-293, 1963.

OPARIL, S.; ZAMAN, A.; CALHOUN, D. A. **Pathogenesis. of. Hypertension.**, n. 139, p. 761-776, 2003.

PACKER, L.; WEBER, S. U.; RIMBACH, G. Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. **J. Nutr.**, n. 131, p. 369S-373S, 2001.

PALATINI, P.; CASIGLIA, E.; GAŚOWSKI, J.; GŁUSZEK, J.; JANKOWSKI, P.; NARKIEWICZ, K.; SALADINI, F.; STOLARZ-SKRZYPEK, K.; TIKHONOFF, V.; VAN BORTEL, L.; WOJCIECHOWSKA, W.; KAWECKA-JASZCZ, K. Arterial stiffness, central hemodynamics, and cardiovascular risk in hypertension. **Vasc. Health. Risk. Manag.**, n. 7, p. 725-39, 2011.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.**, n. 327, p. 524-526, 1987.

PINTÉROVÁ, M.; KUNEŠ, J.; ZICHA, J. Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. **Physiol. Res.**, n. 60, p. 381-402, 2011.

PISSAIA, O.; ROSSI, M. A.; OLIVEIRA, J. S. The heart in protein-calorie malnutrition in rats: morphological, electrophysiological and biochemical changes. **J. Nutr.**, n. 110, p. 2035-2044, 1980.

PRAVENEC, M.; KOZICH, V.; KRIJT, J.; SOKOLOVÁ, J.; ZÍDEK, V.; LANDA, V.; SIMÁKOVÁ, M.; MLEJNEK, P.; SILHAVY, J.; OLIYARNYK, O.; KAZDOVÁ, L.; KURTZ, T. W. Folate deficiency is associated with oxidative stress, increased blood pressure, and insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Hypertens.**, n. 26, p. 135-140, 2013.

PRAVENEC, M.; KOZICH, V.; KRIJT, J.; SOKOLOVÁ, J.; ZÍDEK, V.; LANDA, V.; SIMÁKOVÁ, M.; MLEJNEK, P.; SILHAVY, J.; OLIYARNYK, O.; KAZDOVÁ, L.; KURTZ, T. W. Folate deficiency is associated with oxidative stress, increased blood pressure, and insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Hypertens.**, n. 26, p. 134-140, 2013.

QIPSHIDZE, N.; METREVELI, N.; LOMINADZE, D.; TYAGI, S. C. Folic acid improves acetylcholine-induced vasoconstriction of coronary vessels isolated from hyperhomocysteinemic mice: an implication to coronary vasospasm. **J. Cell. Physiol.**, n. 226, p. 2712-2720, 2011.

RACEK, J.; RUSNÁKOVÁ, H.; TREFIL, L.; SIALA, K. K. The influence of folate and antioxidants on homocysteine levels and oxidative stress in patients with hyperlipidemia and hyperhomocysteinemia. **Physiol. Res.**, n. 54, p. 87-95, 2005.

RADENKOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; POTPARA, T.; PROSTRAN, M. Therapeutic approach in the improvement of endothelial dysfunction: the current state of the art. **Biomed. Res. Int.**, n. 2013, p. 1-12, 2013.

RAMOS-ALVES, F. E.; DE QUEIROZ, D. B.; SANTOS-ROCHA, J.; DUARTE, G. P.; XAVIER, F. E. Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. **Br. J. Pharmacol.**, n. 166, p. 2198-208, 2012.

RECKELHOFF, J. F.; ZHANG, H.; SRIVASTAVA, K. Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. **Hypertension.**, n. 35, p. 480-483, 2000.

REDON, J.; CIFKOVA, R.; LAURENT, S.; NILSSON, P.; NARKIEWICZ, K.; ERDINE, S.; MANCIA, G. Mechanisms of hypertension in the cardiometabolic syndrome. **J. Hypertens.**, n. 27, p. 441-51, 2009.

RISLER, N. R.; CRUZADO, M. C.; MIATELLO, R. M. Vascular Remodeling in Experimental Hypertension. **Scientific. World. Journal.**, n. 5, p. 959-71, 2005.

ROE, N. D.; HE, E. Y.; WU, Z.; REN, J. Folic acid reverses nitric oxide synthase uncoupling and prevents cardiac dysfunction in insulin resistance: Role of Ca²⁺/calmodulin-activated protein kinase II. **Free. Radic. Biol. Med.**, n. 65, p. 234-243, 2013.

SAFAR, M. E.; LONDON, G. M.; ASMAR, R.; FROHLICH, E. D. Recent advances on large arteries in hypertension. **Hypertension.**, n. 32, p. 156-161, 1998.

SANJOAQUIN, M. A.; ALLEN, N.; COUTO, E.; RODDAM, A. W.; KEY, T. J. Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. **Int. J. Cancer.**, n. 113, p. 825-828, 2005.

SCHIFFRIN, E. L. Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment. **Hypertension**, n. 59, p. 367-374, 2012.

SOWERS, J. R. Insulin resistance and hypertension. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, n. 286, p. H1597-1602, 2004.

STANGER, O.; SEMMELROCK, H. J.; WONISCH, W.; BÖS, U.; PABST, E., WASCHER, T. C. Effects of folate treatment and homocysteine lowering on resistance vessel reactivity in atherosclerotic subjects. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, n. 303, p. 158-162, 2002.

STEED, M. M.; TYAGI, S. C. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. **Antioxid. Redox. Signal.**, n. 15, p. 1927-1943, 2011.

STROES, E. S.; VAN FAASSEN, E. E.; YO, M.; MARTASEK, P.; BOER, P.; GOVERS, R.; RABELINK, T. J. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. **Circ. Res.**, n. 86, p. 1129-1134, 2000.

SUNANO, S.; SEKIGUCHI, F. Endothelium-derived factors in hypertensive blood vessels, especially nitric oxide and hypertension. **Yakugaku. Zasshi.**, n. 123, p. 495-515, 2003.

SYMONS, J. D.; MULLICK, A. E.; ENSUNSA, J. L.; MA, A. A.; RUTLEDGE, J. C. Hyperhomocysteinemia evoked by folate depletion: effects on coronary and carotid arterial function. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, n. 22, p. 772-80, 2002.

TADDEI, S. & VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to endothelin in the rat aorta are mediated by thromboxane A₂. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, n. 22, p. 328-331, 1993.

TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SUDANO, I.; SALVETTI, A. Endothelial dysfunction in hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, n. 38, p. S11-14, 2001.

