ÂNGELO BERNAK DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA
VASODILATAÇÃO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO EM AORTA DE
CAMUNDONGOS TRATADOS COM ISOPROTERENOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

ÂNGELO BERNAK DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA
VASODILATAÇÃO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO EM AORTA DE
CAMUNDONGOS TRATADOS COM ISOPROTERENOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Oliveira, Ângelo Bernak de.

Avaliação dos mecanismos envolvidos na vasodilatação dependente do endotélio em aorta de camundongos tratados com isoproterenol / Ângelo Bernak de Oliveira. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia vascular.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the mechanisms involved on the endothelium-dependent vasodilation in aorta of isoproterenol-treated mice.

1. Vasodilatação dependente endotélio 2. Receptor β -adrenérgico
3. Cavéola 4. Óxido nítrico 5. Peróxido de hidrogênio 6. Defesa antioxidante I. Rossoni, Profa. Dra. Luciana Venturini II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0205/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ângelo Bernak de Oliveira.

Título da Dissertação: Avaliação dos mecanismos envolvidos na vasodilatação dependente do endotélio em aorta de camundongos tratados com isoproterenol.

Orientador(a): Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

— () **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **119** nas fls. **109** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Luciana Venturini Rossoni**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Papel das cavéolas na vasodilatação à acetilcolina em aorta de animais tratados com isoproterenol*" do qual participam o(s) aluno(s) **Ângelo Bernak de Oliveira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **20.09.2011, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 22 de setembro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

*Aos meus pais, Francisco e Luzia, pela
minha criação, motivação e amparo.*

*À minha irmã, Débora, pelo companherismo,
apoio e momentos de reflexão.*

*À minha cachorra, Cacao, pelo amor
incondicional, travessuras e mais
travessuras.*

AGRADECIMENTOS

À Ana Paula, Camilla, Gisele, Helane e Profa. Luciana pelas boas-vindas e suporte no Laboratório de Fisiologia Vascular.

À Ana Paula Davel e Luciana pelo auxílio no desenvolvimento e execução do projeto ao longo desses três anos.

À Camilla F. Wenceslau, Milene Malheiros e Suliana Mesquita, eu tenho grande admiração pelos seus princípios, companherismo e profissionalismo.

Ao Aldair, Beatriz², Camilla, Carolina, Karilane, Laís, Leonardo, Jeniffer, Paulo, Pedro, Priscilla, Rafael, Suliana, Samuel, Marina e Milene pelos momentos de descontração e terapia em grupo (rs).

À galera de outros laboratórios como: Adilson, Aline, Ariane, Angela, Aninha, Carla, Cecília, Cida, Daniela, Fernanda, Fernando, Isabella, Regiane, Michelle, Nátalía, Laís, Lucila, Jamaira, Simone, Laiali, Leila e Tássia.

Aos professores que diretamente ou indiretamente contribuíram para minha formação pessoal e profissional: Alexandre, Luiz R. G. Britto, Antonio C. Cassola, Maria Cecília P. Brandt, Douglas Mascara, Dilma, Eliana Akamine, Fernando Abdulkader, Luciana V. Rossoni, Sandra, Maria², Marly Rosinha, Gerhad Malnic, Marcus, Mitsui, Moacir Wu, Nancy A. Rebouças, Nelson A. L. Maciel, Priscila Rosa, Rose Rosa, Santina C. Morini, Vagner R. Antunes, Vítor O. Miranda, Vivian Schmidt e Welington L. Araujo.

Aos amigos de longa data: Adriessa, Aninha, Aurélio, Bruna, Bruno, Carlão, Dani, Denis, Elton, Goretti, Julia, Juninho, Karla, Luciana, Manoel, Marco, Rafinha, Renata, Rodolfo, Jéssica, Walter.

Aos amigos do Thales, Aparecida Rahal, Estrela Guia e Universida de Mogi das Cruzes, são tantos!!!

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas/USP, Faculdade de Medicina/USP, Escola de Educação Física e Esporte/USP; principalmente ao Vilson, Patrícia, Tarcisio, José Maria, Paloma, Leila, Itamar, Socorro, Leonardo, Ney e a mascote Lassie.

À todas as pessoas que fizeram e fazem parte da minha vida, ao espírito suburbano e as ideologias por trás da música que vivenciei!

Apoio Financeiro: CAPES, CNPq e FAPESP.

"Não ande atrás de mim, talvez eu não saiba liderar. Não ande na minha frente, talvez eu não queira segui-lo. Ande ao meu lado, para podermos caminhar juntos."

Provérbio Ute

RESUMO

OLIVEIRA, A. B. **Avaliação dos mecanismos envolvidos na vasodilatação dependente do endotélio em aorta de camundongos tratados com isoproterenol**. 2013. 66f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A hiperativação dos receptores β -adrenérgicos (β -AR) pode ser mimetizada pelo tratamento com isoproterenol (ISO), agonista não-seletivo β -AR, o qual resulta em: hipertrofia cardíaca e aumento da resposta contrátil à fenilefrina e serotonina, estresse oxidativo, aumento da atividade e expressão proteica das isoformas da sintase de óxido nítrico (NOS) endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), assim como da expressão proteica da caveolina-1; porém, sem alterar a vasodilatação dependente do endotélio à acetilcolina (ACh) em aorta de ratos e camundongos. Sabe-se que as caveolinas-1 e -3 são proteínas da cavéola que modulam a atividade das NOS constitutivas. Por sua vez, a nNOS é uma importante fonte geradora de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual induz vasodilatação na aorta de camundongos. Assim, o objetivo da presente dissertação foi investigar os mecanismos envolvidos na vasodilatação dependente do endotélio, focando no papel das cavéolas e na possível interação entre a eNOS/ óxido nítrico (NO) e nNOS/ H_2O_2 em aorta de camundongos tratados com ISO. Para tal, camundongos adultos, machos, da linhagem C57BL/6J, e nocautes para a nNOS, foram tratados com ISO ($15 \text{ mg.kg.dia}^{-1}$, s.c.) ou veículo por sete dias. Anéis de aorta foram montados em banho de órgãos para medida de tensão isométrica. A expressão das proteínas-alvo foi avaliada a partir da técnica de *Western blot*. Os resultados demonstraram que o tratamento com ISO: **1)** induz hipertrofia cardíaca e não modifica nem a vasodilatação à ACh nem ao doador de NO; **2)** aumenta a dependência do microdomínio das cavéolas na resposta vasodilatadora à ACh e ao ionóforo de cálcio e a expressão proteica da caveolina-1, mas não da caveolina-3; **3)** aumenta a modulação das NOS constitutivas, principalmente via nNOS, à ACh; **4)** aumenta a participação do H_2O_2 na vasodilatação à ACh, e **5)** aumenta a expressão de proteínas antioxidantes, como a catalase e as isoformas da superóxido dismutase. Assim, os resultados sugerem que mecanismos compensatórios, como a interação entre eNOS/ caveolina-1, bem como a geração de H_2O_2 via nNOS, os quais contribuem para a manutenção da vasodilatação dependente do endotélio em aorta de camundongos tratados com ISO.

Palavras-chave: Vasodilatação dependente endotélio. Receptor β -adrenérgico. Cavéola. Óxido nítrico. Peróxido de hidrogênio. Defesa antioxidante.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A. B. **Evaluation of the mechanisms involved on the endothelium-dependent vasodilation in aorta of isoproterenol-treated mice.** 2013. 66 p. Masters thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Hyperactivation of β -adrenoceptor (β -AR) induced by isoproterenol-treatment (ISO), a non-selective agonist of β -AR, results in: cardiac hypertrophy and increased contractile response to phenylephrine and serotonin, oxidative stress, increased activity and protein expression of the nitric oxide synthase isoforms (NOS), endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS), as well as caveolin-1 protein expression; however, did not change the endothelium-dependent vasodilation to acetylcholine (ACh) in aorta of rats and mice. It is known that caveolin-1 and -3 are caveolae's proteins that modulate the activity of constitutive NOS. On the other hand, nNOS is an important source of hydrogen peroxide (H_2O_2), which induces aortic vasodilation in mice. The aim of this study was to investigate the mechanisms involved on the endothelium-dependent vasodilation, focusing on the role of caveolae and the possible interaction between eNOS/ nitric oxide (NO) and nNOS/ H_2O_2 in aorta of ISO-treated mice. For this, male mice, C57BL/6J strain and nNOS knockout were treated with ISO ($15 \text{ mg.kg.day}^{-1}$, s.c.) or vehicle for seven days. Aortic rings were mounted in an organ bath for measurement of isometric tension. The expression of proteins was evaluated using Western blot. The results demonstrated that ISO treatment: **1)** induces cardiac hypertrophy and did not change ACh- or NO donor-induced relaxation; **2)** increases the caveolae participation in ACh- and calcium ionophore-induced relaxation and caveolin-1 protein expression, while did not change caveolin-3; **3)** increases the constitutive NOS modulation to ACh-induced relaxation, mainly through nNOS; **4)** increases the H_2O_2 involvement on the vasodilation-induced to ACh; and **5)** increases the antioxidant proteins expression such as catalase and superoxide dismutase isoforms. Taken together, the results suggest that compensatory mechanisms such as the interaction between eNOS/ caveolin-1 in caveolae microdomain, as well as the generation of H_2O_2 via nNOS may contribute to the maintenance of endothelium-dependent vasodilation of the aorta ISO-treated mice.

Keywords: Endothelium-dependent vasodilation. β -adrenoceptor. Caveolae. Nitric oxide. Hydrogen peroxide. Antioxidant defense.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da liberação de fatores vasodilatadores derivados do endotélio vascular.	16
Figura 2 – Massa corpórea e índice de hipertrofia cardíaca em camundongos selvagem da linhagem C57BL/6J, tratados ou não com isoproterenol por sete dias.....	38
Figura 3 – Curva concentração-resposta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica provenientes de animais selvagem da linhagem C57BL/6J, tratados ou não com isoproterenol.	39
Figura 4 – Curva concentração-resposta à acetilcolina e ao ionóforo de cálcio A23187 em anéis de aorta torácica provenientes de animais selvagem da linhagem C57BL/6J, tratados ou não com isoproterenol, após a destruição da cavéola.	40
Figura 5 – Expressão proteica da caveolina-1 e caveolina-3 em aorta torácica de camundongos selvagens da linhagem C57BL/6J, tratados ou não com isoproterenol.....	41
Figura 6 – Curva concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta torácica provenientes de animais selvagem da linhagem C57BL/6J ou tratados com isoproterenol por sete dias, na presença do inibidor não seletivo da sintase de óxido nítrico ou na presença do inibidor seletivo da sintase de óxido nítrico neuronal.	43
Figura 7 – Expressão proteica da sintase de óxido nítrico endotelial e neuronal em aorta torácica de camundongos selvagens da linhagem C57BL/6J, tratados ou não com isoproterenol.....	44
Figura 8 – Curva concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta torácica provenientes de animais selvagem da linhagem C57BL/6J ou tratados com isoproterenol, após dismutar o H ₂ O ₂ em H ₂ O e O ₂ com a catalase.	45
Figura 9 – Expressão protéica da catalase e das isoformas da superóxido dismutase em aorta torácica de camundongos selvagens da linhagem C57BL/6J (C57), tratados ou não com isoproterenol.	47
Figura 10 – Curva concentração-resposta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica provenientes de camundongos nocautes homozigotos do gene da isoforma neuronal da sintase de óxido nítrico, tratados ou não com isoproterenol.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ω – ômega
 α – alfa
 β – beta
7-NI – 7-nitroindazole
ACh – acetilcolina
AKT – proteína quinase B
AMPc – monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA – análise de variância
AR - adrenérgico
dAUC – diferença da área abaixo da curva
BK_{Ca} - canais para potássio ativados por cálcio
C57 – grupo de camundongos controle ou veículo
C57 ISO – grupo de camundongos tratados com isoproterenol
Ca²⁺ – íon cálcio
Ca²⁺-ATPase – bomba de cálcio
Ca/CAM – complexo cálcio-calmodulina
CaM – calmodulina
CEUA - Comissão de ética no uso de animal
CD – β -metil-ciclodextrina
COX – ciclooxigenase
DAG - diacilglicerol
DETCA – dietilditiocarbamato de sódio trihidratado
DMSO – dimetilsulfóxido
E+ – endotélio intacto
EDHF – fator hiperpolizante derivado do endotélio
EDRF – fator derivado do endotélio
eNOS – isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico
EPM – erro padrão da média
FAD – flavina adenina dinucleotídeo
FMN- flavina mononucleotídeo
GCs – guanilato ciclase solúvel
GMPc – monofosfato de guanosina cíclico
GTP – guanosina trifosfato
G_{as} – proteína G estimulatória alfa-s
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
IHC – índice de hipertrofia cardíaca
iNOS- isoforma induzível da sintase de óxido nítrico
ISO – isoproterenol
IP₃ – 1,4,5-trifosfatidilinositol
K⁺ - íon potássio
K_{ATP} – canais para potássio sensíveis a ATP
KCl – cloreto de potássio
K_v – canais para potássio sensíveis a voltagem
L-NAME - N ω -nitro-L-arginina metil ester hidrocloreto
M₃ – receptor muscarínico subtipo 3
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
eNOS – isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico

