

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Mecanismos celulares que influenciam a sinalização por receptores  
 $\alpha_1$ -adrenérgicos na carótida contra-lateral à lesão por cateter balão**

Aline Carvalho Pereira

Ribeirão Preto

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Mecanismos celulares que influenciam a sinalização por receptores  
 $\alpha_1$ -adrenérgicos na carótida contra-lateral à lesão por cateter balão**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientada: Aline Carvalho Pereira

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Maria de Oliveira

Ribeirão Preto

2009

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Pereira, Aline Carvalho

Mecanismos celulares, decorrentes da resposta neurocompensatória, que influenciam a sinalização por  $\alpha_1$ -adrenoceptores na carótida contra-lateral à lesão por cateter balão.

Aline Carvalho Pereira. Ribeirão Preto, 2009.

127 f.: il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP / Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: de Oliveira, Ana Maria

- 1- Lesão vascular. 2- Carótida. 3- Reatividade vascular. 4- Fenilefrina.
- 5- Mobilização de cálcio. 6- Estresse oxidativo.

PEREIRA, A.C. **Mecanismos celulares que influenciam a sinalização por  $\alpha_1$ -adrenoceptores na carótida contra-lateral à lesão por cateter balão.** Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em:

**Banca Examinadora**

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me iluminar sempre, pela minha paciência, persistência e determinação para superar os obstáculos e concluir mais uma etapa.

Aos meus pais Rui e Tereza, ao meu irmão Lucas e sua esposa Edilene e à minha sobrinha Maria Luiza pelo carinho, pelos momentos de alegria e principalmente pela compreensão em todos os momentos, me apoiando sempre. A todos os meus familiares pelo incentivo, apoio e conselhos durante todo o tempo.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Maria de Oliveira, minha orientadora, pela paciência, compreensão, confiança e pela oportunidade. Obrigada pelas discussões e ensinamentos indispensáveis para minha formação profissional e pessoal.

Às professoras da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo Dra. Gloria Emília Petto de Souza, Dra. Lusiane Maria Bendhack e Dra. Sâmia Jocca pelos ensinamentos, amizade e agradável convivência.

Às funcionárias e amigas: Marlene Rodrigues da Silva, Aparecida Rosa da Silva (Nina), Miriam Cristina C. de Melo, Juliana Ap. Vercesi, Flavia F. Salata Carotta pelo apoio e paciência. Agradeço principalmente à Mayara Santos Gomes pelo apoio técnico, companheirismo e pela ótima convivência, indispensáveis durante todo o tempo.

À Vânia Cláudia Olivon, pela amizade, ensinamentos, apoio, companheirismo, e discussões indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos amigos Bruno Nunes do Vale, Larissa Pernomian, Rafaela Pravato Colatto, pelo apoio, companheirismo e discussões. Agradeço especialmente à Lilian Rialto Gimenes

pela amizade e pela ótima convivência e também à Fernanda Ap. de Andrade pelo companheirismo.

Aos amigos do laboratório Alexandre Kanashiro, Alice Valença Araújo, Amanda de Carvalho Pereira, Andrea Carla Pessini, Bruno Rodrigues Silva, Carolina Baraldi Lemes Araújo, Claire Lunardi, Daniel Fraga, Daniella Bonaventura, David do Carmo Malvar, Denis de Melo Soares, Gerson Jhonatan Rodrigues, Jose Wilson do Nascimento Côrrea, Juliano Manvailer Martins, Livia Harumi Yamashiro, Maria José Figueiredo, Mário dos Anjos Neto Filho, Matheus Lavorenti Rocha, Michele Paulo e Renes de Resende Machado pelo agradável convívio e amizade, apoio, discussões e companheirismo, que contribuíram muito para a realização deste trabalho, para meu crescimento profissional e pessoal.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Leandra Ramalho e à técnica Auristela pela colaboração com a preparação e análise do material histológico.

Ao Lenaldo Branco Rocha, técnico do laboratório de microscopia confocal do Departamento de Biologia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Aos funcionários do biotério desta faculdade, especialmente ao Reinaldo Fernando Batista, pela amizade e apoio indispensáveis neste trabalho.

Às secretárias da pós-graduação e a todos os funcionários da Faculdade de Ciências farmacêuticas pela amizade, atenção, cuidado, carinho e apoio imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos os professores, amigos e funcionários que indiretamente contribuíram para conclusão deste estudo.

À Capes, pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

<b>Resumo.....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>ii</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas.....</b>	<b>iii</b>
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1- Estado da Arte.....	02
1.2- Revisão da Literatura.....	04
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1- Animais.....	16
3.2- Grupos Experimentais.....	16
3.3- Cirurgia de Lesão Vascular por Cateter Balão.....	16
3.4- Histologia .....	17
3.5- Protocolos Experimentais.....	17
3.5.1- Estudo da reatividade em preparações isoladas.....	17
3.5.1.1- Conseqüências da resposta neurocompensatória ao cateter balão na reatividade vascular à Phe .....	18
3.5.1.2- Conseqüências da resposta neurocompensatória ao cateter balão na mobilização de cálcio intra e extracelular induzida por Phe.....	18
3.5.1.3- Estudo de fatores decorrentes da resposta neurocompensatória que interferem no influxo de cálcio estimulado pela Phe.....	19
a) Participação de NOS/óxido nítrico no influxo de cálcio extracelular estimulado pela Phe.....	19
b) Participação de canais para potássio no influxo de cálcio na contração desencadeada pela Phe.....	20
c) Participação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no influxo de cálcio e na contração desencadeada pela Phe.....	20

d) Participação de prostanóides no influxo de cálcio na contração desencadeada pela Phe.....	20
e) Participação de junções do tipo Gap no influxo de cálcio e na contração desencadeada pela Phe.....	21
f) Participação do retículo sarcoplasmático no influxo de cálcio e na contração desencadeada pela Phe.....	21
g) Avaliação da mobilização de cálcio extracelular independente da ativação de receptor.....	21
<b>3.5.1.4- Conseqüências da lesão por cateter balão na via de sinalização RhoA/ Rho-quinase.....</b>	<b>21</b>
<b>3.5.1.5- Conseqüências da resposta neurocompensatória ao cateter balão na reatividade vascular ao KCl.....</b>	<b>22</b>
<b>3.5.1.6- Conseqüências da resposta neurocompensatória ao cateter balão na reatividade vascular à acetilcolina (ACh).....</b>	<b>22</b>
<b>3.6- Microscopia Confocal.....</b>	<b>22</b>
<b>3.7- Drogas.....</b>	<b>23</b>
<b>3.8- Análise dos dados.....</b>	<b>23</b>
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1- Estudo temporal das conseqüências da lesão por cateter balão na artéria carótida contra-lateral à lesão.....</b>	<b>26</b>
4.1.1- Conseqüências da lesão por cateter balão na morfologia da artéria carótida contra-lateral à lesão.....	26
4.1.2- Conseqüências da lesão por cateter balão na reatividade à Phe na artéria carótida contra-lateral à lesão.....	28
<b>4.2- Avaliação da mobilização de cálcio induzida por Phe.....</b>	<b>31</b>
4.2.1- Mobilização de cálcio intracelular.....	31
4.2.2- Mobilização de cálcio extracelular.....	32
<b>4.3- Mecanismos celulares envolvidos na alteração do influxo de cálcio induzido por Phe.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.1- Participação da via de sinalização dependente de NO no influxo de cálcio induzido por Phe.....</b>	<b>36</b>
4.3.1.1- Participação da enzima óxido nítrico sintase (NOS).....	36



a) Participação das isoformas da NOS na modulação do influxo de cálcio extracelular.....	39
4.3.1.2 Participação de NO.....	43
4.3.1.3) Participação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs).....	45
<b>4.3.2) Participação de canais para potássio na modulação do influxo de cálcio extracelular.....</b>	<b>48</b>
4.3.2.1) Avaliação da participação de canais para potássio específicos na modulação do influxo de cálcio extracelular.....	50
<b>4.3.3) Participação de espécies reativas de oxigênio (ROS) na modulação do influxo de cálcio extracelular.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.4) A participação de prostanóides na modulação do influxo de cálcio extracelular.....</b>	<b>62</b>
<b>4.3.5) A participação de junções intercelulares do tipo GAP no influxo de cálcio induzido por Phe.....</b>	<b>67</b>
<b>4.3.6) Participação do retículo sarcoplasmático na mobilização de cálcio extracelular induzida por Phe.....</b>	<b>69</b>
<b>4.4) Mobilização de cálcio extracelular independente de receptor.....</b>	<b>71</b>
<b>4.5) Avaliação da concentração de cálcio intracelular por microscopia confocal.....</b>	<b>73</b>
<b>4.6) Mecanismos celulares envolvidos na alteração do influxo de cálcio e no aumento do Emax para Phe .....</b>	<b>77</b>
4.6.1) Avaliação da participação de eNOS no aumento de Emax para Phe na carótida contra-lateral.....	77
4.6.2) Avaliação da participação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no aumento de Emax para Phe na carótida contra-lateral.....	79
4.6.3) Avaliação da participação de COX-2 no aumento de Emax para Phe na carótida contra-lateral.....	80
4.6.4) Avaliação da participação de K <sub>Ca</sub> no aumento de Emax para Phe na carótida contra-lateral.....	82
4.6.5) Avaliação da participação de junções intercelulares do tipo GAP no aumento de Emax para Phe na carótida contra-lateral.....	84
<b>4.7) Consequência da resposta neurocompensatória ao cateter balão na</b>	

ativação de Rho-quinase na artéria carótida contra-lateral à lesão.....	87
4.8) Consequência da resposta neurocompensatória ao cateter balão na contração induzida pelo KCl na carótida contra-lateral à lesão.....	92
4.9) Consequência da resposta neurocompensatória ao cateter balão sobre o relaxamento induzido pela Acetilcolina.....	95
5) DISCUSSÃO.....	98
6) CONCLUSÕES.....	109
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

## RESUMO

PEREIRA, A.C. **Mecanismos celulares que influenciam a sinalização por  $\alpha_1$ -adrenoceptores na carótida contra-lateral à lesão por cateter balão.** 2009. 127 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Em artérias carótidas de ratos, a lesão provocada pela angioplastia por cateter balão resulta em resposta neurocompensatória na carótida contra-lateral à lesão, com aumento da inervação contendo substância P e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), além de alteração de reatividade a agonistas vasoconstritores. O objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos relacionados à alteração de reatividade à fenilefrina (Phe) na carótida contra-lateral à lesão, 1, 2, 4 e 15 dias após a lesão. A análise histológica mostrou que a carótida contra-lateral à lesão é semelhante ao controle. Na artéria ipsi-lateral a camada endotelial estava ausente e, aos 15 dias após a lesão observou-se a presença da neointima. Curvas concentração-resposta para Phe (contração) foram realizadas em anéis isolados de carótidas contra-laterais e controles, 1, 2, 4 e 15 dias após a lesão. No quarto dia após a lesão, observou-se aumento no efeito máximo (Emax) da Phe na artéria contralateral em relação ao controle. Para avaliar se o aumento no Emax da Phe estava relacionado à mobilização de cálcio induzida por esse agonista, foi usada solução de Krebs sem cálcio, contendo ou não EGTA e curvas concentração resposta para  $\text{CaCl}_2$ . Observamos que a mobilização de cálcio intracelular induzido pela Phe na contra-lateral não estava alterada em relação ao controle, mas o influxo de cálcio estava reduzido. Este resultado foi confirmado em usando anéis de carótida marcados com Fluo-3AM em microscópio confocal. Na presença de inibidores específicos, observou-se que a isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase, canais para potássio dependentes de cálcio, prostanoídes derivados da COX-2, ânion superóxido e junções do tipo Gap estão envolvidos na redução do influxo de cálcio na contra-lateral. No entanto, não há participação de óxido nítrico, guanilato ciclase ou da Ca-ATPase do retículo. Ânion superóxido, COX-2 e junções do tipo Gap também participam do aumento de Emax da Phe na carótida contra-lateral à lesão. Os resultados sugerem ainda que ânions superóxido promovem aumento da atividade de Rho-quinase na artéria contra-lateral em relação ao controle, conforme observado em curvas de relaxamento com Y-27632 (inibidor de Rho-quinase), após pré-contração com Phe. A potência para Phe e para  $\text{CaCl}_2$  na contra-lateral foi semelhante ao controle, assim como o relaxamento induzido pela acetilcolina e a contração desencadeada pelo KCl. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a resposta neurocompensatória ao cateter balão resulta em alterações na sinalização celular que interferem na reatividade à Phe na carótida contra-lateral à lesão. Estas alterações são dependentes do endotélio, desencadeadas, provavelmente, por um estresse oxidativo causado por ânions superóxido e sugerem a existência de mecanismos compensatórios para manter o tônus vascular.

Palavras-chave: lesão vascular, carótida, reatividade vascular, fenilefrina, mobilização de cálcio, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

PEREIRA, A.C. **Cellular mechanisms influence  $\alpha_1$ -adrenoceptors signaling in contralateral carotid after balloon catheter injury.** 2009. 127 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

In rat carotid arteries, balloon catheter injury results in neurocompensatory response in contralateral carotid, leading to increased levels of substance P and CGRP (calcitonin gene-related peptide), beside alterations in reactivity to vasoconstrictor agonists. The aim of this work was to study the mechanisms involved in alterations in phenylephrine (Phe) responsiveness in contralateral carotid, 1, 2, 4 and 15 days after injury. Histological analysis showed that contralateral carotid was similar to control. Endothelium was absent in ipsilateral arteries, but 15 days after lesion it was observed the neointima. Concentration-response curves to Phe (contraction) were performed in isolated carotid rings, control and contralateral, 1, 2, 4 and 15 days after lesion. In the fourth day after lesion, it was observed increase in maximum effect ( $E_{max}$ ) to Phe in contralateral compared to control arteries. In order to verify if the increase in  $E_{max}$  to Phe was related to calcium mobilization by this agonist, it was used free-calcium Krebs solution containing or not EGTA, and concentration-response curves to  $CaCl_2$ . It was observed that intracellular calcium mobilization by Phe was similar to control, but calcium influx was reduced in contralateral. Confocal microscopy, using carotid rings loaded with Fluo-3AM, was also utilized to corroborate this result. In presence of specific inhibitors, it was observed that endothelial isoform of nitric oxide synthase, calcium-activated potassium channels, prostanooids from COX-2, superoxide anions and Gap-junctions are involved on reduction of Phe-induced calcium influx. However, neither nitric oxide, guanylate cyclase nor sarcoendoplasmic reticulum Ca-ATPase participate in this response. Superoxide anions, COX-2 and Gap-junctions also play a role on increased  $E_{max}$  to Phe in contralateral carotid. Furthermore, superoxide anions promote increase in Rho-kinase activity in contralateral carotid compared to control, as it was observed in relaxation curves with Y-27632 (Rho-kinase inhibitor), after Phe pre-contraction. Phe and  $CaCl_2$  potency in contralateral were similar to control, like acetylcholine relaxation and KCl-induced contraction. Results obtained in this work indicate that the neurocompensatory response to balloon catheter injury leads to alterations in the signaling pathway downstream  $\alpha_1$ -adrenoceptor activation in contralateral carotid. These alterations are endothelium dependent and, probably, triggered by oxidative stress due to superoxide anions. Taken together, data suggest the existence of compensatory mechanisms to maintain the vascular tonus.

Keywords: vascular injury, carotid, vascular reactivity, phenylephrine, calcium mobilization, oxidative stress.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>18 <math>\alpha</math>-GA</b>	Ácido 18 $\alpha$ -glicirretínico
<b>Ang</b>	Angiotensina
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ATPase</b>	Adenosina trifosfatase
<b>BK<sub>Ca</sub></b>	Canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íon cálcio
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de cálcio
<b>CGRP</b>	Calcitonin gene-related peptide (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina)
<b>COX</b>	Enzima Ciclooxygenase
<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b>	glicose
<b>CPI-17</b>	Proteína inibitória da subunidade catalítica da miosina fosfatase
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentração de droga que produz 50% do efeito máximo
<b>EGTA</b>	Ácido etilenoglicolbisaminoetileteretracético
<b>E<sub>max</sub></b>	Efeito máximo
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>g</b>	Gramas
<b>GCs</b>	Guanilato ciclase solúvel
<b>GDP</b>	Guanosina difosfato
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzida
<b>IP<sub>3</sub></b>	Trifosfato de inositol
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	fosfato de potássio monobásico
<b>K<sub>ATP</sub></b>	Canais para potássio sensíveis ao ATP (adenosina trifosfato)
<b>K<sub>v</sub></b>	Canais para potássio sensíveis à voltagem
<b>L</b>	Litro
<b>L-NAME</b>	N-nitro-L-arginina metil éster
<b>L-NNA</b>	N-nitro-L-arginina
<b>log [M]</b>	logaritmo da concentração molar
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno
<b>MYPT-1</b>	Subunidade regulatória da miosina fosfatase
<b>n</b>	Número
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	bicarbonato de sódio
<b>NAD(P)H oxidase</b>	Enzima oxidase dependente do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintase neuronal
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Ânion superóxido
<b>pD<sub>2</sub></b>	Cologarítmo da concentração de droga que produz 50% do efeito máximo
<b>pH</b>	Cologarítmo da concentração de íons hidrogênio

<b>Phe</b>	Fenilefrina
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>PLD</b>	Fosfolipase D
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>VOC</b>	Canal para cálcio operado por voltagem
<b>Rho-K</b>	Rho-quinase
<b>ROC</b>	Canal para cálcio operado por receptor
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species – espécies reativas de oxigênio
<b>RyR</b>	Receptores de rianodina
<b>SK<sub>Ca</sub></b>	Canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância
<b>SOC</b>	Canal para cálcio operado por estoque
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TEA</b>	Tetraetilamônio
<b>7-NI</b>	7-nitroindazol
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μm</b>	Micromêtro
<b>°C -</b>	graus Celsius
<b>P&lt;0,05</b>	Significância estatística, Probabilidade menor que 5%
<b>40X</b>	Quarenta vezes
<b>63X</b>	Sessenta e três vezes

## ***1-INTRODUÇÃO***

## 1.1- ESTADO DA ARTE

As doenças cardiovasculares representam um problema de saúde pública com grande impacto na sociedade em todo o mundo. Os custos decorrentes do tratamento e suas complicações são bastante significativos (BALU; THOMAS, 2006). Estudos estimam que 33% do total de óbitos em adultos acima de 35 anos são decorrentes de doenças cardiovasculares (AZAMBUJA et al., 2008). No Brasil, há décadas as doenças cardiovasculares representam a primeira causa de morte e são responsáveis por 1.150.000 internações/ano (HIPERDIA, 2006; AZAMBUJA et al., 2008).

Dentre as patologias cardiovasculares destaca-se a aterosclerose, um processo complexo, que pode bloquear a fluxo sanguíneo (LUSIS, 2000). A aterosclerose é comumente tratada por meio de angioplastia, procedimento que envolve a passagem de um pequeno balão pela região ocluída, inflando-o para comprimir o agente bloqueador e restaurar o fluxo sanguíneo (GRECH, 2003). Apesar de ser uma técnica efetiva, o ato de inflar o balão causa uma lesão física no vaso que pode provocar uma restenose (SCHWARTZ, 1994).

Milner et al. (1997) observaram que a lesão causada pelo cateter balão induz mudanças fisiológicas tanto na artéria ipsi-lateral (lesionada) quanto na contra-lateral à lesão. Estes autores mostraram que a lesão por cateter balão desencadeia respostas neurocompensatórias que alteram a inervação perivascular contendo neuropeptídeos sensoriais na artéria carótida lesionada e também na artéria contra-lateral à lesão.

Accorsi-Mendonça et al. (2004) observaram que a lesão por cateter balão em carótida de ratos desencadeia alterações na reatividade vascular a agonistas contráteis em ambas as artérias. Na artéria carótida ipsi-lateral, a lesão por cateter balão promoveu redução significativa no Emax da fenilefrina (Phe) e da angiotensina II (AngII), enquanto na artéria carótida contra-lateral, os autores observaram aumento de Emax da Phe aos 4 dias após a lesão e aumento de Emax da AngII aos 15 dias após a lesão. Segundo Accorsi-Mendonça e cols. (2004), trata-se de um efeito vascular leito-específico que não decorre de processos humorais, já que a reatividade vascular à Phe e à AngII na artéria aorta de animais operados não foi alterada.



Dados da literatura sugerem que a lesão por cateter balão desencadeia uma resposta neurocompensatória na carótida contra-lateral à lesão, promovendo alterações na reatividade vascular. Tal observação justifica a importância de esclarecer os mecanismos celulares envolvidos nestas alterações que interferem na sinalização por alfa<sub>1</sub>-adrenoceptores na carótida contra-lateral à lesão por cateter balão.

## 1.2 - REVISÃO DA LITERATURA

A parede arterial é constituída por três camadas morfológicamente distintas: a camada íntima, que reveste a superfície interna dos vasos, é constituída por uma única camada de células endoteliais e por uma lâmina de fibras elásticas denominada membrana limitante elástica interna (DAVIES; HAGEN, 1993); a camada média, composta por células musculares lisas com formato alongado, envolvidas por colágeno, fibras elásticas e proteoglicanas, responsáveis pela manutenção do tônus muscular e pela integridade do vaso por meio da proliferação e síntese de matriz extracelular (CAMBELL et al., 1988) e a camada adventícia, mais externa, formada por fibroblastos intercalados por células musculares lisas localizadas entre os feixes de colágeno e proteoglicanas (HUSHANG, 1979). Em artérias de maior calibre, existe um conjunto de microvasos, denominado de “vasa-vasorum”, localizado na camada adventícia e média, responsável pela nutrição e oxigenação das células da parede dos vasos (SCOTLAND et al., 2000).