TAKITANI, K.; INOUE, K.; KOH, M.; MIYAZAKI, H.; KISHI, K.; INOUE, A.; TAMAI, H. A-tocopherol status and altered expression of α -tocopherol-related proteins in streptozotocin-induced type 1 diabetes in rat models. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, n. 60, p. 380-6, 2014.

TAWAKOL, A.; MIGRINO, R. Q.; AZIZ, K. S.; WAITKOWSKA, J.; HOLMVANG, G.; ALPERT, N. M.; MULLER, J. E.; FISCHMAN, A. J.; GEWIRTZ, H. High-dose folic acid acutely improves coronary vasodilator function in patients with coronary artery disease. **J. Am. Coll. Cardiol.**, n. 45, p. 1580-1584, 2005.

TAYEBATI, S. K.; TOMASSONI, D.; AMENTA, F. Spontaneously hypertensive rat as a model of vascular brain disorder: microanatomy, neurochemistry and behavior. **J. Neurosci.**, n. 322, p. 241-9, 2012.

TAYLOR, C. A.; HUMPHREY, J. D. Open Problems in Computational Vascular Biomechanics: Hemodynamics and Arterial Wall Mechanics. **Comput. Methods. Appl. Mech. Eng.**, n. 198, p. 3514-3523, 2009.

TAYLOR, S. G.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. **Trends. Pharmacol. Sci.**, n. 9, p. 272-4, 1988.

TIAN, X. Y.; WONG, W. T.; LEUNG, F. P.; ZHANG, Y.; WANG, Y. X.; LEE, H. K.; NG, C. F.; CHEN, Z. Y.; YAO, X.; AU, C. L.; LAU, C. W.; VANHOUTTE, P. M.; COOKE, J. P.; HUANG, Y. Oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2-derived prostaglandin f(2 α) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats. **Antioxid. Redox. Signal.**, n. 16, p. 363-373, 2012.

TORRENS, C.; BRAWLEY, L.; ANTHONY, F. W.; DANCE, C. S.; DUNN, R.; JACKSON, A. A.; POSTON, L.; HANSON, M. A. Folate supplementation during pregnancy improves offspring cardiovascular dysfunction induced by protein restriction. **Hypertension.**, n. 47, p. 982-987, 2006.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, n. 37, p. 1263-1273, 2004.

ULKER, S.; MCKEOWN, P. P.; BAYRAKTUTAN, U. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. **Hypertension.**, n. 41, p. 534-539, 2003.

UNGER, B. S.; PATIL, B. M. Apocynin improves endothelial function and prevents the development of hypertension in fructose fed rat. **Indian. J. Pharmacol.**, n. 41, p. 208-212, 2009.

VALDÉS-RAMOS, R.; GUADARRAMA-LÓPEZ, A. L.; MARTÍNEZ-CARRILLO, B. E.; BENÍTEZ-ARCINIEGA, A. D. Vitamins and type 2 diabetes mellitus. **Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug. Targets.**, n. 15, p. 54-63, 2015.

VAN VARIK, B. J.; RENNENBERG, R. J.; REUTELINGSPERGER, C. P.; KROON, A. A.; DE LEEUW, P. W.; SCHURGERS, L. J. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. **Front. Genet.**, n. 3, p. 290, 2012.

VASDEV, S.; STUCKLESS, J.; RICHARDSON, V. Role of the Immune System in Hypertension: Modulation by Dietary Antioxidants. **Int. J. Angiol.**, n. 20, p. 189-212, 2011.

VERHAAR, M. C.; STROES, E.; RABELINK, T. J. Folates and cardiovascular disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 22, p. 6-13, 2002.

VISENTIN, M.; DIOP-BOVE, N.; ZHAO, R.; GOLDMAN, I. D. The intestinal absorption of folates. **Annu. Rev. Physiol.**, n. 76, p. 251-274, 2014.

WANG, X.; CUI, L.; JOSEPH, J.; JIANG, B.; PIMENTAL, D.; HANDY, D.; LIAO, R.; LOSCALZO, J. Homocysteine Induces Cardiomyocyte Dysfunction and Apoptosis through p38 MAPK-Mediated Increase in Oxidant Stress. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, n. 52, p. 753-760, 2012.

WERNIMONT, S. M.; CLARK, A. G.; STOVER, P. J.; WELLS, M. T.; LITONJUA, A. A.; WEISS, S. T.; GAZIANO, J. M.; TUCKER, K. L.; BACCARELLI, A.; SCHWARTZ, J.; BOLLATI, V.; CASSANO, P. A. Folate network genetic variation, plasma homocysteine, and global genomic methylation content: a genetic association study. **BMC. Med. Genet.**, n. 12, p.150, 2011.

WHITSETT, J.; RANGEL FILHO, A.; SETHUMADHAVAN, S.; CELINSKA, J.; WIDLANSKY, M.; VASQUEZ-VIVAR, J. Human endothelial dihydrofolate reductase

low activity limits vascular tetrahydrobiopterin recycling. **Free. Radic. Biol. Med.**, n. 63, p. 143-150, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). A global brief on hypertension. Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/, 2013. Accessed, April 12, 2015.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K. & MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature.**, n. 332, p. 411-415, 1988.

YANG, D.; FÉLÉTOU, M.; BOULANGER, C.; WU, H.; LEVENS, N.; ZHANG, J. & VANHOUTTE, P. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. **Br. J. Pharmacol.**, n. 136, p. 104-110, 2002.

YANG, Q.; XUE, H.; WONG, W.; TIAN, X.; HUANG, Y.; TSUI, S.; NG, P.; WOHLFART, P.; LI, H.; XIA, N.; TOBIAS, S.; UNDERWOOD, M.; HE, G. AVE3085, an enhancer of endothelial nitric oxide synthase, restores endothelial function and reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology.**, n. 163, p. 1078–1085, 2011.

YI, X.; ZHOU, Y.; JIANG, D.; LI, X.; GUO, Y.; JIANG, X. Efficacy of folic acid supplementation on endothelial function and plasma homocysteine concentration in coronary artery disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Exp Ther Med.**, n. 7, p. 1100-1110, 2014.

YILDIRIM, A.; KELEŞ, F.; ÖZDEMİR, G.; KOŞGER, P.; UÇAR, B.; ALATAŞ, Ö.; KILIÇ, Z. Homocysteine levels in normotensive children of hypertensive parents. **Anatol J Cardiol.**, n. 15, p. 000-000, 2015.