nNOS^{-/-} – camundongos nocautes para o gene nNOS
nNOS – isoforma neuronal da sintase de óxido nítrico
NO – óxido nítrico
NOS – sintase de óxido nítrico
NPS – nitroprussiato de sódio
O₂⁻ - ânion superóxido
ONOO⁻ - peroxinitrito
PGI₂ – prostaciclina
PIP₂ – fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA – proteína quinase A
PKB – proteína quinase B
PKC – proteína quinase C
PKG – proteína quinase G
PLC – fosfolipase C
RPM – rotações por minuto
SBCAL – Sociedade brasileira de ciência de animais de laboratório
s.c. – injeção subcutânea
SDS-PAGE – dodecil sulfato de sódio
Ser – resíduo serina
SOD – superóxido dismutase
Src – tirosina quinase não associada a receptor
Tyr – tirosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Vasodilatação dependente do endotélio	15
1.2 Estresse oxidativo e defesa antioxidante	20
1.3 Receptor adrenérgico e sistema cardiovascular	22
2 OBJETIVO	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Animais	29
3.1.1 Camundongos	29
3.1.2 Modelo animal de experimentação	29
3.2 Experimentos de reatividade vascular	30
3.2.1 Contração induzida por cloreto de potássio	31
3.2.2 Avaliação da viabilidade funcional do endotélio vascular nos anéis de aorta	31
3.2.3 Avaliação da modulação endotelial sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio induzida pela ACh	31
3.2.4 Vasodilatação independente do endotélio induzida pelo nitroprussiato de sódio	32
3.2.5 Vasodilatação dependente do endotélio induzida pelo ionóforo de cálcio A23187	32
3.2.6 Vasodilatação dependente e independente do endotélio em anéis de aorta proveniente de camundongos <i>nNOS</i> ^{-/-}	33
3.3 Expressão proteica pela técnica de <i>Western blot</i>	33
3.4 Reagentes e diluições	35
3.5 Análise estatística	35
4 RESULTADOS	37
4.1 Modelo animal de experimentação	38
4.1.1 Massa corpórea e índice de hipertrofia cardíaca	38
4.2 Experimento de reatividade vascular e <i>Western blot</i>	38
4.2.1 Contração induzida pelo KCl	38
4.2.2 Vasodilatação dependente e independente do endotélio	39
4.2.3 Modulação da cavéola na resposta vasodilatadora induzida pela ACh	39
4.2.4 Expressão proteica da caveolina-1 e caveolina-3	41
4.2.5 Modulação das isoformas constitutivas da NOS na resposta vasodilatadora induzida pela ACh	42
4.2.6 Expressão proteica das isoformas endotelial e neuronal da NOS	44
4.2.7 Modulação do H ₂ O ₂ na resposta vasodilatadora induzida pela ACh	45
4.2.8 Expressão proteica da catalase e das isoformas da superóxido dismutase	46
4.2.9 Modulação da vasodilatação dependente e independente do endotélio em anéis de aorta provenientes de camundongos nocautes para a isoforma <i>nNOS</i>	48
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

Em mamíferos, o sistema cardiovascular é um circuito fechado, constituído pelo coração e vasos sanguíneos, que permite à oxigenação, a nutrição, a remoção de metabólitos, o transporte e a liberação de hormônios e peptídeos vasoativos; necessários para homeostase dos diferentes sistemas (BORON; BOULPAEP, 2009; CURI; PROCÓPIO, 2009). No sistema cardiovascular, tanto o componente cardíaco representado pelo débito cardíaco, como o componente vascular representado pela resistência vascular periférica são determinantes para a manutenção e controle da pressão arterial (BORON; BOULPAEP, 2009; CURI; PROCÓPIO, 2009). O componente vascular, por sua vez, redireciona o fluxo sanguíneo para os diversos territórios, regulando o raio dos vasos sanguíneos ou tônus vascular via mecanismos locais, hormonais e neurais (BORON; BOULPAEP, 2009; CURI; PROCÓPIO, 2009). Nos vasos sanguíneos as células endoteliais desempenham um papel importante no controle do tônus do músculo liso vascular, sintetizando e liberando fatores vasodilatadores – como o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) – além de fatores vasoconstritores – como a endotelina, as prostaglandinas, a angiotensina II e as espécies reativas derivadas do oxigênio (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 1988; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; MONCADA; VANE, 1979; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1988; MONCADA et al., 1977; PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987; TAYLOR; WESTON, 1988; VANHOUTTE; MOMBOULI, 1996).

O desequilíbrio na liberação de fatores vasodilatadores e vasoconstritores podem estar associados ao processo de envelhecimento e/ou a patologias que acometem o sistema cardiovascular como a hipertensão arterial e insuficiência cardíaca, reduzindo a resposta vasodilatadora e/ou potencializando a resposta contrátil nos vasos sanguíneos (GURDAL; FRIENDMAN; JOHNSON, 1995; GRAHAM; RUSH, 2009; KANG et al., 2007; KOGA et al., 1989).

1.1 Vasodilatação dependente do endotélio

As células do endotélio vascular sintetizam e liberam fatores vasodilatadores que agem diretamente nas células do músculo liso, regulando o tônus vascular em resposta a substâncias neurohumorais, como as catecolaminas e bradicinina, e a estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento (Figura 1) (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 1988; FURCHGOTT, 1983; FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989;

FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; MONCADA et al., 1977; MONCADA; VANE, 1979; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987; PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988;; VANHOUTTE; MOMBOULI, 1996; TAYLOR; WESTON, 1988).

Figura 1 – Representação esquemática da liberação de fatores vasodilatadores derivados da ativação das células endoteliais via receptor de membrana ou via tensão de cisalhamento “*shear stress*”. Modificado de MATOBA; SHIMOKAWA, 2003.

+: estimula; agonist: agonista; AMPc: adenosina monofosfato; arachidonic acid: ácido araquidônico; PLA₂: fosfolipase A₂; Ca²⁺/CaM: complexo cálcio-calmodulina; Cu/Zn-SOD: isoforma cobre/zinco da enzima superóxido dismutase; Endothelium: endotélio; eNOS: isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico; EETs: ácido epoxieicosatrienoico; EOX: epoxigenases do citocromo P-450; gap junction: junção comunicante; G_{i/o}: subunidade inibitória proteína G; G_q: subunidade proteína G; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; HETEs: ácidos hidroieicosatetraenoicos; hyperpolarization: hiperpolarização; K⁺: íon potássio; Kir: canal potássio retificador; K_{Ca}: canal potássio de alta condutância; L-arginine: L-arginina; LOX: lipoxigenase; LT: leucotrieno; Na⁺: íon sódio; NO: óxido nítrico; O₂: oxigênio; O₂⁻: ânion superóxido; ONOO⁻: peróxido nitrito; oxidases: oxidases; PGI₂: prostaciclina; pump: bomba de Na⁺/K⁺; receptor: receptor; shear stress: estresse de cisalhamento; vascular smooth muscle: músculo liso vascular.

Dentre os fatores vasodilatadores liberados pelo endotélio podemos citar o NO. O NO é sintetizado pelas isoformas da sintase de óxido nítrico (NOS) endotelial (eNOS; tipo III), neuronal (nNOS; tipo I) e induzível (iNOS; tipo II) (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1988). A NOS para sintetizar o NO utiliza como substrato o aminoácido L-arginina e a molécula de oxigênio, além de necessitar de cofatores como a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), dinucleotido de flavina e adenina (FAD), mononucleotido de flavina (FMN) e tetrahydrobiopterina (BH4) para transferência de elétrons do domínio oxidase para o domínio redutase da enzima

(FÖRSTERMANN, 2010; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). Dentre as três isoformas da NOS, a eNOS e a nNOS são constitutivas, dependentes do aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} para formação do complexo Ca^{2+} /calmodulina (Ca/CAM) e sua ativação (Figura 1); enquanto a iNOS, a isoforma induzível, não depende do aumento da concentração de Ca^{2+} , pois, a concentração intracelular basal de Ca^{2+} é o suficiente para a síntese de NO, mas essa isoforma depende de fatores pro-inflamatório para sua ativação, como as interleucinas (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; KNOWLES; MONCADA, 1994; SCHMIDT; ALP, 2007).

Fisiologicamente, a tensão de cisalhamento, em resposta ao aumento de fluxo sanguíneo, favorece o aumento intracelular de Ca^{2+} por estimular canais para Ca^{2+} sensíveis a estiramento (FLEMING, 2010; MATOBA; SHIMOKAWA, 2003). A tensão de cisalhamento aumenta a probabilidade de abertura dos canais para Ca^{2+} permitindo o seu influxo, conseqüentemente, favorece a formação do complexo Ca/CAM e ativação da eNOS nas células endoteliais. Manobras experimentais *in vitro* em vasos sanguíneos isolados de animais ou humanos são utilizadas para avaliar a função das células endoteliais, favorecendo o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} dependente e independente de receptores de membrana, por exemplo, na vasodilatação induzida pela ACh ou pelo ionóforo de cálcio A23187, respectivamente. O ionóforo de cálcio A23187, por sua vez, desencadeia seus efeitos de forma direta nas células endoteliais por permear a membrana celular; enquanto, a ACh ativa o receptor muscarínico (M_3) que está associado a uma proteína G_q que ativa uma cascata de sinalização intracelular via fosfolipase C (PLC) (BÉNY et al., 2008; TRACEY; PEACH, 1992). A ativação da PLC permite que o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) seja hidrolizado em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). O IP_3 liga-se ao receptor de IP_3 localizado no retículo sarcoplasmático e favorece a liberação de Ca^{2+} no meio intracelular (BÜLBRING; TOMITA, 1987; LIU; RUDICK; ANDERSON, 2002). O aumento da concentração de Ca^{2+} permite a formação do complexo Ca/CAM necessário para processo de síntese de NO pela eNOS e nNOS (Figura 1) (FÖRSTERMAN, 2010; FÖRSTERMAN; SESSA, 2012). Parte da síntese de NO pelas NOS pode ser proveniente de diferentes compartimentos celulares nas células endoteliais, a maior densidade e atividade da eNOS está associada a proteínas de vesículas endocíticas, como no complexo de Golgi e no microdomínio lipídico das cavéolas na membrana celular,

tais compartimentos são determinantes para síntese de NO (SESSA et al., 1995; ANDERSON, 1998; SHAUL; ANDERSON, 1998).

O NO um gás de meia-vida curta, possui alto coeficiente de difusão, o que favorece sua difusão através da bicamada lipídica da membrana celular do endotélio vascular para as células do músculo liso (KNOWLES; MONCADA, 1994). No músculo liso, o NO ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs), a qual converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Os níveis elevados de GMPc favorecem a ativação da proteína quinase G (PKG) que reduz a afinidade dos filamentos contráteis sensíveis ao Ca^{2+} , aumenta a extrusão de Ca^{2+} do músculo liso vascular e aumenta a recaptação do Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático, reduzindo a concentração intracelular de Ca^{2+} (IGNARRO, 1999; IGNARRO et al., 1987; KARAKI et al., 1997; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Adicionalmente, tanto o NO como a PKG tem parte dos seus efeitos desencadeados por atuarem diretamente em canais para K^+ na membrana, aumentando a condutância desse íon pelo canal e promovendo a hiperpolarização das células do músculo liso, que reduz a probabilidade de abertura de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (BOLZ et al., 2003; ETTER et al., 2001; SURKS et al., 1999). Assim, a somatória dos efeitos desencadeados pelo NO no músculo liso vascular resulta em uma potente vasodilatação (Figura 1) (BOLZ et al., 2003; ETTER et al., 2001; SURKS et al., 1999).

Dentre os compartimentos celulares, as cavéolas são regiões da membrana celular enriquecida com colesterol, as quais se invaginam para o citoplasma em forma de Ω (ômega) (ANDERSON, 1998; TAGGART, 2001). Diversos papéis funcionais foram descritos para as cavéolas, tais como a regulação do transporte de macromoléculas e de colesterol, do volume celular, da homeostase de Ca^{2+} e principalmente da sinalização celular, dentre outras funções (TAGGART, 2001). Na década de 1990 foi descrito pela primeira vez uma família de proteínas críticas para a formação e estabilização das cavéolas, as caveolinas, as quais podem interagir com uma variedade de moléculas envolvidas na sinalização intracelular, regulando as vias de sinalização de receptores de membrana associados a proteínas G e a atividade de enzimas, como a AC, a PKA e a eNOS, as quais são determinantes para os mecanismos de regulação do tônus vascular (GARCÍA-CARDEÑA et al., 1996; PATEL; MURRAY; INSEL, 2008). Os mamíferos apresentam três isoformas da caveolina, denominadas caveolina-1, -2 e -3 (ANDERSON, 1998). Cabe destacar,

que a caveolina-1 é determinante para estrutura e função da cavéola na membrana de células endoteliais, músculo liso e músculo estriado cardíaco (ANDERSON, 1998). Nas células endoteliais, a caveolina-1 interage com a eNOS mantendo a enzima em seu estado inativo (GARCÍA-CARDEÑA et al., 1996; JU et al., 1997). A desassociação da eNOS com a caveolina-1 acontece quando a eNOS é sensibilizada pela fosforilação de sítios estimulatórios, como no resíduo de aminoácido serina 1177 ou pelo aumento da afinidade da enzima com o complexo Ca/CAM, mantendo a eNOS passível de ativação para a síntese de NO (FERON et al., 1996; GRATTON et al., 2000; FLEMING, 2010;). A importância da eNOS localizada nas cavéolas para a vasodilatação dependente do endotélio foi reforçada pelo estudo de Linder et al. (2005), no qual os autores demonstraram que a vasodilatação dependente do endotélio induzida pela ACh, em aorta de ratos, foi prejudicada após a destruição das cavéolas com a incubação *in vitro* de β -metil-ciclodextrina (CD), uma substância depletora de colesterol. Além disso, as enzimas PKA e GCs estão colocalizadas com a caveolina-1, essa associação é de fundamental importância para a ação do NO, além de ser determinante para ativação de outros mecanismos vasodilatadores, tanto nas células endoteliais, como nas células do músculo liso vascular (LINDER et al., 2005).

