

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Eduardo Echer dos Reis

**INFLUÊNCIA DA INCUBAÇÃO *IN VITRO* COM EXTRATO DE *Pleurotus albidus* NO
ESTRESSE OXIDATIVO CARDIOVASCULAR E NA REATIVIDADE VASCULAR**

Porto Alegre

2019

Eduardo Echer dos Reis

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

INFLUÊNCIA DA INCUBAÇÃO *IN VITRO* COM EXTRATO DE *Pleurotus albidus* NO ESTRESSE OXIDATIVO CARDIOVASCULAR E NA REATIVIDADE VASCULAR

Orientador: Professor Doutor Paulo Cavalheiro Schenkel

Coorientadora: Professora Doutora Marli Camassola

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Porto Alegre

2019

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família – minha mãe Sueli, minha irmã Cristiane e meu sobrinho Diego - por terem me apoiado, por compreenderem minha ausência, por sempre acreditarem em mim e por estarem do meu lado nos momentos ruins e bons. O amor de vocês e o exemplo de vocês é o que me fez chegar até aqui e seguirá me fortalecendo sempre.

Agradeço também ao meu orientador, professor Paulo Cavalheiro Schenkel, por ter me recebido como orientado, ter confiado no meu trabalho e por tudo que me permitiu aprender nestes dois anos, desde o desenvolvimento da pesquisa até ensinamentos de vida. O senhor é um grande exemplo para mim, tanto pelo lado profissional, como pela pessoa que és.

À minha coorientadora, Marli Camassola, obrigado pela parceria de ajudar em um trabalho que foge do convencional do laboratório, pela paciência e por todas contribuições feitas ao trabalho.

Aos professores Alex Sander da Rosa Araújo, Alexandre Luz de Castro e Adriane Belló-Klein, obrigado pelas ideias, incentivo e apoio. São grandes exemplos de pesquisadores, professores e pessoas admiráveis.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia Cardiovascular, obrigado pela ajuda, e ensinamentos. Gostaria de agradecer especialmente a aqueles que tiveram participação fundamental para o desenvolvimento deste trabalho – Cristina, Marcella, Vanessa, Tânia e Patrick.

Agradeço a todos meus amigos pelo apoio, incentivo e compreensão. Primeiramente aos que me ajudaram de alguma forma a entrar no programa – Matheus Jahn, Emili Mezzomo, Matheus Freitas, Johnatan Vilasboa e Camila Cantele. Também agradeço aos amigos que me apoiaram durante o trajeto – Leonardo Simões, Marjoriane Amaral, Marina Brião, Amanda Chaves, Isadora Tassinari, Silvio Tasca, Gabriel Dall'Alba, Diego Elias, Gabriel Vizioli, Andrei Vargas – vocês foram muito importantes nessa caminhada.

RESUMO

O estresse oxidativo se caracteriza por ser um desbalanço entre moléculas oxidantes e antioxidantes, estando associado a diversas doenças cardiovasculares. Há relatos na literatura que moléculas antioxidantes podem interferir na reatividade vascular, visto que regulam enzimas importantes a esses mecanismos. Tendo em vista que antioxidantes exógenos utilizados como pré-tratamento podem proteger o sistema cardiovascular dos danos oxidativos, o extrato de *Pleurotus albidus* surge como uma alternativa terapêutica. Esse cogumelo é nativo da América Latina e possui poucos relatos na literatura sobre suas propriedades, porém, sabe-se do seu potencial antioxidante *in vitro*. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial cardioprotetor e vasoprotetor do extrato de *Pleurotus albidus*. Foram utilizados ratos Wistar machos pesando cerca de 250g, onde após suas decapitações, os corações foram retirados para utilização em análises bioquímicas e as artérias aortas foram retiradas para utilização em análises de reatividade vascular e análises bioquímicas. Tanto as aortas quanto os corações foram expostos ao extrato de *P. albidus* em diferentes concentrações durante 30 minutos e posteriormente expostos ao modelo de geração de radicais livres por 30 minutos. Nas análises bioquímicas no coração, foram avaliados o potencial protetor do extrato quanto à lipoperoxidação pelo método de TBARS, além da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Nas análises de reatividade vascular, foram avaliadas a influência do extrato na reatividade vascular (vasoconstrição e vasodilatação) quando aortas eram pré-incubadas com o mesmo na concentração de 1,5 mg/ml; também avaliou-se o potencial vasodilatador do extrato na curva de relaxamento em diferentes concentrações e avaliamos o mecanismo de relaxamento do extrato através da utilização de L-NAME, um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase. Nas análises bioquímicas em aortas, foram avaliados o potencial protetor do extrato quanto à lipoperoxidação pelo método de TBARS, além dos níveis de sulfidrilas, dos níveis de espécies reativas de oxigênio totais e a atividade das enzimas NADPH oxidase e óxido nítrico sintase.

Quantificou-se também a ergotioneína, uma molécula antioxidante presente em cogumelos, no extrato através de HPLC. Os resultados desse trabalho mostraram que o extrato de *Pleurotus albidus* provoca relaxamento das artérias aortas torácicas de ratos, com possível envolvimento do óxido nítrico. Além disso, o extrato foi capaz de reduzir os níveis de lipoperoxidação, aumentar a atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase no tecido cardíaco; na aorta, foi capaz de reduzir a atividade da enzima NADPH oxidase e aumentar os níveis de sulfidrilas e a atividade da enzima óxido nítrico sintase. Também foi possível constatar a presença de ergotioneína no extrato, que pode ser uma das moléculas envolvidas nas ações do extrato.

Como conclusão, esses achados podem estar relacionados aos efeitos antioxidantes do extrato, mitigando os danos do estresse oxidativo e podem representar uma futura alternativa terapêutica às doenças cardiovasculares. Entretanto, mais estudos são necessários afim de verificar os mecanismos de ação do extrato, além de seus efeitos em diferentes modelos de doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: antioxidante, estresse oxidativo, *Pleurotus*, reatividade vascular

ABSTRACT

Oxidative stress is characterized by being an imbalance between oxidizing and antioxidant molecules, being associated with several cardiovascular diseases. It is also known that antioxidant molecules can interfere with vascular reactivity, as they regulate enzymes important to these mechanisms. Since exogenous antioxidants used as pretreatment may protect the cardiovascular system from oxidative damage, *Pleurotus albidus* extract is a therapeutic alternative. This mushroom is native to Latin America and has few reports in the literature about its properties, but its antioxidant potential is known in vitro. Thus, the aim of this study was to evaluate the cardioprotective and vasoprotective potential of *Pleurotus albidus* extract. Male Wistar rats weighing 250g were used, where after decapitation, the hearts were removed for use in biochemical analysis and the aortic arteries were removed for use in vascular reactivity and biochemical analyzes. Both aortas and hearts that would be used for biochemical analysis were exposed to *P. albidus* extract at different concentrations for 30 minutes and then exposed to the free radical generation model for 30 minutes. In the biochemical analysis of the heart, were evaluated the protective potential of the extract for lipoperoxidation by the TBARS method, as well as the activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. In the analysis of vascular reactivity, were evaluated the influence of the extract on vascular reactivity (vasoconstriction and vasodilation) when aortas were preincubated with 1.5 mg / ml; also were evaluated the vasodilatory potential of the extract on the relaxation curve at different concentrations and the relaxation mechanism of the extract by using L-NAME, a non-selective nitric oxide synthase inhibitor. In the biochemical analyzes in aortas, were evaluated the protective potential of the extract for lipid peroxidation by the TBARS method, in addition to sulfhydryl levels, total reactive oxygen species levels and the activity of NADPH oxidase and nitric oxide synthase enzymes. We also quantified ergothioneine, an antioxidant molecule present in mushrooms, in the extract by HPLC. In addition, the extract was able to reduce lipoperoxidation levels, increase the activity of enzymes

catalase and glutathione peroxidase in cardiac tissue; In the aorta, it was able to reduce NADPH oxidase activity and increase sulfhydryl levels and nitric oxide synthase activity. It was also possible to verify the presence of ergothioneine in the extract, which may be one of the molecules involved in the actions of the extract.

In conclusion, these findings may be related to the antioxidant effects of the extract, mitigating the damage of oxidative stress and may represent a future therapeutic alternative to cardiovascular disease. However, further studies are needed to verify the mechanisms of action of the extract, as well as its effects on different models of cardiovascular disease.

Keywords: antioxidant, oxidative stress, *Pleurotus*, vascular reactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sacos de polipropileno contendo meio de cultivo e inóculo de *P. albidus*.

Figura 2. Basidiomas de *P. albidus* em desenvolvimento.

Figura 3. Cogumelos *P. albidus* desidratados.

Figura 4. Processo de extração.

Figura 5. Sistema de banho de órgãos isolado.

Figura 6. Desenho experimental genérico dos experimentos de reatividade vascular.

Figura 7. Peroxidação lipídica pelo método de TBARS em tecido cardíaco exposto ao sistema gerador de radicais livres e a diferentes concentrações do extrato de *Pleurotus albidus*.

Figura 8. Atividade da enzima superóxido dismutase em tecido cardíaco exposto ao sistema gerador de radicais livres e a diferentes concentrações do extrato de *Pleurotus albidus*.

Figura 9. Atividade da enzima catalase em tecido cardíaco exposto ao sistema gerador de radicais livres e a diferentes concentrações do extrato de *Pleurotus albidus*.