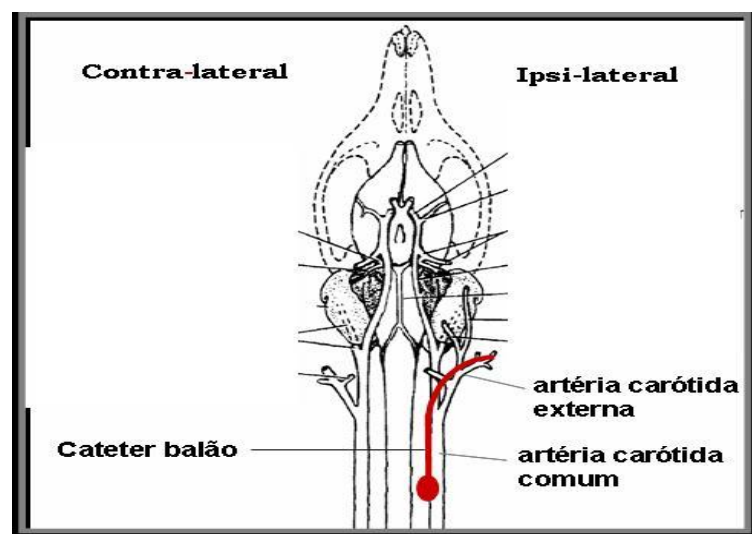
Estímulos fisiológicos ou patológicos podem induzir aumento, diminuição ou mudanças na forma dos componentes de parede arterial (GLAGOV, 1994; GLIBBONS; DZAU, 1994; FAXON et al., 1997). Em termos de morbidade e mortalidade humana, as desordens do sistema arterial, em particular aquelas relacionadas à interface luminal, assumem grande importância (CAMILLERI, 1989).

Dentre as doenças cardiovasculares relacionadas a alterações na estrutura da parede dos vasos sanguíneos, destaca-se a aterosclerose. A aterosclerose é caracterizada por lesões na íntima denominadas ateromas, que invadem e obstruem o lúmen vascular, gerando sérias complicações (ROSS, 1999). Trata-se de um processo complexo que envolve células inflamatórias, disfunção endotelial, proliferação de célula muscular lisa, alteração da matriz extracelular e trombose, resultando em estenose (LUSIS, 2000).

Em vasos contendo placa de ateroma, a angioplastia é um procedimento cirúrgico empregado, desde o final da década de 70, para restabelecer o fluxo sanguíneo. A desobstrução do vaso origina lesões na camada íntima e média (SCHWARTZ, 1994), que desencadeiam o remodelamento vascular, processo com

proliferação, migração e invasão de células inflamatórias, musculares lisas e/ou endoteliais, estabelecendo alterações histológicas que podem levar à formação da camada neoíntima e restenose subsequente (ZHANG et al., 2004; SCHWARTZ; HENRY, 2002). O remodelamento também promove disfunção endotelial com diminuição do vasorelaxamento dependente do endotélio, adesão plaquetária (SHIBATA et al., 2001), e mudança do fenótipo das células musculares de contrátil para sintético (KOCHER et al., 1991; MAJESKY et al., 1992).

O modelo experimental de angioplastia por cateter balão (Figura 1) é muito utilizado para a compreensão de disfunções vasculares originárias da formação da camada neoíntima, durante o processo de reparo tecidual (CLOWES et al., 1983).



**Figura 1: Esquema representativo da angioplastia por cateter balão, em artéria carótida de rato (Adaptado de Clowes et al., 1983).**

Sabe-se que tanto o sistema nervoso simpático quanto o sensorial estão intimamente relacionados às células inflamatórias. A estimulação de nervos sensoriais resulta na liberação de neuropeptídeos como substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) que geram um processo denominado inflamação neurogênica (RICHARDSON; VASKO, 2002). Este processo, mediado principalmente

por fibras amielínicas do tipo C, envolve transmissão antidrômica e resulta em reações em sítios distantes do estímulo ou local da lesão (BLACK, 2002).

Além de SP e CGRP, outras substâncias são sintetizadas e liberadas de neurônios sensoriais, como glutamato. Existem evidências de que neurônios sensoriais contêm ciclooxygenases (COX), sendo capazes, ainda, de sintetizar prostaglandinas próinflamatórias (VASKO et al, 1994). A inervação sensorial está presente na maioria dos órgãos e tecidos, principalmente nos vasos sanguíneos. Pernow (1983) observou a existência de fibras contendo SP próximas à parede dos vasos. Já Brain e Cox (2006), citam a existência de nervos perivasculares associados às células endoteliais.

SP produz relaxamento dependente do endotélio ao atuar em receptores NK-1 no endotélio, que resulta na produção de NO (D'ORLEANS-JUSTE et al., 1986). A SP também produz contração dependente do endotélio atuando nos receptores NK-1 (SHIRAHASE et al., 1995) e contração independente do endotélio atuando em receptores do tipo NK-2 no músculo liso (D'ORLEANS-JUSTE et al., 1986). A SP também promove aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS – reactive oxygen species) (CHIEN et al., 2003; BARDELLI et al., 2005 ; KAREN et al., 2007).

CGRP é um potente vasorelaxante, que promove ativação da adenilato ciclase e da guanilato ciclase (GRAY; MARSHALL, 1992), diminuição da concentração de cálcio intracelular (DONG et al., 2005), ativação de canais para potássio e hiperpolarização (HOOD et al., 1991; MAGGI, 1995). A SP modula os efeitos de CGRP (MAGGI, 1995).

A função de nervos sensoriais é modulada por outros transmissores, como a noradrenalina liberada de nervos eferentes adjacentes. A ativação de alfa-adrenoceptores exerce influência inibitória na liberação de neuropeptídeos de terminações nervosas sensoriais (KAWASAKI et al., 1990; FUDER; SELBACH, 1993). Deste modo, a vasoconstrição simpática e a vasodilatação antidrômica atuam de forma competitiva no controle do tônus vascular (MERHI et al., 1998; HABLER et al., 1997). Vários estudos mostram a existência de mecanismos regulatórios recíprocos entre nervos sensoriais e noradrenérgicos (TERENGGHI et al., 1986; UNGER et al., 1988; MIONE et al., 1992; MAGGI, 1995).

Alterações na inervação sensorial induzidas pela lesão causada pelo cateter balão, foram observadas tanto no local da lesão quanto em sítios específicos

anatomicamente distantes. Milner et al. (1997) observaram que existe uma diminuição na inervação relacionada à SP e CGRP um dia após a lesão por cateter balão em artéria carótida de ratos. Paralelamente, observaram que existe um aumento substancial desta inervação na artéria contra-lateral à lesão por cateter balão (MILNER et al., 1997). Após 28 dias, a inervação de ambas as artérias retornou aos níveis normais. Milner et al. (1997) concluíram que a lesão por cateter balão desencadeia respostas neurocompensatórias que alteram a inervação perivascular, com aumento de neuropeptídeos sensoriais na artéria contra-lateral à lesão.

Bruijns et al.(1998) observaram que em animais simpatotectomizados quimicamente, a angiotensina II promove um aumento na síntese de DNA e proliferação celular em células de músculo liso na artéria carótida contra-lateral à lesão por cateter balão. O mesmo não foi observado na artéria lesionada.

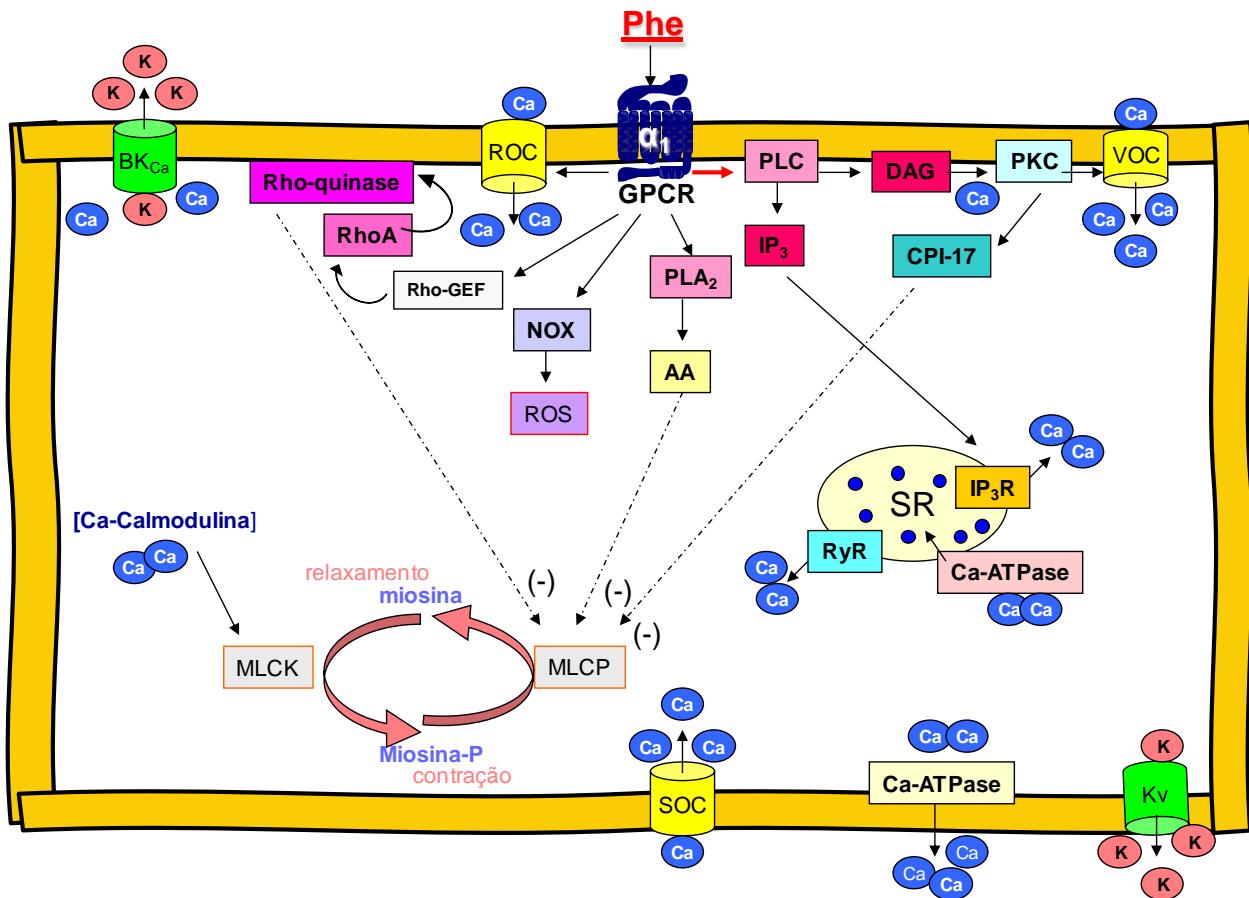
Accorsi-Mendonça et al. (2004) observaram em carótidas de rato lesionadas por cateter balão, redução da reatividade à fenilefrina (Phe) e à angiotensina II (AngII). Por outro lado, foi observado aumento da reatividade à Phe e à AngII na artéria contra-lateral à lesão, entre 4-7 dias e entre 15-30 dias após a lesão, respectivamente. Este aumento de reatividade na artéria contra-lateral foi transitório, voltando aos níveis normais posteriormente. Segundo os autores, esta alteração na reatividade é um efeito vascular leito-específico, que não decorre de fatores humorais, já que na artéria aorta destes animais não se observou alteração de reatividade a estes agonistas.

Outros modelos experimentais de lesão vascular também resultaram em alterações de reatividade à Phe na artéria carótida contra-lateral. Fukada et al. (2004) observaram que o implante de colar de silicone em artéria carótida de rato promoveu aumento de efeito máximo para Phe na artéria contra-lateral, 4 dias após o implante. No processo de estenose total em artéria carótida de cobaio, de Andrade (2008) verificaram que, após 90 dias, existe aumento de efeito máximo para Phe na contra-lateral. Fukada et al. (2004) e de Andrade (2008) sugerem existência de mecanismos compensatórios complexos e pouco conhecidos, ativados na artéria contra-lateral após a injúria vascular.

A Phe é um agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico. Os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos não formam uma população homogênea e, subdividem-se em três subtipos:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ , e  $\alpha_{1D}$ , todos acoplados à proteína  $G_{q/11}$  (ZHONG; MINNEMAN, 1999).

Os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos podem ser expressos simultaneamente no músculo liso vascular (ZHONG E MINNEMAN, 1999). Estudos de microscopia de fluorescência mostraram que receptores do tipo  $\alpha_{1D}$  localizam-se principalmente no interior da célula, os  $\alpha_{1B}$  na superfície celular e os  $\alpha_{1A}$  em ambos os locais (CHALOTHORN et al., 2002; GARCÍA-CAZARÍN et al., 2008). García-Cazarín et al. (2008) mostraram que em células de músculo liso de aorta humana, receptores do tipo  $\alpha_{1D}$  sofrem dimerização na presença de outros  $\alpha_1$ -adrenoceptores concomitantemente, sem, no entanto, alterar sua funcionalidade. Foi observado que durante o amadurecimento e envelhecimento animal, a responsividade vascular bem como o subtipo de  $\alpha_1$ -adrenoceptor predominante variam em aorta e carótida de ratos Wistar (de OLIVEIRA et al, 1998).

A interação com o receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico resulta principalmente na ativação da fosfolipase C (PLC), mas outras vias de sinalização também são ativadas, como o influxo capacitativo de cálcio, fosfolipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ), fosfolipase D (PLD) e metabolismo de AMP cíclico (MINNEMAN, 1988). A PLC atua sobre fosfolípidos de membrana produzindo trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  atua em receptores específicos no retículo sarcoplasmático, enquanto o DAG, na presença de cálcio, ativa a proteína quinase C (PKC) (Figura 2). A PKC ativa canais para cálcio na membrana plasmática (canais para cálcio ativados por voltagem - VOC, principalmente do tipo L), promovendo a entrada de cálcio no meio intracelular (MINNEMAN, 1988; ZHANG et al., 1998; ZHONG E MINNEMAN, 1999). A PKC também modula a atividade de canais para potássio (SHEARMAN et al., 1989, BONEV et al., 1997), além de ativar CPI-17, uma proteína inibitória capaz de se ligar à subunidade catalítica da miosina fosfatase sensibilizando os filamentos contráteis ao cálcio (KITAZAWA et al., 2000).



**Figura 2: Esquema representando os mecanismos envolvidos na contração desencadeada pela ativação de  $\alpha_1$ -adrenocetores.** GPCR: receptor acoplado à proteína G – receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico; Phe: fenilefrina; Ca: íons cálcio; K: íons potássio; ROC: canal para cálcio operado por receptor; VOC: canal para cálcio operado por voltagem; SOC: canal para cálcio operado por estoque; BK<sub>Ca</sub>: canal para potássio dependente de cálcio; K<sub>v</sub>: canal para potássio dependente de voltagem; PLC: fosfolipase C; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína quinase C; CPI-17: proteína inibitória da miosina fosfatase; IP<sub>3</sub>: trifosfato de inositol; IP<sub>3</sub>R: receptor de IP<sub>3</sub>; SR: retículo sarcoplasmático; RyR: receptor de rianodina; Ca-ATPase: bomba Ca-ATPase do retículo e da membrana; PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>; AA: ácido araquidônico; NOX: NADPH oxidase; Rho-GEG: fator de troca de GTP/GDP; ROS: espécies reativas de oxigênio; MLCK: miosina quinase; MLCP: miosina fosfatase. (adaptado de KOSHIMIZU et al., 2002; SAKURADA et al., 2001; KOYAMA et al., 2000; ZHONG; MINNEMAN, 1999; NISHIO; WATANABE, 1997; SAH et al., 1996; HOWE; MARSHALL, 1993; MINNEMAN 1988).

A ativação do receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico resulta em liberação de ácido araquidônico por diferentes mecanismos (ZHONG E MINNEMAN, 1999). Proteínas quinases são ativadas por receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, como MAPK (p38, ERK, JNK), tirosina quinase

e GTPases como a Rho (KOSHIMIZU et al., 2002; HOWE; MARSHALL, 1993; SAH et al., 1996). Também ocorre ativação de NAD(P)H oxidase e geração de ROS (XIAO et al., 2002; NISHIO; WATANABE, 1997) (Figura 2).

A ativação de adrenoceptores promove a mobilização de cálcio intracelular e extracelular. O aumento na concentração de cálcio intracelular ativa a liberação de cálcio induzida por cálcio, através de canais do tipo rianodina no retículo e, simultaneamente, a diminuição do cálcio armazenado no retículo ativa o influxo capacitativo de cálcio por canais operados por estoque (SOC) (FLOREA; BLATTER, 2007; BERRIDGE et al., 2005). A bomba Ca-ATPase do retículo é ativada, repondo o estoque de cálcio reticular (BERRIDGE et al., 2005). O influxo de cálcio extracelular ocorre por canais do tipo VOC, SOC e também por canais para cálcio operados por receptor (ROC) (FASOLATO et al., 1994). A concentração de cálcio intracelular é mantida pela ativação de bombas Ca-ATPases do retículo e da membrana, de trocadores de sódio/cálcio e de canais para potássio dependentes de cálcio, que reduzem a concentração de cálcio intracelular ao nível basal (BERRIDGE et al., 2005; BONEV et al., 1997).

No músculo liso vascular, o aumento na concentração de cálcio intracelular resulta na ativação da quinase da cadeia leve da miosina e fosforilação da miosina. Uma vez fosforilada, a miosina interage com filamentos de actina, produzindo a contração (SOMLYO; SOMLYO, 2000). A resposta contrátil resultante da ativação de receptores adrenérgicos é mediada por receptores do subtipo  $\alpha_{1D}$  em várias artérias de ratos Wistar, como na aorta (HIEBLE et al., 1995; HUSSAIN; MARSHALL, 1997; AREVALO-LEON et al., 2003) e na carótida (VILLALOBOS-MOLINA et al., 1996; de OLIVEIRA et al., 1998; GÓMEZ-ZAMUDIO et al., 2002).

A ativação de receptores acoplados a proteínas G, como é o caso dos alfa-adrenoceptores, resulta em maior força para uma mesma concentração de cálcio, em relação à despolarização. Isto ocorre devido ao mecanismo de sensibilização dos filamentos contráteis ao cálcio, em que o aumento da força independe de aumento na concentração de cálcio intracelular. A ativação destes receptores promove a ativação de Rho-GEF (fator de troca para GTP/GDP) e, conseqüentemente, ativação da via de sinalização RhoA/Rho-quinase (SEASHOLTZ et al., 1999; VILLALBA et al., 2007;



SAKURADA et al., 2001). A Rho-quinase favorece a contração muscular fosforilando resíduos de treonina e serina na subunidade regulatória da miosina fosfatase (MYPT-1) e inibindo sua atividade (KIMURA et al, 1996), além de fosforilar diretamente a miosina (AMANO et al., 1996). A Rho-quinase também fosforila e ativa a CPI-17, outra proteína inibitória da miosina fosfatase que também promove sensibilização dos filamentos contráteis ao cálcio (KOYAMA et al., 2000).

Sakurada et al. (2003), observaram que existe um mecanismo dependente de cálcio para a ativação da via RhoA/Rho-quinase na musculatura lisa vascular, onde o aumento da concentração de cálcio no citoplasma provoca a translocação de RhoA para a membrana e fosforilação da miosina. Lisofosfolípídeos, ácido araquidônico e espécies reativas de oxigênio podem ativar diretamente a Rho-quinase, independentemente da RhoA (JIN et al., 2004; SHIRAO et al., 2002; FENG et al., 1999).

A estimulação de  $\alpha_1$ -adrenoceptores desencadeia proliferação, crescimento e migração de células musculares lisas no processo de formação da neointima após injúria vascular (ZHANG; FABER, 2001; ERAMI et al., 2002). Segundo Bleeke et al. (2004), a proliferação de células musculares lisas, após injúria vascular é decorrente da ativação de receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos e da geração de ROS. Utilizando um antagonista seletivo, BMY 7378, García-Cazarín et al. (2008) observaram que o subtipo  $\alpha_{1D}$  é responsável pela mobilização de cálcio intracelular, geração de ROS e contração estimulada por Phe em células musculares lisas de aorta humana.

Os receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos também são expressos no endotélio de alguns vasos, como em carótida de ratos, onde promovem vasorelaxamento (BOER et al., 1999; FILIPPI et al., 2001; de ANDRADE et al., 2006). Devido à maior seletividade da Phe por este subtipo, o relaxamento ocorre na presença do agonista em concentrações muito menores que as necessárias para induzir contração muscular (FILIPPI et al., 2001).

O mecanismo de relaxamento induzido por ação  $\alpha_1$ -adrenoceptores envolve a produção e liberação de óxido nítrico (NO) do endotélio vascular, que atua como um controle local da resposta vasoconstritora de aminas simpatomiméticas (BOER et al., 1999) e explica o aumento da resposta vasoconstritora por estimulação adrenérgica na ausência de endotélio ou na presença de inibidor de óxido nítrico sintase (NOS)

(GREENBERG et al., 1989). Segundo Filippi et al. (2001), este efeito vasorelaxante é dependente da ativação de PLC, geração de  $IP_3$  e mobilização de cálcio, resultando na ativação de NOS e produção de NO.

As alterações celulares que interferem na sinalização por receptores adrenérgicos na carótida contra-lateral à lesão não estão relacionadas a fatores humorais, mas são decorrentes da resposta neurocompensatória ativada pela lesão por cateter balão (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2004).