ZHANG, C.; WANG, Z. Y.; QIN, Y. Y.; YU, F. F.; ZHOU, Y. H. Association between B vitamins supplementation and risk of cardiovascular outcomes: a cumulative meta-analysis of randomized controlled trials. **PLoS One.**, n. 9, p. e107060, 2014.

ZHOU, M. S.; ADAM, A.G.; JAIMES, E. A. AND RAIJ, L. In salt-sensitive hypertension, increased superoxide production is linked to functional upregulation of angiotensin II. **Hypertension.**, n. 42, p. 945–951, 2003.

Artigo a ser submetido no periódico: *Experimental Physiology*

Folic acid supplementation improves endothelial function by reduced oxidative stress in spontaneously hypertensive rats

Geórgia A. Lima-Leal, Hicla S. Moreira, Fernanda E. Ramos-Alves, Gloria P. Duarte, Fabiano E. Xavier.

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

Corresponding author: Fabiano E. Xavier, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rêgo, Cidade Universitária, 50670-901, Recife Brazil. E-mail: fabianoxavier@ufpe.br, fabiano.exavier@gmail.com

Keywords: hypertension, endothelial dysfunction, spontaneously hypertensive rats, folic acid.

Abstract

Folic acid (FA) supplementation seems to have benefits to cardiovascular system, due to ability to reduced blood homocysteine (Hyc) levels and by its antioxidant properties. The present study was designed to evaluate the effect of FA supplementation on vascular function (contractile and relaxation mechanisms) of spontaneously hypertensive rats (SHR) and the possible mechanisms involved. Four-month-old male SHR received daily supplementation of FA during 2 months at the dose of 8 mg.kg⁻¹ by gavage; SHR untreated received vehicle. Blood pressure (BP) was measured in conscious rats. Aorta and mesenteric resistance arteries (MRA) were used to evaluate the phenylephrine- and noradrenaline-induced contraction, respectively, and relaxation to acetylcholine and sodium nitroprusside (SNP). BP was similar in both FA-treated and untreated animals. Relaxation to acetylcholine, but no to SNP, was increased in aorta and MRA from FA-treated than untreated group. In these arteries, contractility to alpha-adrenoceptor activation was decreased in FA-treated SHR compared to untreated SHR. Incubation of arteries with tempol or apocynin increased relaxation to acetylcholine and decreased contractility to phenylephrine or noradrenaline in untreated SHR but not in FA-treated SHR. Blood Hyc levels were similar in both groups. The present study suggests that folic acid supplementation improve vascular function in SHR, independently to its Hyc-lowering effect. From this perspective, folic acid appears to increase vasodilator factors release possibly through mechanisms involving reduced oxidative stress.

Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are considered a big worldwide health problem. The World Health Organization (WHO) estimates that about 17.5 million people died from CVD in 2012, representing 31% of all global deaths (WHO). Of these deaths, an estimated 7.4 million were due to coronary heart disease and 6.7 million were due to stroke (WHO). High blood pressure is an important risk factor for coronary heart disease and the single most important risk factor for stroke (WHO). It is responsible for about 50% of ischaemic strokes and increases the risk of hemorrhagic stroke. The pathogenesis of hypertension has been extensively studied over the decades, but its etiology is not fully known.

Hypertension has a complex association with endothelial dysfunction, a phenotypical alteration of the vascular endothelium that is characterized by pro-thrombotic, pro-inflammatory and pro-constrictive events (Widlansky *et al.*, 2003, Davel *et al.*, 2010). Enhanced vascular oxidative stress and inflammation play a central role on endothelial dysfunction in hypertension, and inhibitions in both have been shown to reverse endothelial dysfunction (Xavier *et al.*, 2008; Dinh *et al.*, 2014). These processes result in decreased nitric oxide (NO) bioavailability that impairs the balance of the endothelium-dependent bioactive factors, playing an essential role in the pathogenesis of endothelial dysfunction (Dinh *et al.*, 2014). Spontaneously hypertensive rats (SHR) are used as the chosen model in research that intend better understand the mechanisms involved in the human essential hypertension. This model has endothelial dysfunction in both conductance and resistance vessels, related to ROS-induced decrease in NO bioavailability (Davel *et al.*, 2010)

In recent decades it has been established that certain vitamins, such as vitamin C, D and E, have powerful antioxidant effect, which may endorse their use in some diseases where the generation of free radicals is increased, such as hypertension (Houston, 2013; Afolayan & Wintola, 2014). It is further discussed about possible antioxidant properties of vitamin B9, also called folate or folic acid (Nakano *et al.*, 2001; Gore & Munzel, 2011). Folic acid has been shown to reduce superoxide generation (Nakano *et al.*, 2011) and improves nitric oxide bioavailability by preventing superoxide anion production through uncoupling of nitric oxide synthase (Antoniades *et al.*, 2006). Furthermore, beneficial effects of folic acid on vasculature have been also attributed to its ability to decrease homocysteine (Hcy) plasmatic levels (Stanger *et al.*, 2002). High Hcy levels are associated with increased risk for vascular disease (Stanger & Weger, 2003). The mechanism involved on Hcy-induced vascular injury include: DNA dysfunction, increased oxidative stress, endothelial damage and reduced glutathione peroxidase activity (Cheng *et al.*, 2009).

Based on these evidences present work was designed to evaluate the effect of folic acid supplementation on vascular function (contractile and relaxation mechanisms) of SHR and the possible mechanisms involved.

Methods

Animals

All procedures used in this study conforms with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised 1996) and were approved by the Ethics Committee of the *Centro de Ciências Biológicas* from the *Universidade Federal de Pernambuco*. Spontaneously hypertensive rats (SHR) were obtained from colonies maintained at the Animal Quarters of the *Departamento de Fisiologia e Farmacologia* of the *Universidade Federal de Pernambuco*. Rats were housed at a constant room temperature humidity and a light cycle (12:12 h light-dark), with free access feed and tap water.

Four-month-old male SHR were divided in two groups: 1) Control SHR and (N= 6-8) 2). Folic acid (FA)-treated SHR (N= 6-8). FA was administered at 8 mg.kg.day⁻¹ by gavage for 2 months.