Figura 10. Atividade da enzima glutathiona peroxidase em tecido cardíaco exposto ao sistema gerador de radicais livres e a diferentes concentrações do extrato de *Pleurotus albidus*.

Figura 11. Curvas de concentração-resposta mostrando contração à fenilefrina em anéis da aorta torácica de ratos pré-incubados com extrato de *P. albidus*.

Figura 12. Curvas de concentração-resposta mostrando relaxamento à acetilcolina em anéis da aorta torácica de rato contraídos por fenilefrina pré-incubados com extrato de *P. albidus*.

Figura 13. Curvas de concentração-resposta mostrando relaxamento à diferentes concentrações de extrato (0,3 a 6,0 mg/ml) em anéis da aorta torácica de ratos contraídos por fenilefrina.

Figura 14. Curvas de concentração-resposta mostrando relaxamento à diferentes concentrações de extrato de *P. albidus* (0,0047 a 0,3 mg/ml) em anéis da aorta torácica de ratos contraídos por fenilefrina.

Figura 15. Peroxidação lipídica pelo método de TBARS em aorta exposta ao sistema gerador de radicais livres e ao extrato de *Pleurotus albidus*.

Figura 16. Níveis de sulfidril em aorta exposta ao sistema gerador de radicais livres e ao extrato de *Pleurotus albidus*.

Figura 17. Atividade da enzima NADPH oxidase em aorta exposta ao sistema gerador de radicais livres e ao extrato de *Pleurotus albidus*.

Figura 18. Atividade da enzima óxido nítrico sintase em aorta exposta ao sistema gerador de radicais livres e ao extrato de *Pleurotus albidus*.

Figura 19. Níveis de espécies reativas de oxigênio totais em aorta exposta ao sistema gerador de radicais livres e ao extrato de *Pleurotus albidus*.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABAP – 2,2'-azobis (2-metilamidinopropano)
ABTS - 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ANOVA – Análise de variância
Ca²⁺ - Cálcio
CaCl₂ – Cloreto de cálcio
CaCO₃ – Carbonato de cálcio
CAT – Catalase
CO₂ – Dióxido de carbono
DCFH-DA – Diclorofluoresceína diacetato
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DPPH – 2,2- difenil-1-picril-hidrazil
DTNB – 5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico)
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROS – Espécies reativas de oxigênio
FeCl₂ – Cloreto de ferro (II)
GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina
GPx – Glutathione peroxidase
GRX – Glutaredoxina
GTP – Trifosfato de guanosina
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HbO₂ – Oxihemoglobina
HEPES – Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico
KCl – Cloreto de potássio
KH₂PO₄ – Fosfato monopotássico
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
MgSO₄ – Sulfato de magnésio

NaCl – Cloreto de sódio

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NaH₂PO₄ – Fosfato monossódico

NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio

O₂ – Oxigênio

O₂⁻ - Superóxido

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNB – 2-nitro-5-tiobenzoato TRX – Tiorredoxina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Regulação do tônus vascular e doenças cardiovasculares (DCV)	14
1.2 Estresse oxidativo	17
1.3 <i>Pleurotus albidus</i> (<i>P. albidus</i>)	20
2 HIPÓTESE	23
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico de <i>Pleurotus albidus</i>	24
4.2 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> e do conteúdo fenólico total do extrato de <i>Pleurotus albidus</i>	26
4.3 Animais	27
4.4 Determinação da concentração de proteínas	27
4.5 Indução de estresse oxidativo <i>in vitro</i> em tecido cardíaco	28
4.5.1 Superóxido Dismutase (SOD)	29
4.5.2 Catalase (CAT)	29
4.5.3 Glutathiona Peroxidase (GPx)	30
4.5.4 Determinação da lipoperoxidação	30
4.6 Reatividade vascular da aorta	30
4.7 Indução de estresse oxidativo <i>in vitro</i> em aortas	33
4.7.1 Determinação da lipoperoxidação	34
4.7.2 Sulfidrilas.....	35
4.7.3 NADPH oxidase	35
4.7.4 Óxido nítrico sintase	35
4.7.5 Medida de níveis de espécies reativas de oxigênio totais (EROS)	36

4.8 Identificação e quantificação de ergotioneína.....	36
4.10 Análise estatística.....	37
5 RESULTADOS	37
5.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> e conteúdo fenólico total do extrato de <i>Pleurotus albidus</i>	37
5.2 Indução de estresse oxidativo <i>in vitro</i> no tecido cardíaco.....	38
5.3 Reatividade vascular das aortas.....	42
5.3.1 Experimento 1 - Incubação da aorta com extrato de <i>P. albidus</i>	42
5.3.2 Experimento 2 - Curva de concentração-resposta com concentrações de 0,3 a 6,0 mg/ml de extrato de <i>P. albidus</i>	43
5.3.3 Experimento 3 - Curva de concentração-resposta com concentrações de 0,0047 a 0,3 mg/ml de extrato de <i>P. albidus</i> e Experimento 4 - Mecanismo de relaxamento com concentrações de 0,0047 a 0,3 mg/ml de extrato de <i>P. albidus</i> utilizando L-NAME (inibidor da enzima óxido nítrico sintase)	44
5.4 Indução de estresse oxidativo <i>in vitro</i> em aortas	46
5.5 Identificação e quantificação de ergotioneína.....	51
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	57
8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	57
9 PERSPECTIVAS.....	58
10 REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Regulação do tônus vascular e doenças cardiovasculares (DCV)

As DCV atingem grande parte da população mundial, com altos índices de mortalidade. Em 2009, os custos relacionados a essas doenças chegaram a 106 bilhões de euros na União Europeia, equivalendo a 9% dos gastos totais com cuidados em saúde. Esses custos excessivos ressaltam a necessidade de pesquisas na área cardiovascular (PIEPOLI et al., 2016). Nos Estados Unidos, aproximadamente 800 mil pessoas são acometidas por um infarto agudo do miocárdio anualmente, sendo que 27% dessas acabam falecendo (BOATENG; SANBORN, 2013). No Brasil, há registro de cerca de 100 mil óbitos anuais devido a infartos agudos do miocárdio (DATASUS, 2018). A hipertensão arterial sistêmica é um dos fatores de risco mais relevantes para doenças cardiovasculares e afeta cerca de 25% da população adulta do mundo (IKEWUCHI, 2014). Aproximadamente 45% das mortes por doenças cardíacas e 51% das mortes por acidente vascular cerebral em todo o mundo estão relacionadas à hipertensão arterial sistêmica (KJELDSEN et al., 2014).

O desequilíbrio do tônus vascular é um dos fatores relevantes no desenvolvimento da hipertensão arterial, sendo que a manutenção do equilíbrio desse tônus é fundamental para prevenção de diversas doenças e para a manutenção das funções do vaso. As artérias de resistência são formadas por camadas denominadas: íntima, constituída basicamente de células endoteliais; média, composta por células musculares lisas e de tecido conjuntivo fibroelástico; adventícia, formada por tecido conjuntivo (PUGSLEY; TABRIZCHI, 2000). Além das questões estruturais, as células endoteliais desempenham um papel fundamental para a manutenção da homeostasia da parede vascular. O endotélio possui propriedades importantes, como elaboração de moléculas anticoagulantes e pró-coagulantes, regulação da inflamação, regulação do tônus do músculo liso vascular através da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras e

modulação do fluxo sanguíneo (POBER; COTRAN, 1990). A disfunção endotelial é um fator importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial e o infarto agudo do miocárdio (VANHOUTTE, 1989; OLIVEIRA; LUZ; RAMIRES, 1998; DA SILVA, 2000; MELO et al., 2004). Essa disfunção caracteriza-se pela incapacidade do endotélio em promover o relaxamento vascular, devido a um desbalanço na produção ou disponibilidade de substâncias vasodilatadoras, dentre elas o óxido nítrico (PUGSLEY; TABRIZCHI, 2000; VASCONCELOS et al., 2007).

O óxido nítrico (NO) é um gás que possui ação inibitória sobre a agregação e adesão de plaquetas a superfície vascular, além de ser a principal substância vasodilatadora derivada do endotélio (HELLER et al., 1999). Sob condições fisiológicas, o óxido nítrico é produzido através da estimulação por diversos fatores, como as forças de cisalhamento produzidas pelo fluxo sanguíneo no vaso. Uma vez liberado, se difunde rapidamente para o músculo liso vascular, ativando a guanilato ciclase solúvel que converte guanidil trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (CARVAJAL et al., 2000), que por meio da proteína quinase dependente de GMPc, dispara fosforilações que reduzem o conteúdo e a sensibilidade ao Ca^{2+} intracelular, promovendo relaxamento (LINCOLN et al., 2001). Nos mamíferos, o óxido nítrico pode ser gerado por três isoformas diferentes da enzima NO sintase: a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), a óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A nNOS está mais associada a processos como a plasticidade sináptica e a regulação central da pressão sanguínea. A iNOS por sua vez, está ligada a processos como a mediação da inflamação, a resposta imune não-específica e o choque séptico. Já o NO endotelial derivado da eNOS é um vasodilatador fisiológico e é importante na manutenção das propriedades do vaso e na prevenção de doenças como hipertensão (FÖRSTERMANN; SESSA, 2011).