Outro fator vasodilatador liberado pelas células endoteliais é o EDHF. Diversos estudos têm especulado a natureza dos EDHFs, os quais promovem hiperpolarização das células de músculo liso vascular independente dos efeitos hiperpolarizantes do NO e da PGI_2 (SHIMOKAWA, 2010). Dentre os EDHFs conhecidos, podemos citar o K^+ que promove hiperpolarização das células de músculo liso vascular por ativar canais reficadores para K^+ e/ou a Na^+/K^+ -ATPase (EDWARDS et al., 1998); o endotélio vascular, liberando produtos do ácido araquidônico, como ácido epoxieicosatrienoico (FISSLTHALER et al., 1999; QUILLEY; MCGRUFF, 2000); e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzido pela dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelas isoformas da superóxido dismutase (SOD) (ELLIS; TRIGGLE, 2003; FORSTERMAM, 2010; GUTTERMAN; MIURA; LIU, 2005; SHIMOKAWA; MATOBA, 2004; MATOBA; SHIMOKAWA, 2003; MATOBA et al., 2000; MATOBA et al., 2002; MATOBA et al., 2003).

Nos últimos 10 anos, o H_2O_2 foi caracterizado como um importante fator derivado do endotélio (EDRF) em artérias de camundongos e artéria mesentérica de resistência de humanos (CAPETTINI et al., 2008; MATOBA; SHIMOKAWA, 2003;

MATOBA et al., 2003; MATOBA et al., 2002; MATOBA et al., 2000). Os efeitos do H_2O_2 ocorrem diretamente em canais de alta condutância para K^+ sensíveis a Ca^{2+} (BK_{Ca}) (BÉNY et al., 2008; ELLIS; TRIGGLE, 2003). O aumento da condutância de canais BK_{Ca} favorece o efluxo de K^+ que hiperpolariza a célula de músculo liso vascular, mantendo o potencial de membrana por mais tempo negativo (aproximadamente -60 mV), favorecendo a vasodilatação (Figura 1) (BARLOW; WHITTE, 1998; BÉNY et al., 2008; ELLIS; TRIGGLE, 2003; MATOBA et al., 2000; MATOBA et al., 2003).

Além da via clássica de produção de H_2O_2 pelas isoformas da SOD, dados da literatura têm demonstrado que a eNOS e a nNOS também podem ser importantes fontes geradoras de H_2O_2 em aorta de camundongos (CAPETTINI et al., 2008; MATOBA; SHIMOKAWA, 2003). Estudos têm demonstrado que o H_2O_2 parece desempenhar um papel tão importante quanto o NO na regulação do tônus vascular em promover vasodilatação (SHIMOKAWA, 2010). Em artéria mesentérica de resistência de camundongos transgênicos, cujo gene da eNOS foi removido (camundongos nocautes eNOS^{-/-}), o prejuízo do relaxamento dependente do endotélio induzido pela ACh via NO, foi compensando pela ação do H_2O_2 (MATOBA et al., 2000). Sabendo que o H_2O_2 é um importante EDRF em aorta de camundongos, possivelmente em situações que existam aumentos nos níveis de $O_2^{\cdot-}$ e redução da síntese de NO, há a possibilidade de mecanismos compensatórios, como a produção de H_2O_2 contrabalancear a diminuição da vasodilatação dependente do endotélio pela ação do NO. Assim, observa-se a necessidade de investigar a relação entre estresse oxidativo, defesa antioxidante e a produção de H_2O_2 como um mecanismo vasodilatador compensatório dependente do endotélio em aorta de camundongos.

1.2 Estresse oxidativo e defesa antioxidante

O estresse oxidativo consiste no desequilíbrio entre a geração e degradação de espécies reativas por enzimas oxidantes e antioxidantes, respectivamente (FÖURSTERMANN, 2010). O endotélio vascular além de sintetizar e liberar fatores vasodilatadores e vasoconstritores, também pode gerar espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio, por exemplo, o $O_2^{\cdot-}$ produzido pela COX, lipoxigenase, P-450 monoxigenase, eNOS desacoplada e NADPH oxigenase; o peróxido de nitrito

(ONOO⁻) produzido a partir da reação entre o O₂⁻ e NO; e o H₂O₂ produzido a partir da dismutação do O₂⁻ pela SOD, como esquematizado na Figura 1 (FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2010; FÖURSTERMANN; MÜNZEL, 2006; FÖURSTERMANN; SESSA, 2012; FÖURSTERMANN, 2010; KATUSIC, 1996). Em contrapartida, a defesa antioxidante representada pela SOD, glutathiona peroxidase, catalase, dentre outras enzimas, mantém as espécies reativas dentro de níveis controlados (FÖURSTERMANN, 2010).

Dentre os efeitos deletérios do estresse oxidativo, podemos citar o aumento dos níveis de ONOO⁻, uma espécie reativa capaz de oxidar o cofator BH₄ necessário para síntese de NO (FÖURSTERMANN, 2010; SHIMIDT et al., 2007). A oxidação do BH₄ pode acarretar o desacoplamento da eNOS que prejudica o processo de redução de oxigênio durante a síntese de NO, desviando o fluxo de elétrons e liberando grandes quantidades de O₂⁻ (KATUSIC; D'USCIO; NATH, 2009; LANDMESSER et al., 2003). O excesso de O₂⁻ liberado pelo desacoplamento da NOS reduz a biodisponibilidade de NO. Além disso, a redução do substrato L-arginina ou aumento da atividade da arginase, enzima que degrada a L-arginina, também podem contribuir para o desacoplamento da NOS, prejudicando os mecanismos de vasodilatação dependente do endotélio (FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2010; FÖURSTERMANN, 2010; LANDMESSER et al., 2003; SHIMIDT et al., 2007).

Embora o estresse oxidativo possa ocorrer pelo aumento da geração de espécies reativas, a redução ou saturação da capacidade antioxidante também pode favorecer esse quadro de estresse oxidativo, conseqüentemente, desfavorece o equilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores, por exemplo, o aumento dos níveis de O₂⁻ e a redução da biodisponibilidade de NO prejudicam a vasodilatação dependente do endotélio que caminha para a perda do controle do tônus vascular (FÖURSTERMANN, 2010). O desequilíbrio na geração e degradação de espécies reativas também foi observado em aortas de camundongos nocautes homozigoto para o subtipo do receptor β₂-AR, onde há aumento da resposta contrátil a fenilefrina e serotonina, aumento na produção de O₂⁻ pela NADPH oxidase, redução da expressão proteica da eNOS, mas com aumento da expressão proteica da isoforma manganês-SOD (DAVEL et al., 2012). Adicionalmente, no modelo experimental de hipertrofia cardíaca induzida pela hiperativação dos receptores beta-adrenérgicos (β-AR) com ISO foi observado um aumento na produção de O₂⁻ em decorrência do desacoplamento da eNOS (DAVEL et al., 2006). Dentro desse

contexto, a hiperativação β -AR parece mediar alterações relevantes na regulação do tônus vascular, tanto por potencializar a resposta contrátil, como por alterar mecanismos vasodilatadores dependentes do endotélio e mecanismos associados à defesa antioxidante.

1.3 Receptor adrenérgico e sistema cardiovascular

As células dos diferentes tecidos do corpo, tanto de humanos como de outras espécies de mamíferos, apresentam receptores AR na membrana que reconhecem as catecolaminas, noradrenalina e adrenalina (BENOVIC et al., 1988; BYLUND et al., 1994). Os receptores AR estão divididos em dois tipos: α -AR e β -AR e seus diferentes subtipos: α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 - e β_3 -AR (CHRUSCINSKI et al., 2001; BENOVIC et al., 1988; BYLUND et al., 1994). Em situações fisiológicas, a ativação do receptor β -AR no coração, em particular o subtipo β_1 -AR, tanto pela liberação de noradrenalina via inervação simpática como por catecolaminas circulantes, aumenta o desempenho cardíaco pelo aumento da condução do sinal elétrico dos nódulos sinoatrial e atrioventricular, aumento da frequência cardíaca, aumento da força de contração e aumento da velocidade de relaxamento do músculo cardíaco, elevando o débito cardíaco (BORON; BOULPAEP, 2009; CURI; PROCÓPIO, 2009). Entretanto, em situações patológicas, a hiperativação a longo-prazo dos receptores β -AR pode ocasionar efeitos deletérios, como o remodelamento cardíaco, redução da função cardíaca e indiretamente a redução da expectativa de vida, tanto em animais como em humanos (BEZNAK; HACKER, 1964; PATTERSON et al., 2004; RONA et al., 1959). A utilização de fármacos bloqueadores dos receptores β -AR demonstraram ser eficientes na melhora da função cardíaca e redução da mortalidade em seres humanos (BERTHE et al., 1999; NI et al., 2011; SHARPE, 1999). Apesar do grande número de trabalhos avaliando as modificações da função e morfologia do coração pela hiperativação dos receptores AR, pouco é conhecido sobre os efeitos da hiperativação crônica dos receptores β -AR nos vasos sanguíneos.

Nos vasos sanguíneos, o sistema nervoso simpático é determinante para a regulação do tônus vascular. A resposta final vasodilatadora ou vasoconstritora dependerá do tipo e subtipo do receptor adrenérgico ativado, da densidade desse receptor na membrana e do tipo celular avaliado (BENOVIC et al., 1988; BYLUND et

al., 1994). As catecolaminas, por exemplo, ativam os receptores α -AR associado a uma proteína G_q no músculo liso vascular que estimula a via da PLC (BYLUND et al., 1994). O aumento de Ca^{2+} no músculo liso vascular contribui com a despolarização da célula, aumentando a probabilidade de abertura de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (KARAKI et al., 1997). Além disso, o DAG ativa proteína quinase C (PKC) que aumenta a probabilidade de abertura de canais para Ca^{2+} dependentes de ligante e sensibiliza os filamentos contráteis sensíveis ao Ca^{2+} , induzindo a vasoconstrição (KARAKI et al., 1997). Contrariamente, a estimulação do receptor α -AR no endotélio vascular, também associado a uma proteína G_q , desencadeia a ativação da via PLC, mas o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} no endotélio vascular, favorece a formação do complexo Ca/CAM e ativação da eNOS e nNOS, aumentando a síntese de NO e consequentemente contrapondo a vasoconstrição (BÜLBRING; TOMITA, 1987; FÖRSTERMANN, 2010; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Por outro lado, a ativação dos receptores β -AR (subtipos β_1 -, β_2 - e β_3 -AR) no músculo liso vascular induz vasodilatação (BRAWLEY et al., 2000; FERRO et al., 2004; RAUTUREAU et al., 2002). Classicamente esta vasodilatação é induzida pela ativação da cascata intracelular dependente da proteína G_{as} ativando a AC que converte a ATP em AMPc, o aumento dos níveis de AMPc favorece a ativação da proteína quinase A (PKA), a qual aumenta a probabilidade de abertura de canais para K^+ , canais sensíveis a voltagem (K_v), canais BK_{Ca} e canais sensíveis a ATP (K_{ATP}), promovendo a hiperpolarização da célula de músculo liso vascular, além de aumentar a extrusão de Ca^{2+} pela membrana celular pela Ca^{2+} -ATPase (FERRO et al., 2004; FERRO, 2006; KO et al., 2008; REMBOLD; CHEN, 1998; WERSTIUK; LEE, 2000; TANAKA; HORINOUCI; KOIKE, 2005). Assim, a somatória dos efeitos após a ativação dos receptores β -AR localizados no músculo liso vascular resulta em redução do tônus vascular.