Arterial blood pressure measurement in conscious rats

Rats were anesthetized with ketamine, xylazine, and acetopromazin mixture (64.9, 3.2, and 0.78 mgkg⁻¹, respectively, i.p.) and allowed to breathe room air spontaneously. The right carotid artery was cannulated with a polyethylene catheter (PE-50 with heparinized saline) that was exteriorized in the midscapular region. After 24h, arterial pressure and heart rate were measured in conscious animals by a pressure transducer (model MLT844, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) and recorded using an interface

and software for computer data acquisition (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia). Heart rate was determined from the intra-beat intervals.

Vascular Reactivity Study

Vessel preparation

Rats were anesthetized with ketamine, xylazine and acetopromazin mixture (64.9; 3.2 and 0.78 mg.Kg⁻¹, respectively, i.p.) and killed by exsanguination. The thoracic aorta and the mesenteric vascular bed were carefully removed and placed in cold oxygenated Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (KHB). The buffer consisted of (in mM): NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO₃ 25; CaCl₂.2H₂O 2.5, glucose 11, KH₂PO₄ 1.2, 1.2 and EDTA MgSO₄.7H₂O 0.01). Aortic segments (3mm in length) were mounted between two steel hooks in isolated tissue chambers containing 5 ml of gassed (95% O₂ and 5% CO₂) KHB, at pH 7.4 and 37°C. Aortic segments were subjected to a resting tension of 1 g, which was readjusted every 15 min during 45 min of stabilization. The isometric tension was recorded by using an isometric force displacement transducer (Leticia Scientific Instruments, TRI-210, Panlab, S.L., Barcelona, Spain) connected to a data acquisition system (Powerlab, ADInstruments, Bella Vista, Australia). For experiments in mesenteric resistance arteries (MRA), the third-order branch of the mesenteric arcade was dissected and cut into segments of approximately 2 mm in length. Segments of mesenteric resistance arteries were mounted in a small vessel chamber myograph (Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark) to measure isometric tension according to the method described by Mulvany & Halpern (1977).

Experimental protocols

Vessels were initially exposed twice to KCl (75 mmol/L in Aorta and 120 mmol/L in MRA) to check their functional integrity. Thirty minutes after, segments were contracted with concentration of phenylephrine (aorta) or noradrenaline (MRA) inducing 50-70% of the contraction induced by KCl. Acetylcholine (0.1 nmol/L to 10 μ mol/L) or sodium nitroprusside (SNP, 1 nmol/L to 10 μ mol/L) was then added to assess endothelium-dependent and -independent relaxation, respectively. Sixty minutes after, cumulative concentration-response curves for phenylephrine or noradrenaline (0.1 nmol/L to 30 μ mol/L) were generated. Additionally, concentration-response curves to acetylcholine, phenylephrine and noradrenaline were performed in presence of the superoxide dismutase mimetic tempol (10 μ mol/L), the NADPH oxidase inhibitor apocynin (100 μ mol/L) or the nitric oxide synthase enzyme (NOS) inhibitor, L-NAME. All drugs were added 30 min before generating the concentration-response curve.

Measurement of plasma levels of homocysteine

The level of homocysteine was measured in the groups using immunoturbidimetry method (LabTest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). Blood samples were centrifuged for 10 minutes at 4500 r.p.m. and serum was stored at proper temperature of -80°C until the day of experiment. The results were expressed as μ mol/L.

Chemical compounds

Drugs used were phenylephrine hydrochloride, acetylcholine, sodium nitroprusside, apocynin, L-NAME and Tempol (Sigma, St. Louis, MO, USA). For experiments *in vitro*, stock solutions (10 mmol/L) of drugs were made in distilled water. These solutions were kept at -20°C , and appropriate dilutions were made on the day of the experiment.

Statistical analysis

Relaxation responses to acetylcholine and sodium nitroprusside were expressed as the percentage of relaxation of the maximum contractile response induced by phenylephrine or noradrenaline. Phenylephrine/ noradrenaline contractile responses were expressed as a percentage of the maximum response produced by KCl.

All values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) of the number of rats used in each experiment. Results were analyzed using Student's t-test or "two-way" ANOVA. When ANOVA showed a significant treatment effect, Bonferroni's *post hoc* test was used to compare individual means (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

In this study there were no significant differences in systolic or diastolic blood pressures and heart rate between folic acid (FA)-treated and untreated groups (Figure 1).

Vascular response to phenylephrine/noradrenaline and endothelium-dependent and -independent relaxations

KCl evoked similar contractions in aorta from folic acid (FA)-treated than untreated SHR (FA-treated: 2.20 ± 0.02 vs. untreated: 2.26 ± 0.14 g, $P > 0.05$). In mesenteric resistance arteries (MRA) response to KCl was also comparable in FA-treated and untreated SHR (FA-treated: 10.36 ± 0.20 vs. untreated: 11.00 ± 0.72 mN.mm⁻¹, $P > 0.05$).

Acetylcholine-induced relaxation was increased in both MRA and aorta from group receiving supplementation with FA (Figure 2A and B). In MRA and aorta from both groups, relaxation induced by sodium nitroprusside was comparable (Figure 2C and D). Supplementation with FA reduced noradrenaline (MRA) and phenylephrine (aorta) responses in arteries from SHR compared to untreated group ($R_{\max}$ to noradrenaline in MRA, Untreated SHR: 122 ± 9.37 vs. FA-treated SHR: 91.6 ± 2.48 %, $P < 0.05$; $R_{\max}$ to phenylephrine in aorta, Untreated SHR: 133 ± 5.12 vs. FA-treated SHR: 90.9 ± 5.06 %, $P < 0.05$). Preincubation with L-NAME resulted in left shift of the concentration-response curve to noradrenaline and phenylephrine in arteries from FA-treated and untreated SHR (Figure 3). This effect was greater in both MRA and aorta from FA-treated SHR (Figure 3).

Given these results we determined whether decreased ROS play a role in the vascular effects of supplementation with FA. As shown in Figure 4, superoxide mimetic tempol significantly increased acetylcholine-induced relaxation of MRA and aorta isolated from untreated SHR. Although in the absence of tempol, acetylcholine-induced relaxation were decreased in untreated SHR compared with FA-treated animals (Figure 1), in the presence of tempol, there was no significant difference in acetylcholine-induced relaxation in FA-treated and untreated SHR (MRA: $81.7 \pm 5.56\%$ vs. $91.0 \pm 0.99\%$; $P > 0.05$; Aorta: $50.5 \pm 5.63\%$ vs. $54.5 \pm 4.51\%$; $P > 0.05$, Figure 4). FA supplementation blocked the effect of tempol in arteries from SHR (Figure 4C and D). Similar findings were obtained with NADPH oxidase inhibitor apocynin (Figure 4).