Já é bem conhecido o efeito vasodilatador e hipotensivo que a acetilcolina exerce sobre os vasos sanguíneos por meio da liberação de NO pelo endotélio vascular (BROADLEY; BROADLEY, 2019). A acetilcolina causa uma resposta

vasodilatadora em aortas pré-contraídas com noradrenalina com endotélio íntegro, porém esse efeito é convertido em resposta vasoconstritora pela remoção do endotélio, como foi demonstrado por Furchgott e Zawadski (1980). A prova de que a resposta vasodilatadora da acetilcolina se deve à liberação de NO foi demonstrada pela inibição da enzima óxido nítrico sintase com a utilização de L-NAME, propiciando uma inibição completa da resposta vasodilatadora na aorta de ratos (MARTIN; BOLOFO; GILES, 1992). Já na resposta à fenilefrina, a inibição da eNOS por L-NAME, potenciou a resposta vasoconstritora em aortas de ratos (TOPOUZIS; SCHOTT; STOCLET, 1991). O papel do NO no endotélio vascular parece diferir entre diferentes vasos sanguíneos, o que mostra que cada tipo de vaso pode reagir diferente às drogas como acetilcolina, fenilefrina e L-NAME (TABERNEIRO; GIRALDO; VILA, 1996).

Entre os fatores que contribuem para o desenvolvimento da hipertensão arterial sistêmica, há mudanças no estilo de vida, diferenças raciais, desnutrição e dietas desequilibradas (YAHAYA; RAHMAN; ABDULLAH, 2014). O tratamento anti-hipertensivo medicamentoso consiste basicamente na utilização dos inibidores da enzima conversora de angiotensina, dos bloqueadores dos receptores de angiotensina, dos bloqueadores de canais de cálcio e dos diuréticos (KJELDSEN et al., 2014). Já o tratamento não-medicamentoso visa a diminuição da morbidade e a mortalidade por modificações em hábitos de vida que favoreçam a redução da pressão arterial. Dentre as terapias não-medicamentosas, destacam-se o exercício físico e dieta, que são fatores importantes no controle da pressão arterial. Esses fatores têm como principais benefícios: o baixo custo, o risco mínimo e o aumento da eficácia do tratamento medicamentoso (LOPES; BARRETO-FILHO; RICCIO, 2003). Foi demonstrado que a alta ingestão de sal está relacionada ao aumento do risco de desenvolver hipertensão arterial sistêmica, por isso ressalta-se a importância da dieta no controle de doenças cardiovasculares (MENETON et al., 2005).

Neste contexto podemos destacar os cogumelos comestíveis que, pela baixa quantidade de sódio, surgem como excelentes opções alimentares para pessoas com pressão arterial elevada. Além do mais, os cogumelos apresentam uma rica

composição nutricional, com vários compostos: polissacarídeos, fibras dietéticas, terpenos, peptídeos, glicoproteínas, álcoois, elementos minerais, ácidos graxos insaturados, antioxidantes, etc. (RATHORE; PRASAD; SHARMA, 2017).

1.2 Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são moléculas altamente reativas que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Essas moléculas estão presentes em todos os sistemas biológicos e podem ser geradas durante a fosforilação oxidativa, onde a redução do oxigênio molecular para água requer quatro elétrons e cerca de 2-5% dessa reação é feita por uma via que pode dar origem à formação de EROS pela redução monovalente de oxigênio molecular, gerando superóxido (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). O superóxido em condições fisiológicas é produzido principalmente nas mitocôndrias, microsomas e peroxissomas através da ação da enzima NADPH oxidase (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Em níveis adequados, as EROS são importantes na sinalização celular; porém, quando estão em níveis elevados induzem danos na membrana celular por lipoperoxidação, alterações na estrutura e função das proteínas e danos estruturais no ácido desoxirribonucleico (KIM et al., 2015).

Há indícios que suportam o papel do estresse oxidativo e das EROS na patogênese de diversas doenças cardiovasculares, incluindo isquemia cardíaca, aterosclerose, insuficiência cardíaca, cardiomiopatia, hipertrofia, arritmias e hipertensão arterial sistêmica (ARAUJO et al., 2008). Diversos trabalhos evidenciam o papel das alterações redox na patogênese de outras doenças além das cardiovasculares, como as doenças pulmonares, neuronais, autoimunes e renais (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; CHRISTEN, 2000; MACNEE, 2001; VALKO et al., 2007; MASSICOT et al., 1997; BEATTY et al., 2000). Embora as EROS sejam importantes na indução e manutenção de muitas vias sinalizadoras de transdução envolvidas no crescimento e diferenciação celular e atuem como mensageiros secundários na coordenação de importantes funções celulares como

a proliferação e a morte celular programada (ARAUJO et al., 2008), seus níveis elevados estão associados a processos patológicos (KIM et al., 2014). De fato, tem sido mostrado que as EROS estão envolvidas em várias vias de sinalização para insuficiência cardíaca, dentre elas aquelas relacionadas com o sistema renina-angiotensina-aldosterona e com a ativação de receptores beta-adrenérgicos (TSUTSUMI et al., 2007). Além disso, elas estão envolvidas em alterações da expressão gênica a indução de sobrecarga de Ca^{2+} e a ativação das cascatas de apoptose nos cardiomiócitos (TSUTSUMI et al., 2007).

No contexto vascular, o óxido nítrico pode vir a reagir com radicais livres derivados do oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), perdendo sua atividade vasodilatadora e produzindo substâncias citotóxicas como o peroxinitrito e radicais hidroxila (STOCLET et al., 1999). Essa interação pode contribuir para diversos mecanismos fisiopatológicos de doenças cardiovasculares (CHATTERJEE; CATRAVAS, 2008). O ânion superóxido é formado pela adição de um elétron a molécula de oxigênio e é produzido na cadeia respiratória mitocondrial, pelas xantinas-oxidases, ciclooxigenase, lipoxigenase, óxido nítrico sintase e principalmente na parede dos vasos pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase). Essa enzima desempenha um papel importante na formação de ânion superóxido nas células vasculares (SOCCIO et al., 2005). Outras EROS e radicais livres também apresentam influência na regulação do tônus dos vasos, por exemplo, o peróxido de hidrogênio pode atuar tanto como vasoconstritor como vasodilatador. Já o radical hidroxila, formado a partir do peróxido de hidrogênio pela presença de ferro ou cobre, tem poder vasodilatador e vasoconstritor mediado pela proteína quinase C e guanilato ciclase solúvel (GIL-LONGO; GONZÁLES-VASQUEZ, 2005).

A fim de mimetizar o dano oxidativo a células, foram criados diferentes modelos de indução de estresse oxidativo utilizando peróxido de hidrogênio (ZHANG et al., 2013; KIM et al., 2014). Dentre os modelos propostos para a geração de EROS, podemos destacar o modelo de Halliwell, que visa a geração de radical hidroxil através da incubação de homogeneizados de tecido com cloreto

de ferro (FeCl_2), H_2O_2 e ácido ascórbico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Os danos gerados nesse modelo, baseiam-se nas reações de Haber-Weiss e Fenton.

Se contrapondo aos elevados níveis de EROS estão as defesas antioxidantes. Essas atuam para estabilizar as EROS e os radicais livres e, assim, manter o equilíbrio redox. Entre as defesas antioxidantes mais importantes estão os sistemas enzimáticos tioredoxina (TRX) e glutaredoxina (GRX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutaciona peroxidase (GPx). TRX pode atuar como uma enzima antioxidante, doando hidrogênio para proteínas oxidadas; GRX pode catalisar a redução de dissulfetos, regenerando atividades importantes das moléculas celulares; SOD catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio; CAT atua na decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio; GPx, por sua vez, depende de glutaciona reduzida, que é oxidada a glutaciona oxidada (CASTRO et al., 2014). Além das enzimas que fazem parte da reserva antioxidante, há ainda os antioxidantes não-enzimáticos: tocoferóis, carotenoides, flavonoides, ácido ascórbico e ácido úrico (BELLÓ-KLEIN et al., 2004).

Portanto, considerando que o desequilíbrio entre a formação de EROS e a capacidade antioxidante é um dos principais mecanismos envolvidos em diversas doenças, além do fato das doenças cardiovasculares estarem entre as principais causas de morte no mundo, estudos que visam a manutenção ou o reestabelecimento do equilíbrio redox são promissores. Nesse contexto, vários estudos foram realizados visando mostrar o papel dos antioxidantes como alternativa terapêutica à doenças que tenham o estresse oxidativo como um dos fatores causadores (MASSICOT et al., 1997; BEATTY et al., 2000, CHRISTEN, 2000; GALLE, 2001; HALLIWELL, 2001; ALLAN BUTTERFIELD, 2002), entre elas as doenças que envolvem desbalanço do tônus vascular. Assim, realizar pré-tratamentos com antioxidantes exógenos ou promover adaptação dos antioxidantes endógenos pode melhorar os danos causados em doenças ligadas ao estresse oxidativo, pela redução na formação de radicais livres (SATO et al., 1999).

1.3 *Pleurotus albidus* (*P. albidus*)

Macrofungos são conhecidos por produzirem metabólitos secundários que possuem bioatividades de interesse medicinal. Dentre esses metabólitos, encontram-se compostos fenólicos, que possuem atividade antioxidante descrita na literatura (GAMBATO et al., 2016; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997). Os cogumelos comestíveis vêm sendo estudados por apresentarem propriedades antioxidantes e outros efeitos benéficos como propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antivirais, antialérgicas e anticarcinogênicas (SOBRATTEE et al., 2005; FERREIRA; BARROS; ABREU, 2009). As espécies de cogumelos do gênero *Pleurotus* produzem diversas moléculas como naringina, miricetina e ácidos fenólicos, que são conhecidos por possuírem essas propriedades (GAMBATO et al., 2016). Além disso, o gênero *Pleurotus* possui características culinárias atraentes, como alto teor de fibras e baixos teores de gordura (SÁNCHEZ; ROYSE, 2001). Os cogumelos desse gênero estão entre os mais populares em todo o mundo, alcançando a terceira posição na produção de cogumelos comestíveis, atrás apenas das espécies do gênero *Agaricus* e *Lentinula* (FERNANDES et al., 2015).