A ativação aguda dos receptores β -AR localizados nas células endoteliais ocasiona a vasodilatação pela ativação da eNOS via proteína G_s /AMPc/PKA e liberação de NO (FERRO et al., 2004; QUEEN et al., 2006). A sinalização desencadeada pela ativação dos receptores β -AR nas células endoteliais também favorece a fosforilação de sítios estimulatórios da eNOS, por exemplo, resíduos de aminoácidos serina 1177 via PKA, proteína quinase B (PKB ou Akt) ou proteína quinase dependente do complexo Ca/CAM (FLEMING, 2010), aumentando a

produção de NO em condições basais (FERRO et al., 2004; FLEMING, 2010; QUEEN et al., 2006). Alguns estudos têm demonstrado que os receptores β -AR e a eNOS estão colocalizados nas cavéolas com a caveolina-1, assim como a nNOS colocalizadas com a caveolina-3 nas células do músculo liso vascular e músculo estriado cardíaco (BAROUCH et al., 2002; FERON et al., 1996; MASSION et al., 2004).

Uma vez que a PKA é a enzima-alvo na cascata de sinalização dos receptores β -AR em vasos sanguíneos, é pertinente levantar a hipótese de que os efeitos vasculares dos agonistas desses receptores são regulados por vias de sinalização localizadas nas cavéolas. Dentro desse contexto, Allen et al. (2009) sugeriram que a caveolina-1 e as vias de sinalização são modulados nas cavéolas pela estimulação da cascata de sinalização dos receptores β -AR, influenciando na dinâmica e interação de proteínas na membrana celular com os receptores AR. Neste sentido, Banquet et al. (2011) observaram que o relaxamento induzido pelo agonista seletivo dos receptores β_2 -AR, o procaterol, foi reduzido pela incubação com β -metil-ciclodextrina em artérias pulmonares de camundongos. Além disso, estes mesmos autores demonstraram em camundongos nocaute para o gene da caveolina-1, o relaxamento ao procaterol foi potencializado, o que reforça o papel modulatório da cavéola, principalmente da caveolina-1 sobre o efeito vasodilatador da ativação do receptor β_2 -AR (BANQUET et al., 2011). Apesar dos poucos estudos, há indícios que a caveolina-1 modula a atividade fisiológica de receptores β -AR e sua cascata de sinalização intracelular, alterando em parte os efeitos vasodilatadores dependentes de NO. Possivelmente, a hiperativação crônica dos receptores β -AR poderia modificar a interação entre as NOS e as cavéolas, modificando os mecanismos de vasodilatação dependente do endotélio.

Sabe-se que a hiperativação dos receptores AR, tanto pelo aumento da descarga simpática direta em órgãos-alvo, como pelo aumento dos níveis circulantes de catecolaminas, estão associados a doenças que acometem o sistema cardiovascular, por exemplo, a hipertensão arterial, a hipertrofia cardíaca e a insuficiência cardíaca, podendo modificar o controle do tônus vascular (BRISTOW, 2000; ESLER; KAYE, 2000; GRASSI et al., 2011). Experimentalmente, esta hiperativação crônica dos receptores AR, em particular os subtipos dos receptores β -AR, pode ser mimetizada pela administração de um agonista não seletivo como o

ISO. O tratamento crônico com ISO induz hipertrofia cardíaca associada ao desenvolvimento de fibrose miocárdica e necrose de cardiomiócitos (BENJAMIN et al., 1989; BEZNAK; HACKER, 1964; RONA et al., 1959).

Além das alterações morfológicas no coração, a hiperativação crônica dos receptores β -AR em aorta de ratos tratados com ISO induz aumento da resposta contrátil à fenilefrina e a serotonina associado ao estresse oxidativo, pelo aumento dos níveis $O_2^{\cdot-}$ proveniente do desacoplamento da eNOS, além do aumento de fatores pro-inflamatórios, como as interleucinas (DAVEL et al., 2006; DAVEL et al., 2008). Apesar dos níveis elevados de $O_2^{\cdot-}$ e redução da biodisponibilidade de NO nesse modelo experimental, tanto em ratos (DAVEL et al., 2006; FUKUDA et al., 2008; KRENEK et al., 2006), como em camundongos da linhagem C57BL/6J e FVB (DAVEL, 2008; DAVEL et al., 2011), não foram observadas alterações na vasodilatação dependente do endotélio induzida pela ACh.

O tratamento com ISO por sete dias aumenta a expressão proteica da eNOS, nNOS, cobre/zinco-SOD (DAVEL et al., 2006) e caveolina-1 (KRENEK et al., 2006) na aorta de animais. Nesse modelo de hiperativação β -AR, Davel et al. (2006) sugerem que o NO liberado pela ACh ou pelo ISO estaria mais protegido pela SOD em relação ao NO basal liberado pela ação da fenilefrina. Adicionalmente, Krenek et al. (2006) sugeriram que o aumento da expressão proteica da caveolina-1 estaria inibindo a eNOS, o que impediria uma resposta exarcebada da ACh na aorta de ratos tratados cronicamente com ISO. Dentro deste contexto, há necessidade de esclarecer as possíveis alterações da reatividade vascular após a hiperativação crônica dos receptores β -AR. Uma vez que, na aorta de ratos e camundongos tratados com ISO por sete dias apresentaram um quadro de estresse oxidativo e aumento de resposta contrátil, sem nenhum prejuízo da vasodilatação dependente do endotélio induzida pela ACh. Dessa forma, a presente dissertação teve como hipótese a existência de uma possível interação entre a cavéola e as vias eNOS/ NO e/ou nNOS/ H_2O_2 em resposta aos efeitos da hiperativação dos receptores β -AR em aorta de camundongos.

2 OBJETIVO

Investigar os mecanismos envolvidos na vasodilatação dependente do endotélio, focando no papel das cavéolas e a possível interação com a eNOS/ NO e/ou nNOS/ H_2O_2 em aorta de camundongos tratados com ISO por sete dias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os protocolos experimentais utilizados no presente estudo seguem os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e registrados sob nº 119 nas fls. 109 do livro 02.

3.1.1 *Camundongos*

Foram utilizados camundongos machos de 12 a 16 semanas de idade, selvagem da linhagem C57BL/6J (C57) e nocautes homozigotos da isoforma neuronal da sintase de óxido nítrico (nNOS^{-/-}). Os camundongos utilizados neste estudo foram obtidos dos biotérios da Faculdade de Medicina e do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (USP), respectivamente. Os camundongos nNOS^{-/-} foram cedidos gentilmente pela Prof^a. Dr^a. Silvana Chiavegatto do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Após o desmame, os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da USP em gaiolas coletivas (máximo 5 animais) com livre acesso à ração e água, com condições controladas de temperatura (22 ± 1 °C), umidade relativa do ar (50-60%) e ciclo claro-escuro (12-12h),

3.1.2 *Modelo animal de experimentação*

Os camundongos foram divididos em dois grupos experimentais. Um grupo de animais C57 foi tratado com ISO, formando o grupo C57 ISO. Outro grupo de animais C57 foi tratado com veículo, formando o grupo C57 controle. Os camundongos nNOS^{-/-}, tratados ou não com ISO, foram utilizados somente para avaliar a participação da nNOS nos resultados de reatividade vascular, como será descrito nos próximos subitens. Os grupos de animais C57 ISO e nNOS^{-/-} ISO foram submetidos ao tratamento por sete dias com ISO (15 mg.kg⁻¹.dia⁻¹, s.c.), com intervalo de 24 horas entre as doses, e seus respectivos controles foram tratados apenas com o veículo (óleo de soja), como descrito previamente por Davel, (2008), Davel et al. (2011) e Gava et al. (2004).

Após sete dias de tratamento, os animais foram mortos por deslocamento da coluna cervical. Em seguida os animais foram pesados, posteriormente, o coração, a aorta torácica e a tíbia foram isolados. O comprimento da tíbia entre a eminência intercondilar e a face articular inferior foi mensurado com paquímetro (SOBOTTA, 2000). O comprimento da tíbia foi um parâmetro avaliado para a normalização dos resultados de hipertrofia cardíaca. No coração, os ventrículos foram isolados dos átrios, posteriormente, a parede do ventrículo direito foi cortada parcialmente para remoção de coágulo, em seguida os ventrículos foram pesados em balança analítica (Modelo MARK 120A, Bel Engineering). A massa ventricular foi normalizada pelo comprimento da tíbia para obtenção do índice de hipertrofia cardíaca (IHC). O IHC permitiu avaliar a eficácia do tratamento com ISO em induzir hipertrofia cardíaca.

3.2 Experimentos de reatividade vascular

Para avaliar o efeito do tratamento com ISO após sete dias sob a vasodilatação dependente do endotélio, a aorta torácica foi removida e colocada em placa de petri contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,6; NaHCO₃ 25; CaCl₂-2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄-7H₂O 1,2; glicose 11; Na₂EDTA 0,01), previamente gaseificada com 95% O₂ e 5% CO₂, para a remoção do tecido conectivo. Em seguida, a aorta torácica foi cortada transversalmente em segmentos de 2 a 3 mm de comprimento, denominados de anéis de aorta. Os anéis de aorta foram montados em cubas isoladas (banho de órgãos) contendo 5 mL de solução Krebs-Henseleit com temperatura mantida em 37 °C e pH 7,4. Duas hastes metálicas foram passadas por dentro do lúmen dos anéis de aorta. Uma das hastes foi fixada a parede do banho de órgãos e a outra haste conectada verticalmente a um transdutor de força isométrica (LETICA, Espanha), o qual estava conectado ao sistema de aquisição do sinal elétrico (MP100 Biopac Systems, CA, EUA). Os anéis de aorta torácica foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,5 grama, estiramento adequado para gerar a máxima contração induzida ao cloreto de potássio (KCl, 125 mM) e reajustada quando necessário, durante o período de 60 minutos de estabilização (DAVEL et al., 2012; RABELO et al., 2003).

3.2.1 Contração induzida por cloreto de potássio

Após a estabilização foi administrado KCl (125 mM) na cuba contendo Krebs-Henseleit de todos os anéis de aorta estudados. Esta manobra foi realizada para verificar a viabilidade das células de músculo liso vascular e a capacidade contrátil dos anéis. Após a administração do KCl foram aguardados aproximadamente 30 minutos até a obtenção do platô. Os anéis que contraíram menos de 0,5 grama em resposta ao KCl foram descartados, sendo indicativo de lesão das células do músculo liso vascular durante a preparação dos anéis. A contração induzida pelo KCl de cada anel foi considerada como a sua contração máxima. Após a avaliação da resposta ao KCl, os anéis foram lavados por três vezes com a solução de Krebs-Henseleit e estabilizados por mais 30 minutos para realização do protocolo de teste da viabilidade funcional do endotélio vascular como descrito a seguir.

3.2.2 Avaliação da viabilidade funcional do endotélio vascular nos anéis de aorta

A função endotelial foi avaliada por meio do relaxamento induzido pela ACh, agonista do receptor muscarínico. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina, agonista do receptor α_1 -AR, em uma concentração capaz de induzir aproximadamente 50 a 75% da resposta máxima contrátil induzida pelo KCl. Uma vez obtido o platô, foi adicionado ACh (10^{-5} M). Um relaxamento igual ou superior a 50% foi considerado como demonstrativo de função endotelial íntegra. Os anéis que relaxaram menos que 50% à ACh foram descartados do presente estudo.

3.2.3 Avaliação da modulação endotelial sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio induzida pela ACh

Posteriormente a avaliação da integridade funcional das células endoteliais, os anéis de aorta provenientes de camundongos da linhagem C57 foram lavados por três vezes com solução de Krebs-Henseleit e na sequência cada anel foi submetido a um dos protocolos experimentais a serem detalhados a seguir. Assim, os anéis de aorta foram distribuídos em subgrupos para avaliar a vasodilatação dependente do endotélio induzida pela curva concentração-resposta à ACh, nas seguintes condições: **1)** controle (E+); **2)** após a destruição das cavéolas com a utilização de β -

metil-ciclodextrina (CD, 10^{-2} M); **3**) após a inibição não-seletiva da NOS com N_{ω} -nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME, 10^{-4} M); **4**) inibição seletiva da nNOS com 7-nitroindazole (7-NI, 10^{-4} M); e **5**) após a dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2 com a utilização da catalase (2.400 U/mL).

Cada fármaco adicionado na solução de Krebs-Henseleit permaneceu por 30 minutos, com exceção da CD e da catalase que permaneceram 60 e 45 minutos, respectivamente. Após o tempo de administração dos fármacos, apenas nos anéis de aorta com CD foram lavados por duas vezes para remover o fármaco. Posteriormente foram aguardados 5 minutos. Em seguida foi realizada a pré-contracção de todos os anéis com fenilefrina, em uma concentração capaz de induzir de 50 a 75% da resposta máxima induzida pelo KCl, uma vez obtido o platô, foi realizada a curva concentração-resposta à ACh (10^{-10} a 10^{-5} M).

3.2.4 Vasodilatação independente do endotélio induzida pelo nitroprussiato de sódio

Com a finalidade de verificar a vasodilatação independente do endotélio, alguns anéis de aorta provenientes de animais C57, tratados ou não com ISO, foram pré-contráídos com fenilefrina em uma concentração capaz de induzir de 50 a 75% da resposta máxima induzida pelo KCl, uma vez obtido o platô, foi avaliada a vasodilatação independente do endotélio por meio da construção da curva concentração-resposta com o uso do doador de NO, o nitroprussiato de sódio (NPS; 10^{-12} a 10^{-5} M).