As previously reported (Xavier *et al.*, 2008), preincubation with tempol decreased contractile responses to noradrenaline and phenylephrine in MRA and aorta, respectively, from untreated SHR (Figure 5A and B), while in segments from FA-treated group these responses remained unmodified (Figure 5C and D). Similar results were observed when arteries were pretreated with apocynin (Figure 5).

Homocysteine levels

Serum homocysteine levels were similar in folic acid-treated and untreated SHR (Figure 6).

Discussion

In the present study we have demonstrated functional evidences that oral supplementation of folic acid, although not modify the blood pressure, improves endothelial NO bioavailability and increased endothelial function in SHR, by inhibiting NADPH oxidase-dependent ROS generation. These effects were independent of its homocysteine (Hcy)-lowering effect.

Hyperhomocysteinemia is associated with a higher risk of cardiovascular disease (Moat *et al.*, 2004). In the vasculature, increased Hcy causes endothelial dysfunction by a mechanism involving ROS generation and possibly through reduction of antioxidant defenses (Hsu, 2013). Folic acid, through its active form, 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF), transfers a methyl group to Hcy to form methionine, reducing Hcy levels in blood (Aguilar *et al.*, 2004). Due to this effect, folic acid is counted as an important weapon against cardiovascular disease. A study by Kolling *et al.* (2011) showed that administration of Hcy in rats increased ROS generation and reduced antioxidant defenses. However, when administered together with Hcy, folic acid prevented the effects of this amino acid (Kolling *et al.*, 2011). In the current study, we demonstrated that supplementation with folic acid, although not modify the blood pressure, improved endothelium-dependent relaxation and reduced vasoconstrictor response to alpha-adrenoceptor activation in conductance and resistance arteries from SHR. However, folic acid supplementation failed to reduce Hcy levels in these rats. This indicates that the vascular protective effects of folic acid in SHR are independent of its ability to reduce plasma levels of homocysteine. Reinforcing this result, previous studies have failed to

demonstrate a benefit of lowering Hcy for cardiovascular disease (Børnaa *et al.*, 2006; Lonn *et al.*, 2006). Moreover, folic acid improved endothelial function independent of its Hcy-lowering effect in patients with coronary artery disease. (Shiriodaria *et al.*, 2007). Therefore, what is (are) the underlying mechanism (s) of vascular effect induced by folic acid in SHR?

Folic acid or its metabolite 5-MTHF has been shown to reduce superoxide production (Nakano *et al.*, 2001). To test whether reduced ROS generation would be involved in the vascular effects of folic acid in SHR, experiments were performed in presence of the membrane permeable superoxide mimetic tempol. In control SHR, preincubation with tempol increased relaxation to acetylcholine and decreased phenylephrine- and noradrenaline-induced contraction in aorta and mesenteric resistance arteries, respectively. This indicates a role for superoxide generation in the endothelial dysfunction in SHR, as previously reported (Miyagawa *et al.* 2007; Xavier *et al.*, 2008). Tempol did not affect relaxation or contraction responses of folic acid-supplemented SHR, implying that superoxide anions have undetectable effect on vascular reactivity in these groups. Our results also indicate that the reduced ROS generation in folic-acid supplemented SHR implies increased NO bioavailability, since in arteries from this group the increase in noradrenaline and phenylephrine responses induced by L-NAME was greater when compared to control SHR. Consistent with these studies, Moens *et al.* (2007) also observed antioxidant effects of folic acid in a model of coronary occlusion. A possible mechanism for the antioxidant effect of folic acid involves tetrahydrobiopterin stabilization and reduced superoxide generation via uncoupling of nitric oxide synthase (Moens *et al.*, 2007). Uncoupling eNOS has

also been reported in SHR (Li *et al.*, 2006) and its reversion could be involved in the protective vascular effects of folic acid in these rats. On the other hand, the active folic acid metabolite 5-MTHF can directly binds the pterin site in eNOS; and increase; this binding mimics the orientation and interactions of the tetrahydrobiopterin and prevents the exaggerated ROS production (Hyndman *et al.*, 2002).

ROS generation in SHR also involves NAD(P)H oxidase-mediated mechanisms (Touyz *et al.*, 2004). In addition, it has been demonstrated that folic acid supplementation was capable to inhibit NAD(P)H oxidase-mediated superoxide anion production (Hwang *et al.* 2011; Sarna *et al.*, 2012). To analyze the involvement of NAD(P)H oxidase pathway on vascular effects of folic acid in SHR, experiments were performed in presence of apocynin, a NAD(P)H oxidase inhibitor. As previously reported (Hamilton *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2008) apocynin improved endothelial function in SHR, evidenced by increased endothelium-dependent relaxation and decreased contractility in both aorta and mesenteric resistance arteries. In folic acid-supplemented SHR apocynin did not produce any significant changes in the relaxation to acetylcholine or in contractile responses to noradrenaline and phenylephrine. These findings suggest that in SHR folic acid decrease vascular ROS generation by a mechanism involving NAD(P)H oxidase inhibition.

Despite its protective vascular effects, folic acid supplementation was unable to reduce blood pressure in SHR. We can attribute this result to the fact that hypertension is a multifactor disease involving other mechanisms, such as humoral, renal and neural mechanism. In addition, folic acid is not considered an antihypertensive drug.

In summary, the present study suggests that folic acid supplementation improve vascular function in SHR. From this perspective, folic acid appears to increase vasodilator factors release possibly through mechanisms involving oxidative stress reduction. Thus, this vitamin seems to be promising as adjuvant therapy in preventing or retarding vascular damage in hypertension. However, more studies are needed to better understand the vascular mechanisms of folic acid in SHR.

Acknowledgements

Geórgia A. Lima-Leal and Hicla S. Moreira was supported by a master degree fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fernanda E. Ramos-Alves was supported by a doctoral degree fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Gloria P. Duarte and Fabiano E. Xavier are recipients of research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We are grateful to José Antonio de Albuquerque for his technical assistance.

Conflict of interest

None

References

Afolayan AJ, Wintola OA (2014). Dietary supplements in the management of hypertension and diabetes - a review. *Afr J Tradit Complement Altern Med* **11**, 248-258

Aguilar B, Rojas JC, Collados MT (2004). Metabolism of homocysteine and its relationship with cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis* **18**, 75-87

Alvarez Y, Briones AM, Hernanz R, Pérez-Girón JV, Alonso MJ, Salaices M (2008). Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol* **153**, 926-935.