Quando falamos da utilização de cogumelos comestíveis é importante ressaltar a influência da produção, do método de extração e da espécie de cogumelo. Esses processos podem alterar as propriedades nutricionais e até mesmo a composição de moléculas dos cogumelos (MILES; CHANG, 1988).

Os nutracêuticos de cogumelos têm sido utilizados desde os tempos antigos para tratar diversas doenças humanas. Suas características nutricionais e culinárias atraíram os pesquisadores e nutricionistas para tornar seu uso rotineiro para as pessoas comuns e incluí-los no plano de alimentação saudável (RATHORE; PRASAD; SHARMA, 2017). Nas últimas décadas, os cogumelos não estão sendo consumidos somente como alimento, mas também como o principal componente bioativo na fabricação de suplementos alimentares para melhorar a qualidade de vida humana. Assim, diversos extratos de cogumelos vêm sendo alvos de ensaios clínicos e de empresas farmacêuticas para o desenvolvimento de

alimentos funcionais (RATHORE; PRASAD; SHARMA, 2017). No entanto, a produção de tais nutracêuticos requer um conhecimento profundo sobre o processo de produção, tornando-o economicamente viável e estável quanto à qualidade e quantidade de moléculas bioativas (RATHORE; PRASAD; SHARMA, 2017). Devido à diversidade de cogumelos em todo o mundo, eles surgem como o alimento nutracêutico da próxima geração, pois são considerados um alimento natural completo e adequado para todas as faixas etárias (RATHORE; PRASAD; SHARMA, 2017). Na última década, o número de patentes e artigos científicos sobre esse gênero aumentou exponencialmente, com um grande incremento de pesquisas científicas/artigos de revisão (PATEL et al., 2012). Esses demonstraram que os cogumelos do gênero *Pleurotus* apresentam propriedades terapêuticas tais como: anti-hipercolesterolêmica, anti-hipertensiva, antidiabética, antiobesidade, antienvhecimento, antimicrobiana e antioxidante, além de ação hepatoprotetora (PATEL et al., 2012). Neste contexto, amplia-se a gama de aplicações dos cogumelos *Pleurotus*, principalmente por atenuar fatores de risco ao sistema cardiovascular, como o envelhecimento, o estresse oxidativo e isquemias (JAYAKUMAR; THOMAS; GERALDINE, 2007; JAYAKUMAR et al., 2008; JAYAKUMAR et al, 2010; YAN; JING; WANG, 2015).

O cogumelo *Pleurotus albidus* é uma espécie relativamente comum na América do Sul, pertencente ao filo Basidiomycota, ordem Agaricales, família Pleurotaceae (PUTZKE; PUTZKE, 2004), mas que possui poucos trabalhos que descrevem sua produção e suas propriedades nutricionais. Gambato et al. (2016) mostraram que esse cogumelo apresenta potencial terapêutico para combater/retardar doenças associadas com o estresse oxidativo e inflamação. Diversos estudos vêm sendo feitos afim de adquirir novos compostos naturais com propriedades terapêuticas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998), dentre eles o estudo de Gambato et al. (2018), aponta a ergotioneína como uma das moléculas presentes no extrato do cogumelo *Pleurotus albidus*.

A ergotioneína é um derivado da histidina, isolado de cogumelos comestíveis e que pode exercer proteção contra muitas doenças, incluindo doenças cardiovasculares. Esse efeito benéfico se deve principalmente ao potencial

vasodilatador e antioxidante da molécula, influenciando a produção de óxido nítrico e inativando ânions superóxido (GOKCE; ARUN, 2014). Essa molécula não é sintetizada em humanos, mas os níveis sanguíneos da mesma podem chegar a 0,44 mM como resultado do consumo alimentar. Essa substância já foi detectada no fígado, no rim, nas vesículas seminais, na medula óssea, nas lentes ópticas e no sistema nervoso central (MARTIN, 2010).

2 HIPÓTESE

Baseado nas propriedades dos cogumelos *Pleurotus* destacadas na literatura, este estudo sugere como hipótese que, através da sua ação antioxidante, o extrato de *Pleurotus albidus* atenua o estresse oxidativo e modula a reatividade vascular.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial cardioprotetor e vasoprotetor do extrato hidroalcoólico de *Pleurotus albidus*.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Identificar as características do extrato hidroalcoólico de *Pleurotus albidus*;
- II. Testar suas propriedades antioxidantes *in vitro*;
- III. Analisar a influência do extrato sobre defesas antioxidantes e parâmetros de dano oxidativo cardiovasculares *in vitro* em aortas e corações de ratos Wistar;
- IIII. Analisar a influência do extrato na reatividade vascular da artéria aorta;
- IV. Identificar a presença de ergotioneína no extrato hidroalcoólico de *Pleurotus albidus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico de *Pleurotus albidus*

Foi utilizada a linhagem 88F de *Pleurotus albidus* (MIUCS 1580), pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassas da Universidade de Caxias do Sul/RS e depositada na seção micológica do Herbário da Universidade de Caxias do Sul (UCS/MUSIC) (ROSA; WASUM; DILLON, 2016).

Os basidiomas foram cultivados em sacos de polipropileno, contendo 1,5 kg de meio de cultivo (bagaço de uva *Vitis labrusca*, 50%; serragem de *Pinus* sp. 44 %; farelo de trigo, 5 %; CaCO₃, 1,0 % e água destilada para a obtenção de 66 % de umidade). Primeiramente, os sacos foram inoculados com todo o conteúdo de placas de Petri com micélio do fungo previamente crescido, sendo posteriormente armazenados em local com temperatura controlada (28 °C). Quando observada colonização total do meio de cultivo e presença de primórdios de basidiomas, os sacos foram perfurados com bisturi e levados para estufa com temperatura ambiente (entre 20 e 30 °C) e umidade relativa do ar entre 70 a 90% (GAMBATO et al., 2016).



Figura 1. Sacos de polipropileno contendo meio de cultivo e inóculo de *P. albidus*.

Fotografia obtida nesse estudo.



Figura 2. Basidiomas de *P. albidus* em desenvolvimento. Fotografia obtida nesse estudo.

Os cogumelos foram coletados e então secos em desidratador (Funkitchen®) durante 8 h, a 50°C, triturados em moedor (Cadence®) e armazenados a 4 °C. Após isso, 10 g de cogumelo em pó seco e 100 ml de etanol 70% foram colocados em um sistema de refluxo por 30 minutos a 100 ° C. Posteriormente, a mistura foi filtrada sob vácuo e a fração solúvel em etanol foi evaporada em um evaporador rotativo (modelo 803, Fisatom). O resíduo insolúvel em etanol foi re-extraído com 100 ml de água por uma hora no mesmo sistema. Ao final, os extratos foram agregados e liofilizados até que o extrato seco fosse obtido (GAMBATO et al., 2018).



Figura 3. Cogumelos *P. albidus* desidratados. Fotografia obtida nesse estudo.



Figura 4. Processo de extração. Fotografia obtida nesse estudo.

4.2 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e do conteúdo fenólico total do extrato de *Pleurotus albidus*

O conteúdo fenólico total do extrato foi determinado usando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu com algumas modificações. O meio de reação era composto por 200 μL de extrato aquoso, 800 μL de carbonato de sódio (7,5%) e 100 μL de reagente de Folin-Ciocalteu. A reação foi mantida no escuro durante 30 minutos e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (espectrofotômetro de UV-1700, Shimadzu, Quioto, Japão) no comprimento de

onda de 725 nm. Os resultados foram calculados e expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico (mg de AG/mL de amostra) (SINGLETON; ROSSI, 1965).

A atividade antioxidante *in vitro* do extrato foi determinada com o ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) adaptado por Yamaguchi et al. (1998). O método DPPH é baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm. Os resultados foram expressos como o conteúdo de extrato (%) necessário para inibir 50% do radical DPPH (IC 50%). Para chegar ao IC 50% se utiliza o teste de regressão.

4.3 Animais

Foram utilizados 66 ratos Wistar com aproximadamente 45 dias e 250 g provenientes do CREAL da UFRGS. Os animais foram distribuídos entre os diferentes experimentos. O cálculo do tamanho amostral foi efetuado através do programa WINPEPI 11.65, assumindo intervalo de confiança de 95%, erro amostral de 3% e acréscimo de 30% para atender eventuais insucessos. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico (com as seguintes dimensões: 33 X 17 X 40 cm), com no máximo 4 animais por gaiola, sob condições padronizadas do biotério setorial do Departamento de Farmacologia da UFRGS (temperatura controlada em 21°C, ciclo claro/escuro de 12 h, ração e água ad libitum). Projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS, n° 34651.

4.4 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas nos homogeneizados de coração e aorta foi determinada pelo método de Lowry, usando solução de albumina bovina como padrão (LOWRY et al., 1951).