3.2.5 Vasodilatação dependente do endotélio induzida pelo ionóforo de cálcio A23187

Com a finalidade de verificar se as alterações observadas na vasodilatação induzida pela ACh após a destruição das caveólas com a CD foram ocasionadas por translocação do receptor muscarínico para as cavéolas, foi avaliada a vasodilatação dependente do endotélio induzida pelo ionóforo de cálcio A23187. Para isso, alguns anéis de aorta provenientes de animais C57, tratados ou não com ISO, nas seguintes condições: **1**) controle (E+); e **2**) após a destruição das cavéolas com a utilização de CD (10^{-2} M) durante 60 minutos. Após o tempo de administração do

fármaco, apenas nos anéis de aorta com CD foram lavados por duas vezes para remover o fármaco. Posteriormente foram aguardados 5 minutos antes de realizar a pré-contracção com fenilefrina em uma concentração capaz de induzir de 50 a 75% da resposta máxima induzida pelo KCl, uma vez obtido o platô, foi avaliada a curva concentração-resposta com o uso do ionóforo de cálcio A23187 (10^{-9} a 10^{-5} M).

3.2.6 Vasodilatação dependente e independente do endotélio em anéis de aorta proveniente de camundongos *nNOS*^{-/-}

Com a finalidade de confirmar se as alterações observadas na vasodilatação induzida pela ACh após a inibição seletiva da nNOS com 7-NI foram exclusivas da isoforma nNOS, utilizou-se anéis de aorta provenientes de camundongos nocautes *nNOS*^{-/-}, tratados ou não com ISO, onde a viabilidade das células do músculo liso e endotélio vascular foram testados previamente como descrito nos protocolos para os anéis de aorta de camundongos C57. Posteriormente, os anéis de aorta foram pré-contráídos com fenilefrina (50 a 75% da resposta máxima induzida pelo KCl), uma vez obtido o platô, foi avaliada a vasodilatação dependente ou independente do endotélio induzida pela ACh (10^{-10} a 10^{-5} M) ou NPS (10^{-12} a 10^{-5} M), respectivamente.

3.3 Expressão proteica pela técnica de *Western blot*

A expressão proteica foi avaliada pela técnica de *Western blot*. Para isso, o segmento da aorta torácica dos camundongos C57, exceto o arco aórtico, foi removido e colocado em placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit para remoção do tecido conjuntivo e armazenado a -80 °C. Posteriormente a aorta foi homogeneizada em solução de RIPA (tampão para lise celular; Milipore, EUA) com inibidores de proteases e fosfatases: fenilmetil sulfonil fluorida (1 mM); ortovanadato (10 mM); fluoreto de sódio (100 mM); pirofosfato de sódio (10 mM); coquetel inibidor de protease (1:1000; Sigma, EUA). Em seguida, esses homogeneizados foram centrifugados (4000 rpm, 4 °C, 15 minutos), o sobrenadante foi coletado e utilizado para determinação do conteúdo proteico pelo método de *Bicinchoninic Acid* (BCA *protein assay kit*, Thermo Scientific, EUA).

Cinquenta µg de proteína dos homogeneizados de aorta foram aplicados nos geles de poliácridamida 10% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para as proteínas eNOS, nNOS, catalase, caveolina-1 e caveolina-3; e geles 12% com SDS-PAGE para as proteínas EC-SOD, Cu/Zn-SOD e Mn-SOD. Para o controle de peso molecular foi adicionado nos geles o marcador de peso molecular padrão (Bio-Rad, EUA). Após eletroforese, as amostras foram transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (Hybond-P PVDF; Amersham-GE Healthcare, UK), previamente ativada com metanol. Após a transferência de 12 horas, para confirmar a eficiência da transferência o gel foi corado com *coomassie blue* e as membranas foram coradas com *Ponceau* 0,1% em ácido acético 1%. Posteriormente a membrana foi bloqueada com leite desnatado 5% dissolvido em tampão Tris por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas por 12 horas em temperatura de 4 °C sob agitação com solução de bloqueio (leite desnatado 5%, exceto para catalase que foi bloqueada em solução de albumina 3%), contendo os anticorpos primários específicos para as proteínas-alvo: eNOS (1:1000; BD Transduction, EUA); nNOS (1:1000; BD Transduction, EUA); caveolina-1 (1:1000; AbCam, EUA); caveolina-3 (1:1000; AbCam, EUA); catalase (1:3000; Sigma, EUA); extracelular-SOD (1:1000; Stressgen, EUA); manganês-SOD (1:2000; Stressgen, EUA) e cobre/zinco-SOD (1:1500; Stressgen, EUA). Após incubação, as membranas foram lavadas com solução de Tris sob agitação. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários específicos para os anticorpos primários das proteínas estudadas: imunoglobulina IgG anti-camundongo conjugado à peroxidase (Bio-Rad, EUA) para: eNOS (1:1500), nNOS (1:1500), cobre/zinco-SOD (1:1500) e catalase (1:5000); imunoglobulina IgG anti-coelho conjugado à peroxidase (Amersham-GE Healthcare, UK) para: caveolina-1 (1:10000), extracelular-SOD (1:8000) e manganês-SOD (1:8000); e, imunoglobulina IgG anti-cabra conjugado à peroxidase (Jackson Immuno Research, EUA) para: caveolina-3 (1:10000).

Após o término do período de incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas com solução de Tris. Os imunocomplexos foram detectados por um sistema de detecção de quimioluminescência para peroxidase (ECL Normal, Amersham-GE Healthcare, UK) seguida de autoradiografia (Hyperfilm ECL) por períodos variados conforme a revelação e fixação dos filmes de raio-X.

As bandas das proteínas foram quantificadas mediante análise densitométrica. Para tal, os filmes foram digitalizados por um scanner (extensão TIFF; 200 dpi) e os blots foram quantificados a partir do programa *Scion Image* (Scioncorp, NIH, EUA). A mesma membrana foi utilizada para detectar a expressão da proteína α -actina incubada com anticorpo primário (1:20000; Sigma-Aldrich, EUA) e, posteriormente, anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à peroxidase (1:10000; Bio-Rad, EUA), utilizada como controle interno para a normalização da expressão proteica das proteínas-alvo de cada amostra utilizada.

3.4 Reagentes e diluições

Todos os sais utilizados no preparo da solução de Krebs-Henseleit foram adquiridos da Synth (Brasil). Os demais fármacos utilizados no presente estudo: hidrocloreto de (-)-isoproterenol (cód. I6504), hidrocloreto de fenilefrina (cód. P6126), hidrocloreto de acetilcolina (cód. A6625), nitroprussiato de sódio dihidratado (cód. S0501), ionóforo de cálcio A23187 (cód. C7522), β -metil-ciclodextrina (cód. C4555), hidrocloreto de N_{ω} -nitro-L-arginina-metil ester (cód. N5751), 7-nitroindazole (cód. N5751) e catalase (cód. C9322) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Todas as drogas foram diluídas em água destilada, exceto para o ionóforo de cálcio A23187 diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções-estoque foram mantidas a -20 °C e as diluições utilizadas foram preparadas para cada lote de experimentos, exceto a β -metil-ciclodextrina que foi preparada previamente a cada protocolo experimental.

3.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), o número de animais utilizados em cada experimento foram demonstrados dentro dos gráficos de barras ou entre parênteses nas figuras. A resposta vasodilatadora a ACh, NPS e ao ionóforo de cálcio A23187 foram expressas como a porcentagem de relaxamento relativo a pré-contração à fenilefrina em cada anel de aorta. As curvas concentração-resposta aos estímulos vasodilatadores foram geradas a partir da análise de regressão não-linear. A comparação da magnitude da resposta aos diferentes estímulos vasodilatadores entre os anéis de aorta provenientes dos

camundongos, tratados ou não com ISO, foi realizado pela porcentagem da diferença da área abaixo da curva (%dAUC), obtidas por meio da análise da área abaixo da curva das curvas concentração-resposta. A análise estatística dos dados foi realizada por teste-*t* (não pareado) ou análise de variância ANOVA duas-vias, seguida pelo teste *post-hoc* de *Bonferroni* para múltiplas comparações. Os valores foram considerados estatisticamente significativos para $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism 5*.

4 RESULTADOS

4.1 Modelo animal de experimentação

4.1.1 Massa corpórea e índice de hipertrofia cardíaca

O tratamento com ISO não alterou nem a massa corpórea (Figura 2 A) nem o comprimento da tíbia (C57 [N=54]: $16,8 \pm 0,05$ vs. C57 ISO [N=59]: $16,9 \pm 0,06$ mm; $P > 0,05$. Teste *t*) dos camundongos quando comparados ao grupo controle C57. Por sua vez, o tratamento com ISO aumentou significativamente o IHC em 19% quando comparado ao grupo C57 (Figura 2 B).

Figura 2 – Massa corpórea (A) e índice de hipertrofia cardíaca (IHC) (B) em camundongos selvagem da linhagem C57BL/6J (C57), tratados ou não com isoproterenol (ISO; 15 mg.kg^{-1} , s.c.) por sete dias. Valores expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais de cada grupo está indicado dentro da barra. * $P < 0,05$ vs. C57, Teste *t*.

4.2 Experimento de reatividade vascular e Western blot

4.2.1 Contração induzida pelo KCl

Observou-se uma resposta contrátil ao KCl similar entre os anéis de aorta de camundongos C57, tratados ou não com ISO (C57 [N=41]: $0,77 \pm 0,02$ vs. C57 ISO [N=46]: $0,74 \pm 0,02$ g. Teste *t*).

4.2.2 Vasodilatação dependente e independente do endotélio

A vasodilatação dependente do endotélio induzido pela ACh, assim como a vasodilatação induzida pelo doador de NO, foram similares entre os grupos de camundongos C57, tratados ou não com ISO (Figura 3 A-B).

Figura 3 – Curva concentração-resposta à acetilcolina (**A**) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) (**B**) em anéis de aorta torácica, com endotélio intacto, provenientes de animais selvagem da linhagem C57BL/6J (C57), tratados ou não com isoproterenol (ISO; 15 mg.kg⁻¹, s.c.) por sete dias. Valores expressos como média ± EPM. O número de anéis de aorta de cada grupo está indicado em parênteses. ANOVA 2-vias.

4.2.3 Modulação da cavéola na resposta vasodilatadora induzida pela ACh

A destruição das cavéolas com CD reduziu significativamente o relaxamento à ACh em ambos os grupos quando comparados aos respectivos controles (Figura 4 A-B). Essa redução ocorreu em maior magnitude no grupo C57 ISO quando comparado ao grupo controle C57 como observado pelo gráfico representativo da %dAUC (Figura 4 A-B; painel central). A partir do resultado de aumento da modulação das cavéolas na resposta vasodilatadora nos anéis de aorta de camundongos C57 ISO, buscou-se avaliar se tal efeito estaria relacionado a migração do receptor muscarínico para o microdomínio das cavéolas em decorrência do tratamento com ISO, o que poderia refletir no aumento da modulação das cavéolas no relaxamento em resposta à ACh nos anéis de aorta de camundongos C57 ISO. Para isso, foi realizada a curva concentração-resposta ao ionóforo de cálcio A23187, na presença ou não de CD. O ionóforo de cálcio A23187 promoveu

relaxamento dependente da concentração utilizada de forma similar entre os anéis de aorta provenientes de camundongos C57, tratados ou não com ISO (Figura 4 C-D). O relaxamento induzido pelo ionóforo de cálcio A23187 na presença da CD foi reduzido de forma significativa apenas no grupo C57 ISO (Figura 4 C-D; painel central).

Figura 4 – Curva concentração-resposta à acetilcolina (**A-B**) e ao ionóforo de cálcio A23187 (**C-D**) em anéis de aorta torácica, com endotélio intacto, provenientes de animais selvagem da linhagem C57BL/6J (C57) (**A-C**) ou tratados com isoproterenol (ISO; 15 mg.kg⁻¹, s.c.) (**B-D**), após a destruição das cavéolas com a utilização β -metil-ciclodextrina (CD, 10⁻² M). Painel central representa a porcentagem de diferença da área abaixo da curva (%dAUC) na presença do fármaco. Valores expressos como média $\pm$ EPM. O número de anéis de aorta de cada grupo está indicado em parênteses. **P*<0,05 vs. respectivo controle, ANOVA 2-vias; **P*<0,05 vs. C57. Teste *t*.

4.2.4 Expressão proteica da caveolina-1 e caveolina-3

Pela técnica de *Western blot*, buscou-se avaliar possíveis alterações na expressão proteica da caveolina-1 e caveolina-3 que são determinantes para estrutura e sinalização celular no microdomínio da cavéola. Observou-se que a expressão proteica da caveolina-1 aumentou em 23% na aorta de camundongos C57 ISO e a expressão proteica da caveolina-3 foi similar ao grupo controle C57 (Figura 5 A-B).

Figura 5 – Expressão proteica da caveolina-1 **(A)** e caveolina-3 **(B)** em aorta torácica de camundongos selvagens da linhagem C57BL/6J (C57), tratados ou não com isoproterenol (ISO; 15 mg.kg⁻¹, s.c.). Os painéis superiores dos gráficos mostram os *blots* típicos. A expressão proteica de caveolina-1 e caveolina-3 foram normalizadas pela expressão proteica de α -actina. Valores expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais de cada grupo está indicado dentro das barras. * $P < 0,05$ vs. C57. Teste *t*.