Antoniades C, Shirodaria C, Warrick N, Cai S, de Bono J, Lee J, Leeson P, Neubauer S, Ratnatunga C, Pillai R, Refsum H, Channon KM (2006). 5-methyltetrahydrofolate rapidly improves endothelial function and decreases superoxide production in human vessels: effects on vascular tetrahydrobiopterin availability and endothelial nitric oxide synthase coupling. *Circulation* **114**, 1193-1201.

Børnaa KH, Njølstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E, Rasmussen K; NORVIT (2006). Trial Investigators.

Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* **354**, 1578-1588.

Cheng Z, Yang X, Wang H (2009). Hyperhomocysteinemia and Endothelial Dysfunction. *Curr Hypertens Rev* **5**, 158-165.

Davel AP, Wenceslau CF, Akamine EH, Xavier FE, Couto GK, Oliveira HT, Rossoni LV (2011). Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Braz J Med Biol Res*, **44**, 920-932.

Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S (2014). Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *Biomed Res Int* **2014**, 1-11.

Hamilton CA, Brosnan MJ, Al-Benna S, Berg G, Dominiczak AF. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension* **40**, 755-762.

Houston M (2013). Nutrition and nutraceutical supplements for the treatment of hypertension: part II. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **15**, 845-851.

Hsu HC, Chiou JF, Wang YH, Chen CH, Mau SY, Ho CT, Chang PJ, Liu TZ, Chen CH (2013). Folate deficiency triggers an oxidative-nitrosative stress-mediated apoptotic cell death and impedes insulin biosynthesis in RINm5F pancreatic islet β -cells: relevant to the pathogenesis of diabetes. *PLoS One* **8**, e77931.

Hyndman ME, Verma S, Rosenfeld RJ, Anderson TJ, Parsons HG (2002). Interaction of 5-methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin on endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, 2167-2172.

Hwang SY, Siow YL, Au-yeung KKW, House J, Karmin O (2011). Folic acid supplementation inhibits NADPH oxidase-mediated superoxide anion production in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **300**, 189-198.

Kolling J, Scherer EB, da Cunha AA, da Cunha MJ, Wyse AT (2011). Homocysteine induces oxidative-nitrate stress in heart of rats: prevention by folic acid. *Cardiovasc Toxicol* **11**, 67-73.

Li H1, Witte K, August M, Brausch I, Gödtel-Armbrust U, Habermeier A, Closs EI, Oelze M, Münzel T, Förstermann U. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase

expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol* **47**, 2536-2544.

Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest J Jr (2006). Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* **354**, 1567-1577.

Miyagawa K, Ohashi M, Yamashita S, Kojima M, Sato K, Ueda R, Dohi Y (2007). Increased oxidative stress impairs endothelial modulation of contractions in arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **25**, 415-421.

Moat SJ, Lang D, McDowell IF, Clarke ZL, Madhavan AK, Lewis MJ, Goodfellow J (2004). Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *J Nutr Biochem* **15**, 64-79.

Moens AL, Claeys MJ, Wuyts FL, Goovaerts I, Van Hertbruggen E, Wendelen LC, Van Hoof VO, Vrints CJ (2007). Effect of folic acid on endothelial function following acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* **99**, 476-481.

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* **41**, 19-26.

Nakano E, Higgins JA, Powers HJ (2001). Folate protects against oxidative modification of human LDL. *Br J Nutr* **86**, 637-639.

Sarna LK, Wu N, Wang P, Hwang SY, Siow YL, O K (2012). Folic acid supplementation attenuates high fat diet induced hepatic oxidative stress via regulation of NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol* **90**.155-165.

Shirodaria C, Antoniadou C, Lee J, Jackson CE, Robson MD, Francis JM, Moat SJ, Ratnatunga C, Pillai R, Refsum H, Neubauer S, Channon KM (2007). Global improvement of vascular function and redox state with low-dose folic acid: implications for folate therapy in patients with coronary artery disease. *Circulation* **115**, 2262–2270.

World Health Organization (WHO). Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. Mendis S, Puska P, Norrving B editors. Geneva: World Health Organization.

Touyz RM (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* **44**, 248-52.

Legends for figures

Figure 1. Systolic (A) and diastolic (B) blood pressure and heart rate (C) from control and folic acid (FA)-treated SHR. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. t test: $P>0.05$, $N=6$.

Figure 2. Endothelium-dependent and independent relaxation acetylcholine (A,B) and sodium nitroprussiate (SNP, C,D) in mesenteric resistance arteries (MRA) and aorta from folic-acid (FA)-treated and untreated SHR. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. $N=6-8$ rats in each group.

Figure 3. Effect of preincubation with L-NAME on the concentration-dependent vasoconstriction to noradrenaline (A,C) and phenylephrine (B,D) in mesenteric resistance arteries (MRA) and aorta from folic-acid (FA)-treated and untreated SHR. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. $N=6-8$ rats in each group.

Figure 4. Effect of tempol or apocycin on endothelium-dependent vasodilation to acetylcholine in mesenteric resistance arteries (MRA, A,C) and aorta (B,D) from folic-acid (FA)-treated and untreated SHR. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. $N=6-8$ rats in each group.

Figure 5. Effect of tempol or apocycin on contractile response to noradrenaline (A,C) and phenylephrine (B,D) in mesenteric resistance arteries (MRA, A,C) and aorta (B,D) from folic-acid (FA)-treated and untreated SHR. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. $N=6-8$ rats in each group.

Figure 6. Plasma homocysteine levels in folic acid (FA)-treated and untreated SHR. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N=5-6 rats in each group. Results were analyzed by *t*-test.