4.5 Indução de estresse oxidativo *in vitro* em tecido cardíaco

Os ratos foram anestesiados com cetamina (90mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg, i.p.) e, quando estavam em anestesia profunda, foram decapitados. Feito isso, foram posicionados em decúbito dorsal e o diafragma foi cortado por incisão abdominal para expor a cavidade torácica. Então, o tórax foi aberto em ambos os lados seguindo o ligamento cartilaginoso as costelas e o coração foi retirado e preparado para mensuração da curva de dose *in vitro* (grau de severidade: sem recuperação). Os corações foram homogeneizados durante 40 segundos no Ultra-Turrax na presença de KCl 1,15% (5 ml/g de tecido) e fluoreto de fenil-metil-sulfonil (PMSF) na concentração de 100 mmol/L em isopropanol (10µL por mL de KCl adicionado). Em seguida, este homogeneizado foi centrifugado por 10 minutos a 1000g na centrífuga refrigerada (4°C) e o sobrenadante foi separado para utilização nas análises. Inicialmente, o homogeneizado foi incubado com o extrato solubilizado em água destilada de *P. albidus* nas concentrações de 0,75 mg/ml; 1,0 mg/ml; 1,25 mg/ml; 1,5 mg/ml; 2,0 mg/ml; 2,5 mg/ml; 3,0 mg/ml por 30 minutos a 37° C. As amostras que não foram expostas ao extrato, foram incubadas no mesmo volume de água destilada. As amostras foram posteriormente incubadas com FeCl₂, H₂O₂ e ácido ascórbico para induzir estresse oxidativo (sistema de geração de radicais hidroxila) por 30 min a 37°C (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Após essas incubações, foram realizados os ensaios de TBARS, catalase, superóxido dismutase e glutathiona peroxidase.

4.5.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A superóxido dismutase é responsável por catalisar a reação de dois ânions superóxido, formando oxigênio e peróxido de hidrogênio. Nesse trabalho, utilizou a técnica baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol para determinação da atividade da SOD. A auto oxidação do pirogalol em meio básico, gera ânion superóxido. A SOD da amostra analisada compete pelo radical superóxido e sua atividade é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. Para realização da técnica, utilizaram-se os seguintes reagentes: solução tampão (Tris base 50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L, pH 8,2), solução de catalase (30 μ mol/L), volumes adequados das soluções de SOD e pirogalol 24 mmol/L (em ácido clorídrico a 10 mM). Há necessidade de realização de uma curva padrão, utilizando-se as concentrações de 0; 0,25; 0,5 e 1 unidade de SOD (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), através da qual é obtido o fator de correção para conversão da porcentagem de inibição da auto oxidação em unidades de enzima. A reação leva à formação de coloração nas amostras, que é detectada espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da enzima foi expressa em U SOD/mg de proteína (MARKLUND, 1985).

4.5.2 Catalase (CAT)

A CAT é responsável por catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio à água. Assim, há a possibilidade de utilização do consumo de peróxido de hidrogênio como medida de atividade enzimática. O ensaio se baseia na medição da redução da absorbância no comprimento de onda de 240 nm, onde há maior absorção de luz pelo peróxido de hidrogênio. Os resultados foram expressos em pmoles/mg de proteína (AEBI, 1985).

4.5.3 Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx é responsável por catalisar a reação de hidroperóxidos com glutathione reduzida para formação de glutathione oxidada e o produto da redução do hidroperóxido. Assim, mensurando o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação de GPx, pode-se medir a atividade da enzima. Os resultados foram expressos em nmoles/min/mg de proteína (FLOHÉ; GUNZLER, 1984).

4.5.4 Determinação da lipoperoxidação

A reação entre radicais livres e lipídios de membrana provocam a lipoperoxidação, com consequente formação de malonaldeído. Essa substância, quando na presença de ácido tiobarbitúrico, forma um composto com coloração que pode ser medida espectrofotometricamente a 532 nm (BUEGE; AUST, 1978).

4.6 Reatividade vascular da aorta

Os animais foram anestesiados com cetamina (90mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg, i.p.), e em seguida, decapitados. A aorta torácica foi cuidadosamente removida e imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (composição em mM: 118 NaCl, 4,7 KCl, 1,75 CaCl₂, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0,5 EDTA e 5,6 glicose). A aorta foi então manipulada para retirada do tecido conectivo e adiposo, e então dividida em 6 segmentos cilíndricos com 3-4 mm de comprimento.

Após a manipulação, os segmentos foram adaptados ao aparato experimental. Cada anel da artéria foi colocado em cubas contendo 10 ml de solução de Krebs-Henseleit mantida aquecida a 37 °C, continuamente gaseificada

com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), mantendo o pH estável em 7,4 de acordo com método do sistema de banho de órgãos isolado descrito por Nielsen e Owman (1971). Para a montagem do aparato experimental, dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos vasculares, de forma que permaneçam paralelos. Um fio foi fixado a uma haste fixa à parede da cuba e o outro conectado verticalmente a uma haste móvel presa a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração no diâmetro do vaso foi captada pelo transdutor de força conectado a um sistema de aquisição de dados e este a um computador. Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de 1g, reajustada quando necessário, durante aproximadamente 30 minutos de estabilização.

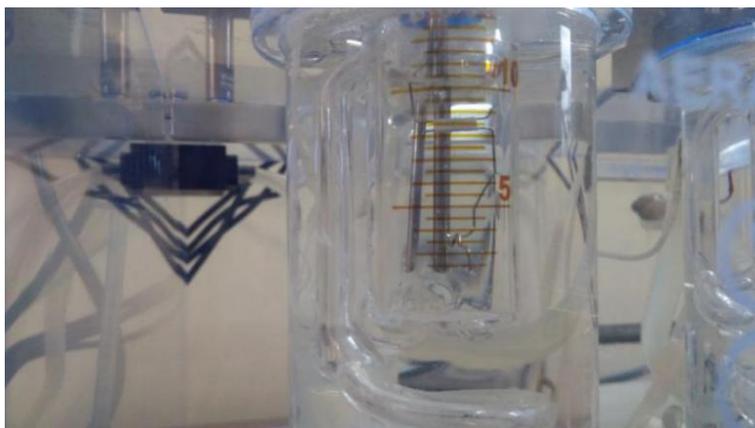


Figura 5. Sistema de banho de órgãos isolado. Fotografia obtida nesse estudo.

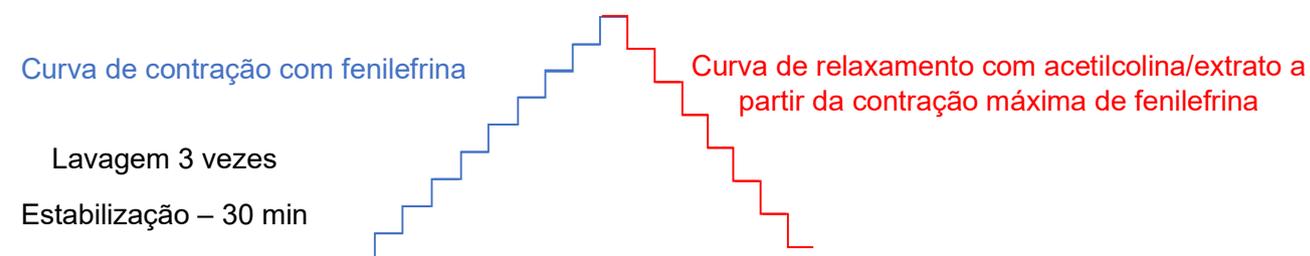


Figura 6. Desenho experimental genérico dos experimentos de reatividade vascular.

Foram realizados 4 diferentes experimentos:

Experimento 1 – Incubação da aorta com extrato de *P. albidus*

A concentração utilizada no primeiro experimento foi baseada no experimento *in vitro* no tecido cardíaco, pois foi a que apresentou maior potencial antioxidante.

- 1º. Estabilização das artérias no sistema de banho de órgãos por 15 minutos;
- 2º. Incubação das artérias com extrato de *Pleurotus albidus* dissolvido em solução Krebs-Henseleit na concentração de 1,5 mg/ml em 2 cubas e outras 2 cubas contendo somente solução Krebs-Henseleit, por 30 minutos;
- 3º. Estabilização das artérias no sistema de banho de órgãos por mais 15 minutos;
- 4º. Curva de contração - avaliação das respostas a concentrações crescentes de fenilefrina (10^{-10} M – 3×10^{-4} M).
- 5º. Curva de relaxamento - avaliação das respostas a concentrações crescentes de acetilcolina (10^{-11} M – 3×10^{-4} M).

Após verificação dos resultados do experimento 1, visando elucidar a responsividade vascular ao extrato, foi realizada uma curva de relaxamento utilizando diferentes concentrações de extrato de *P. albidus*.

Experimento 2 – Curva de extrato de *P. albidus* com concentrações de 0,3 a 6,0 mg/ml

- 1º. Estabilização das artérias no sistema de banho de órgãos por 30 minutos;
- 2º. Curva de contração com concentrações crescentes de fenilefrina (10^{-10} M – 3×10^{-4} M);

3º. Curva de relaxamento - avaliação das respostas a concentrações crescentes de extrato (0,3; 0,6; 1,0; 1,5; 3,0 e 6 mg/ml).

Após verificação dos resultados do experimento 2, visando elucidar a resposta vasodilatadora do extrato, foi realizada uma nova curva com concentrações menores de extrato de *P. albidus*.