4.2.5 Modulação das isoformas constitutivas da NOS na resposta vasodilatadora induzida pela ACh

A inibição não-seletiva das isoformas das NOS com L-NAME reduziu significativamente o relaxamento à ACh em ambos os grupos quando comparados aos respectivos controles (Figura 6 A-B). Essa redução ocorreu em maior magnitude no grupo C57 ISO quando comparado ao grupo controle C57, como observado pelo gráfico representativo da %dAUC (Figura 6 A-B; painel central). Após observar o aumento da modulação das NOS no grupo C57 ISO, buscou-se avaliar de forma mais seletiva a participação da nNOS no relaxamento induzido pela ACh. Assim, o 7-NI reduziu significativamente o relaxamento à ACh no grupo C57 ISO e foi similar ao grupo C57, quando comparados aos respectivos controles (Figura 6 C-D). Consequentemente, esta redução foi em maior magnitude no grupo C57 ISO, como observado pelo gráfico representativo da %dAUC, sugerindo um aumento da participação da nNOS na vasodilatação à ACh em aorta de animais tratados com ISO (Figura 6 C-D; painel central).

Figura 6 – Curva concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta torácica, com endotélio intacto, provenientes de animais selvagem da linhagem C57BL/6J (C57) **(A-C)** ou tratados com isoproterenol (ISO; 15 mg.kg^{-1} , s.c.) por sete dias **(B-D)**, na presença do inibidor não seletivo da sintase de óxido nítrico (NOS) **(A-B)**, o N_{ω} -nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME; 10^{-4} M) ou na presença do inibidor seletivo da sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS), o 7-nitroindazole (7-NI; 10^{-4} M) **(C-D)**. Painel central representa a porcentagem de diferença da área abaixo da curva (%dAUC) na presença do fármaco. Valores expressos como média $\pm$ EPM. O número de anéis de aorta de cada grupo está indicado em parênteses. * $P < 0,05$ vs. respectivo controle, ANOVA 2-vias; * $P < 0,05$ vs. C57. Teste *t*.

4.2.6 Expressão proteica das isoformas endotelial e neuronal da NOS

A expressão proteica da eNOS e nNOS aumentou em 24% e 62%, respectivamente, na aorta de camundongos C57 ISO quando comparado a aorta de camundongos C57 (Figura 7 A-B).

Figura 7 – Expressão proteica da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) **(A)** e neuronal (nNOS) **(B)** em aorta torácica de camundongos selvagens da linhagem C57BL/6J (C57), tratados ou não com isoproterenol (ISO; 15 mg.kg⁻¹, s.c.) por sete dias. Os painéis superiores dos gráficos mostram os *blots* típicos. A expressão proteica da eNOS e nNOS foram normalizadas pela expressão proteica de α -actina. CT+, controle positivo para a nNOS (encéfalo de camundongo). Valores expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais de cada grupo está indicado dentro das barras. * $P < 0,05$ vs. C57. Teste *t*.

4.2.7 Modulação do H_2O_2 na resposta vasodilatadora induzida pela ACh

Após observar que o tratamento de camundongos com ISO aumentou a modulação do relaxamento dependente do microdomínio das cavéolas e das isoformas da NOS, buscou-se avaliar se o H_2O_2 estaria atuando como EDRF em resposta à ACh. Para isso, o H_2O_2 foi dismutado em água e oxigênio molecular com a utilização da catalase. A incubação dos anéis de aorta com catalase reduziu significativamente o relaxamento à ACh em ambos os grupos quando comparados aos respectivos controles (Figura 8 A-B). Essa redução ocorreu em maior magnitude no grupo C57 ISO quando comparado ao grupo controle C57, como observado pelo gráfico representativo da %dAUC, sugerindo uma maior participação do H_2O_2 na vasodilatação induzida pela ACh em aortas de camundongos tratados com ISO (Figura 8; painel central).

Figura 8 – Curva concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta torácica, com endotélio intacto, provenientes de animais selvagem da linhagem C57BL/6J (C57) **(A)** ou tratados com isoproterenol (ISO; 15 mg.kg⁻¹, s.c.) **(B)**, após dismutar o H_2O_2 em H_2O e O_2 com a catalase (2.400 U/mL). Painel central representa a porcentagem de diferença da área abaixo da curva (%dAUC) na presença do fármaco. Valores expressos como média ± EPM. O número de anéis de aorta de cada grupo está indicado em parênteses. +*P*<0,05 vs. respectivo controle, ANOVA 2-vias; **P*<0,05 vs. C57. Teste *t*.

4.2.8 Expressão proteica da catalase e das isoformas da superóxido dismutase

A partir do resultado funcional com o uso da catalase, buscou-se avaliar pela técnica de *Western blot* possíveis alterações na expressão proteica de proteínas relacionadas ao balanço dos níveis H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$, como a catalase e as isoformas da SOD. A expressão proteica da catalase e das isoformas extracelular-SOD e manganês-SOD aumentaram em 40, 27 e 33%, respectivamente, nas aortas de camundongos C57 ISO quando comparado a aorta de camundongos controle C57 (Figura 9 A-C). Entretanto, não houve diferença significativa na expressão proteica para a isoforma cobre/zinco-SOD (Figura 9 D).

Figura 9 – Expressão protéica da catalase **(A)** e das isoformas da superóxido dismutase extracelular (EC-SOD) **(B)**, manganês (Mn-SOD) **(C)** e cobre/zinco (Cu/Zn-SOD) **(D)** em aorta torácica de camundongos selvagens da linhagem C57BL/6J (C57), tratados ou não com isoproterenol (ISO; 15 mg.kg⁻¹, s.c.) por sete dias. Os painéis superiores dos gráficos demonstram os *blots* típicos. A expressão protéica das proteínas alvo foi normalizada pela expressão de α -actina. Valores expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais de cada grupo está indicado dentro das barras. * $P < 0,05$ vs. C57. Teste *t*.

4.2.9 Modulação da vasodilatação dependente e independente do endotélio em anéis de aorta provenientes de camundongos nocautes para a isoforma nNOS

Com base nos resultados de aumento da modulação da nNOS sobre a vasodilatação à ACh em aorta de camundongos tratados com ISO, e sabendo-se, como descrito na introdução da presente dissertação que a nNOS tem sido descrita como uma fonte de H_2O_2 ; buscou-se avaliar a vasodilatação induzida pela ACh utilizando anéis de aorta provenientes de camundongos nocautes homozigotos para o gene da isoforma nNOS ($nNOS^{-/-}$) com *background* na linhagem C57BL/6J, tratados ou não com ISO.

O tratamento com ISO não alterou nem a massa corpórea ($nNOS^{-/-}$ [N=7]: $25,9 \pm 1,61$ vs. $nNOS^{-/-}$ ISO [N=6]: $25,3 \pm 1,91$ g; Teste *t*) nem o comprimento da tíbia ($nNOS^{-/-}$ [N=7]: $16,6 \pm 0,22$ vs. $nNOS^{-/-}$ ISO [N=6]: $16,5 \pm 0,39$ mm; Teste *t*) dos camundongos $nNOS^{-/-}$ ISO quando comparados aos camundongos $nNOS^{-/-}$. Por sua vez, o tratamento com ISO aumentou significativamente o IHC dos camundongos $nNOS^{-/-}$ ISO em 23% quando comparado ao grupo controle $nNOS^{-/-}$ ($nNOS^{-/-}$ [N=7]: $7,06 \pm 0,49$ vs. $nNOS^{-/-}$ ISO [N=6]: $8,68 \pm 0,5$ mg.mm⁻¹; $P > 0,05$. Teste *t*).

Nos anéis de aorta proveniente dos camundongos $nNOS^{-/-}$, o relaxamento dependente do endotélio induzido pela ACh foi dependente da concentração utilizada em ambos os grupos, tratados ou não com ISO, mas o relaxamento à ACh foi prejudicado na aorta dos camundongos $nNOS^{-/-}$ ISO quando comparado ao camundongos $nNOS^{-/-}$ (Figura 10 A), sem modificar o relaxamento independente do endotélio induzido pelo NPS em ambos os grupos (Figura 10 B).

Figura 10 – Curva concentração-resposta à acetilcolina **(A)** e ao nitroprussiato de sódio (NPS) **(B)** em anéis de aorta torácica, com endotélio intacto, provenientes de camundongos nocautes homozigotos do gene da isoforma neuronal da sintase de óxido nítrico (nNOS^{-/-}; quadrado vazio), tratados ou não com isoproterenol (ISO; 15 mg.kg⁻¹, s.c.; quadrado cheio). Valores expressos como média ± EPM. O número de anéis de aorta de cada grupo está indicado em parênteses. **P*<0,05 vs. nNOS^{-/-}, ANOVA 2-vias.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo buscou-se avaliar os mecanismos envolvidos na vasodilatação dependente do endotélio em aorta de camundongos após a hiperativação β -AR induzida pelo tratamento com ISO por sete dias, focando-se no papel das cavéolas e a possível interação com as vias eNOS/ NO e nNOS/ H_2O_2 . Sumarizando, os resultados demonstraram que a hiperativação β -AR com ISO: **1)** induz hipertrofia cardíaca e não modifica nem a resposta vasodilatadora à ACh nem ao doador de NO; **2)** aumenta a dependência do microdomínio das cavéolas na resposta vasodilatadora à ACh e ao ionóforo de cálcio A23187, e aumenta a expressão proteica da caveolina-1, mas não da caveolina-3; **3)** aumenta a modulação das NOS constitutivas, principalmente via nNOS, na resposta vasodilatadora à ACh; **4)** aumenta a participação do H_2O_2 na vasodilatação à ACh; e **5)** aumenta a expressão de proteínas relacionadas a defesa antioxidante, como a catalase e isoformas da superóxido dismutase. Dessa forma, os presentes resultados sugerem que a manutenção da vasodilatação à ACh, frente ao estresse oxidativo induzido pelo tratamento com ISO, ocorra devido a mecanismos compensatórios provenientes do microdomínio das cavéolas pela interação eNOS/ caveolina-1, assim como da geração de H_2O_2 via nNOS, os quais contribuem com a manutenção da vasodilatação dependente do endotélio em aorta de camundongos tratados com ISO.

Observou-se no presente estudo a efetividade do tratamento com ISO ($15 \text{ mg.kg.dia}^{-1}$) em induzir hipertrofia cardíaca em camundongos da linhagem C57BL/6J e nocautes homozigotos para o gene da nNOS. O tratamento subcutâneo com ISO por sete dias foi um modelo desenvolvido inicialmente para estudar alterações funcionais e morfológicas do coração, devido à evidente hipertrofia cardíaca causada pela estimulação crônica dos receptores β -AR (BEZNAK; HACKER, 1964; RONA et al., 1959). Dados da literatura têm demonstrado que o tratamento com baixas doses de ISO de $0,3$ e $15 \text{ mg.kg.dia}^{-1}$ em ratos e camundongos, respectivamente, foram eficientes em induzir hipertrofia cardíaca, mas preservando a função cardíaca e a pressão arterial média (DAVEL et al., 2006; DAVEL et al., 2008; GAVA et al., 2004; KNUFMAN et al., 1987).

Apesar dos poucos estudos demonstrando os efeitos causados pela hiperativação crônica dos receptores β -AR nos vasos sanguíneos, sabe-se que patologias que acometem o sistema cardiovascular podem estar associadas à

simpatoexcitação e a hiperativação dos receptores β -AR (BRODDE et al., 1989; DAVEL et al., 2011). Dados da literatura têm demonstrado que a hiperativação β -AR pelo tratamento com ISO promove estresse oxidativo na aorta torácica de ratos (AVILA et al., 2013; DAVEL et al., 2006) e camundongos (DAVEL, 2008; DAVEL et al., 2011), associado ao aumento da resposta contrátil à fenilefrina e serotonina, a partir da cascata de sinalização dos receptores α_1 -AR e 5-HT, respectivamente (DAVEL et al., 2006; DAVEL et al., 2008; DAVEL et al., 2011; FUKUDA et al., 2008), além de reduzir a biodisponibilidade de NO, prejudicando a capacidade de controle do tônus vascular (DAVEL et al., 2006; DAVEL et al., 2008; DAVEL et al., 2011); porém, sem alterar a vasodilatação dependente do endotélio em resposta à ACh ou na presença do doador de NO (DAVEL et al., 2006; KRENEK et al., 2006). Em artéria cerebral de coelhos a hiperativação β -AR pelo tratamento com ISO apresenta redução na resposta contrátil, devido a alterações funcionais e estruturais nas células do músculo liso vascular (KIM et al., 2012). Dentro desse contexto, no presente estudo foi confirmado que o tratamento com ISO em camundongos, não altera a resposta vasodilatadora dependente do endotélio à ACh, assim como ao doador de NO, na resposta vasodilatadora independente do endotélio nos anéis de aorta, mesmo na presença de estresse oxidativo característico do modelo experimental. Esses dados foram consistentes com trabalhos que utilizaram ratos (DAVEL et al., 2006; KRENEK et al., 2006) e camundongos das linhagens C57BL/6J e FVB tratados com ISO (DAVEL, 2008).