Os receptores  $\alpha_1$ .adrenérgicos são fundamentais em processos cardiovasculares fisiológicos e patológicos, sendo extremamente necessário entender os mecanismos envolvidos nas alterações desta via de sinalização (MINNEMAN, 1988).

Para melhor entender os mecanismos desencadeados pela lesão por cateter balão na hiper-reatividade à Phe na carótida contra-lateral, o presente estudo avaliou a resposta à Phe e a participação de fatores celulares nesta resposta na carótida contra-lateral à lesão.

## ***2. OBJETIVO***

## OBJETIVO GERAL

Estudar os fatores envolvidos no aumento da reatividade vascular à Phe na artéria carótida contra-lateral à lesão por cateter balão.

### Objetivos Específicos

- Estudar, em diferentes tempos pós-lesão, a resposta contrátil decorrente da ativação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos na artéria carótida contra-lateral à lesão por cateter balão.
- Estudar se o aumento do  $E_{max}$  para Phe é decorrente de alteração na mobilização de cálcio.
- Estudar a participação dos seguintes fatores celulares na mobilização de cálcio induzida por Phe na artéria contra-lateral :
  - Óxido nítrico sintases/óxido nítrico
  - Canais para potássio
  - Espécies reativas de oxigênio
  - Prostanóides
  - Junções do tipo Gap
  - Ca-ATPase do retículo
  - Dependência da ativação do receptor adrenérgico
- Estudar se os fatores envolvidos na mobilização de cálcio participam do aumento de  $E_{max}$  para Phe.
- Estudar a participação de Rho-kinase no aumento de  $E_{max}$  para Phe.

### ***3. MATERIAIS E MÉTODOS***

### **3.1- Animais**

Foram utilizados ratos Wistar adultos, com idade média de 80 dias (400-450g), provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo - *Campus* de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos com livre acesso de água e alimento, em temperatura constante de 22°C e em ciclo de luz de 12 horas (claro/escuro). O uso de animais nestes experimentos foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais do *Campus* de Ribeirão Preto (protocolo nº 06.1.1063.53.4).

### **3.2- Grupos experimentais**

O efeito da lesão por cateter balão na reatividade de artérias carótidas contralaterais à esta lesão, foi estudado 1, 2, 4 e 15 dias após a cirurgia. Foram utilizados dois grupos, sendo os animais da mesma idade: 1) grupo controle, composto por animais íntegros; 2) grupo submetido ao procedimento cirúrgico de lesão vascular por cateter balão. Os animais de ambos os grupos foram mantidos nas mesmas condições.

### **3.3- Cirurgia de Lesão Vascular por Cateter balão**

Os animais foram anestesiados com Cetamina (100mg/Kg) e Xilazina (100mg/Kg), via intraperitoneal. Foi realizada uma incisão longitudinal na linha média cervical anterior de aproximadamente 2 cm, separação por planos até identificação e isolamento das artérias carótidas comum, externa e interna esquerda.

As artérias externa e interna foram separadas e tracionadas, interrompendo o fluxo na artéria interna. Posteriormente, o fluxo sanguíneo foi interrompido na artéria comum, na porção distal à bifurcação carotídea e, por último, na artéria externa, impedindo o refluxo sanguíneo durante o procedimento. Então, foi realizada uma pequena incisão na carótida externa, por onde foi introduzido um cateter balão (2F Fogarty) até a luz da carótida comum. Com o cateter posicionado na luz do vaso, adicionou-se 0,1 mL de solução NaCl (0,9% - p/v), inflando o balão na luz arterial e distendendo a parede do vaso. Foram realizados três movimentos de deslocamento de cateter, no sentido longitudinal à bifurcação da carótida, lesando a maior parte possível do endotélio vascular.

Após a retirada do cateter, o fluxo pela carótida externa foi interrompido na porção proximal à bifurcação para evitar o sangramento e restabelecer o fluxo sanguíneo. O local foi suturado com fio de seda 3.0. Ao final do procedimento foi administrado oxitetraciclina (400 mg/Kg), via intramuscular.

### **3.4- Histologia**

Para a análise histológica, os animais foram anestesiados com Isoflurano e perfundidos, via cardíaca, com 20 mL de solução salina (NaCl, 0,9% - p/v) e posteriormente, 10 mL de formol tamponado em solução fosfato a 10% (v/v). Os segmentos de artérias carótidas controle, ipsi-laterais (lesionadas) e contra-laterais à lesão foram removidos e fixados em formol tamponado a 10% (v/v) durante 24 horas. Após a fixação, o tecido foi desidratado e incluído em blocos de parafina. Cortes de 4 µm de espessura foram dispostos em lâmina de microscopia. As lâminas foram coradas com Hematoxilina/Eosina, para verificar a ocorrência de alterações na estrutura da parede vascular. Os cortes foram analisados em microscópio Nikon (Japão) com aumento de 40x e, as imagens foram captadas por câmera digital (Coolpix 4500, Roper Scientific, Japão) e transferidas para o computador, onde foram editadas utilizando o software Adobe PhotoShop 7.0 (Adobe System Inc.; Nasdaq: ADBE; San Jose, CA, USA).

### **3.5- Protocolos Experimentais**

#### **3.5.1- Estudo da reatividade em preparações isoladas**

Os animais controle e operados (1, 2, 4 e 15 dias após a lesão por cateter balão) foram anestesiados com Isoflurano (via inalatória) e sacrificados por exsanguinação da aorta abdominal. Através de uma incisão na linha média do pescoço, a artéria carótida contra-lateral à lesão por cateter balão foi isolada e retirada do animal. Após o isolamento a artéria foi cortada em segmentos de 4mm e dois ganchos de metal foram inseridos no lúmen da mesma para produzir tensão, com cuidado para não lesar o endotélio.

Os anéis foram mantidos em cuba de órgão isolado contendo 5 mL de solução de Krebs cuja composição é (mmol/L): NaCl 118,4; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 1,9; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2;

MgSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11,6; pH 7,4. A temperatura foi mantida constante a 37°C, do mesmo modo que a aeração com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro, a um transdutor para registro de contração isométrica (Tri 201-Letica, Espanha). Os resultados das contrações foram obtidos em programa computacional (WINDAQ DI 148 – DATAQ Instruments, USA), conectado aos transdutores.

As preparações foram mantidas em repouso, sob uma tensão de 1g, durante 1h. Após o período de estabilização, a viabilidade da preparação foi testada com KCl (90 mmol/L) e Fenilefrina (Phe, 10<sup>-7</sup> mol/L). Conforme o protocolo experimental, o endotélio foi preservado ou removido mecanicamente. Em todos os experimentos, a presença do endotélio foi verificada pré-contraindo-se as preparações com Fenilefrina (Phe, 10<sup>-7</sup> mol/L) e adicionando-se posteriormente acetilcolina (ACh, 10<sup>-6</sup> mol/L). Aquelas que produziram relaxamento maior que 80% foram consideradas com endotélio.

#### **3.5.1.1- Conseqüências da resposta neurocompensatória ao cateter balão na reatividade vascular à Phe:**

Com o objetivo de avaliar a resposta contrátil da artéria contra-lateral à lesão por cateter balão à Phe, concentrações crescentes de Phe (10<sup>-10</sup> - 10<sup>-5</sup> mol/L) foram adicionadas às preparações na cuba. Foram utilizadas artérias carótidas de animais controle e artérias carótidas contra-laterais à lesão de animais operados, na presença e ausência de endotélio.

#### **3.5.1.2- Conseqüências da resposta neurocompensatória ao cateter balão na mobilização de cálcio intra e extracelular induzida por Phe:**

Neste experimento foi utilizada solução de Krebs sem cálcio e solução de Krebs sem cálcio com EGTA, que difere da solução de Krebs normal pela exclusão de CaCl<sub>2</sub> e adição de 1mmol/L de EGTA (Sigma). Inicialmente foram utilizadas artérias com e sem endotélio para melhor avaliar a participação do endotélio, posteriormente em



experimentos com inibidores específicos, foram utilizadas apenas artérias contendo endotélio.

**a) Mobilização do cálcio intracelular:** A solução de Krebs normal foi substituída por solução de Krebs sem cálcio e imediatamente após foi adicionado Phe ( $10^{-7}$  mol/L). A contração foi desencadeada pelo cálcio intracelular (TOSTES et al., 1995).

**b) Mobilização do cálcio extracelular:** Em solução de Krebs sem cálcio com EGTA, foi adicionada Phe ( $10^{-7}$  mol/L) sucessivamente, lavando-se com esta mesma solução de Krebs-EGTA, até que não mais fosse desencadeada contração (depleção do cálcio intracelular). Então, a solução de Krebs-EGTA foi substituída pela solução de Krebs sem cálcio e adicionou-se Phe ( $10^{-7}$  ou  $10^{-5}$  mol/L). Cerca de 5 minutos após a adição de Phe, foram adicionadas concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$  (0,05 – 2,5 mmol/L), obtendo-se uma curva concentração-resposta (TOSTES et al., 1996; TIRAPELLI, et al. 2006), que possibilitou estudar a contribuição do influxo de cálcio na resposta contrátil desencadeada pela Phe.

**3.5.1.3- Estudo de fatores decorrentes da resposta neurocompensatória que interferem no influxo de cálcio estimulado pela Phe:** Este protocolo teve como objetivo verificar quais as alterações celulares decorrentes da resposta neurocompensatória estariam interferindo no influxo de cálcio extracelular induzido por Phe na carótida contra-lateral à lesão por cateter balão. Foram utilizados animais controle e operados (4 dias após a cirurgia).

**a) Participação de NOS/óxido nítrico no influxo de cálcio extracelular estimulado pela Phe:** Após depleção do cálcio intracelular, em meio contendo solução de Krebs sem cálcio, as preparações foram incubadas com L-NAME (inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase – NOS,  $10^{-4}$  mol/L), 1400W (inibidor seletivo de NOS induzida – iNOS,  $10^{-7}$  mol/L) (GARVEY et al., 1997), L-NNA (inibidor seletivo de NOS endotelial – eNOS,  $10^{-4}$  mol/L), 7-NI (inibidor seletivo de NOS neuronal – nNOS,  $10^{-4}$  mol/L), ODQ (inibidor da enzima guanilato ciclase,  $10^{-6}$  mol/L) (TIRAPELLI et al.,

2006) e Oxihemoglobina (sequestrador de óxido nítrico,  $10^{-5}$  mol/L, preparada a partir de hemoglobina bovina) (MARTIN et al., 1985; HERNANZ et al., 2004) por 30 minutos, adicionando-se, a seguir, Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$  (0,05 – 2,5 mmol/L).

**b) Participação de canais para potássio no influxo de cálcio na contração desencadeada pela Phe:** Após depleção do cálcio intracelular, em meio contendo solução de Krebs sem cálcio, as preparações foram incubadas com tetraetilamônio (inibidor não seletivo de canais para potássio - TEA,  $10^{-2}$  mol/L), 4-aminopiridina (inibidor seletivo de canais para potássio ativados por voltagem,  $10^{-3}$  mol/L), glibenclamida (inibidor seletivo de canais para potássio ativados por ATP,  $3 \times 10^{-6}$  mol/L), caribdotoxina (inibidor seletivo de canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância,  $10^{-7}$  mol/L) e apamina (inibidor seletivo de canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância,  $10^{-6}$  mol/L) por 30 minutos (TIRAPELLI et al, 2005), adicionando-se, a seguir, Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$  (0,05 – 2,5 mmol/L).

**c) Participação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no influxo de cálcio e na contração desencadeada pela Phe:** Após depleção do cálcio intracelular, em meio contendo solução de Krebs sem cálcio, as preparações foram incubadas com Tempol (sequestrador de ROS, SOD mimético permeável à membrana,  $10^{-3}$  mol/L) (ZHENG et al, 2003; JIN et al., 2004) ou Tiron (sequestrador de ânion superóxido, permeável à membrana,  $10^{-3}$  mol/L) (SHI et al, 2007) por 30 minutos, adicionando-se, a seguir, Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$  (0,05 – 2,5 mmol/L). Para excluir a possibilidade de geração de peróxido de hidrogênio por ação do Tempol, o mesmo procedimento também foi realizado incubando com poli-etilenoglicol (PEG)-catalase (250U/mL), em associação ao Tempol (FRESQUET et al., 2006; OLTMAN et al., 2003; NURKIEWICZ; BOEGEHOLD, 2007; HERNANZ et al., 2004).

**d) Participação de prostanóides no influxo de cálcio e na contração desencadeada pela Phe:** Após depleção do cálcio intracelular, em meio contendo solução de Krebs sem cálcio, as preparações foram incubadas com Indometacina

(inibidor não seletivo das enzimas cicloxigenases - COX,  $10^{-5}$  mol/L) por 30 minutos (de Andrade et al., 2008) e a seguir foram adicionadas Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$  (0,05 – 2,5 mmol/L). O mesmo procedimento foi realizado incubando as preparações com SC-236 (inibidor seletivo de COX-2,  $10^{-10}$  mol/L) (OLIVON, 2006), já que a Indometacina exibe maior potência em inibir COX-1 (MITCHELL et al., 1994) e pode promover efeitos além da inibição de COX (de ANGELIS et al., 2004).

**e) Participação de junções do tipo Gap no influxo de cálcio e na contração desencadeada pela Phe:** Após a depleção do cálcio intracelular, os anéis de carótida foram incubados por 30 minutos com ácido 18  $\alpha$ -glicirretínico (18  $\alpha$ -GA,  $5 \times 10^{-6}$  mol/L) (GUPTA et al., 2008) em meio contendo solução de Krebs sem cálcio. Após, foi adicionado Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$  (0,05 – 2,5 mmol/L).

**f) Participação do retículo sarcoplasmático no influxo de cálcio e na contração desencadeada pela Phe:** Após a depleção do cálcio intracelular, os anéis de carótida foram incubados por 30 minutos com tapsigargina ( $10^{-6}$  mol/L) (TOSTES et al., 1996), um inibidor da enzima Ca-ATPase do retículo, em meio contendo solução de Krebs sem cálcio. Após, foi adicionado Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$  (0,05 – 2,5 mmol/L).

**g) Avaliação da mobilização de cálcio extracelular independente da ativação de receptor:** Após a depleção do cálcio intracelular, foi adicionada solução de KCl (90mmol/L) em meio contendo solução de Krebs sem cálcio. Posteriormente, foram adicionadas concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$  (0,05 – 2,5 mmol/L).

#### **3.5.1.4 – Conseqüências da lesão por cateter balão na via de sinalização RhoA – Rho-quinase**

Para avaliar se a cirurgia de lesão por cateter balão altera a sinalização dependente de Rho-quinase, artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão foram

pré-contraídas com Phe ( $10^{-7}$  mol/L), adicionando-se posteriormente concentrações crescentes de Y27632 (inibidor seletivo de Rho-quinase,  $10^{-10}$ - $10^{-5}$  mol/L). O mesmo procedimento foi realizado após incubar as preparações com Tiron ( $10^{-3}$  mol/L), por 30 minutos.

#### **5.1.5- Conseqüências da resposta neurocompensatória ao cateter balão na reatividade vascular ao KCl:**

Para verificar se o procedimento de lesão por cateter balão altera a capacidade contrátil, foram realizadas curvas concentração-resposta para KCl (10 a 120 mmol/L). Foram utilizadas artérias carótidas de animais controle e operados, na presença e ausência de endotélio.

#### **3.5.1.6- Conseqüências da resposta neurocompensatória ao cateter balão na reatividade vascular à acetilcolina (ACh):**

Com o objetivo de verificar se a lesão por cateter balão altera a capacidade de relaxamento endotelial, foram realizadas curvas concentração-resposta para ACh ( $10^{-10}$  -  $10^{-5}$  mol/L). Foram utilizadas artérias carótidas de animais controle e operados, na presença de endotélio.

#### **3.6- Microscopia confocal:**

Utilizando o fluorocromo Fluo 3-AM, foram realizados experimentos em microscópio confocal (Leica TCS SP2 \*) para melhor avaliar a mobilização de cálcio extracelular pela Phe. A microscopia confocal permite a visualização e análise simultânea de células endoteliais e musculares lisas, sendo possível observar o processo em tempo real.

**a) Preparo do material:** As artérias carótidas foram isoladas e colocadas em solução de Hanks (pH 7,4; 37°C), cuja composição é (mmol/L): NaCl 145,0; KCl 5,0; MgCl<sub>2</sub> 1,0; CaCl<sub>2</sub> 1,6; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5; Glicose 10,0; Hepes 10,0. Com auxílio de lupa e lâmina de bisturi foram cortados anéis de aproximadamente 150 µm de espessura. Estes anéis foram colocados em lamínula para microscopia confocal (42 mm de

diâmetro) contendo solução de poli-lisina 50% (diluída em Hanks) e mantidas a 37°C, sob aeração com mistura carbogênica, em câmara úmida, por cerca de 30 minutos para fixação. Posteriormente, foi adicionado Fluo 3-AM (10 µmol/L, diluído em Hanks), mantendo-se por mais 30 minutos. Após a incubação, o excesso foi removido lavando cuidadosamente com Hanks.

**b) Experimento:** Utilizando um laser de argônio, o Fluo 3-AM foi excitado em 488 nm e a emissão foi medida 510 nm. Utilizando objetiva de imersão em água (63x) e modo de aquisição xyt, a 400 Hz e 512x512 pixels, as imagens foram capturadas a cada 1,635 segundos. O programa Leica Mycosystem LAS AF Lite foi usado para analisar as imagens. Foram selecionadas para análise células (regiões de interesse) na camada endotelial e muscular. Considerou-se  $F_0$  como fluorescência basal antes do estímulo,  $F$  como fluorescência final após o estímulo, obtendo-se a porcentagem de aumento da intensidade de fluorescência ( $\Delta IF = [F - F_0 / F] \times 100$ ) (OLIVEIRA et al., 2008).

### 3.7- Drogas

NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O e NaHCO<sub>3</sub> (Synth), Apamina (American Peptide), Y-27632 (Tocris Bioscience), Isoflurano (Forane, ABBOTT), demais drogas e reagentes foram adquiridas da Sigma.

### 3.8- Análise dos dados

O estudo da reatividade vascular foi baseado em processos de interação droga-receptor através da análise dos parâmetros farmacológicos de efeito máximo (Emax) e potência ( $pD_2$ ). O Emax é definido como o efeito máximo que um agonista é capaz de produzir em um dado tecido sobre condições experimentais particulares (KENAKIN, 1997). Após a construção de várias curvas concentração-efeito para um agonista em um determinado tecido, o conjunto de  $\log EC_{50}$  (logaritmo da concentração do agonista que produz 50% do efeito máximo) assume uma distribuição normal, sendo esta a concentração com menor variação de resposta (KENAKIN, 1997), compatível com manipulações e comparações estatísticas (KENAKIN, 1997).  $pD_2$  é representado pelo cologaritmo da  $EC_{50}$ .

Os valores de Emax e log EC<sub>50</sub> foram determinados através de regressão não-linear dos mínimos quadrados utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad software, versão 3.01, 1999). A análise estatística utilizada para comparação entre os grupos controle e operados foi a análise de variância (ANOVA) de uma via (“one-way”), seguido do pós-teste de Newman-Keuls (P<0,05), através do programa GraphPad Prism (versão 3.01 Prism, Graphpad, USA).

Para as análises de intensidade de fluorescência, foi usado o teste T de Student não pareado.

***RESULTADOS***

#### **4.1- Estudo temporal das conseqüências da lesão por cateter balão na artéria carótida contra-lateral à lesão.**

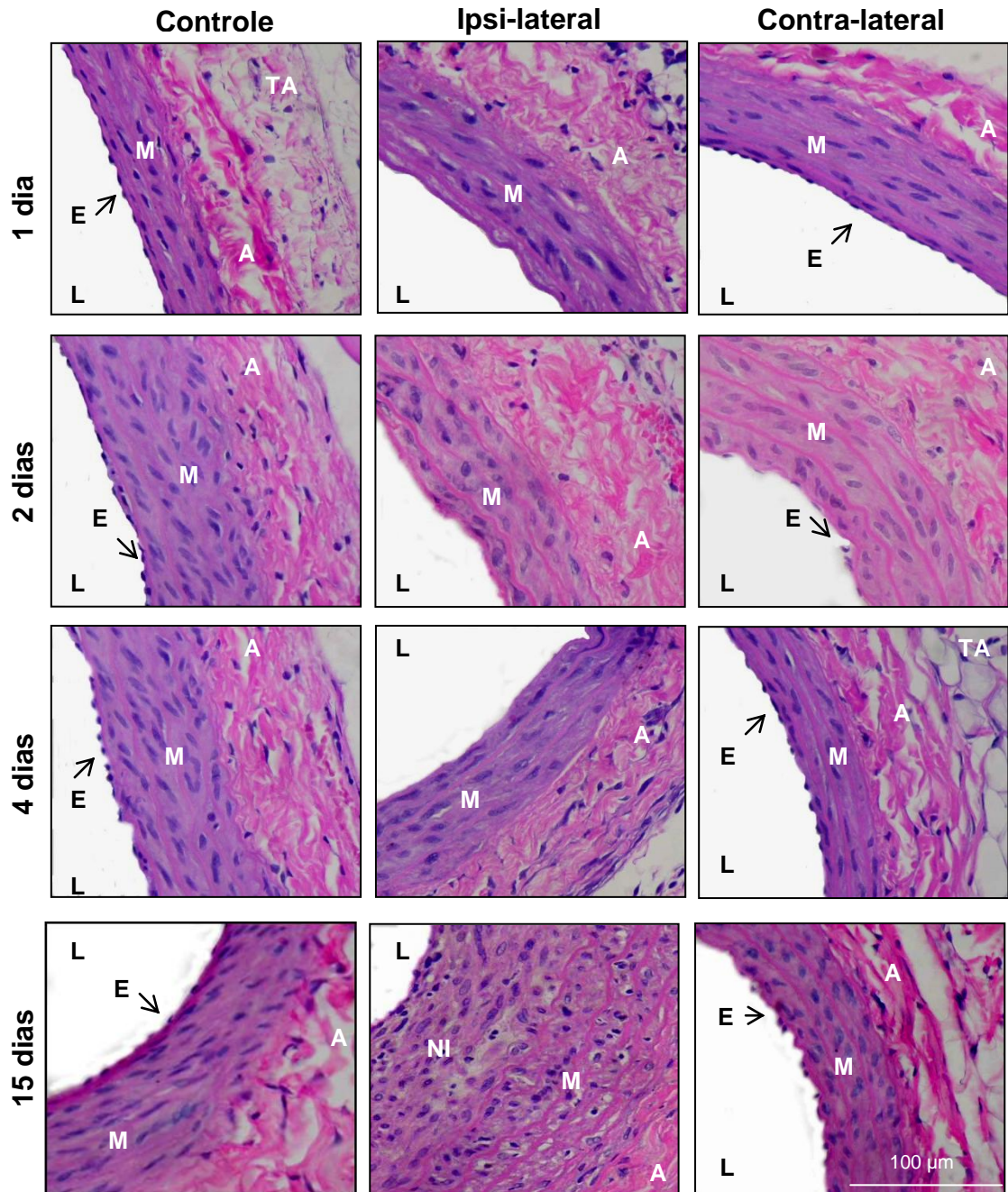
##### **4.1.1- Conseqüências da lesão por cateter balão na morfologia da artéria contra-lateral à lesão:**

As características morfológicas de artérias ipsi-laterais (lesadas) e contra-laterais à lesão foram visualizadas por meio de cortes histológicos, comparando-as com artérias controle (Figura 3).