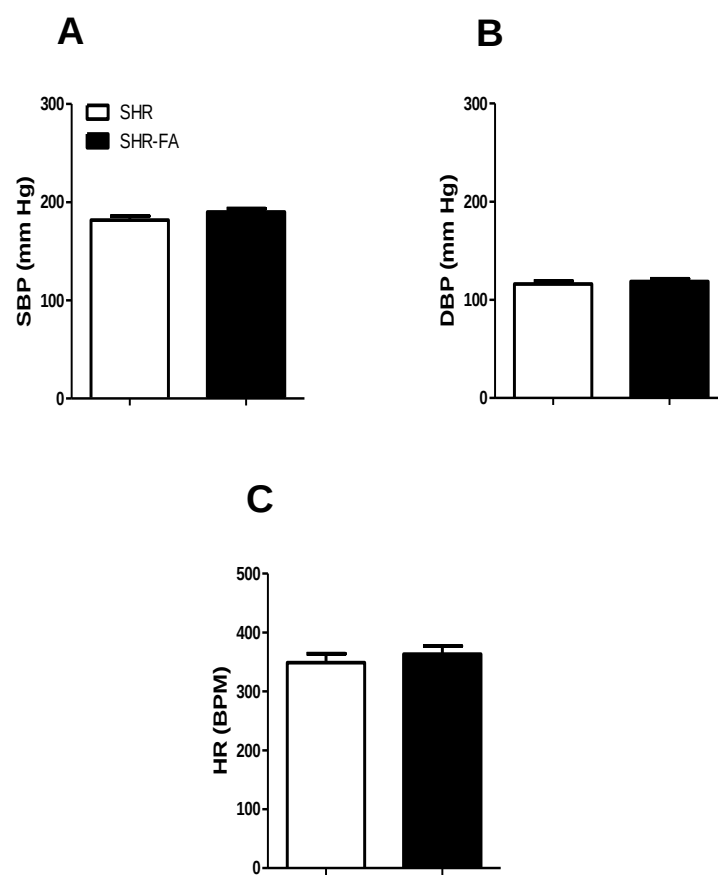
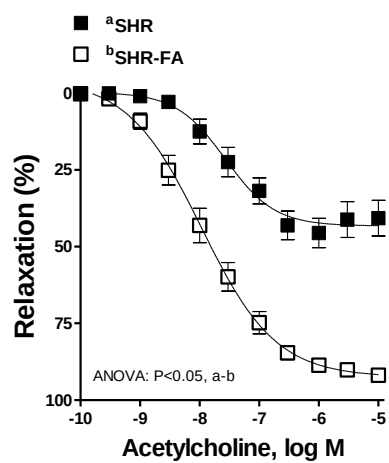
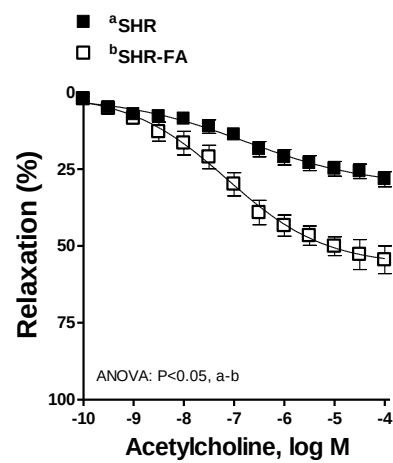
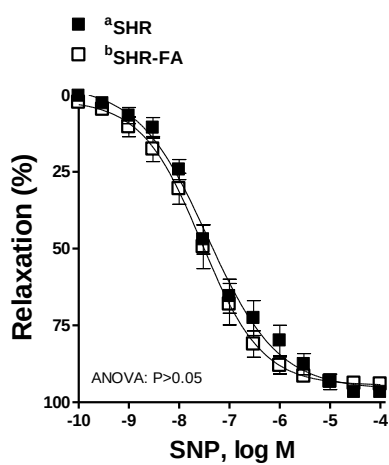
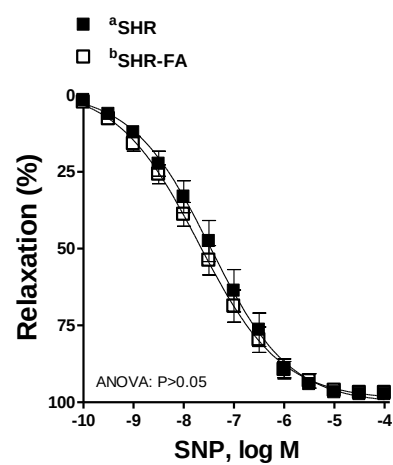
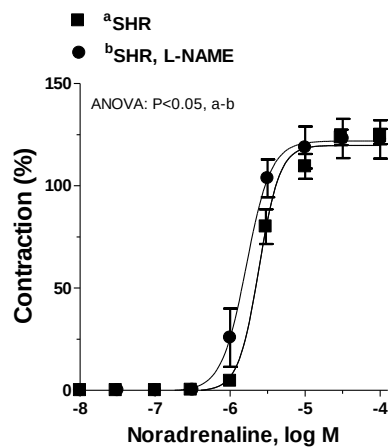
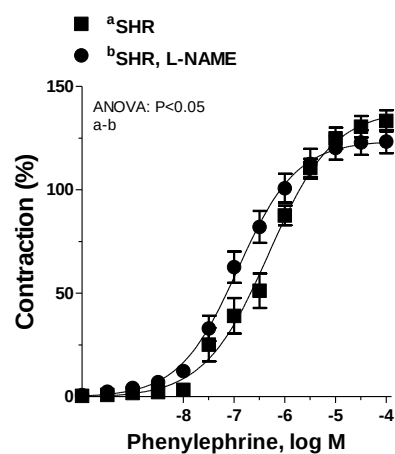
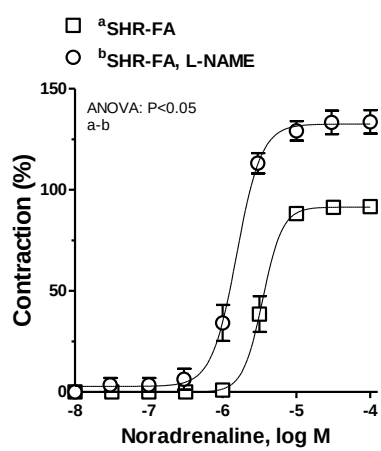
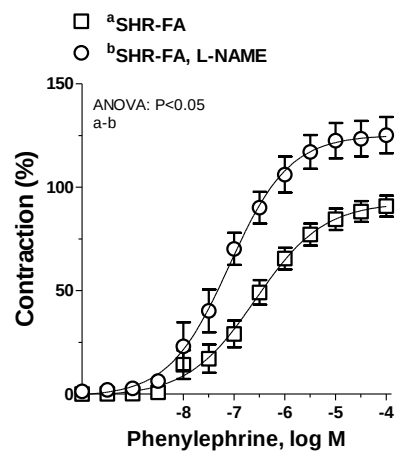
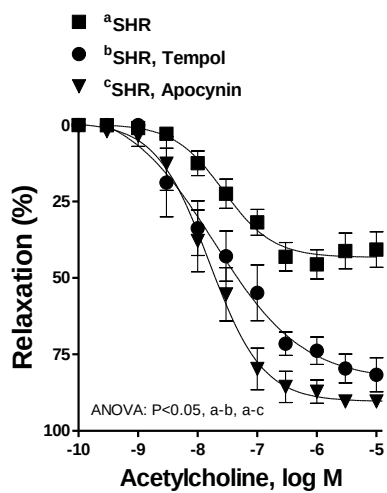