Como inicialmente descrito na introdução deste trabalho, a maior densidade e atividade da eNOS no microdomínio lipídico da cavéola está associada a proteínas estruturais e de sinalização celular (ANDERSON, 1998; SESSA et al., 1995; SHAUL; ANDERSON, 1998). As cavéolas correspondem a aproximadamente 15% do volume das células endoteliais e sua proteína estrutural a caveolina-1, além de estabilizar a cavéola pode modular a atividade de diversas proteínas como a eNOS, inibindo a sua atividade (BUCCI et al., 2000; LI; COUET; LISANTI, 1996; PREDESCU; PALADE, 1993). Pela primeira vez, demonstrou-se no presente estudo que a hiperativação β -AR com ISO aumentou a modulação das cavéolas na vasodilatação dependente do endotélio à ACh em aorta de camundongos C57 ISO. Utilizando-se de uma manobra farmacológica com a CD foi possível desestabilizar e destruir o microdomínio das cáveolas, o que permitiu constatar funcionalmente a importância das cavéolas na vasodilatação à ACh (LINDER et al., 2005). Adicionalmente, a

vasodilatação dependente do endotélio induzida pelo ionóforo de cálcio A23187 demonstrou que o aumento da modulação das caveólas em aorta de camundongos C57 ISO ocorreu de forma independente do receptor muscarínico no microdomínio das caveólas. Sugerindo que a hiperativação β -AR com ISO estaria aumentando a modulação de mecanismos vasodilatadores, possivelmente associados à interação de proteínas estruturais da caveóla, sem modificar a sensibilidade ou ação do receptor muscarínico na caveóla em resposta à ACh.

Os presentes resultados também demonstraram que o tratamento com ISO aumentou a expressão protéica da caveolina-1, mas sem alterar a expressão protéica da caveolina-3. O aumento da expressão proteica da caveolina-1 foi observado pela hiperativação β -AR com ISO em aorta de ratos (KRENEK et al., 2006). Dados da literatura têm demonstrado que tanto a caveolina-1 como a caveolina 3, possuem uma sequência de aminoácidos em sua estrutura capaz de interagir com as NOS constitutivas, inibindo sua atividade catalítica (GARCÍA-GARDEÑA et al., 1997; PATEL; MURRAY; INSEL, 2008). Dentro desse contexto, o aumento da modulação do microdomínio das caveólas na resposta vasodilatadora à ACh e ao ionóforo de cálcio A23187, associado ao aumento da expressão proteica da caveolina-1, buscou-se avaliar se o aumento da expressão proteica da caveolina-1 poderia modificar a vasodilatação dependente do endotélio induzida pela ACh, via NOS. Os resultados demonstraram que a inibição não seletiva das NOS com L-NAME aboliu o relaxamento à ACh em aorta de camundongos e a hiperativação β -AR com ISO aumentou a modulação das NOS, principalmente da nNOS, na resposta vasodilatadora dependente do endotélio em aorta de camundongos C57 ISO. Em conjunto os resultados sugerem que o relaxamento dependente do endotélio em aorta de camundongos foi proveniente das NOS e possivelmente proveniente do microdomínio das caveólas.

Contudo, observa-se que a hiperativação β -AR com ISO aumentou a expressão proteica, tanto da eNOS, como da nNOS. Esses resultados foram compatíveis com dados da literatura, onde Davel et al. (2006) observaram na aorta de ratos o aumento da atividade e expressão proteica das NOS constitutivas, e Krennek et al. (2006) observaram o aumento da expressão proteica da eNOS. Esses resultados em conjunto sugerem que apesar do aumento da modulação das NOS constitutivas na vasodilatação dependente do endotélio à ACh, parte da eNOS estaria parcialmente ou proporcionalmente inibida pelo aumento da expressão

proteica da caveolina-1. Por outro lado, sugere-se que o aumento da expressão proteica das caveolinas não estariam interagindo negativamente com a nNOS.

Recentemente Chen et al. (2012) propôs um mecanismo de *feedback* negativo para a eNOS, onde o NO estimularia a proteína quinase Src, a qual fosforilaria a caveolina-1, no resíduo tirosina-14 (Tyr-14), a caveolina-1 fosforilada teria sua afinidade pela eNOS aumentada, consequentemente, inibindo a atividade da eNOS. Esse mecanismo reforça a idéia de que a eNOS teria sua atividade regulada pela interação com a caveolina-1, além de controlar a produção de NO no microdomínio da cavéola. Entretanto, há necessidade de mais estudos para elucidar esse mecanismo, possivelmente pela técnica de imunoprecipitação seria plausível verificar se houve ou não aumento da formação do complexo caveolina-1/ eNOS na aorta dos camundongos tratados com ISO.

Diferentemente da interação inibitória entre a caveolina-1/ eNOS, a interação entre a caveolina-3/ nNOS estaria ocorrendo em menor magnitude, uma vez que a hiperativação β -AR com ISO não alterou a expressão proteica da caveolina-3 e aumentou expressivamente a expressão proteica da nNOS. Sugerindo que a nNOS estaria passível de ativação, possivelmente refletindo a maior modulação do mecanismo vasodilatador dependente do endotélio à ACh, via NOS. Os resultados sugerem que a hiperativação β -AR com ISO aumentou a dependência do microdomínio das cavéolas e das NOS, em particular a nNOS, na manutenção da resposta vasodilatadora à ACh em aorta de camundongos.

No presente estudo, observou-se o aumento da modulação do H_2O_2 no mecanismo de vasodilatação dependente do endotélio na aorta de camundongos C57 ISO incubados com catalase. Como citado inicialmente na introdução deste trabalho, estudos tem descrito a nNOS como uma das principais fontes de H_2O_2 , um importante EDRF em aorta de camundongos da linhagem C57BL/6J (CAPETTINI et al., 2008; CAPETTINI et al., 2011; SHIMOKAWA, 2010). Segundo Capettini et al. (2008) a inibição não seletiva das NOS com L-NAME ou L-NNA reduziu tanto a liberação de NO como a de H_2O_2 , o mesmo efeito ocorreu pela remoção mecânica das células endoteliais, além de abolir o relaxamento induzido pela ACh. Além disso, esses autores também demonstraram que a dismutação do H_2O_2 com a catalase exógena reduziu a vasodilatação à ACh, mas não alterou a liberação de NO (CAPETTINI et al., 2008). Sugerindo que o relaxamento dependente do endotélio foi desencadeado tanto pela atuação do NO como pelo H_2O_2 e ambos os fatores

vasodilatadores foram provenientes do endotélio vascular. Aparentemente o sistema vascular parece apresentar mecanismos redundantes para promover a resposta vasodilatadora, possivelmente compensando uma condição adversa, como o estresse oxidativo.

No presente estudo a participação do H_2O_2 como EDRF na aorta de camundongos tratados com ISO foi reforçada pelo prejuízo do relaxamento à ACh na presença da catalase. Somado a isso, há indícios de que a nNOS estaria mais ativa após a hiperativação β -AR com ISO e sendo uma fonte geradora de H_2O_2 , uma vez que na presença do seu inibidor seletivo ou da catalase observou-se prejuízo na vasodilatação à ACh. Dentro desse contexto, buscamos confirmar a participação da nNOS na vasodilatação dependente do endotélio a partir da utilização de animais nocautes para o gene da nNOS^{-/-}. A deleção do gene da nNOS reduziu a resposta vasodilatadora à ACh em 35% quando comparado aos animais selvagens C57. Esse resultado foi consistente com dados da literatura, onde foi observado o prejuízo de 25% no relaxamento em aorta de camundongos nNOS^{-/-} quando comparado a anéis de aorta de camundongos controle da linhagem C57BL/6J (NANGLE; COTTER; CAMERON, 2004), assim como a redução do relaxamento e produção de NO em resposta a ACh em aorta de camundongos que receberam previamente RNA de interferência para nNOS (CAPETTINI et al., 2008; CAPETTINI et al., 2011). Além disso, demonstramos que a hiperativação β -AR com ISO potencializou o prejuízo no relaxamento dependente do endotélio nas aortas de camundongos nNOS^{-/-}. Esses resultados sugerem que a via nNOS foi determinante como mecanismo compensatório para a vasodilatação dependente do endotélio induzida pela ACh na aorta de camundongos C57 tratados com ISO por sete dias, frente ao estresse oxidativo presente no modelo experimental.

Como citado inicialmente na introdução deste trabalho, sabe-se que o estresse oxidativo acomete o sistema cardiovascular, o $O_2^{\cdot-}$ e o $ONOO^-$ podem interagir de forma negativa com substrato L-arginina ou BH4, reduzindo o substrato e um dos cofatores essenciais para síntese de NO, acarretando no desacoplamento da eNOS (FÖRSTERMANN, 2010). A eNOS desacoplada passaria a produzir grandes quantidades de $O_2^{\cdot-}$, por sua vez, a defesa antioxidante neutralizaria o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 pela ação das isoformas da SOD, assim como o $O_2^{\cdot-}$ e o próprio H_2O_2 poderiam estimular o aumento da atividade e expressão proteica das enzimas relacionadas à defesa antioxidante, contrabalanceando o estado redox (FÖRSTERMANN, 2010;

FÖRSTERMANN; LI, 2011). No presente estudo foi observado um aumento na expressão de proteínas relacionadas à defesa antioxidante como a catalase, extracelular-SOD e manganês-SOD em aorta de camundongos tratados com ISO. Possivelmente, o estresse oxidativo desencadeou a ativação da defesa antioxidante para neutralizar o $O_2^{\cdot-}$ e proteger o NO. Além disso, a defesa antioxidante via SOD estaria aumentando os níveis de H_2O_2 que indiretamente promoveria a manutenção da vasodilatação dependente do endotélio à ACh na aorta de camundongos tratados com ISO. Adicionalmente, Davel et al. (2006) observaram aumento da expressão proteica da isoforma cobre/zinco-SOD em aorta de ratos tratados com ISO, sugerindo a proteção do NO contra a ação do $O_2^{\cdot-}$. Entretanto, nossos resultados demonstraram que a hiperativação β -AR com ISO não alterou a expressão proteica da cobre/zinco-SOD, mas aumentou a expressão proteica das isoformas extracelular-SOD e manganês-SOD em anéis de aorta de camundongos C57 ISO. Possivelmente, a diferença de resultados esteja relacionada a especificidade da espécie animal utilizada. Em conjunto os resultados sugerem que o aumento da modulação da atividade e/ ou expressão da nNOS e da expressão de proteínas relacionadas a defesa antioxidante foram modificadas para contrabalancear o estresse oxidativo na aorta de camundongos C57 ISO.

6 CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados demonstram que nos anéis de aorta provenientes de camundongos da linhagem C57BL/6J tratados com ISO apesar de não modificar a vasodilatação dependente do endotélio induzida pela ACh, aumentou a modulação de fatores vasodilatadores envolvidos nessa resposta. Assim, a hiperativação β -AR aumentou a modulação da via eNOS/ caveolina-1 e a via nNOS/ H_2O_2 em aorta de camundongos. Sugerindo que a hiperativação β -AR ativa mecanismos vasodilatadores compensatórios ao estresse oxidativo, presente nas aortas de camundongos da linhagem C57BL/6J tratados com ISO, que são responsáveis pela manutenção da vasodilatação dependente do endotélio.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, J. A. et al. Caveolin-1 and lipid microdomains regulate Gs trafficking and attenuate Gs/adenylyl cyclase signaling. **Mol. Pharmacol.**, v. 76, n. 5, p. 1082-1093, Nov 2009.
- ANDERSON, R. G. The caveolae membrane system. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 199-225, 1998.
- AVILA, P. R. et al. Resveratrol and fish oil reduce catecholamine-induced mortality in obese rats: role of oxidative stress in the myocardium and aorta. **Br. J. Nutr.**, p. 1-11, Apr 2013.
- BANQUET, S. et al. Role of G(i/o)-Src kinase-PI3K/Akt pathway and caveolin-1 in β_2 -adrenoceptor coupling to endothelial NO synthase in mouse pulmonary artery. **Cell. Signal.**, v. 23, n. 7, p. 1136-1143, Jul 2011.
- BARLOW, R. S.; WHITE, R. E. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 4, pt 2, p. H1283-1289, Oct 1998.
- BAROUCH, L. A. et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. **Nature**, v. 416, n. 6878, p. 337-339, Mar 2002.
- BENJAMIN, I. J. et al. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. **Circ. Res.**, v. 65, n. 3, p. 657-670, Sep 1989.
- BÉNY, J. L. et al. Muscarinic receptor knockout mice confirm involvement of M3 receptor in endothelium-dependent vasodilatation in mouse arteries. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 51, n. 5, p. 505-512, May 2008.
- BENOVIC, J. L. et al. Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, v. 4, p. 405-428, 1988.
- BERTHE, C. et al. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). **Lancet**, v. 353, n. 9169, p. 2001-2007, Jun 1999.
- BEZNAK, M.; HACKER, P. Hemodynamics during the chronic stage of myocardial damage caused by isoproterenol. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 42, p. 269-274, Mar 1964.
- BOLZ, S. S. et al. Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway. **Circulation**, v. 107, n. 24, p. 3081-3087, Jun 2003.
- BORON, W.F.; BOULPAEP, E.L. **Medical physiology: a cellular and molecular approach**. 2. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRAWLEY, L.; SHAW, A. M.; MACDONALD, A. Role of endothelium/nitric oxide in atypical beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 398, n. 2, p. 285-296, Jun 2000.