As artérias contra-laterais à cirurgia, independente do período pós-cirúrgico analisado, apresentaram características morfológicas similares àquelas encontradas em artérias controles (Figura 3). Observou-se uma única camada de células endoteliais (camada íntima), posicionadas ao redor do lúmen vascular. Na camada média, pôde-se observar três a quatro camadas de células de músculo liso. Na camada adventícia observou-se a presença de fibras colágenas e a continuidade do tecido conjuntivo frouxo do tecido adjacente (Figura 3).

Em artérias ipsi-laterais à lesão, foi observada a presença de infiltrado inflamatório no tecido adjacente, enquanto as camadas média e adventícia apresentaram-se semelhantes às observadas em artérias controle. Após 1, 2 e 4 dias da cirurgia, o endotélio está ausente na artéria ipsilateral, pois foi denudado pelo cateter balão. Já aos 15 dias após a lesão, observou-se a formação da camada neoíntima, entre a média e o lúmen (Figura 3), resultado da proliferação celular em direção ao lúmen do vaso.





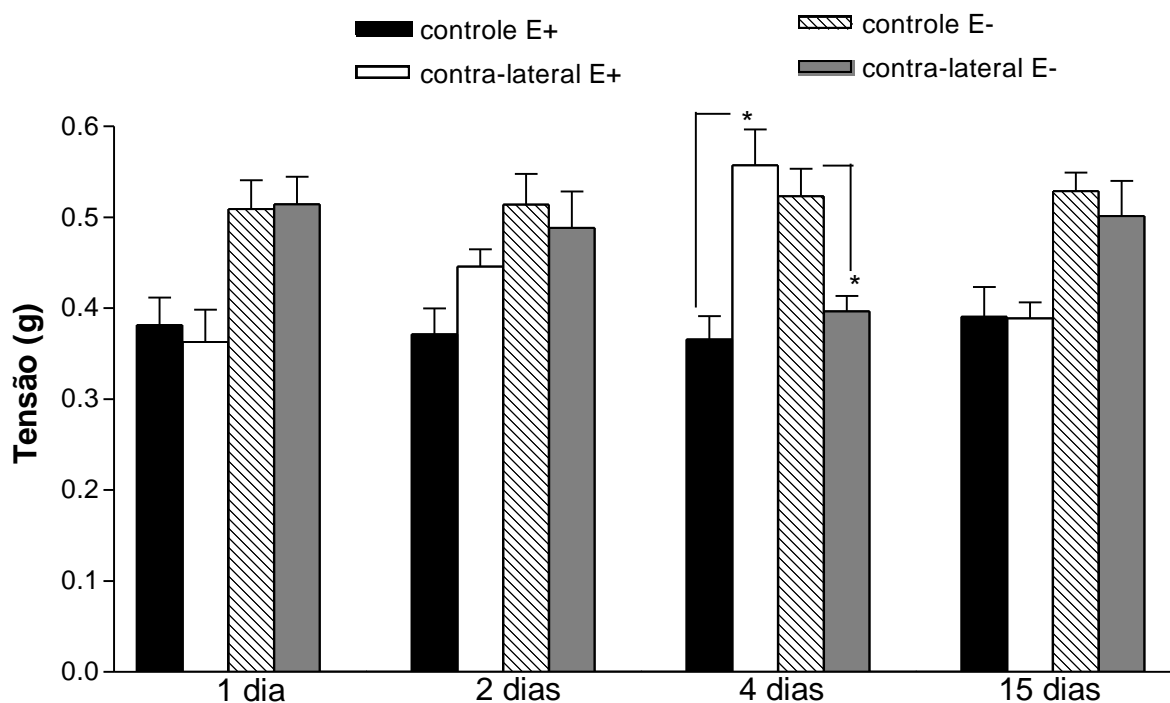
**Figura 3: Cortes histológicos representativos de artérias carótidas controle (animais intactos), ipsi-lateral e contra-lateral (animais operados) 1, 2, 4 e 15 dias após a lesão por balão cateter. Coloração: Hematoxilina/Eosina. E: endotélio, L: lúmem; M: camada média; A: camada adventícia; NI: camada neoíntima; TA: tecido adjacente. Objetiva: 40X.**

#### 4.1.2) Consequências da lesão por cateter balão na reatividade à Phe na artéria carótida contra-lateral à lesão:

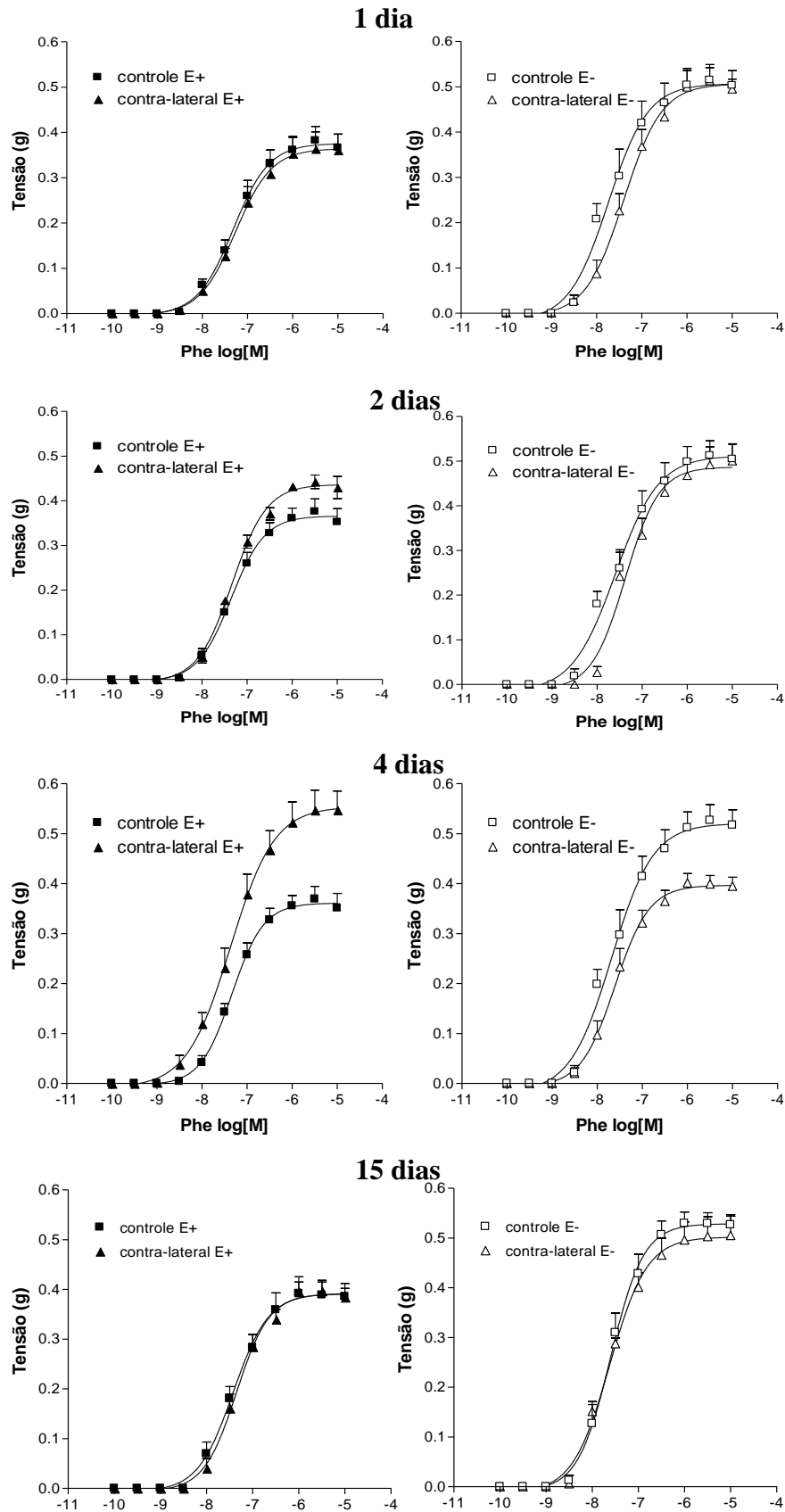
Para estudar as consequências da resposta neurocompensatória à lesão por cateter balão na reatividade à Phe na artéria contra-lateral, foram realizadas curvas concentração-resposta para Phe ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  mol/L), em diferentes tempos pós-lesão.

Em artérias contra-laterais 1 e 2 dias após a lesão, a resposta contrátil induzida por Phe foi semelhante ao controle (Figuras 4 e 5, Tabela 1).

Aos 4 dias após a lesão, observou-se aumento do efeito máximo ( $E_{max}$ ) para Phe na artéria contra-lateral com endotélio enquanto na ausência de endotélio observou-se redução do  $E_{max}$  para Phe em relação a artérias controle. Já aos 15 dias após a lesão, a reatividade à Phe foi semelhante em artérias contra-laterais e controle, na presença ou ausência de endotélio (Figuras 4 e 5, Tabela 1). Não foram observadas alterações de potência ( $pD_2$ ) entre os grupos estudados (Tabela 2).



**Figura 4: Efeito contrátil máximo ( $E_{max}$ ) da Phe em artérias carótidas controle e contralaterais isoladas 1, 2, 4 e 15 dias após a lesão, na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio.** Os dados representam a média  $\pm$  EPM. (\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls).



**Figura 5: Efeito contrátil induzido pela Phe em artérias carótidas controle e contra-laterais isoladas 1, 2, 4 e 15 dias após a lesão, na presença (E+) e ausência (E-) de endotélio. Os dados, obtidos em curvas concentração-efeito para Phe ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  mol/L), representam a média  $\pm$  EPM.**

**Tabela 1: Valores de Emax (gramas de tensão) de Phe em artérias carótidas controle e contra-laterais, isoladas 1, 2, 4 e 15 dias após a lesão, com e sem endotélio.**

	Com endotélio		Sem endotélio	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>1 dia</b>	0,38±0,03 (n=7)	0,36±0,03 (n=8)	0,51±0,03 (n=6)	0,51±0,03 (n=9)
<b>2 dias</b>	0,37±0,03 (n=7)	0,45±0,02 (n=7)	0,51±0,03 (n=6)	0,49±0,04 (n=7)
<b>4 dias</b>	0,37±0,03 (n=7)	0,56±0,04* (n=9)	0,52±0,03 (n=7)	0,40±0,02* (n=8)
<b>15 dias</b>	0,39±0,03 (n=5)	0,39±0,02 (n=8)	0,53±0,02 (n=6)	0,50±0,04 (n=8)

Os dados representam a média ± EPM. (\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls).

**Tabela 2: Valores de  $pD_2$  de Phe em artérias carótidas controle e contra-laterais, isoladas 1, 2, 4 e 15 dias após a lesão, com e sem endotélio.**

	Com endotélio		Sem endotélio	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>1 dia</b>	7,26±0,07 (n=7)	7,28±0,08 (n=8)	7,69±0,17 (n=6)	7,36±0,12 (n=9)
<b>2 dias</b>	7,33±0,05 (n=7)	7,31±0,06 (n=7)	7,57±0,16 (n=6)	7,38±0,05 (n=7)
<b>4 dias</b>	7,31±0,05 (n=7)	7,37±0,14 (n=9)	7,64±0,15 (n=7)	7,61±0,12 (n=8)
<b>15 dias</b>	7,47±0,15 (n=5)	7,37±0,11 (n=8)	7,59±0,13 (n=6)	7,65±0,06 (n=8)

Os dados representam a média ± EPM.

### **Conclusão Parcial:**

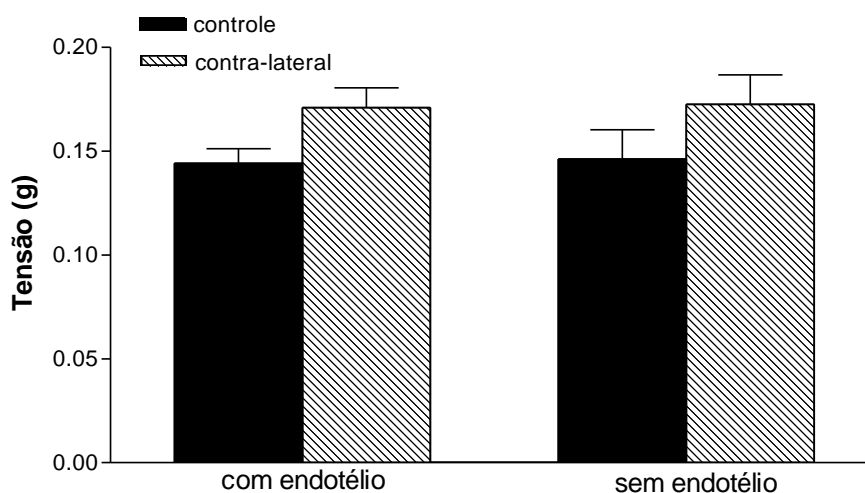
➤ *A resposta neurocompensatória à lesão por cateter balão promoveu alterações no endotélio que resultaram em aumento no Emax para Phe no quarto dia após a lesão. Aos 15 dias após a lesão, o Emax para Phe na artéria contra-lateral retornou aos níveis do controle.*

## **4.2) Avaliação da mobilização de cálcio induzida por Phe.**

Como citado anteriormente, o cálcio pode ser um fator determinante para a resposta da Phe. O presente protocolo foi efetuado com o objetivo de estudar se a alteração no Emax da Phe na artéria contra-lateral, 4 dias após a lesão, estava relacionada à alteração na mobilização de cálcio induzida pela Phe.

### **4.2.1) Mobilização de cálcio intracelular**

Os resultados mostraram que a mobilização de cálcio intracelular induzida por Phe na artéria contralateral foi semelhante à observada em artéria controle (Figura 6, Tabela 2).



**Figura 6: Mobilização do cálcio intracelular em artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com e sem endotélio.** Valores de contração máxima (gramas de tensão) desencadeada pela Phe ( $10^{-7}$  mol/L) em meio zero-cálcio. Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

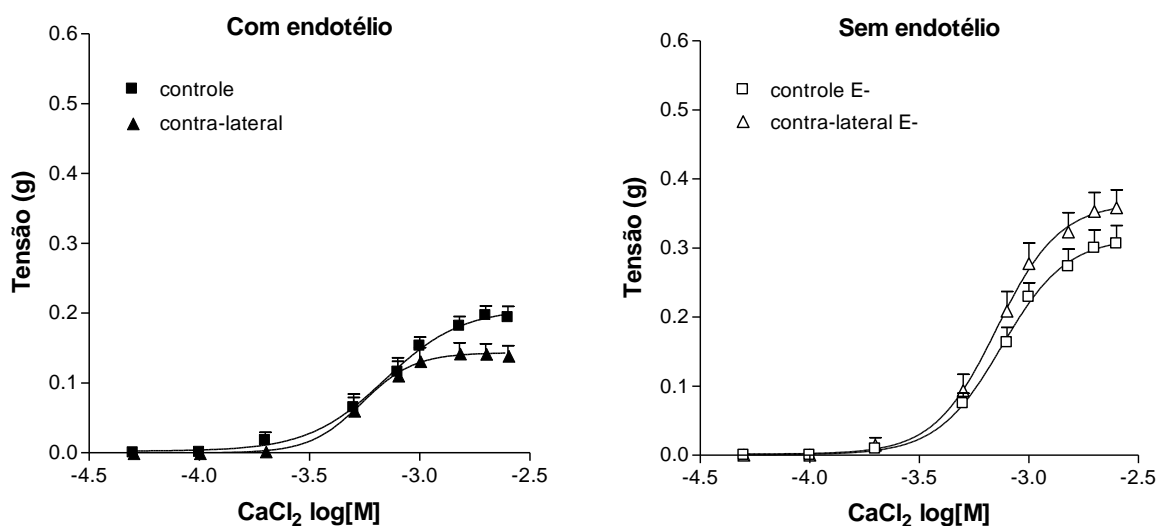
**Tabela 2: Valores de contração (gramas de tensão) desencadeada pela Phe ( $10^{-7}$  mol/L) em meio zero-cálcio - mobilização do cálcio intracelular em artérias carótidas controle e contra-laterais com e sem endotélio.**

Com endotélio		Sem endotélio	
Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
0,14 $\pm$ 0,01 (n=9)	0,15 $\pm$ 0,01 (n=8)	0,17 $\pm$ 0,01 (n=10)	0,17 $\pm$ 0,01 (n=9)

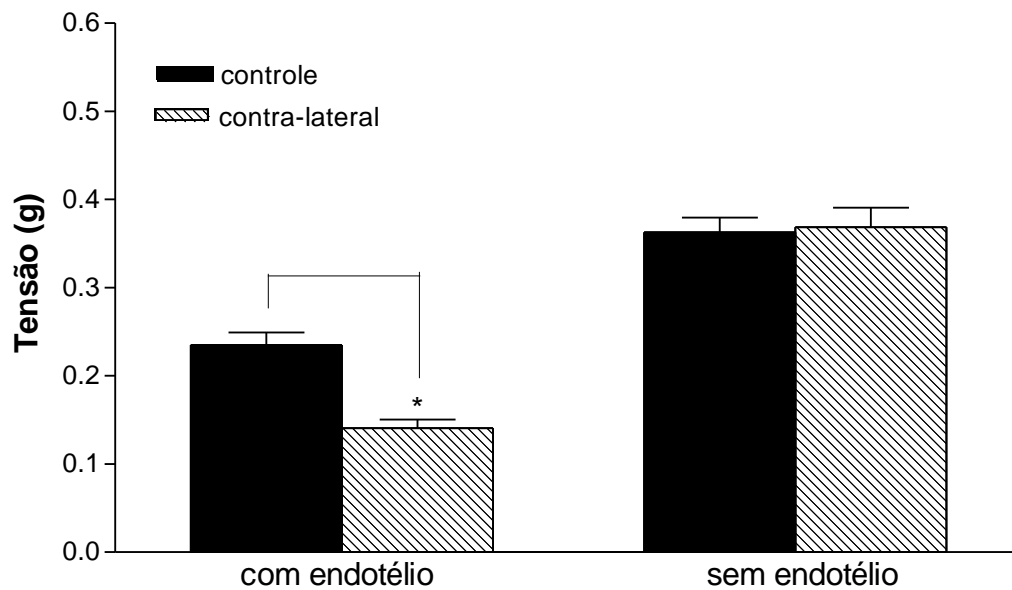
Os valores representam a média  $\pm$  EPM, em gramas de tensão.

#### 4.2.2) Mobilização de cálcio extracelular

A tensão vascular decorrente da mobilização de cálcio extracelular induzida por Phe ( $10^{-7}$  mol/L) na carótida contra-lateral, 4 dias após a lesão, foi significativamente menor que no controle com endotélio (Figuras 7 e 8, Tabela 3). A remoção do endotélio provocou aumento de  $E_{max}$  para  $CaCl_2$  na contra-lateral, estando aos níveis do controle sem endotélio. Não foram observadas alterações de potência entre os grupos estudados (Tabela 3).