Figure 1

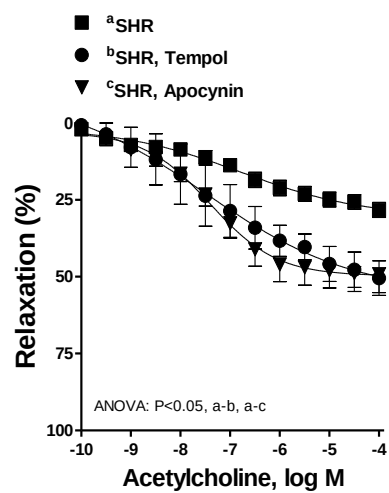
A- MRA**B-Aorta****C- MRA****D- Aorta****Figure 2**

A- MRA**B- Aorta****C- MRA****D- Aorta****Figure 3**

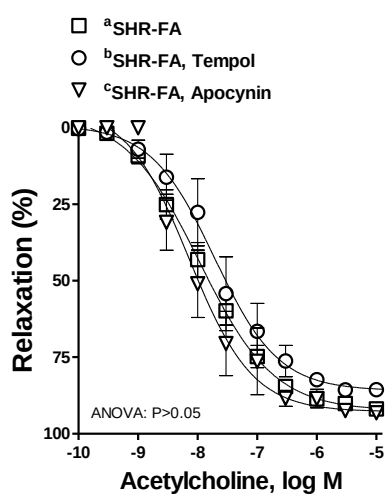
A- MRA



B- Aorta



C- MRA



D- Aorta

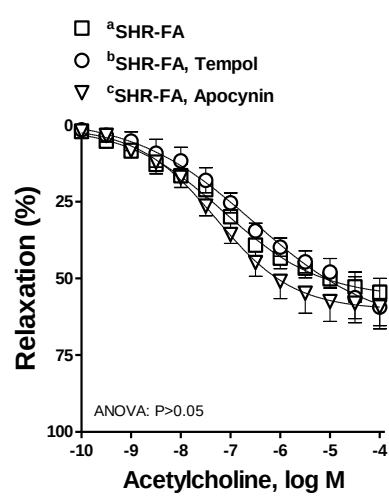
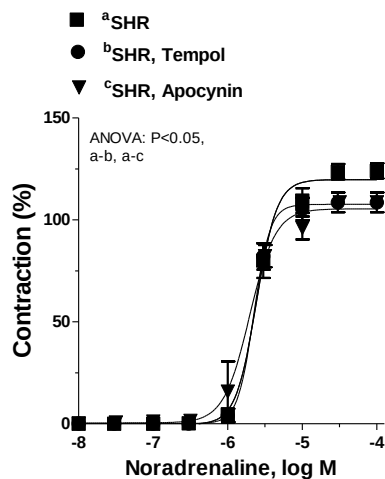
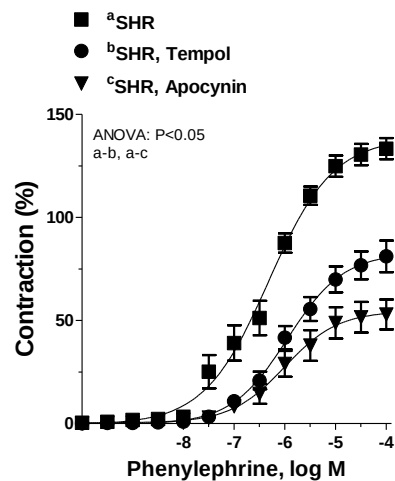


Figure 4

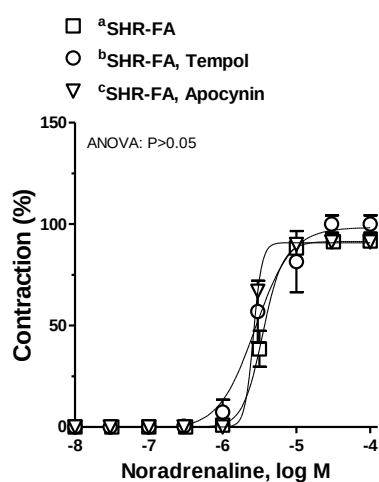
A- MRA



B- Aorta



C- MRA



D- Aorta

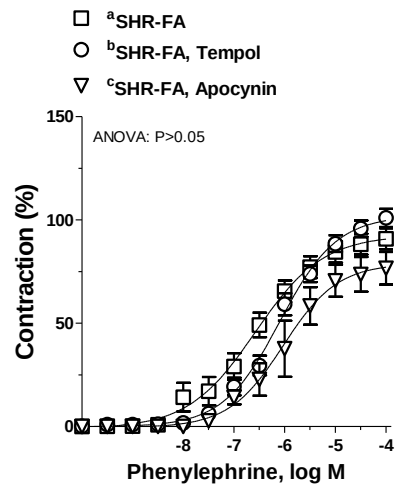


Figure 5

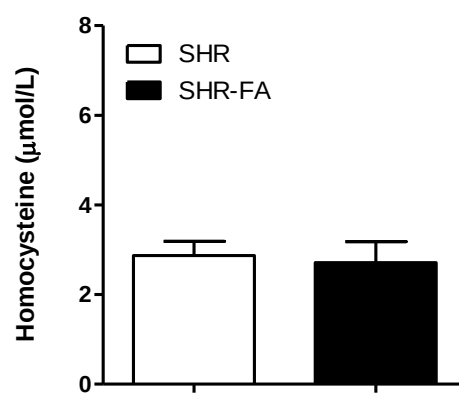


Figure 6

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente estudo demonstram que a suplementação crônica de ácido fólico é capaz de melhorar a função vascular em SHR. Essa melhora parece ser decorrente da redução do estresse oxidativo, devido a uma menor produção de espécies reativas de oxigênio e/ou uma maior atividade do sistema de defesa antioxidante desses animais. Nessa perspectiva, o nutriente parece aumentar a liberação de fatores vasorrelaxantes.