BRISTOW, M. R. beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. **Circulation**, v. 101, n. 5, p. 558-569, Feb 2000.

BUCCI, M. et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. **Nat. Med.**, v. 6, n. 12, p. 1362-1367, Dec 2000.

BYLUND, D. B. et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 46, n. 2, p. 121-136, Jun 1994.

BÜLBRING, E.; TOMITA, T. Catecholamine action on smooth muscle. **Pharmacol. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 49-96, Mar 1987.

CAPETTINI, L. S. et al. Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 164, n. 6, p. 1738-1748, Nov 2011.

CAPETTINI, L. S. et al. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 295, n. 6, p. H2503-H2511, Dec 2008.

CHEN, Z. et al. Nitric oxide-dependent Src activation and resultant caveolin-1 phosphorylation promote eNOS/caveolin-1 binding and eNOS inhibition. **Mol. Biol. Cell.**, v. 23, n. 7, p. 1388-1398, Apr 2012.

CHRUSCINSKI, A. et al. Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)-adrenergic receptors. **Mol. Pharmacol.**, v. 60, n. 5, p. 955-962, Nov 2001.

CURI, R.; PROCÓPIO, J. **Fisiologia básica**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2009.

DAVEL, A. P. *Alterações vasculares induzidas pelo tratamento crônico com isoproterenol: Investigação dos subtipos de receptores beta-adrenérgicos envolvidos e da possível geração de um processo inflamatório local*. 152f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DAVEL, A. P. et al. Increased vascular contractility and oxidative stress in β_2 -adrenoceptor knockout mice: the role of NADPH oxidase. **J. Vasc. Res.**, v. 49, n. 4, p. 342-352, 2012.

DAVEL, A. P. et al. Effects of isoproterenol treatment for 7 days on inflammatory mediators in the rat aorta. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 295, n. 1, p. H211-H219, Jul 2008.

DAVEL, A. P. et al. Changes in vascular reactivity following administration of

isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 148, n. 5, p. 629-639, Jul 2006.

DAVEL, A. P. et al. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 44, n. 9, p. 920-932, Sep 2011.

EDWARDS, G. et al. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**, v. 396, n. 6708, p. 269-272, Nov 1998.

ELLIS, A.; TRIGGLE, C. R. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. **Can J Physiol. Pharmacol.**, v. 81, n. 11, p. 1013-1028, Nov 2003.

ESLER, M.; KAYE, D. Sympathetic nervous system activation in essential hypertension, cardiac failure and psychosomatic heart disease. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 35, n. 7, p. S1-S7, 2000. Suppl. 4.

ETTER, E. F. et al. Activation of myosin light chain phosphatase in intact arterial smooth muscle during nitric oxide-induced relaxation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 37, p. 34681-34685, Sep 2001.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 93, n. 3, p. 515-524, Mar 1988.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 12, n. 4, p. 267-275, Aug 2010.

FERON, O. et al. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 37, p. 22810-22814, Sep 1996.

FERRO, A. beta-adrenoceptors and potassium channels. **Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 373, n. 3, p. 183-185, Jun 2006.

FERRO, A. et al. Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. **Br. J. Pharmacol.**, v. 143, n. 3, p. 397-403, Oct 2004.

FISSLTHALER, B. et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. **Nature**, v. 401, n. 6752, p. 493-497, Sep 1999.

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

FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflugers. Arch.**, v. 459, n. 6, p. 923-939, May 2010.

FÖRSTERMANN, U.; LI, H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. **Br. J. Pharmacol.**, v. 164, n. 2, p. 213-223, Sep 2011.

FÖRSTERMANN, U.; MÜNDEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708-1714, Apr 2006.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur. Heart J.**, v. 33, n. 7, p. 829-37, 837a-837d, Apr 2012.

FUKUDA, L. E. et al. Fenofibrate and pioglitazone do not ameliorate the altered vascular reactivity in aorta of isoproterenol-treated rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 52, n. 5, p. 413-421, Nov 2008.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ. Res.**, v. 53, n. 5, p. 557-573, Nov 1983.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **F. A. S. E. B. J.**, v. 3, n. 9, p. 2007-2018, Jul 1989.

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. 373-376, Nov 1980.

GARCÍA-CARDEÑA, G. et al. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 41, p. 25437-25440, Oct 1997.

GARCÍA-CARDEÑA, G. et al. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 44, p. 27237-27240, Nov 1996.

GAVA, A. L. et al. Decreased baroreflex sensitivity in isoproterenol-treated mice with cardiac hypertrophy. **Auton. Neurosci.**, v. 114, n. 1-2, p. 47-54, Jul 2004.

GRAHAM, D. A.; RUSH, J. W. Cyclooxygenase and thromboxane/prostaglandin receptor contribute to aortic endothelium-dependent dysfunction in aging female spontaneously hypertensive rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 107, n. 4, p. 1059-1067, Oct 2009.

GRASSI, G. et al. Sympathetic mechanisms, organ damage, and antihypertensive treatment. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 13, n. 4, p. 303-308, Aug 2011.

GRATTON, J. P. et al. Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 29, p. 22268-22272, Jul 2000.

GURDAL, H.; FRIEDMAN, E.; JOHNSON, M. D. Beta-adrenoceptor-G alpha S coupling decreases with age in rat aorta. **Mol. Pharmacol.**, v. 47, n. 4, p. 772-778,

Apr 1995.

GUTTERMAN, D. D.; MIURA, H.; LIU, Y. Redox modulation of vascular tone: focus of potassium channel mechanisms of dilation. **Arterioscler.Thromb.Vasc. Biol.**, v. 25, n. 4, p. 671-678, Apr 2005.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. **Biosci. Rep.**, v. 19, n. 2, p. 51-71, Apr 1999.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, Dec 1987.

JU, H. et al. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 30, p. 18522-18525, Jul 1997.

KANG, K. B. et al. A role for cyclooxygenase in aging-related changes of beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat aortas. **Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.**, v. 375, n. 4, p. 273-281, Jun 2007.

KARAKI, H. et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol. Rev.**, v. 49, n. 2, p. 157-230, Jun 1997.

KATUSIC, Z. S. Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. **Free. Radic. Biol. Med.**, v. 20, n. 3, p. 443-448, 1996.

KATUSIC, Z. S.; D'USCIO, L. V.; NATH, K. A. Vascular protection by tetrahydrobiopterin: progress and therapeutic prospects. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 30, n. 1, p. 48-54, Jan 2009.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.**, v. 298, pt 2, p. 249-258, Mar 1994.

KNUFMAN, N. M. et al. Quantification of myocardial necrosis and cardiac hypertrophy in isoproterenol-treated rats. **Res. Commun. Chem. Pathol.Pharmacol.**, v. 57, n. 1, p. 15-32, Jul 1987.

KO, E. A. et al. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **J. Smooth Muscle Res.**, v. 44, n. 2, p. 65-81, Apr 2008.

KOGA, T. et al. Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat. **Hypertension**, v. 14, n. 5, p. 542-548, Nov 1989.

KRENEK, P. et al. Increased expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in the aorta of rats with isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 84, n. 12, p. 1245-1250, Dec 2006.

LANDMESSER, U. et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. **J. Clin. Invest.**, v. 111, n. 8, p.

1201-1209, Apr 2003.

LI, S.; COUET, J.; LISANTI, M. P. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 46, p. 29182-29190, Nov 1996.

LINDER, A. E. et al. Dynamic association of nitric oxide downstream signaling molecules with endothelial caveolin-1 in rat aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 314, n. 1, p. 9-15, Jul 2005.

LIU, P.; RUDICK, M.; ANDERSON, R. G. Multiple functions of caveolin-1. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 44, p. 41295-8, Nov 2002.

MASSION, P. B. et al. Cardiomyocyte-restricted overexpression of endothelial nitric oxide synthase (NOS3) attenuates beta-adrenergic stimulation and reinforces vagal inhibition of cardiac contraction. **Circulation**, v. 110, n. 17, p. 2666-2672, Oct 2004.

MATOBA, T.; SHIMOKAWA, H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 92, n. 1, p. 1-6, May 2003.

MATOBA, T. et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. **Biochem.Biophys. Res. Commun.**, v. 290, n. 3, p. 909-913, Jan 2002.

MATOBA, T. et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. **J. Clin.Invest.**,v. 106, n. 12, p. 1521-1530, Dec 2000.

MONCADA, S.et al. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI2) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. **Thromb. Res.**, v. 11, n. 3, p. 323-344, Sep 1977.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, v. 12, n. 4, p. 365-372, Oct 1988.

MONCADA, S.; VANE, J. R. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. **N. Engl. J. Med.**, v. 300, n. 20, p. 1142-1147, May 1979.

NANGLE, M. R.; COTTER, M. A.; CAMERON, N. E. An in vitro investigation of aorta and corpus cavernosum from eNOS and nNOS gene-deficient mice. **Pflugers. Arch.**, v. 448, n. 2, p. 139-145, May 2004.

NI, L. et al. β -AR blockers suppresses ER stress in cardiac hypertrophy and heart failure. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27294, 2011.

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664-666, Jun 1988.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-526, Jun 1987.

PATEL, H. H.; MURRAY, F.; INSEL, P. A. Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 48, p. 359-391, 2008.

PATTERSON, A. J. et al. Protecting the myocardium: a role for the beta2 adrenergic receptor in the heart. **Crit. Care. Med.**, v. 32, n. 4, p. 1041-1048, Apr 2004.

PREDESCU, D.; PALADE, G. E. Plasmalemmal vesicles represent the large pore system of continuous microvascular endothelium. **Am. J. Physiol.**, v. 265, n. 2, pt 2, p. H725-H733, Aug 1993.

QUEEN, L. R. et al. Mechanisms underlying beta2-adrenoceptor-mediated nitric oxide generation by human umbilical vein endothelial cells. **J. Physiol.**, v. 576, pt 2, p. 585-594, Oct 2006.

QUILLEY, J.; MCGIFF, J. C. Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 21, n. 4, p. 121-124, Apr 2000.

RABELO, L. A. et al. Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H₂O₂. **Br. J. Pharmacol.**, v. 138, n. 7, p. 1215-1220, Apr 2003.

RAUTUREAU, Y. et al. Beta 3-adrenoceptor in rat aorta: molecular and biochemical characterization and signalling pathway. **Br. J. Pharmacol.**, v. 137, n. 2, p. 153-161, Sep 2002.

REMBOLD, C. M.; CHEN, X. L. Mechanisms responsible for forskolin-induced relaxation of rat tail artery. **Hypertension**, v. 31, n. 3, p. 872-877, Mar 1998.

RONA, G. et al. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. **A. M. A. Arch. Pathol.**, v. 67, n. 4, p. 443-455, Apr 1959.

SCHMIDT, T. S.; ALP, N. J. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. **Clin. Sci. (Lond.)**, v. 113, n. 2, p. 47-63, Jul 2007.

SESSA, W. C. et al. The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 30, p. 17641-17644, Jul 1995.

SHARPE, N. Benefit of beta-blockers for heart failure: proven in 1999. **Lancet**, v. 353, n. 9169, p. 1988-1999, Jun 1999.

SHAUL, P. W.; ANDERSON, R. G. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 5 Pt 1, p. L843-L851, Nov 1998.

SHIMOKAWA, H. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Pflugers. Arch.**, v. 459, n. 6, p. 915-922, May 2010.

SHIMOKAWA, H.; MATOBA, T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Pharmacol. Res.**, v. 49, n. 6, p. 543-549, Jun 2004.

SOBOTTA, J. **Atlas de anatomia humana**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SURKS, H. K. et al. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase I α . **Science**, v. 286, n. 5444, p. 1583-1587, Nov 1999.

TAGGART, M. J. Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins? **News. Physiol. Sci.**, v. 16, p. 61-65, Apr 2001.

TAYLOR, S. G.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. **Trends Pharmacol Sci**, v. 9, n. 8, p. 272-274, Aug 1988.

TANAKA, Y.; HORINOUCI, T.; KOIKE, K. New insights into beta-adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 32, n. 7, p. 503-514, Jul 2005.

TRACEY, W. R.; PEACH, M. J. Differential muscarinic receptor mRNA expression by freshly isolated and cultured bovine aortic endothelial cells. **Circ. Res.**, v. 70, n. 2, p. 234-40, Feb 1992.

VANHOUTTE, P. M.; MOMBOULI, J. V. Vascular endothelium: vasoactive mediators. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v. 39, n. 3, p. 229-38, 1996 Nov-Dec 1996.

WERSTIUK, E. S.; LEE, R. M. Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 78, n. 6, p. 433-452, Jun 2000.