**Figura 7: Mobilização do cálcio extracelular induzido por Phe em artérias controle e contra-laterais à lesão.** Curvas concentração-efeito para  $CaCl_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L) em meio sem cálcio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L), em artérias com e sem endotélio. Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

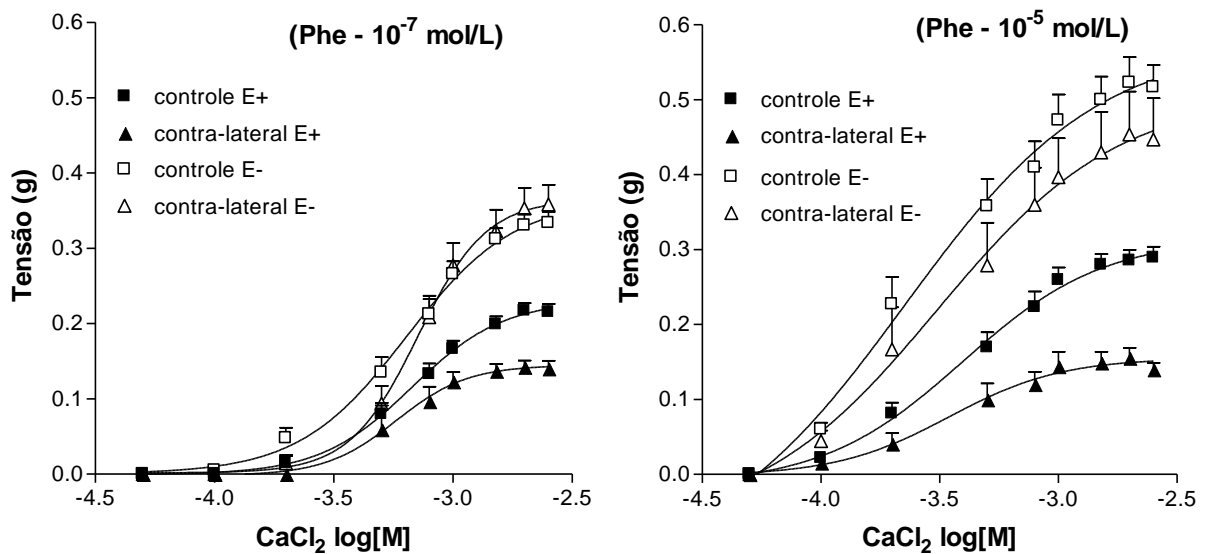


**Figura 8: Mobilização do cálcio extracelular induzida por Phe em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão.** Emax obtido em curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) em meio sem cálcio. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. (\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls).

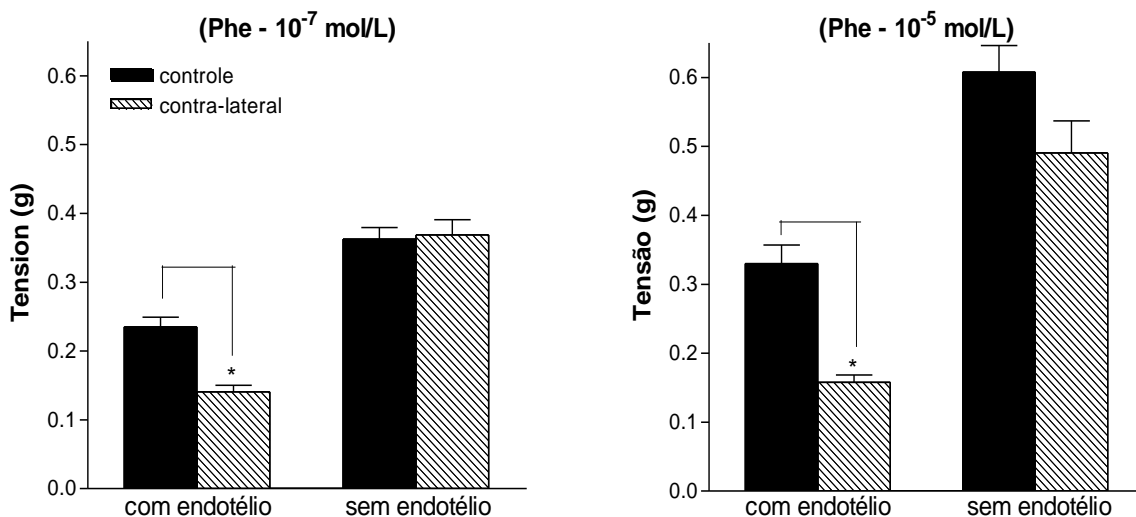
Aos 4 dias após a lesão, observou-se aumento do Emax para Phe e redução do influxo de cálcio estimulado pela concentração de Phe que promove 50% do Emax ( $\text{EC}_{50}$ ).

Para verificar se a mobilização de cálcio extracelular induzida pela  $\text{EC}_{50}$  da Phe ( $10^{-7}$  mol/L) era semelhante àquela que promove o Emax da Phe ( $10^{-5}$  mol/L), foi realizado o mesmo protocolo, porém com maior concentração de Phe ( $10^{-5}$  mol/L).

O maior estímulo (Phe  $10^{-5}$  mol/L) promoveu aumento de Emax em artérias controle e nenhuma alteração em artérias contra-laterais 4 dias após a lesão (Figuras 9 e 10, Tabela 5). Estes resultados confirmam a existência de comprometimento no influxo de cálcio na artéria contra-lateral à lesão por cateter balão.



**Figura 9: Mobilização do cálcio extracelular induzido por Phe em artérias controle e contra-laterais 4 dias após a lesão por cateter balão. Curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L) em meio sem cálcio contendo Phe ( $10^{-7} \text{ mol/L}$ ) ou ( $10^{-5} \text{ mol/L}$ ), na presença de endotélio. Os dados representam a média  $\pm$  EPM.**



**Figura 10: Mobilização do cálcio extracelular induzido por Phe em artérias controle e contra-laterais 4 dias após a lesão por cateter balão. Representação do  $E_{\text{max}}$  obtido em curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L) em meio sem cálcio contendo Phe ( $10^{-7} \text{ mol/L}$ ) ou ( $10^{-5} \text{ mol/L}$ ), na presença e ausência de endotélio. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. (\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls).**



**Tabela 4: Valores de Emax (gramas de tensão) de CaCl<sub>2</sub> (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe (10<sup>-7</sup> mol/L ou 10<sup>-5</sup> mol/L) em meio sem cálcio - mobilização de cálcio extracelular em artéria controle e contra-lateral à lesão.**

	Com endotélio		Sem endotélio	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>10<sup>-7</sup> mol/L</b>	0,24 ± 0,01 (n=11)	0,14 ± 0,01* (n=5)	0,36 ± 0,02 (n=16)	0,37 ± 0,02 (n=9)
<b>10<sup>-5</sup> mol/L</b>	0,33 ± 0,03 (n=8)	0,16 ± 0,01* (n=6)	0,61 ± 0,04 (n=7)	0,50 ± 0,06 (n=5)

Os dados representam a média ± EPM. (\*) indica diferença significativa (P<0,05) em relação ao controle (ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls).

**Tabela 5: Valores de pD<sub>2</sub> de CaCl<sub>2</sub> (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe (10<sup>-5</sup> mol/L ou 10<sup>-7</sup> mol/L) em meio sem cálcio - mobilização de cálcio extracelular em artéria controle e contra-lateral à lesão.**

	Com endotélio		Sem endotélio	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>10<sup>-7</sup> mol/L</b>	3,18 ± 0,02 (n=11)	3,25 ± 0,09 (n=5)	3,23 ± 0,04 (n=16)	3,17 ± 0,04 (n=9)
<b>10<sup>-5</sup> mol/L</b>	3,35 ± 0,10 (n=8)	3,42 ± 0,12 (n=6)	3,56 ± 0,10 (n=7)	3,44 ± 0,11 (n=5)

Os dados representam a média ± EPM.

### **Conclusão Parcial:**

➤ Aos 4 dias após a lesão, observou-se que a hiperreatividade à Phe na artéria contra-lateral com endotélio não é decorrente de aumento na mobilização de cálcio. Por outro lado, ocorreu redução da mobilização de cálcio pela Phe na contra-lateral, sendo esta resposta dependente do endotélio.

### **4.3) Mecanismos celulares envolvidos na alteração do influxo de cálcio induzido por Phe**

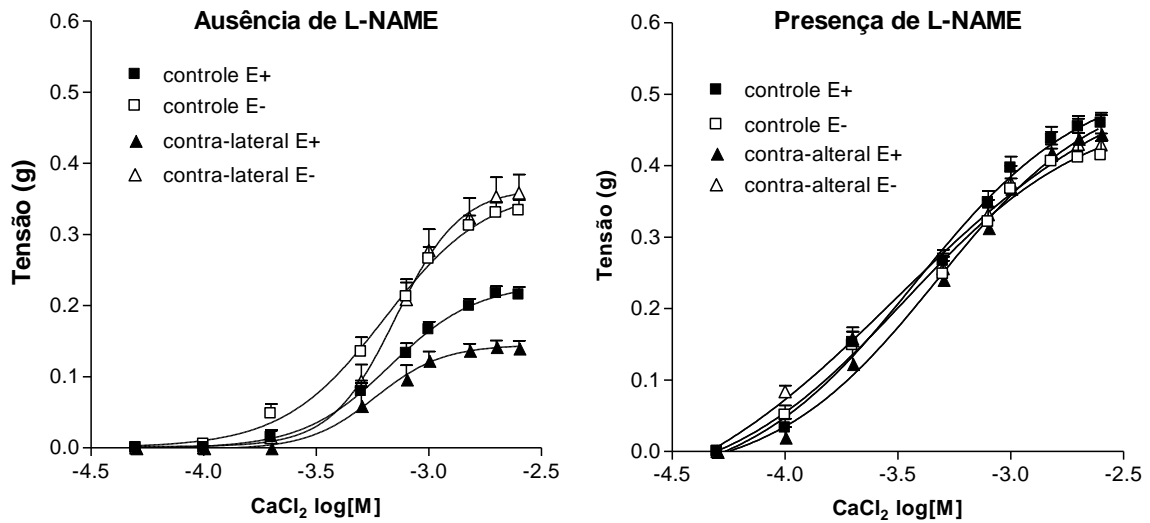
Existem vários fatores celulares que regulam a concentração intracelular de cálcio, como óxido nítrico, canais para potássio, espécies reativas de oxigênio, prostanoídes, junções do tipo GAP e a Ca-ATPase do retículo. Para verificar quais fatores estão envolvidos nesta redução do influxo de cálcio na artéria contra-lateral à lesão, investigou-se:

#### **4.3.1) A participação da via de sinalização dependente de NO no influxo de cálcio induzido por Phe**

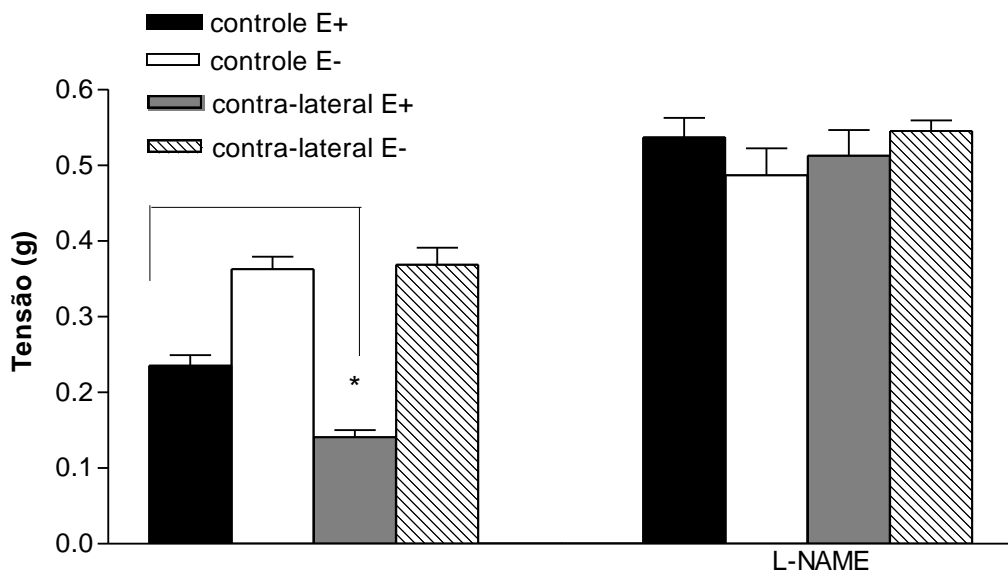
##### **4.3.1.1) Participação da enzima óxido nítrico sintase (NOS)**

A participação de NO na redução do influxo de cálcio extracelular na artéria carótida contra-lateral foi avaliada utilizando-se L-NAME ( $10^{-4}$  mol/L), um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS).

Na presença de L-NAME e Phe ( $10^{-7}$  mol/L) ocorreu aumento do  $E_{max}$  do  $CaCl_2$  em artérias controle e contra-laterais, contendo ou não endotélio (Figuras 11 e 12, Tabela 6). Em artérias contra-laterais, os valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  do  $CaCl_2$  foram semelhantes aos observados em artérias controle, na presença de L-NAME (Figuras 11 e 12, Tabela 6 e 7). Este resultado sugere a participação de NOS/NO na redução do influxo de cálcio na artéria contra-lateral.



**Figura 11: Efeito do L-NAME na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais 4 dias após a lesão, contendo (E+) ou não (E-) endotélio.** Curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05-2,50 mmol/L), em meio sem cálcio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e L-NAME ( $10^{-4}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.



**Figura 12: Efeito do L-NAME na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, contendo (E+) ou não (E-) endotélio.** Representação do  $E_{max}$  obtido em curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e L-NAME ( $10^{-4}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \* indica diferença significativa em relação ao controle.

**Tabela 6: Valores de  $E_{max}$  (gramas de tensão) do  $CaCl_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e L-NAME ( $10^{-4}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio.**

		Sem L-NAME		Com L-NAME	
		Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b><math>E_{max}</math></b>	<b>E+</b>	0,24 ± 0,01 (n=11)	0,14 ± 0,01*	0,54 ± 0,03 (n=12)	0,51 ± 0,03 (n=6)
	<b>E-</b>	0,36 ± 0,02 (n=16)	0,37 ± 0,02 (n=9)	0,49 ± 0,04 (n=9)	0,55 ± 0,01 (n=5)

Os dados representam a média ± EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-keuls).

**Tabela 7: Valores de  $pD_2$  do  $CaCl_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e L-NAME ( $10^{-4}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio.**

		Sem L-NAME		Com L-NAME	
		Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b><math>pD_2</math></b>	<b>E+</b>	3,18 ± 0,02 (n=11)	3,25 ± 0,09 (n=5)	3,49 ± 0,09 (n=12)	3,34 ± 0,08 (n=6)
	<b>E-</b>	3,23 ± 0,04 (n=16)	3,17 ± 0,04 (n=9)	3,52 ± 0,10 (n=9)	3,54 ± 0,09 (n=5)

Os dados representam a média ± EPM.

### **Conclusão parcial**

*Não foi observada diferença nos parâmetros de  $E_{max}$  ou  $pD_2$  entre artérias controle e contra-laterais à lesão, na ausência de endotélio. Este resultado, associado aos anteriores, sugere que a diminuição do influxo de cálcio observada na contra-lateral é dependente do endotélio e envolve a participação de NOS.*

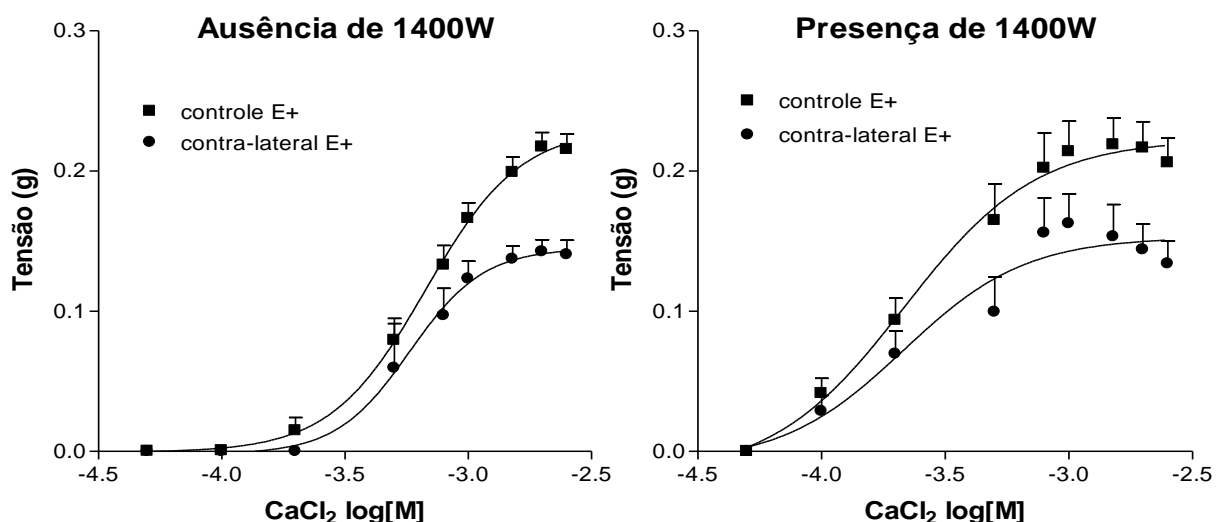
### a) Participação das isoformas da NOS na modulação do influxo de cálcio extracelular:

Considerando que o presente estudo mostrou que na presença de L-NAME não existem diferenças nos parâmetros de  $E_{max}$  ou  $pD_2$  do  $CaCl_2$  entre artérias controle e contra-laterais sem endotélio, foram estudadas apenas artérias contendo endotélio.

Com o objetivo de avaliar a participação da isoforma induzida da NOS (iNOS) na diminuição do influxo de cálcio extracelular na artéria carótida contra-lateral à lesão por cateter balão, foi utilizado o inibidor seletivo 1400W ( $10^{-7}$  mol/L).

O  $E_{max}$  do  $CaCl_2$  não foi alterado em artérias controle na presença de 1400W, sugerindo que a iNOS não modula o influxo de cálcio (Figuras 13 e 16, Tabela 6). Resultado semelhante foi observado em artérias contra-laterais com endotélio. O influxo de cálcio permaneceu reduzido em artérias contra-laterais comparadas com o controle (Figuras 13 e 16, Tabela 8). Na presença de 1400W, a potência do  $CaCl_2$  foi semelhante entre os grupos controle e contra-lateral (Tabela 9).

Os resultados mostraram que a iNOS não participa da diminuição do influxo de cálcio observado na contra-lateral.

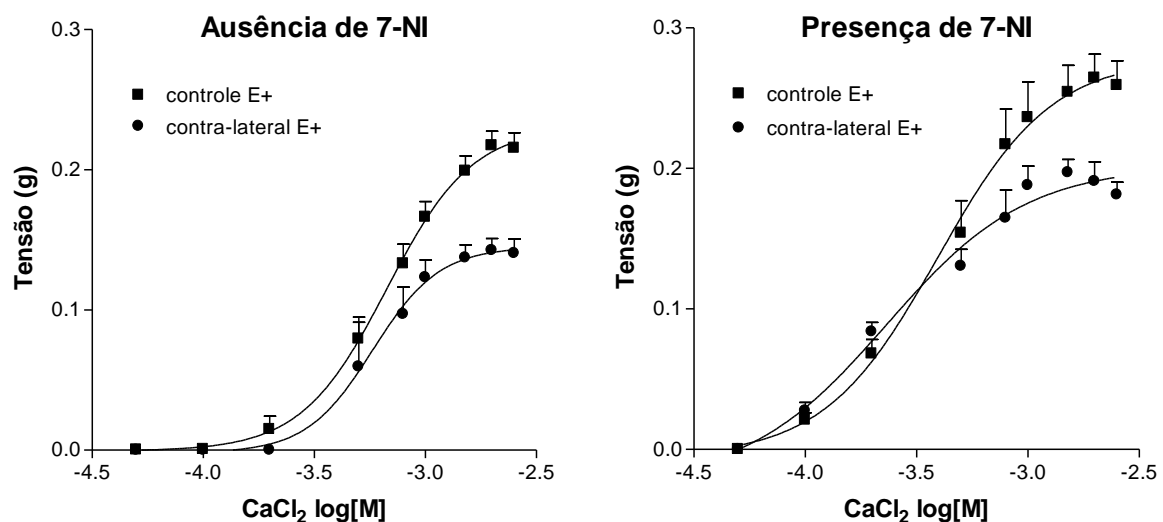


**Figura 13: Efeito do 1400W na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio (E+).** Curvas concentração-efeito para  $CaCl_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e 1400W ( $10^{-7}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

A participação da isoforma neuronal da NOS (nNOS) na diminuição do influxo de cálcio extracelular na artéria carótida contra-lateral à lesão, foi avaliada utilizando o inibidor preferencial 7-NI ( $10^{-4}$  mol/L).

Na presença de 7-NI, o  $E_{max}$  do  $CaCl_2$  foi significativamente menor que em artérias controle (Figuras 14 e 16, Tabela 8). O  $pD_2$  foi semelhante entre artérias controle e contra-laterais na presença de 7-NI (Tabela 9).

Os resultados obtidos indicam que a nNOS não está envolvida na diminuição do influxo de cálcio observado em artérias contra-laterais à lesão.