Experimento 3 - Curva com concentrações de 0,0047 a 0,3 mg/ml de extrato de *P. albidus*

1º. Estabilização das artérias no sistema de banho de órgãos por 30 minutos;

2º. Curva de contração com concentrações crescentes de fenilefrina (10^{-10} M – 3×10^{-4} M);

3º. Curva de relaxamento - avaliação das respostas a concentrações crescentes de extrato (0,0047; 0,0094; 0,0188; 0,0376; 0,0750; 0,15 a 0,3 mg/ml).

Após verificação dos resultados do experimento 3, visando elucidar o possível mecanismo de relaxamento provocado pelo extrato de *P. albidus* na curva de relaxamento, realizamos o experimento 4 utilizando Nw-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME).

Experimento 4 – Mecanismo de relaxamento com concentrações de 0,0047

a 0,3 mg/ml de extrato de *P. albidus* utilizando Nw-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME), um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase.

1º. Estabilização das artérias no sistema de banho de órgãos por 30 minutos;

2º. Incubação das artérias com L-NAME na concentração de 100 mM por 30 minutos;

- 3º. Curva de contração com concentrações crescentes de fenilefrina (10^{-10} M – 3×10^{-4} M);
- 4º. Curva de relaxamento - avaliação das respostas a concentrações crescentes de extrato (0,0047; 0,0094; 0,0188; 0,0376; 0,0750; 0,15 a 0,3 mg/ml).

4.7 Indução de estresse oxidativo *in vitro* em aortas

Os animais foram anestesiados com cetamina (90mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg, i.p.), e em seguida, decapitados. A aorta torácica foi cuidadosamente removida e imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (composição em mM: 118 NaCl, 4,7 KCl, 1,75 CaCl₂, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0,5 EDTA e 5,6 glicose). A aorta foi então manipulada para retirada do tecido conectivo e adiposo, posteriormente foi armazenada em freezer -80°C até o momento das análises. As amostras de aortas foram maceradas em nitrogênio líquido. Depois disso, homogeneizadas em Ultra-Turrax na presença de KCl 1,15% (5 ml/g de tecido) e fluoreto de fenil-metil-sulfonil (PMSF) na concentração de 100 mmol/L em isopropanol (10µL por mL de KCl adicionado). Posteriormente, foi realizada uma sonificação com o dispositivo Hielscher Ultrasound Technology. Em seguida, este homogeneizado foi centrifugado por 10 minutos a 1000g na centrífuga refrigerada (4°C) e o sobrenadante foi separado para utilização nas análises. Inicialmente, o homogeneizado foi incubado com o extrato solubilizado em água destilada de *P. albidus* na concentração de 0,3 mg/ml por 30 minutos a 37°C. As amostras que não foram expostas ao extrato, foram incubadas no mesmo volume de água destilada. As amostras foram posteriormente incubadas com FeCl₂, H₂O₂ e ácido ascórbico para induzir estresse oxidativo (sistema de geração de radicais hidroxila) por 30 min a 37°C (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). A concentração utilizada nesses ensaios foi a que mostrou o maior relaxamento

nos experimentos de reatividade vascular. Após essas incubações, foram realizados os ensaios de NADPH oxidase, TBARS, EROS, óxido nítrico sintase e sulfidrilas.

4.7.1 Determinação da lipoperoxidação

A reação entre radicais livres e lipídios de membrana provocam a lipoperoxidação, com conseqüente formação de malonaldeído. Essa substância, quando na presença de ácido tiobarbitúrico, forma um composto com coloração que pode ser medida espectrofotometricamente a 532 nm (BUEGE; AUST, 1978).

4.7.2 Sulfidrilas

Para o ensaio de sulfidrilas, 0,1 mM de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) foi adicionado ao homogeneizado de aortas, com posterior incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi medida espectrofotometricamente a 412 nm, mensurando a formação de TNB, e os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína. (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

4.7.3 NADPH oxidase

A NADPH oxidase através da transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, provoca a geração de ânions superóxido. A atividade da enzima foi determinada no homogeneizado de aortas medindo o consumo de NADPH a 340nm, sendo sua atividade diretamente proporcional

à produção do ânion superóxido. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína (WEI et al, 2006).

4.7.4 Óxido nítrico sintase

A atividade da enzima óxido nítrico sintase nos homogeneizados de aorta foi avaliada medindo-se a conversão da oxihemoglobina (HbO₂) induzida por óxido nítrico em metahemoglobina. O meio para reação era composto de (mmol/L): CaCl₂ 1,8; KCl 2,7; MgCl₂ 0,23; NaCl 137; NaH₂PO₄ 3,6; glicose 5,0; HEPES 10; pH 7,4, contendo 2 mol/L de HbO₂ e 1 mmol/L de L-arginina. A atividade foi expressa em nmol NO/min/mg de proteína (VALDEZ; ZAOBORNÝJ; BOVERIS, 2005).

4.7.5 Medida de níveis de espécies reativas de oxigênio totais (EROS)

Níveis de EROS totais foram medidos usando emissão de fluorescência por diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA), que permeia a membrana e é rapidamente oxidado à 2,7-diclorofluoresceína, altamente fluorescente, na presença de EROS intracelulares. As amostras foram excitadas a 488 nm; a emissão coletada com um filtro de passagem longa de 525 nm e expressa em nmol/mg de proteína (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992).

4.8 Identificação e quantificação de ergotioneína

A extração da ergotioneína foi realizada utilizando o método proposto por Dubost et al. (2007), onde 0,5 g de extrato foram adicionados a 7 ml de solução etanólica fria (10 mMol/L de ditioneitol (DTT) em etanol 70 %, 100 µMol/L betaína em etanol, 100 µMol/L de 2-Mercapto-1-metilimidazol (MMI)

em etanol 70 %) juntamente com 3 ml de água deionizada. Após realizada a mistura, a solução foi colocada sob agitação por 10 segundos. Posteriormente, adicionou-se 2 ml de dodecil sulfato de sódio 1% (m/v) em etanol e agitou-se a solução novamente por 10 segundos. Então, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 3220 g em 5°C. O sobrenadante foi liofilizado e ressuspenso em água deionizada, centrifugado por 1 minuto a 8900 g e filtrado em membranas de poro 0,22 µm; o permeado foi mantido a -20°C.

A ergotioneína foi identificada e quantificada no extrato por cromatografia líquida de alta eficiência. A separação foi realizada em um sistema (Shimadzu, Japão) constituído por bomba quaternária LC-20AD, degaseificador DGU-20A3, forno para coluna CTO-20A e o software LC Solution®. Utilizou-se a coluna Discovery® C18 de 15 cm × 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel do sistema foi composta de 0,7% de fosfato de sódio dibásico (m/v), 3% de acetonitrila (v/v) e 0,1% de trietilamina (v/v) em pH 7,3; o fluxo foi ajustado em 0,4 ml/minuto, a temperatura foi ajustada em 30°C, o volume de injeção em 20µL e o comprimento de onda em 254 nm. A ergotioneína foi identificada com base no tempo de retenção obtido do padrão e a quantificação foi realizada utilizando uma curva padrão com concentrações conhecidas.

4.10 Análise estatística

Para determinação da normalidade foi utilizado o teste de Shapiro-Wilks. Após verificação da normalidade, foi utilizada análise de variância (ANOVA – 1 via) para as análises bioquímicas *in vitro* no tecido cardíaco e nas aortas, seguidas do pós-teste de Tukey para detectar diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Para as análises de reatividade vascular, foi utilizado teste t para detectar diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). As análises foram realizadas usando os softwares

GraphPad Prism 6.0. Os dados estão expressos em média e desvio padrão no caso das análises bioquímicas e média e erro padrão médio para as análises de reatividade vascular.

7 CONCLUSÃO

Em resumo, nossos achados sugerem que o extrato de *P. albidus* promove relaxamento dependente de óxido nítrico em aortas de ratos hígidos. Além disso, o extrato no coração foi capaz de reduzir a lipoperoxidação, além de aumentar as atividades das enzimas catalase e glutathione peroxidase. Já na aorta, o extrato foi capaz de reduzir a lipoperoxidação e a atividade da enzima NADPH oxidase, além de aumentar os níveis de sulfidrilas e óxido nítrico sintase. Esses achados podem estar relacionados aos efeitos antioxidantes do extrato, fornecendo uma proteção aos danos do estresse oxidativo e podem representar uma futura terapia às doenças cardiovasculares. Entretanto, há necessidade de mais estudos para evidenciar os mecanismos de proteção do extrato e testar a capacidade terapêutica do mesmo em modelos de doenças cardiovasculares.

8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Ao comparar o nosso estudo com outros que analisaram os parâmetros oxidativos e a reatividade vascular, temos que levar em conta a questão da metabolização do extrato, pois na maioria dos estudos, os extratos são dados aos animais e no nosso estudo, houve somente a exposição dos órgãos de interesse *in vitro*. Assim, mais estudos se fazem necessários para melhor compreensão dos efeitos do extrato no sistema cardiovascular.

9 PERSPECTIVAS

Estudos futuros focarão no isolamento das moléculas de interesse, para verificar qual delas é responsável pelos efeitos benéficos. Outro objetivo de pesquisas futuras será identificar os mecanismos responsáveis pelos efeitos benéficos do extrato *in vivo*. Além disso, pode-se estudar a combinação dessas moléculas com terapias já existentes, sempre na busca de tratamentos mais eficazes e com custos mais baixos. Também serão buscadas parcerias com empresas para produção em larga escala dos cogumelos comestíveis de interesse desse trabalho. Todos esses passos serão dados para buscar inovações tecnológicas e farmacológicas a fim de reduzir os danos de doenças cardiovasculares, assim visando o desenvolvimento de um produto comercializável. Também será analisada a incubação das artérias com a molécula ergotioneína, para verificação do seu efeito vasodilatador, assim como o efeito do extrato em modelos *in vivo*, como o modelo SHR.

10 REFERÊNCIAS

- ABIDIN, M H Z; ABDULLAH, N; ABIDIN, N Z. Therapeutic properties of Pleurotus species (Oyster mushrooms) for Atherosclerosis: a review. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 6, p. 1251-1261, 2017.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods In Enzymology**, p.121-126, 1984. Elsevier.

- AKANMU, D et al. The antioxidant action of ergothioneine. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 288, n. 1, p. 10-16, 1991.
- AKSENOV, M Y.; MARKESBERY, W R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2-3, p. 141-145, 2001.
- ALLAN BUTTERFIELD, D. Amyloid β -peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. **Free radical research**, v. 36, n. 12, p. 1307-1313, 2002.
- ALVAREZ, Y et al. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. **Journal of hypertension**, v. 23, n. 4, p. 767-777, 2005.
- ARAUJO, A S R et al. The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. **Journal Of Molecular Endocrinology**, v. 41, n. 6, p.423-430, 19 set. 2008. BioScientifica.
- ARUOMA, O I. et al. Antioxidant action of ergothioneine: assessment of its ability to scavenge peroxynitrite. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 231, n. 2, p. 389-391, 1997.
- BAHORUN, T. et al. Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. **Internet Journal of Medical Update**, v. 1, n. 2, p. 25-41, 2006.
- BEATTY, S et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Survey of ophthalmology**, v. 45, n. 2, p. 115-134, 2000.
- BEDARD, K; KRAUSE, K H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.
- BEDIRLI, A et al. Ergothioneine pretreatment protects the liver from ischemia-reperfusion injury caused by increasing hepatic heat shock protein 70. **Journal of Surgical Research**, v. 122, n. 1, p. 96-102, 2004.
- BELLÓ-KLEIN, A et al. Espécies Ativas de Oxigênio como Mediadoras da Hipertrofia e Insuficiência Cardíaca. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v. 3, n. 13, p.1-4, set. 2004.
- BELLÓ-KLEIN, A et al. Oxidative stress and antioxidant strategies in cardiovascular disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.
- BOATENG, S; SANBORN, T. Acute myocardial infarction. **Disease-a-month**, v. 59, n. 3, p.83-96, mar. 2013. Elsevier BV.

BROADLEY, K J.; BROADLEY, H D. Modulation of vascular responses of guinea-pig aorta by non-endothelial nitric oxide: A minor role for the endothelium. **Vascular pharmacology**, v. 121, p. 106580, 2019.

BUEGE, J A.; AUST, S D. [30] Microsomal lipid peroxidation. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1978. p. 302-310.

CARVAJAL, J A. et al. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. **Journal of cellular physiology**, v. 184, n. 3, p. 409-420, 2000.

CASTRO, A L et al. Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction. **Molecular And Cellular Endocrinology**, v. 391, n. 1-2, p.22-29, jun. 2014. Elsevier BV.

CECHINEL FILHO, V; YUNES, R A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 21, n. 1, p. 99-105, Feb. 1998

CERIELLO, A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. **Diabetes care**, v. 31, n. Supplement 2, p. S181-S184, 2008.

CHAN, E C. et al. Adventitial application of the NADPH oxidase inhibitor apocynin in vivo reduces neointima formation and endothelial dysfunction in rabbits. **Cardiovascular research**, v. 75, n. 4, p. 710-718, 2007.

CHATTERJEE, M. et al. Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 53, n. 1, p. 84-93, 2007.

CHATTERJEE, A; CATRAVAS, J D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. **Vascular pharmacology**, v. 49, n. 4-6, p. 134-140, 2008.

CHRISTEN, Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 2, p. 621S-629S, 2000.

CIARCIA, R. et al. Apocynin activity in spontaneously hypertensive rats (SHR): preliminary studies in vivo. **Veterinary research communications**, v. 34, n. 1, p. 83-86, 2010.

DA SILVA, P M. Modulação da função endotelial: um objectivo a prosseguir na terapêutica cardiovascular. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar*, v. 16, n. 4, p. 293-311, 2000.

DATASUS. **Infarto agudo do miocárdio é primeira causa de mortes no País, revela dados do DATASUS**. Disponível em:
<<http://datasus.saude.gov.br/noticias/atualizacoes/559-infarto-agudo-do-miocardio-e-primeira-causa-de-mortes-no-pais-revela-dados-do-datasus>>.

DHALLA, N S.; TEMSAH, R M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of hypertension**, v. 18, n. 6, p. 655-673, 2000.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUBOST, N J et al. Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectroscopy. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 8, n. 3, 2006.

FEDERICO, M P et al. Noções sobre parâmetros farmacocinéticos/farmacodinâmicos e sua utilização na prática médica. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 15, n. 3, p. 201-205, 2017.

FELIPPI, R. **Efeito do extrato aquoso de erva-mate (Ilex paraguariensis) na reatividade vascular: enfoque na aterosclerose experimental**. 2005. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

FERNANDES, A et al. How does electron beam irradiation dose affect the chemical and antioxidant profiles of wild dried Amanita mushrooms? **Food chemistry**, v. 182, p. 309-315, 2015.

FERREIRA, I C F R; BARROS, L; ABREU, R. Antioxidants in wild mushrooms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 12, p. 1543-1560, 2009.

FERREIRA, E S. **EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE Acmella oleracea (L.) R.K.Jansen SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES DE RATOS**. 2018. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia Para A Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2018.

FLOHÉ, L; GÜNZLER, W A. [12] Assays of glutathione peroxidase. **Methods In Enzymology**, p.114-120, 1984. Elsevier.

FÖRSTERMANN, U; SESSA, W C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2011.

FRANZONI, F et al. An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 60, n. 8, p. 453-457, 2006.

FURCHGOTT, R F.; ZAWADZKI, J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **nature**, v. 288, n. 5789, p. 373, 1980.

GALLE, J. Oxidative stress in chronic renal failure. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 16, n. 11, p. 2135-2137, 2001.

GAMBATO, G et al. Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state cultivated macrofungi *Pleurotus albidus* and *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**, v. 207, p.46-51, maio 2016. Elsevier BV.

GAMBATO, G et al. *Pleurotus albidus* Modulates Mitochondrial Metabolism Disrupted by Hyperglycaemia in EA. hy926 Endothelial Cells. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

GANESHPURKAR, A et al. Antioxidant potential of white oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus florida* (higher basidiomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**, v. 17, n. 5, 2015.

GHANI, M A et al. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food chemistry**, v. 230, p. 195-207, 2017.

GIL-LONGO, J; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, C. Characterization of four different effects elicited by H₂O₂ in rat aorta. **Vascular pharmacology**, v. 43, n. 2, p. 128-138, 2005.

GOKCE, G.; ARUN, M. Z. Ergothioneine produces relaxation in isolated rat aorta by inactivating superoxide anion. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 18, n. 21, p. 3339-3345, 2014.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J M C. [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1990. p. 1-85.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs & aging**, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HARTMAN, P E. Ergothioneine as antioxidant. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1990. p. 310-318.

HELLER, R. et al. Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. **Atherosclerosis**, v. 144, n. 1, p. 49-57, 1999.

IKEWUCHI, J C et al. Blood pressure lowering activity of a flavonoid and phytosterol rich extract of the sclerotia of *Pleurotus tuberregium* (Fr) Sing in salt-loaded rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 257-263, 2014.

INCALZA, Maria Angela et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular pharmacology**, v. 100, p. 1-19, 2018.

JAYAKUMAR, T. et al. *Pleurotus ostreatus*, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. **Chemico-Biological Interactions**, v. 176, n. 2-3, p. 108-120, 2008.

JAYAKUMAR, T et al. An extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, increases catalase gene expression and reduces protein oxidation during aging in rats. **Zhong xi yi jie he xue bao= Journal of Chinese integrative medicine**, v. 8, n. 8, p. 774-780, 2010.

JAYAKUMAR, T et al. An extract of the pleurotus *ostreatus* mushroom bolsters the glutathione redox system in various organs of aged rats. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 4, p. 771-778, 2010.

JAYAKUMAR, T; THOMAS, P A; GERALDINE, P. Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. **Experimental gerontology**, v. 42, n. 3, p. 183-191, 2007.

KIM, D et al. The protective effect of hispidin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells through Akt/GSK-3 β and ERK1/2 signaling pathway. **Experimental cell research**, v. 327, n. 2, p. 264-275, 2014.

KIM, G H et al. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Experimental neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325-340, 2015.

KJELDSEN, S et al. Updated national and international hypertension guidelines: a review of current recommendations. **Drugs**, v. 74, n. 17, p. 2033-2051, 2014.

LAM, Y S; OKELLO, E J. Determination of lovastatin, β -glucan, total polyphenols, and antioxidant activity in raw and processed oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus ostreatus* (higher Basidiomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**, v. 17, n. 2, 2015.

LEBEL, C P.; ISCHIROPOULOS, H; BONDY, S C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research In Toxicology**, v. 5, n. 2, p.227-231, mar. 1992. American Chemical Society (ACS).

LI, L. et al. A polysaccharide–peptide complex from abalone mushroom (*Pleurotus abalonus*) fruiting bodies increases activities and gene expression of antioxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in senescence-accelerated mice. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, n. 4, p. 863-869, 2007.