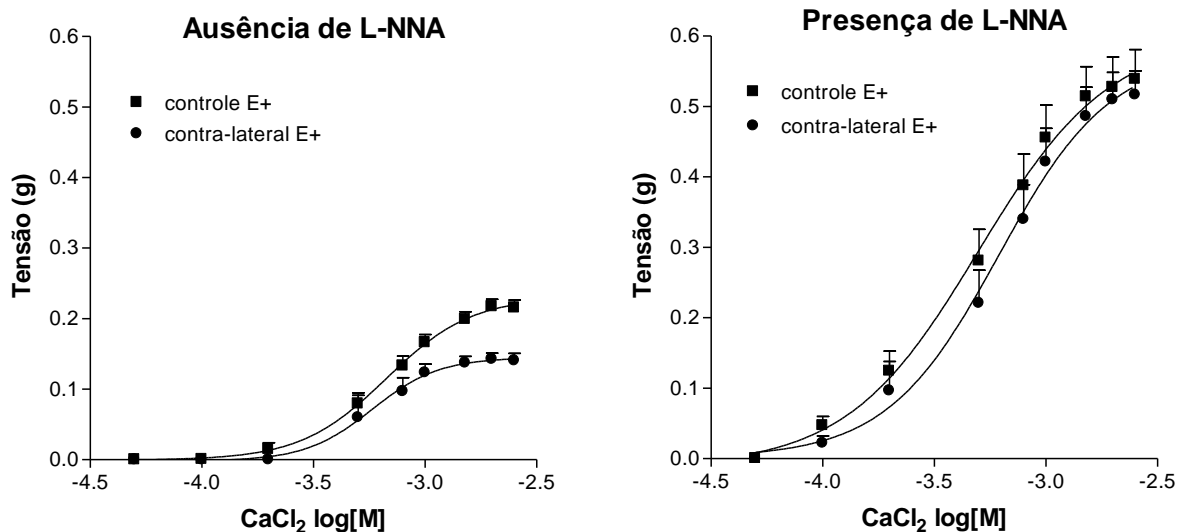
**Figura 14: Efeito de 7-NI na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por balão cateter, com (E+) endotélio.** Curvas concentração-efeito para  $CaCl_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e 7-NI ( $10^{-4}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

Para avaliar a participação da isoforma endotelial da NOS (eNOS) na redução do influxo de cálcio extracelular na artéria carótida contra-lateral à lesão por balão cateter, foi utilizado L-NNA ( $10^{-4}$  mol/L).

Na presença de L-NNA ocorreu aumento significativo no  $E_{max}$  do  $CaCl_2$  em meio contendo Phe em artérias controle com endotélio, mostrando a importância da nNOS na modulação do influxo de cálcio. O mesmo foi observado em artérias contra-laterais, sendo o  $E_{max}$  semelhante ao observado em artérias controle (Figuras 15 e 16, Tabela 8).

Não foi observada diferença de  $pD_2$  do  $CaCl_2$  na presença de Phe entre artérias controles e contra-laterais na presença de L-NNA (Tabela 9).

Os resultados sugerem que a eNOS seja a isoforma envolvida na modulação negativa do influxo de cálcio em artérias contra-laterais 4 dias após a lesão.

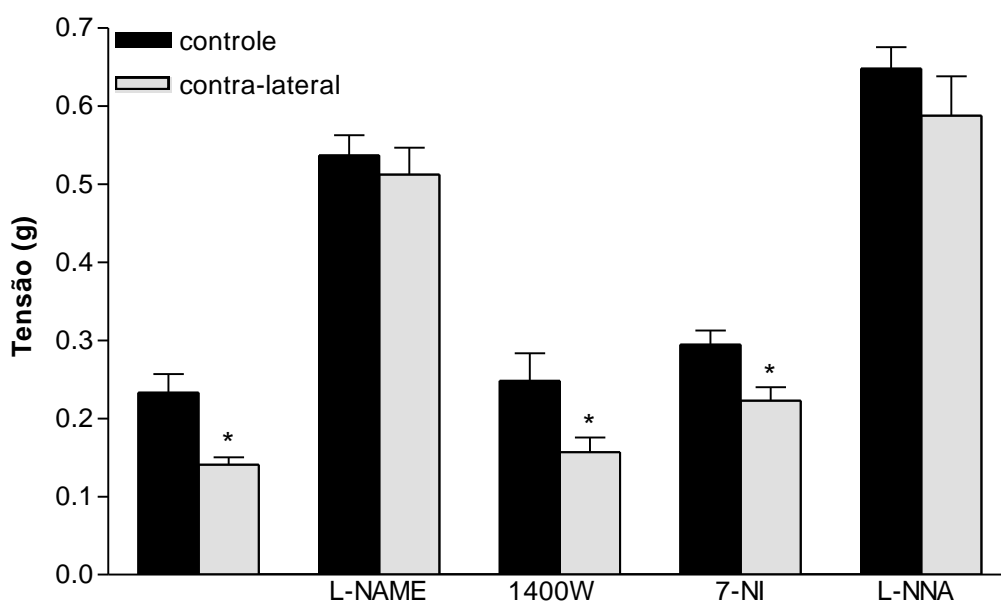


**Figura 15: Efeito do L-NNA na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por balão cateter, com endotélio (E+).** Curvas concentração-efeito para  $CaCl_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e L-NNA ( $10^{-4}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

**Tabela 8: Valores de  $E_{max}$  (gramas de tensão) do  $CaCl_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e inibidor (L-NAME,  $10^{-4}$  mol/L; 1400W,  $10^{-7}$  mol/L; 7-NI,  $10^{-4}$  mol/L ou L-NNA,  $10^{-4}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão, com endotélio.**

		<b>L-NAME</b>	<b>1400W</b>	<b>7-NI</b>	<b>L-NNA</b>
<b>Controle</b>	0,24 $\pm$ 0,01 (n=11)	0,54 $\pm$ 0,03 (n=12)	0,25 $\pm$ 0,03 (n=7)	0,29 $\pm$ 0,01 (n=6)	0,60 $\pm$ 0,05 (n=7)
<b>Contra-lateral</b>	0,14 $\pm$ 0,01* (n=5)	0,51 $\pm$ 0,03 (n=6)	0,16 $\pm$ 0,02* (n=6)	0,21 $\pm$ 0,01* (n=4)	0,59 $\pm$ 0,05 (n=4)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).



**Figura 16: Efeito de inibidores das isoformas da NOS na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio.** Representação do Emax obtido em curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e inibidor (L-NAME,  $10^{-4}$  mol/L; 1400W,  $10^{-7}$  mol/L; 7-NI,  $10^{-4}$  mol/L ou L-NNA,  $10^{-4}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \* indica diferença significativa em relação ao controle.

**Tabela 9: Valores de  $pD_2$  do  $\text{CaCl}_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e inibidor (L-NAME,  $10^{-4}$  mol/L; 1400W,  $10^{-7}$  mol/L; 7-NI,  $10^{-4}$  mol/L ou L-NNA,  $10^{-4}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão, com endotélio.**

		L-NAME	1400W	7-NI	L-NNA
<b>Controle</b>	3,18 $\pm$ 0,02 (n=11)	3,49 $\pm$ 0,09 (n=12)	3,52 $\pm$ 0,03 (n=7)	3,36 $\pm$ 0,05 (n=6)	3,33 $\pm$ 0,06 (n=7)
<b>Contra-lateral</b>	3,25 $\pm$ 0,09 (n=5)	3,34 $\pm$ 0,08 (n=6)	3,62 $\pm$ 0,12 (n=6)	3,58 $\pm$ 0,05 (n=4)	3,21 $\pm$ 0,07 (n=4)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

### **Conclusão parcial**

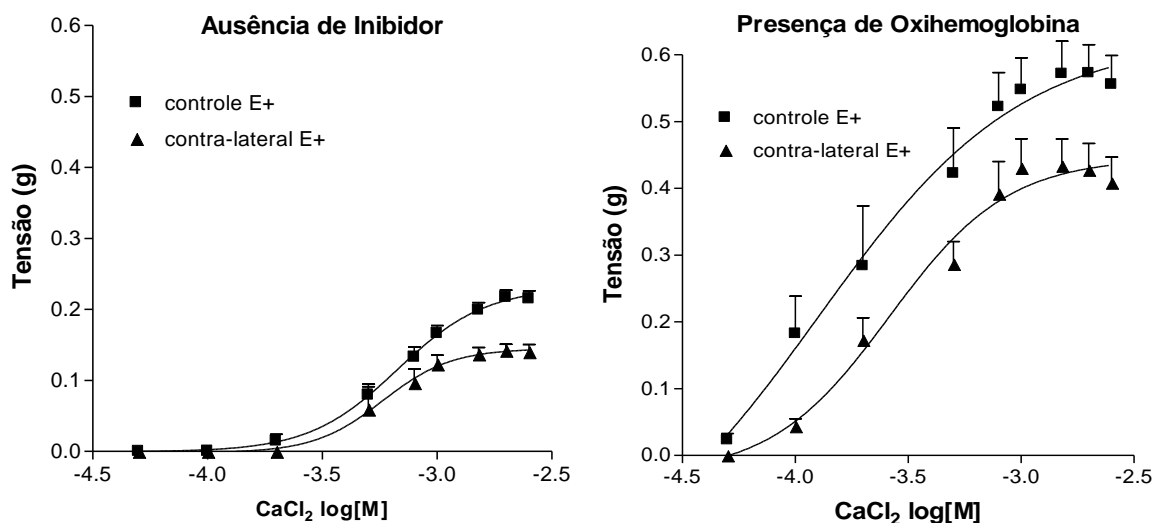
Os resultados sugerem que a isoforma endotelial da NOS (eNOS) está envolvida na redução do influxo de cálcio induzido pela Phe na artéria contra-lateral à lesão.



#### 4.3.1.2) Participação de NO

Para avaliar a participação de NO na mobilização de cálcio extracelular induzida por Phe na artéria contra-lateral à lesão foi utilizada Oxihemoglobina (OxiHb), uma substância capaz de seqüestrar NO.

Em artérias controle, OxiHb ( $10^{-5}$  mol/L) promoveu aumento no Emax do  $\text{CaCl}_2$  na presença de Phe. O mesmo foi observado em artérias contra-laterais, porém permanecendo menor que em artérias controle (Figura 17 e 18, Tabela 10). OxiHb promoveu aumento na potência do  $\text{CaCl}_2$  em artérias controle, mas na contra-lateral nenhuma alteração foi observada (Tabela 11).

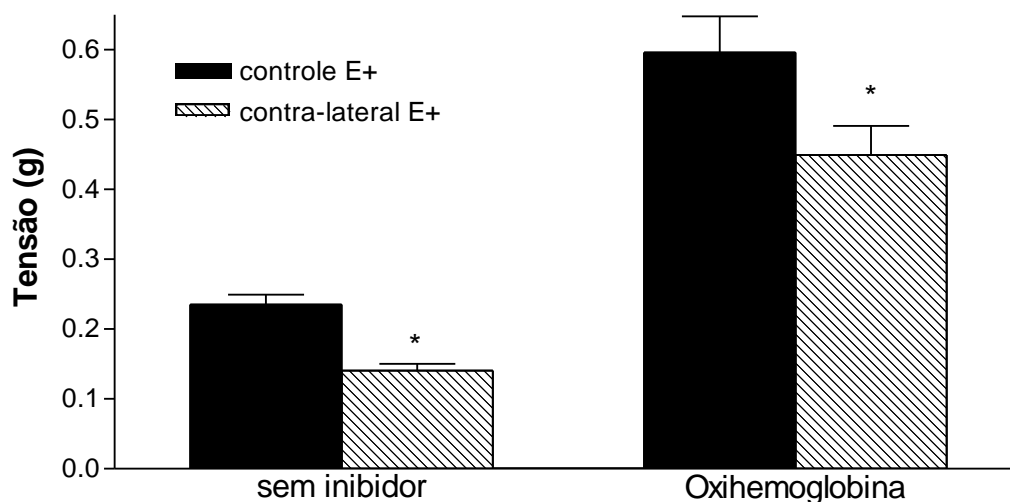


**Figura 17: Efeito da Oxihemoglobina na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio (E+).** Curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e Oxihemoglobina ( $10^{-5}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

**Tabela 10: Valores de Emax (gramas de tensão) do  $\text{CaCl}_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e Oxihemoglobina ( $10^{-5}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença de endotélio.**

	Sem Oxihemoglobina		Com Oxihemoglobina	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>Emax</b>	0,24 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01*	0,60 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,04*
	(n=11)	(n=5)	(n=7)	(n=8)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).



**Figura 18: Efeito de Oxihemoglobina na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, contendo endotélio (E+).** Representação do Emax obtido em curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mol/L), em meio sem cálcio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e Oxihemoglobina ( $10^{-5}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \* indica diferença significativa em relação ao controle.

**Tabela 11: Valores de  $pD_2$  do  $\text{CaCl}_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e Oxihemoglobina ( $10^{-5}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença de endotélio.**

	Sem Oxihemoglobina		Com Oxihemoglobina	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
$pD_2$	$3,18 \pm 0,02$	$3,25 \pm 0,09$	$3,94 \pm 0,24^*$	$3,53 \pm 0,10$
	(n=11)	(n=5)	(n=7)	(n=8)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).

### **Conclusão parcial:**

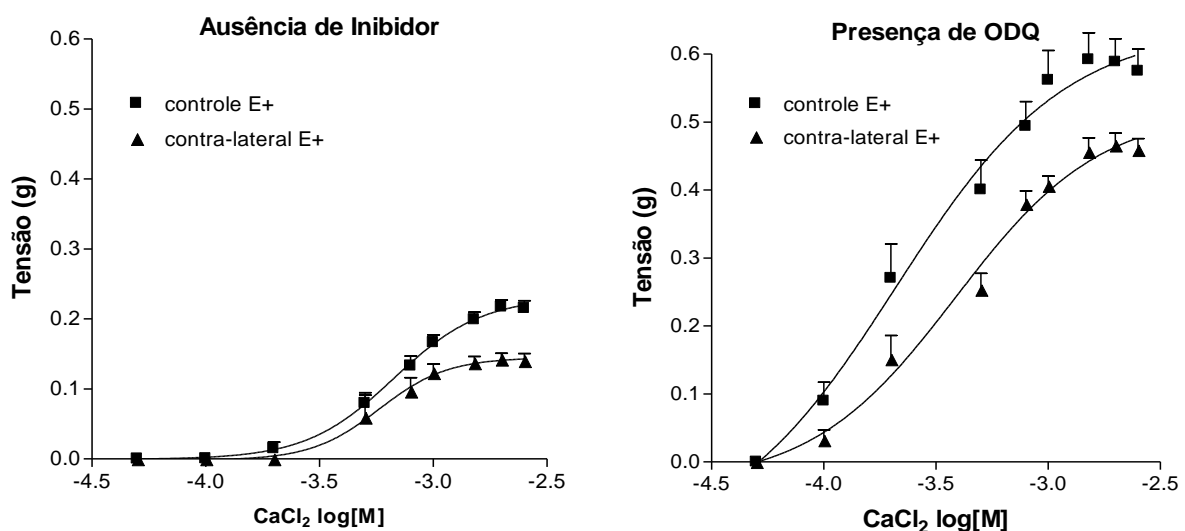
*Os resultados sugerem que o NO não participa da redução do influxo de cálcio na artéria contra-lateral à lesão.*

#### 4.3.1.3) Participação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs)

A participação da enzima GCs na mobilização de cálcio extracelular na artéria contra-lateral à lesão foi avaliada utilizando o inibidor ODQ.

ODQ ( $10^{-6}$  mol/L) promoveu aumento no  $E_{max}$  do  $CaCl_2$  em artérias controle e contra-laterais, mas permaneceu reduzido em artérias contra-laterais em relação ao controle (Figura 19 e 20, Tabela 12).

ODQ promoveu aumento no  $pD_2$  do  $CaCl_2$  em artérias controle, mas na contra-lateral nenhuma alteração foi observada, corroborando a hipótese de comprometimento na via NO/GC (Tabela 13).

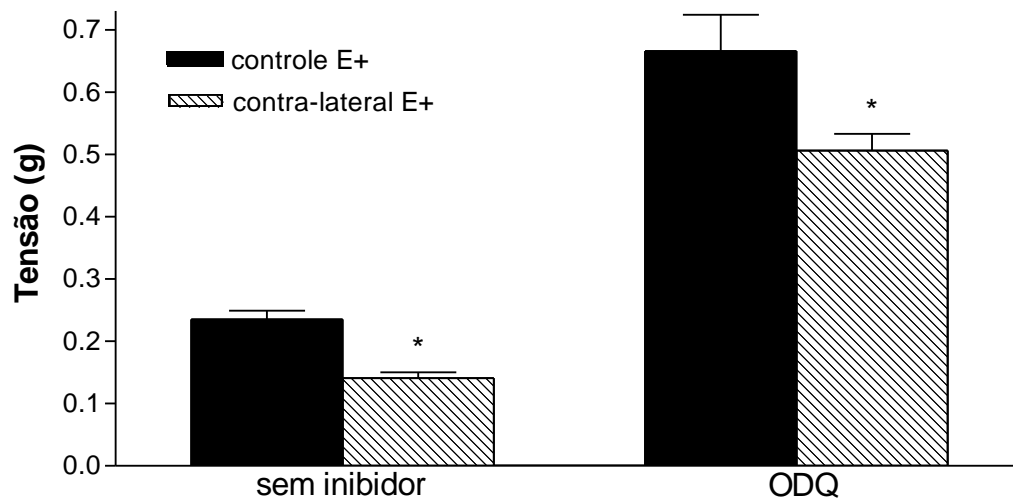


**Figura 19:** Efeito do ODQ na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio (E+). Curvas concentração-efeito para  $CaCl_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e ODQ ( $10^{-6}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

**Tabela 12:** Valores de  $E_{max}$  (gramas de tensão) do  $CaCl_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e ODQ ( $10^{-6}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença de endotélio.

	Sem ODQ		Com ODQ	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b><math>E_{max}</math></b>	0,24 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01*	0,67 $\pm$ 0,06	0,51 $\pm$ 0,03*
	(n=11)	(n=5)	(n=8)	(n=6)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).



**Figura 20: Efeito do ODQ na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, contendo endotélio (E+).** Representação do Emax obtido em curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio sem cálcio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e ODQ ( $10^{-6}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \* indica diferença significativa em relação ao controle.

**Tabela 13: Valores de  $pD_2$  do  $\text{CaCl}_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e ODQ ( $10^{-6}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença de endotélio.**

	Sem ODQ		Com ODQ	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b><math>pD_2</math></b>	3,18 $\pm$ 0,02 (n=11)	3,25 $\pm$ 0,09 (n=5)	3,61 $\pm$ 0,09*	3,50 $\pm$ 0,14 (n=6)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).

**Conclusão:**

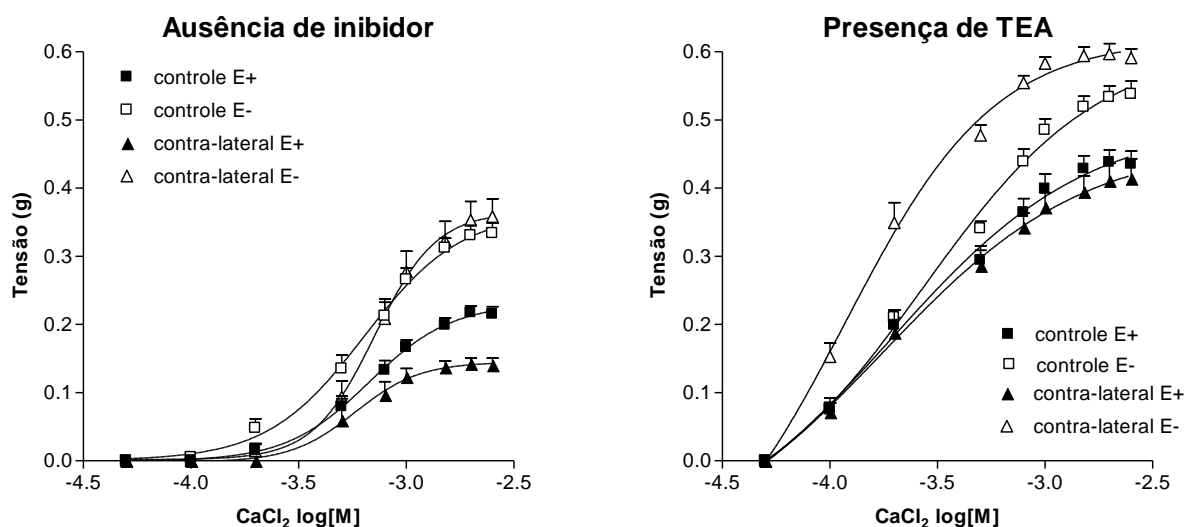
➤ *A isoforma endotelial da NOS (eNOS) participa da redução do influxo de cálcio extracelular induzido por Phe na artéria carótida contra-lateral, porém, os resultados sugerem que não há participação da via NO/GCs.*

#### 4.3.2) A participação de canais para potássio na modulação do influxo de cálcio extracelular:

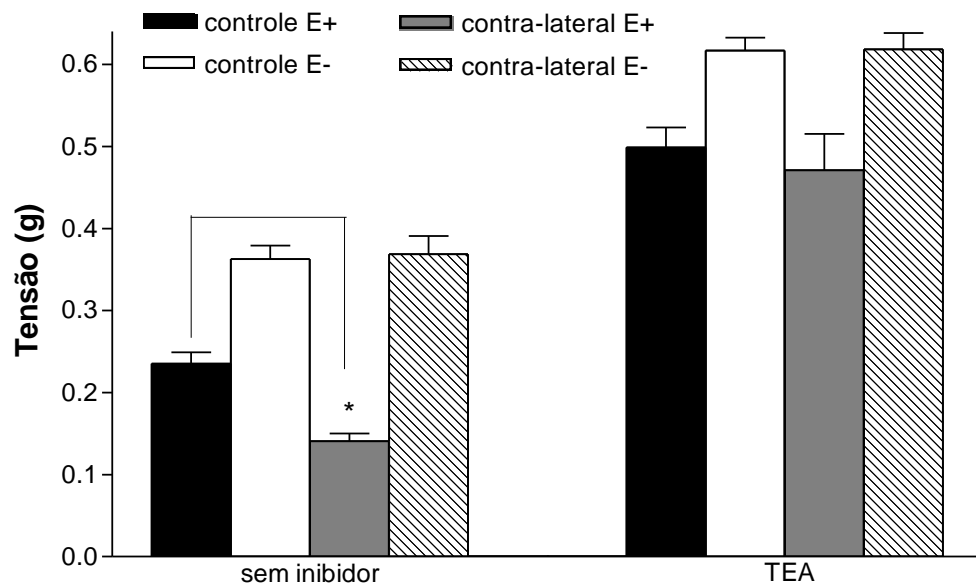
Para avaliar a participação de canais para potássio na diminuição do influxo de cálcio extracelular na artéria carótida contra-lateral, 4 dias após a lesão por cateter balão, foi utilizado TEA ( $10^{-2}$  mol/L), um inibidor não seletivo de canais para potássio.