LI, S; SHAH, N P. Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. **Food chemistry**, v. 165, p. 262-270, 2014.

LINCOLN, THOMAS M. et al. Signal Transduction in Smooth Muscle: Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 3, p. 1421-1430, 2001.

LOPES, H F; BARRETO-FILHO, J A S.; RICCIO, G M G. Tratamento não-medicamentoso da hipertensão arterial. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, v. 13, n. 1, p. 148-55, 2003.

LOWRY, O H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUDMER, P L. et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. **New England Journal of Medicine**, v. 315, n. 17, p. 1046-1051, 1986.

MARALDI, T. Natural compounds as modulators of NADPH oxidases. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

MARKLUND, S L. Pyrogallol autoxidation. **Handbook of methods for oxygen radical research**, v. 1985, p. 243-247, 1985.

MARTIN, G. R.; BOLOFO, M. L.; GILES, H. Inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by arginine analogues: a pharmacological analysis of agonist and tissue dependence. **British journal of pharmacology**, v. 105, n. 3, p. 643-652, 1992.

MARTIN, K R. The bioactive agent ergothioneine, a key component of dietary mushrooms, inhibits monocyte binding to endothelial cells characteristic of early cardiovascular disease. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 6, p. 1340-1346, 2010.

MASSICOT, F. et al. Preventive effects of two PAF-antagonists, PMS 536 and PMS 549, on cyclosporin-induced LLC-PK 1 oxidative injury. **Journal of lipid mediators and cell signalling**, v. 15, n. 2, p. 203-214, 1997.

MELO, L G. et al. Endothelium-targeted gene and cell-based therapies for cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 10, p. 1761-1774, 2004.

MENETON, P et al. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. **Physiological reviews**, v. 85, n. 2, p. 679-715, 2005.

MILES, P G.; CHANG, S T. **Mushroom biology: concise basics and current developments**. World Scientific, 1997.

MITSUYAMA, H; MAY, J M. Uptake and antioxidant effects of ergothioneine in human erythrocytes. **Clinical Science**, v. 97, n. 4, p. 407-411, 1999.

MOTOHASHI, N; MORI, I. The role of ergothioneine in the oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by metmyoglobin or methemoglobin. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 5, p. 1702-1707, 1983.

NGUYEN, T K et al. Evaluation of antioxidant, anti-cholinesterase, and anti-inflammatory effects of culinary mushroom *Pleurotus pulmonarius*. **Mycobiology**, v. 44, n. 4, p. 291-301, 2016.

NIELSEN, K C.; OWMAN, C. Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. **Brain Research**, v. 27, n. 1, p. 33-42, 1971.

OBAYASHI, K et al. L-Ergothioneine scavenges superoxide and singlet oxygen and suppresses TNF- α and MMP-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 27, n. 3, p. 191-191, 2005.

OLIVEIRA, S F; LUZ, P L; RAMIRES, J A F. Disfunção vascular no diabetes melito. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v. 8, n. 5, p. 892-901, 1998.

PALMER, R MJ; MONCADA, S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 158, n. 1, p. 348-352, 1989.

PATEL, Y; NARAIAN, R; SINGH, V. K. Medicinal properties of *Pleurotus* species (oyster mushroom): a review. **World Journal of Fungal and Plant Biology**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2012.

PHAM-HUY, L A; HE, H; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International journal of biomedical science: IJBS**, v. 4, n. 2, p. 89, 2008.

PIEPOLI, M F. et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. **European Heart Journal**, v. 37, n. 29, p.2315-2381, 23 maio 2016. Oxford University Press (OUP).

POBER, J S.; COTRAN, R S. The role of endothelial cells in inflammation. **Transplantation**, v. 50, n. 4, p. 537-544, 1990.

PUGSLEY, M. K.; TABRIZCHI, R. The vascular system: An overview of structure and function. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 44, n. 2, p. 333-340, 2000.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os reinos dos fungos**. 2 ed. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2004. 605 p.

RABELO, L A. et al. Desbalanço redox: NADPH oxidase como um alvo terapêutico no manejo cardiovascular. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 94, n. 5, p. 684-693, May 2010.

RATHORE, H; PRASAD, S; SHARMA, S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. **PharmaNutrition**, v. 5, n. 2, p. 35-46, 2017.

- REGLINSKI, J.; SMITH, W. E.; STURROCK, R. D. Spin-echo ¹H NMR detected response of ergothioneine to oxidative stress in the intact human erythrocyte. **Magnetic resonance in medicine**, v. 6, n. 2, p. 217-223, 1988.
- REN, D et al. Antioxidant and antitumor effects of polysaccharides from the fungus *Pleurotus abalonus*. **Chemico-biological interactions**, v. 237, p. 166-174, 2015.
- RICE-EVANS, C; MILLER, N; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends In Plant Science**, v. 2, n. 4, p.152-159, abr. 1997. Elsevier BV.
- ROSA, L.O.; WASUM, R.A.; DILLON, A.J.P. (2016). Macrofungos (Filo Basidiomycota) do Sul do Brasil – levantamento e verificação da capacidade de secreção de enzimas ligninolíticas. 1 ed. Saarbrücken, Deutschland: **Novas edições acadêmicas**. 273p.
- ROUGEE, M. et al. Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity. **Photochemistry and photobiology**, v. 47, n. 4, p. 485-489, 1988.
- SÁNCHEZ, J E.; ROYSE, D J. **La biología y el cultivo de Pleurotus spp.** México, MX: Limusa, 2001.
- SATO, M et al. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 31, n. 6, p. 1289-1297, 1999.
- SCHNEIDER, C D; OLIVEIRA, A R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte. São Paulo, BR. Vol. 10, n. 4 (jul./ago. 2004), p. 308-313.**, 2004.
- SINGLETON, V L.; ROSSI, J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- SOBRATTEE, M A et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1-2, p. 200-213, 2005.
- SOCCIO, M et al. Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD (P) H oxidase and its genetic variants. **European journal of clinical investigation**, v. 35, n. 5, p. 305-314, 2005.
- STOCLET, J. C. et al. Induction of nitric oxide synthase and dual effects of nitric oxide and cyclooxygenase products in regulation of arterial contraction in human septic shock. **Circulation**, v. 100, n. 2, p. 107-112, 1999.

- SUN, Y; HU, X; LI, W. Antioxidant, antitumor and immunostimulatory activities of the polypeptide from *Pleurotus eryngii* mycelium. **International journal of biological macromolecules**, v. 97, p. 323-330, 2017.
- TABERNERO, A; GIRALDO, J; VILA, E. Effect of NG-nitro-L-arginine methylester (L-NAME) on functional and biochemical alpha 1-adrenoceptor-mediated responses in rat blood vessels. **British journal of pharmacology**, v. 117, n. 4, p. 757, 1996.
- THOMAS, P A; GERALDINE, P; JAYAKUMAR, T. *Pleurotus ostreatus*, an edible mushroom, enhances glucose 6-phosphate dehydrogenase, ascorbate peroxidase and reduces xanthine dehydrogenase in major organs of aged rats. **Pharmaceutical biology**, v. 52, n. 5, p. 646-654, 2014.
- TOPOUZIS, S.; SCHOTT, C.; STOCLET, J. C. Participation of endothelium-derived relaxing factor and role of cyclic GMP in inhibitory effects of endothelium on contractile responses elicited by alpha-adrenoceptor agonists in rat aorta. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 18, n. 5, p. 670-678, 1991.
- TSUTSUMI, T et al. Modulation of the myocardial redox state by vagal nerve stimulation after experimental myocardial infarction. **Cardiovascular Research**, v. 77, n. 4, p.713-721, 7 dez. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvm092>.
- VALDEZ, L B.; ZAORBORNÝ, T; BOVERIS, A. Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase. **Methods in enzymology**, v. 396, p. 444-455, 2005.
- VALKO, M et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VANHOUTTE, P M. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. **Hypertension**, v. 13, n. 6_pt_2, p. 658-667, 1989.
- VASCONCELOS, S M L et al. Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirevisão. **Rev Bras Hipertens**, v. 14, n. 4, p. 269-74, 2007.
- WEI, Y et al. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 35137-35146, 2006.
- WILLIAMS, H C.; GRIENGLING, K K. NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents?. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 9-16, 2007.
- YAHAYA, N F M; RAHMAN, Mohammad Azizur; ABDULLAH, Noorlidah. Therapeutic potential of mushrooms in preventing and ameliorating

hypertension. **Trends in food science & technology**, v. 39, n. 2, p. 104-115, 2014.

YAMAGUCHI, T et al. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 62, n. 6, p. 1201-1204, 1998.

YAN, B; JING, L; WANG, J. A polysaccharide (PNPA) from *Pleurotus nebrodensis* offers cardiac protection against ischemia–reperfusion injury in rats. **Carbohydrate polymers**, v. 133, p. 1-7, 2015.

ZHANG, F et al. BNC protects H9c2 cardiomyoblasts from H₂O₂-induced oxidative injury through ERK1/2 signaling pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

ZHANG, J et al. Purification and antioxidant activities of intracellular zinc polysaccharides from *Pleurotus cornucopiae* SS-03. **Carbohydrate polymers**, v. 111, p. 947-954, 2014.

ZUBERBIER, T.; LÖTVALL, J. Action plan for the global strategy for the prevention and control of non communicable diseases. **Prevent and control cardiovascular diseases, cancers, chronic respiratory diseases, diabetes (2008)**. URL: www.who.int/nmh/Actionplan-PC-NCD-2008.pdf, 2013.