Na presença de TEA, ocorreu aumento dos valores do  $E_{max}$  e do  $pD_2$  do  $CaCl_2$  em artérias controle e contra-laterais. Este efeito foi observado na presença e na ausência de endotélio, mostrando a importância de canais para potássio na modulação do influxo de cálcio em ambos os grupos estudados (Figuras 21 e 22, Tabela 14). Os parâmetros de  $E_{max}$  e  $pD_2$  do  $CaCl_2$  na presença de TEA, foram semelhantes no controle e na contra-lateral, com e sem endotélio, (Tabelas 14 e 15).

Os resultados indicam que canais para potássio participam da regulação do influxo de cálcio na contra-lateral com endotélio, 4 dias após a lesão.



**Figura 21: Efeito do TEA na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com (E+) e sem (E-) endotélio.** Curvas concentração-efeito para  $CaCl_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e TEA ( $10^{-2}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.



**Figura 22: Efeito do TEA na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com (E+) e sem (E-) endotélio.** Representação do Emax obtido em curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e TEA ( $10^{-2}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \* indica diferença significativa em relação ao controle.

**Tabela 14: Valores de Emax (gramas de tensão) do  $\text{CaCl}_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e TEA ( $10^{-2}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio.**

		Sem TEA		Com TEA	
		Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>Emax</b>	<b>E+</b>	0,24 $\pm$ 0,01 (n=11)	0,14 $\pm$ 0,01* (n=5)	0,50 $\pm$ 0,02 (n=10)	0,47 $\pm$ 0,04 (n=5)
	<b>E-</b>	0,36 $\pm$ 0,02 (n=16)	0,37 $\pm$ 0,02 (n=9)	0,62 $\pm$ 0,02 (n=8)	0,62 $\pm$ 0,02 (n=4)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).

**Tabela 15: Valores de  $pD_2$  para  $CaCl_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e TEA ( $10^{-2}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio.**

		Sem TEA		Com TEA	
		Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
$pD_2$	E+	3,18 ± 0,02 (n=11)	3,25 ± 0,09 (n=5)	3,73 ± 0,12*	3,78 ± 0,17*
	E-	3,23 ± 0,04 (n=16)	3,17 ± 0,04 (n=9)	3,63 ± 0,07*	3,90 ± 0,09*

Os dados representam a média ± EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).

### **Conclusão parcial:**

*Os resultados mostram que canais para potássio participam da redução do influxo de cálcio induzido pela Phe na artéria contra-lateral à lesão.*

#### **4.3.2.1) Avaliação da participação de canais para potássio específicos na modulação do influxo de cálcio extracelular:**

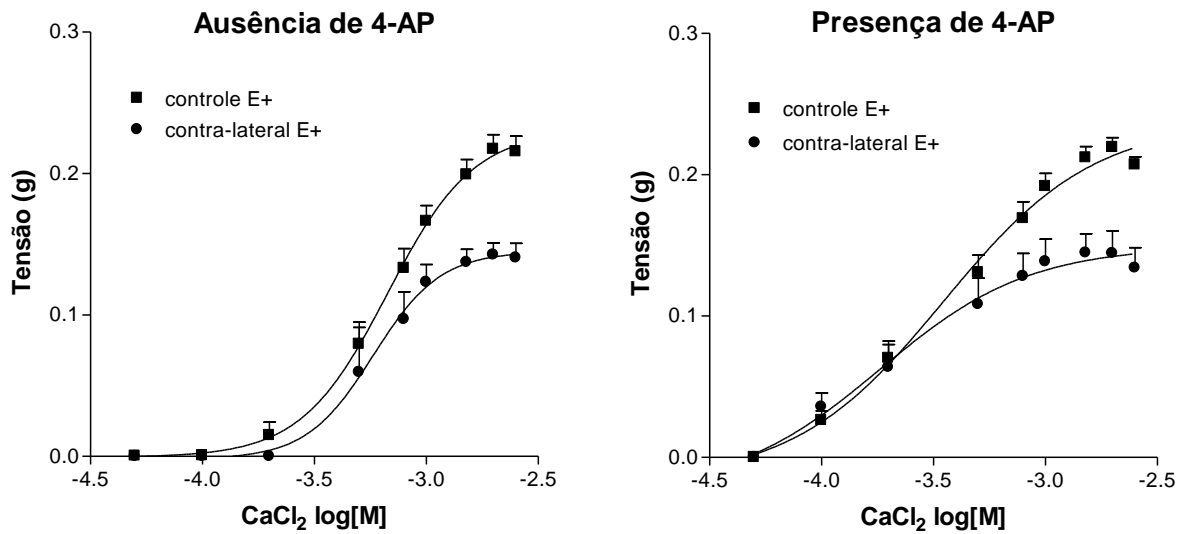
Na presença de TEA, artérias controle e contra-laterais sem endotélio não apresentaram diferença de  $E_{max}$  ou  $pD_2$  do  $CaCl_2$ , sendo, por isso, estudadas apenas artérias contendo endotélio.

A participação de canais para potássio dependentes de voltagem ( $K_v$ ) na diminuição do influxo de cálcio extracelular na artéria carótida contra-lateral, 4 dias após a lesão, foi avaliada utilizando o inibidor seletivo 4-aminopiridina (4-AP,  $10^{-3}$  mol/L).

A presença de 4-AP não alterou o  $E_{max}$  do  $CaCl_2$  em nenhum dos grupos estudados, permanecendo reduzido na artéria contra-lateral em relação ao controle (Figuras 23 e 27, Tabela 16).

A potência do  $CaCl_2$  não foi alterada na presença de 4-AP em nenhum dos grupos estudados (Tabela 17).





**Figura 23: Efeito de 4-AP na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio (E+).** Curvas concentração-efeito para CaCl<sub>2</sub> (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe (10<sup>-7</sup> mol/L) e 4-AP (10<sup>-3</sup> mol/L). Os dados representam a média ± EPM.

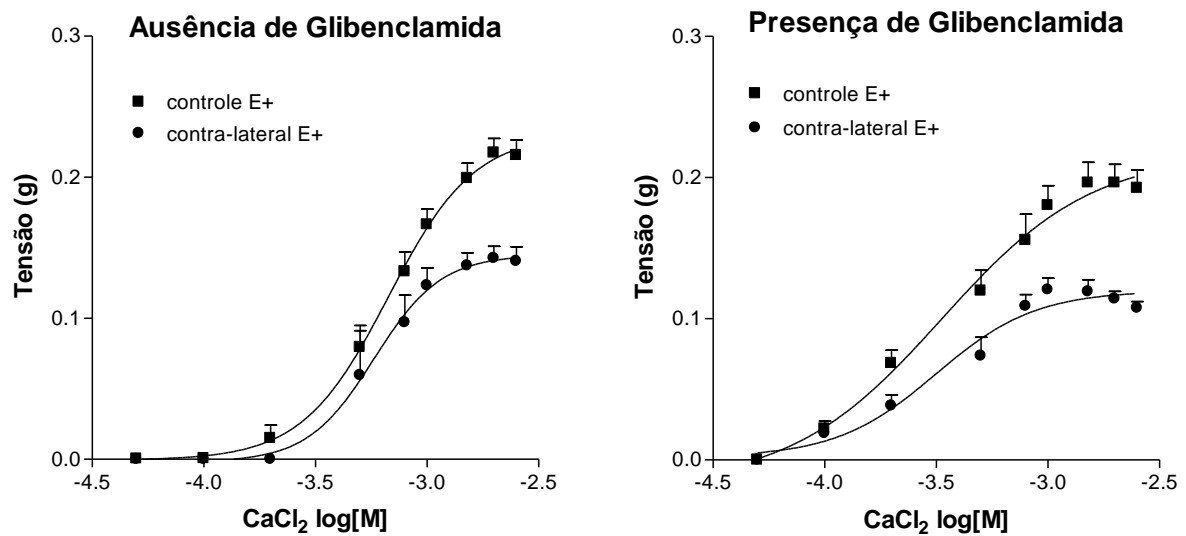
### **Conclusão parcial:**

*Os resultados sugerem que não há participação de K<sub>v</sub> na modulação negativa do influxo de cálcio na artéria contra-lateral 4 dias após a lesão.*

Foi utilizado Glibenclamida, inibidor seletivo de canais para potássio dependentes de ATP (K<sub>ATP</sub>) para verificar se estes canais estão envolvidos na diminuição do influxo de cálcio extracelular na artéria carótida contra-lateral à lesão por cateter balão.

Na presença de Glibenclamida não houve alteração no E<sub>max</sub> do CaCl<sub>2</sub> em meio contendo Phe em artérias controle, sugerindo que canais do tipo K<sub>ATP</sub> não participam da modulação do influxo de cálcio. O mesmo foi observado em artérias contra-laterais, permanecendo diminuído o influxo de cálcio em relação a artérias controle (Figuras 24 e 27, Tabela 16).

A potência para CaCl<sub>2</sub> também não foi alterada em nenhum dos grupos estudados na presença de glibenclamida (Tabela 17).



**Figura 24: Efeito de Glibenclamida na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio (E+).** Curvas concentração-efeito para CaCl<sub>2</sub> (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe (10<sup>-7</sup> mol/L) e Glibenclamida (3x10<sup>-6</sup> mol/L). Os dados representam a média ± EPM.

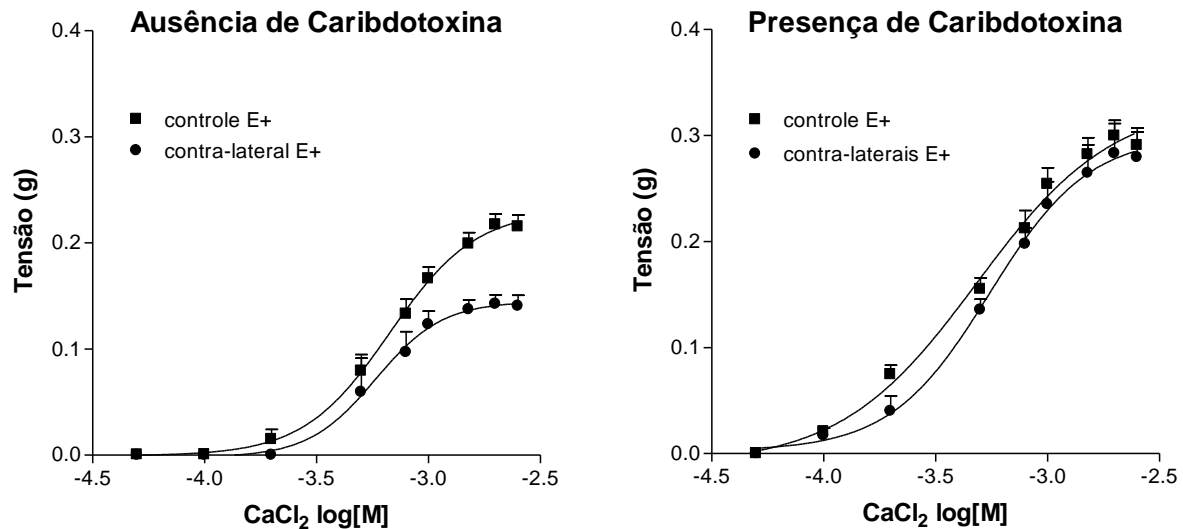
### **Conclusão parcial**

*Os resultados obtidos mostram que não existe participação de K<sub>ATP</sub> na modulação negativa do influxo de cálcio na artéria contra-lateral à lesão, 4 dias após a lesão.*

Um inibidor seletivo de canais para potássio dependentes de cálcio de alta condutância (BK<sub>Ca</sub>), caribdotoxina, foi usado para avaliar a participação destes canais na diminuição do influxo de cálcio extracelular na artéria carótida contra-lateral.

Na presença de caribdotoxina ocorreu aumento de E<sub>max</sub> do CaCl<sub>2</sub> em artérias controle e contra-laterais, mostrando a importância de canais para potássio do tipo BK na modulação do influxo de cálcio. O E<sub>max</sub> observado em artérias contra-laterais foi semelhante ao controle (Figuras 25 e 27, Tabela 16).

Não foram observadas alterações de potência para CaCl<sub>2</sub> entre os grupos controle e contra-lateral na presença e ausência de caribdotoxina (Tabela 17).



**Figura 25: Efeito de caribdotoxina na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio (E+).** Curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e caribdotoxina ( $10^{-7}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

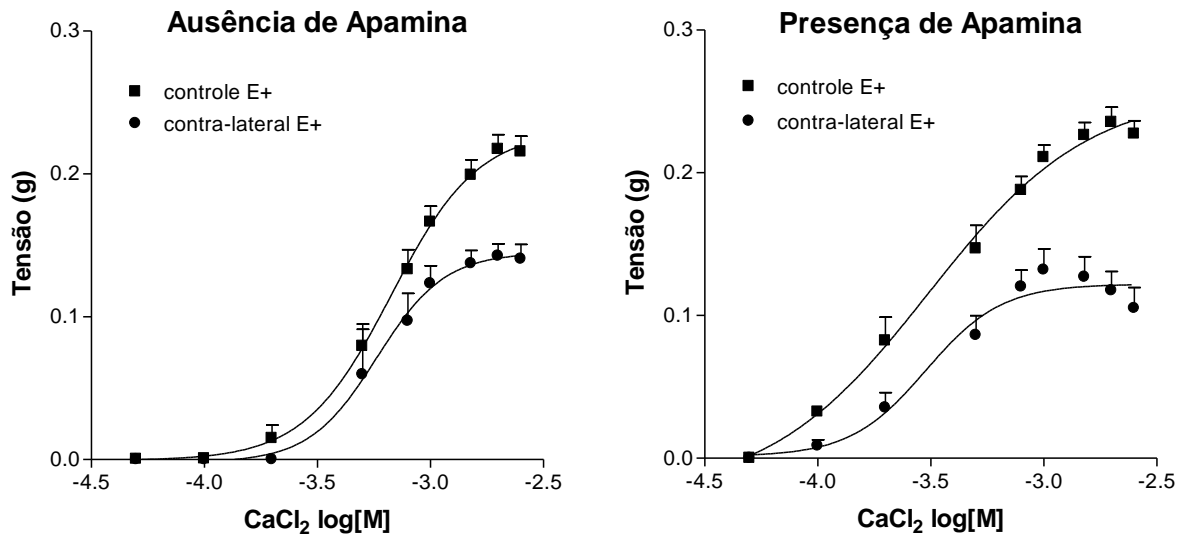
### **Conclusão parcial**

O presente estudo mostrou que  $BK_{Ca}$  estão envolvidos na modulação negativa do influxo de cálcio na artéria contra-lateral à lesão, na presença de endotélio, 4 dias após a lesão.

Para avaliar a participação de canais para potássio dependentes de cálcio de baixa condutância (SK) na diminuição do influxo de cálcio extracelular na artéria carótida contra-lateral, foi utilizado apamina, um inibidor seletivo destes canais.

Na presença de apamina o  $E_{max}$  do  $\text{CaCl}_2$  em artérias controle não foi alterado, sugerindo pequena participação de SK na modulação do influxo de cálcio. O mesmo foi observado em artérias contra-laterais, permanecendo reduzido o influxo de cálcio nas artérias contra-laterais em relação a artérias controle, na presença de apamina (Figuras 26 e 27, Tabela 16).

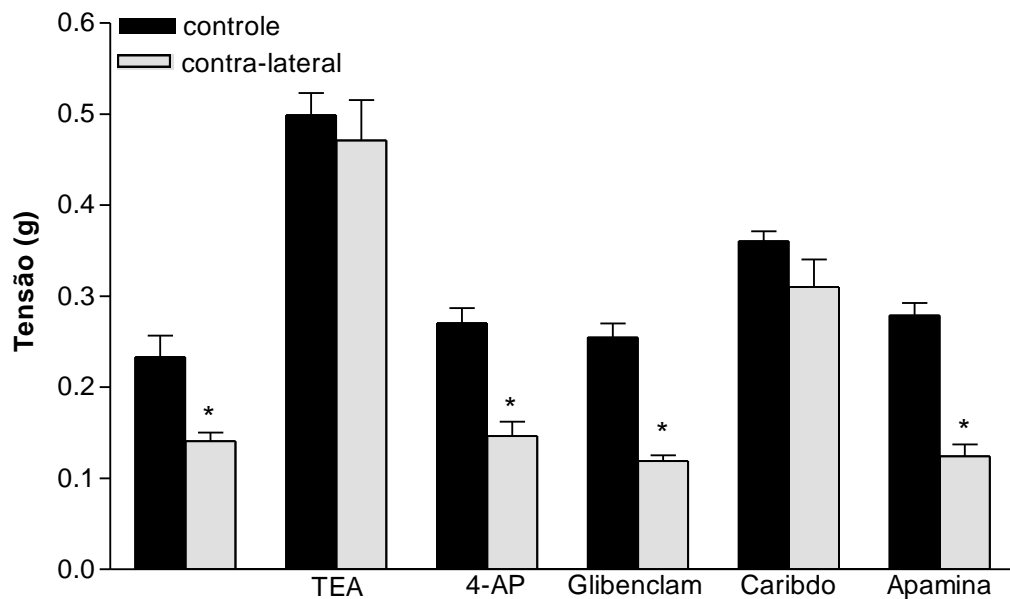
Os valores de  $pD_2$  para  $\text{CaCl}_2$  foram semelhantes entre artérias controle e contra-laterais na presença de apamina (Tabela 17).



**Figura 26:** Efeito de apamina na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio (E+). Curvas concentração-efeito para CaCl<sub>2</sub> (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe (10<sup>-7</sup> mol/L) e apamina (10<sup>-6</sup> mol/L). Os dados representam a média ± EPM.

### **Conclusão parcial**

*Os resultados obtidos indicam que canais do tipo SK não estão envolvidos na modulação negativa do influxo de cálcio na artéria contra-lateral, 4 dias após a lesão.*



**Figura 27: Efeito de inibidores de canais para potássio na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio.** Representação do Emax obtido em curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e inibidor (TEA,  $10^{-2}$  mol/L; 4-AP,  $10^{-3}$  mol/L; glibenclamida,  $3 \times 10^{-6}$  mol/L; Caribdotoxina,  $10^{-7}$  mol/L; apamina,  $10^{-6}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \* indica diferença significativa em relação ao controle.

**Tabela 16: Valores de Emax (gramas de tensão) do  $\text{CaCl}_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e TEA ( $10^{-2}$  mol/L), 4-AP ( $10^{-3}$  mol/L), Glibenclamida ( $3 \times 10^{-6}$  mol/L), Caribdotoxina ( $10^{-7}$  mol/L) ou apamina ( $10^{-6}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio.**

	TEA	4-AP	Glib	Carib	Apa	
<b>Controle</b>	0,24 $\pm$ 0,01 (n=11)	0,50 $\pm$ 0,02 (n=10)	0,24 $\pm$ 0,01 (n=11)	0,23 $\pm$ 0,01 (n=9)	0,35 $\pm$ 0,01 (n=9)	0,26 $\pm$ 0,02 (n=6)
<b>Contra-lateral</b>	0,14 $\pm$ 0,01* (n=5)	0,47 $\pm$ 0,04 (n=5)	0,15 $\pm$ 0,01* (n=6)	0,12 $\pm$ 0,01* (n=4)	0,31 $\pm$ 0,03 (n=5)	0,12 $\pm$ 0,01* (n=5)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls). Glib: glibenclamida; Carib: caribdotoxina; Apa: apamina.

**Tabela 17: Valores de  $pD_2$  do  $CaCl_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e TEA ( $10^{-2}$  mol/L), 4-AP ( $10^{-3}$  mol/L), Glibenclamida ( $3 \times 10^{-6}$  mol/L), Caribdotoxina ( $10^{-7}$  mol/L) ou apamina ( $10^{-6}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio.**

		<b>TEA</b>	<b>4-AP</b>	<b>Glib</b>	<b>Carib</b>	<b>Apa</b>
<b>Controle</b>	3,18 ± 0,02 (n=11)	3,73 ± 0,12* (n=10)	3,48 ± 0,07 (n=11)	3,47 ± 0,11* (n=9)	3,29 ± 0,04 (n=9)	3,48 ± 0,10 (n=6)
<b>Contra-lateral</b>	3,25 ± 0,09 (n=5)	3,78 ± 0,17* (n=5)	3,67 ± 0,13 (n=6)	3,47 ± 0,11* (n=9)	3,31 ± 0,07 (n=5)	3,53 ± 0,11 (n=5)

Os dados representam a média ± EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-Keuls). Glib: glibenclamida; Carib: caribdotoxina; Apa: apamina.

### **Conclusão:**

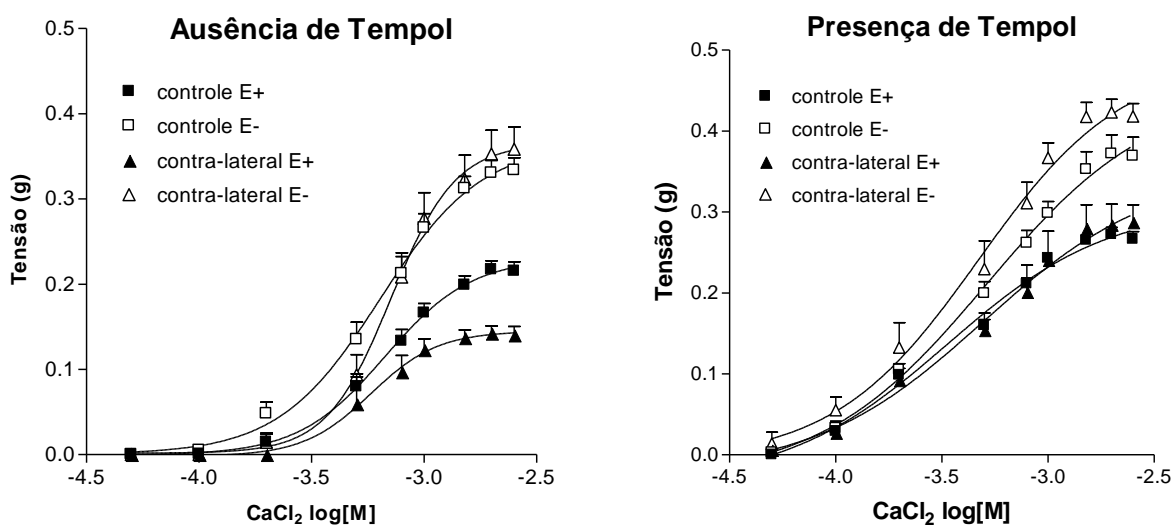
➤ *Há participação de canais para potássio do tipo  $BK_{Ca}$  na redução do influxo de cálcio extracelular induzido por Phe na artéria carótida contra-lateral, 4 dias após a lesão.*

### 4.3.3) A participação de espécies reativas de oxigênio (ROS) na modulação do influxo de cálcio extracelular

A participação de ROS na diminuição do influxo de cálcio extracelular na artéria carótida contra-lateral à lesão por cateter balão, 4 dias após a lesão, foi avaliada utilizando-se Tempol, Catalase e Tiron, substâncias capazes de sequestrar ROS, principalmente ânion superóxido e peróxido de hidrogênio.

Na presença de Tempol, observou-se aumento do Emax do  $\text{CaCl}_2$  na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) em todos os grupos estudados, mostrando a importância de ROS na regulação do influxo de cálcio. Em artérias contra-laterais, 4 dias após a lesão, o Emax observado foi semelhante ao controle, tanto na presença quanto na ausência de endotélio (Figuras 28 e 31, Tabela 18).

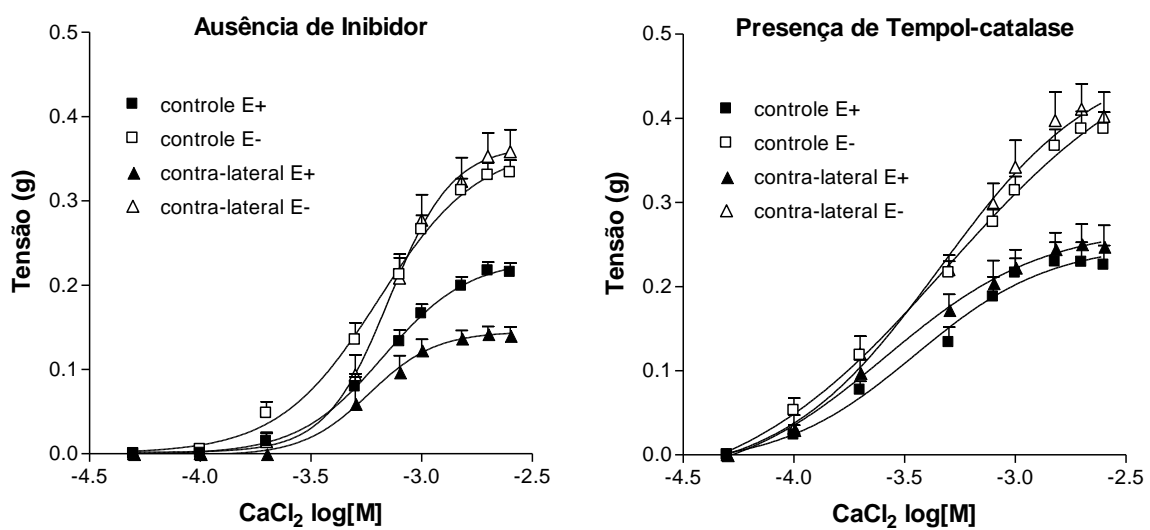
Não foi observada alteração de potência entre os grupos estudados na presença e na ausência de tempol (Tabela 19).



**Figura 28: Efeito do Tempol na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com (E+) e sem (E-) endotélio.** Curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e Tempol ( $10^{-3}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

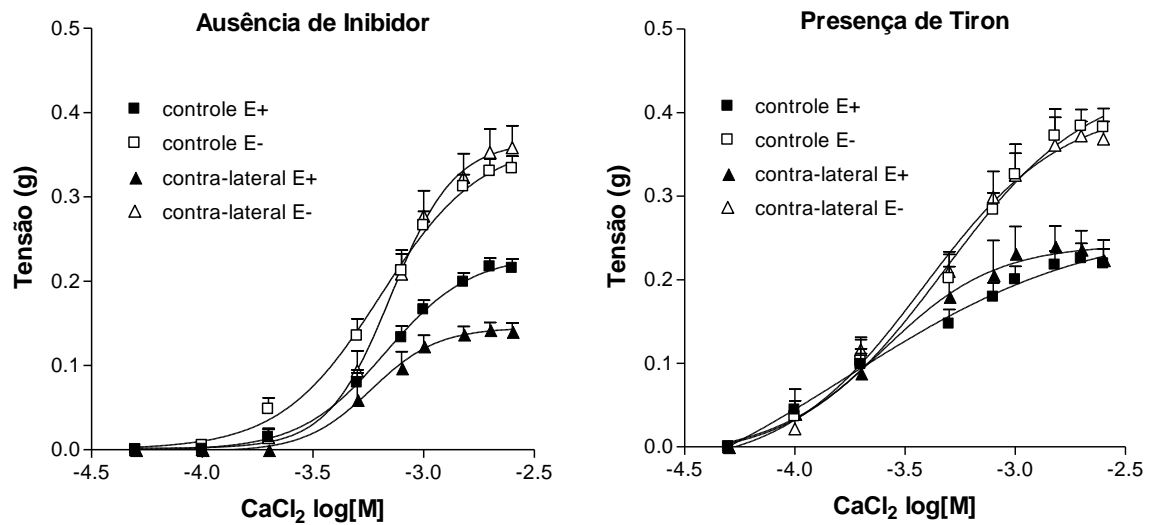
Resultados semelhantes foram obtidos com a associação de Tempol e catalase (Figuras 29 e 31, Tabelas 18 e 19) e também com Tiron (Figuras 30 e 31, Tabelas 18 e 19), sugerindo que a espécie reativa predominante na contra-lateral seja o ânion superóxido.

Os resultados indicam que existe a participação de ROS na diminuição do influxo de cálcio observado na contra-lateral com endotélio, 4 dias após a lesão. Na ausência de endotélio, não foram observadas alterações.



**Figura 29: Efeito de Tempol + PEG-Catalase na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com (E+) e sem (E-) endotélio.** Curvas concentração-efeito para CaCl<sub>2</sub> (0,05 - 2,50 mmol/L), na presença de Phe (10<sup>-7</sup>mol/L), Tempol (10<sup>-3</sup>mol/L) e PEG-Catalase (250U/mL). Os dados representam a média ± EPM.



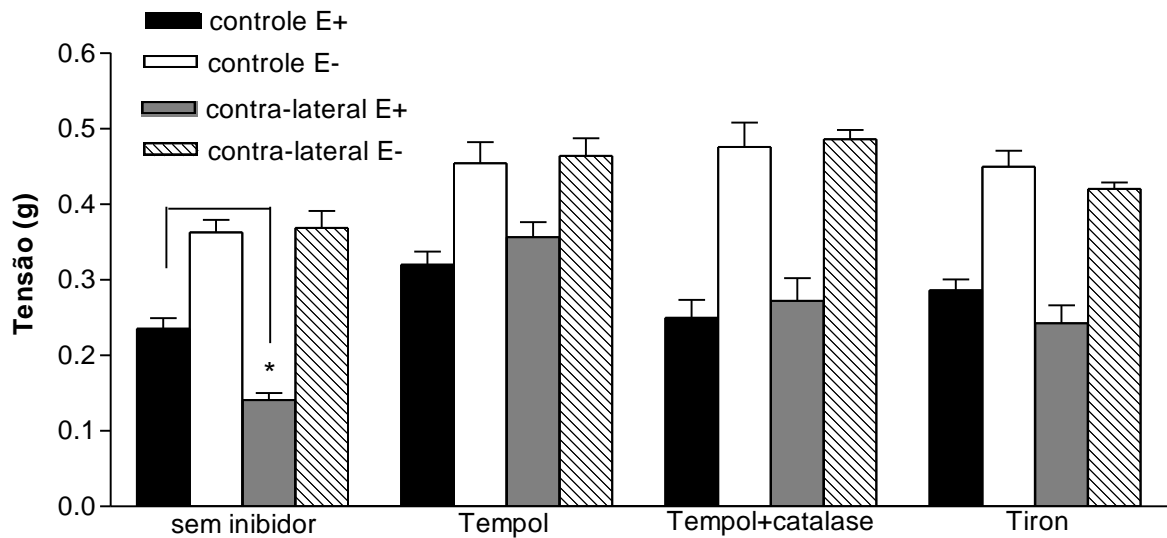


**Figura 30:** Efeito do Tiron na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com (E+) e sem (E-) endotélio. Curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e Tiron ( $10^{-3}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

**Tabela 18:** Valores de  $E_{\text{max}}$  (gramas de tensão) do  $\text{CaCl}_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e Tempol ( $10^{-3}$  mol/L), Tempol + PEG-Catalase ( $10^{-3}$  mol/L + 250U/mL) e Tiron ( $10^{-3}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio.

		Tempol	Temp + PEG-Cat	Tiron	
<b>Controle</b>	E+	0,24 $\pm$ 0,01 (n=11)	0,32 $\pm$ 0,02 (n=11)	0,25 $\pm$ 0,02 (n=5)	0,29 $\pm$ 0,01 (n=9)
	E-	0,36 $\pm$ 0,02 (n=16)	0,45 $\pm$ 0,04 (n=7)	0,48 $\pm$ 0,03 (n=7)	0,45 $\pm$ 0,02 (n=7)
<b>Contra</b>	E+	0,14 $\pm$ 0,01* (n=5)	0,36 $\pm$ 0,02 (n=4)	0,27 $\pm$ 0,03 (n=3)	0,24 $\pm$ 0,02 (n=3)
	E-	0,37 $\pm$ 0,02 (n=9)	0,46 $\pm$ 0,02 (n=5)	0,49 $\pm$ 0,02 (n=3)	0,42 $\pm$ 0,01 (n=3)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls). Contra: contra-lateral; Temp: Tempol, PEG-Cat: PEG-catalase.



**Figura 31: Efeito de antioxidantes na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com (E+) e sem (E-) endotélio.** Representação do  $E_{max}$  obtido em curvas concentração-efeito para  $CaCl_2$  (0,05 - 2,50 mol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e inibidor (Tempol,  $10^{-3}$  mol/L; Tiron,  $10^{-3}$  mol/L; Tempol-catalase,  $10^{-3}$  mol/L, 250U/mL). Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \* indica diferença significativa em relação ao controle.

**Tabela 19: Valores de  $pD_2$  do  $CaCl_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e Tempol ( $10^{-3}$  mol/L), Tempol + PEG-Catalase ( $10^{-3}$  mol/L + 250U/mL) e Tiron ( $10^{-3}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio.**

		Tempol	Temp + PEG-Cat	Tiron	
<b>Controle</b>	E+	3,18 $\pm$ 0,02 (n=11)	3,46 $\pm$ 0,12 (n=11)	3,47 $\pm$ 0,07 (n=5)	3,50 $\pm$ 0,11 (n=9)
	E-	3,23 $\pm$ 0,04 (n=16)	3,30 $\pm$ 0,07 (n=7)	3,53 $\pm$ 0,22 (n=7)	3,27 $\pm$ 0,03 (n=7)
<b>Contra</b>	E+	3,25 $\pm$ 0,09 (n=5)	3,29 $\pm$ 0,14 (n=4)	3,59 $\pm$ 0,08 (n=3)	3,54 $\pm$ 0,17 (n=3)
	E-	3,17 $\pm$ 0,04 (n=9)	3,37 $\pm$ 0,10 (n=5)	3,34 $\pm$ 0,16 (n=3)	3,39 $\pm$ 0,05 (n=3)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls). Contra: contra-lateral; Temp: Tempol, PEG-Cat: PEG-catalase.

**Conclusão Parcial:**

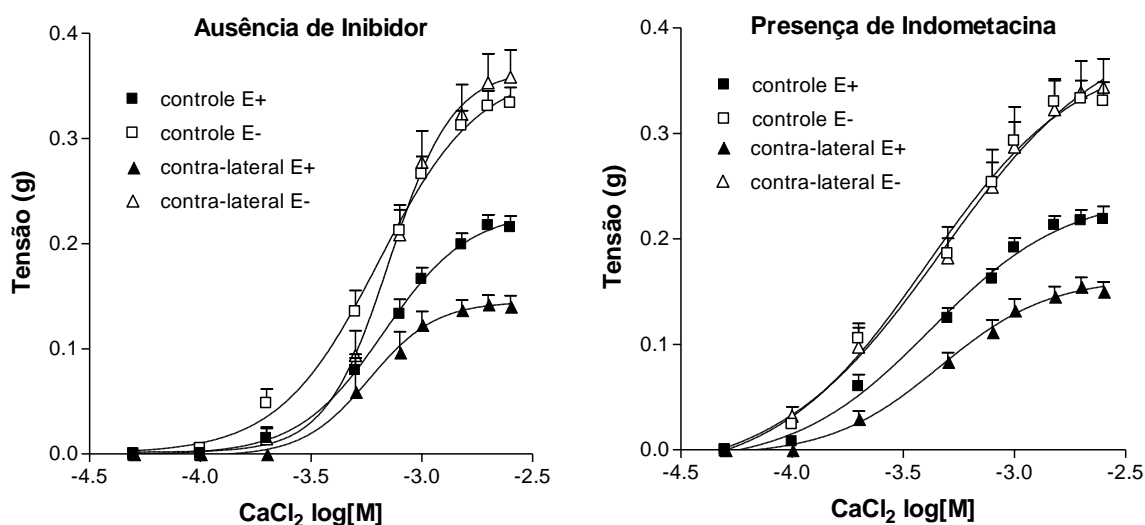
➤ *Espécies reativas de oxigênio, provavelmente ânions superóxidos, estão envolvidos na redução do influxo de cálcio extracelular induzido por Phe na artéria carótida contra-lateral, 4 dias após a lesão.*

#### 4.3.4) A participação de prostanóides na modulação do influxo de cálcio extracelular:

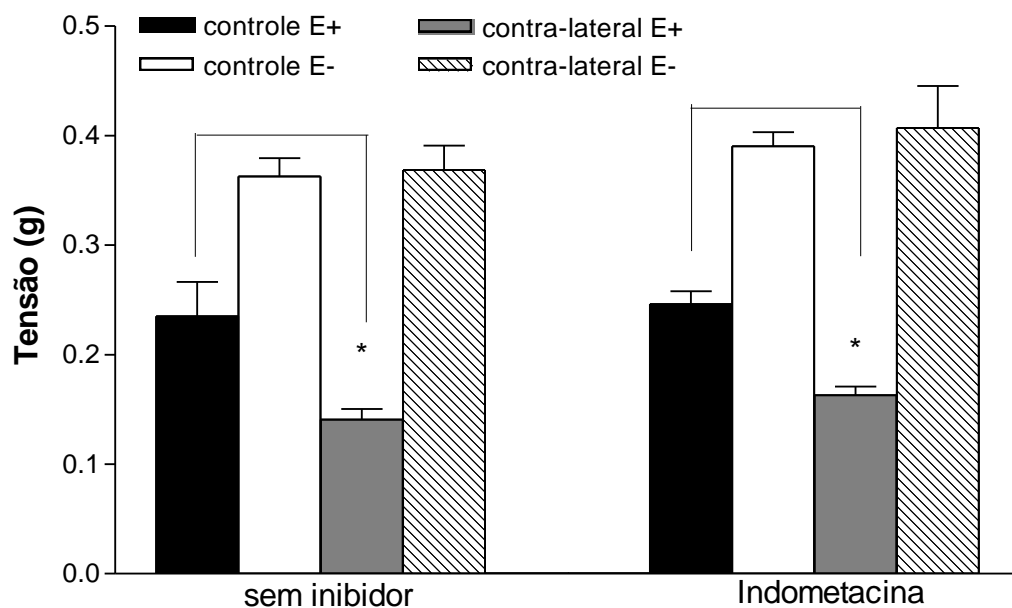
Com o objetivo de verificar se prostanóides estão envolvidos na redução do influxo de cálcio extracelular na artéria carótida contra-lateral à lesão por cateter balão, foi utilizado Indometacina, um inibidor não seletivo da ciclooxigenase.

Na presença de Indometacina, o  $E_{max}$  do  $CaCl_2$  na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) foi pouco alterado, nos grupos controle e contra-lateral, com e sem endotélio. O influxo de cálcio na contra-lateral com endotélio permaneceu diminuído em relação ao controle, na presença de Indometacina (Figuras 32 e 33, Tabela 20).

A potência não foi alterada na presença de Indometacina, entre os grupos estudados (Tabela 21).



**Figura 32: Efeito da Indometacina na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com (E+) e sem (E-) endotélio.** Curvas concentração-efeito para  $CaCl_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e Indometacina ( $10^{-5}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.



**Figura 33: Efeito da Indometacina na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com (E+) e sem (E-) endotélio.** Representação do Emax obtido em curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50mmol/L), em meio contendo Phe( $10^{-7}$ mol/L) e Indometacina ( $10^{-5}$ mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \* indica diferença significativa em relação ao controle.

**Tabela 20: Valores de Emax (gramas de tensão) do  $\text{CaCl}_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mmol/L) e Indometacina ( $10^{-5}$  mmol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio.**

		Sem Indometacina		Com Indometacina	
		Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>Emax</b>	<b>E+</b>	0,24 $\pm$ 0,01 (n=11)	0,14 $\pm$ 0,01*	0,25 $\pm$ 0,01 (n=8)	0,16 $\pm$ 0,02*
	<b>E-</b>	0,36 $\pm$ 0,02 (n=16)	0,37 $\pm$ 0,02 (n=9)	0,39 $\pm$ 0,01 (n=10)	0,41 $\pm$ 0,04 (n=4)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).

**Tabela 21: Valores de  $pD_2$  do  $CaCl_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mmol/L) e Indometacina ( $10^{-5}$  mmol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio.**

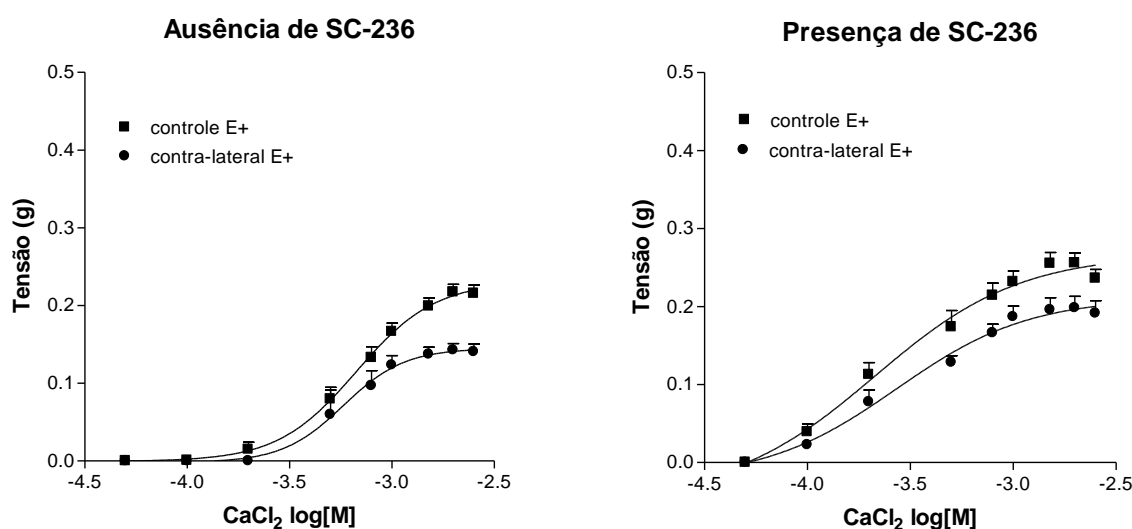
		Sem Indometacina		Com Indometacina	
		Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
$pD_2$	E+	3,18 ± 0,02 (n=11)	3,25 ± 0,09 (n=5)	3,38 ± 0,07 (n=8)	3,34 ± 0,05 (n=6)
	E-	3,23 ± 0,04 (n=16)	3,17 ± 0,04 (n=9)	3,39 ± 0,04 (n=10)	3,30 ± 0,10 (n=4)

Os dados representam a média ± EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).

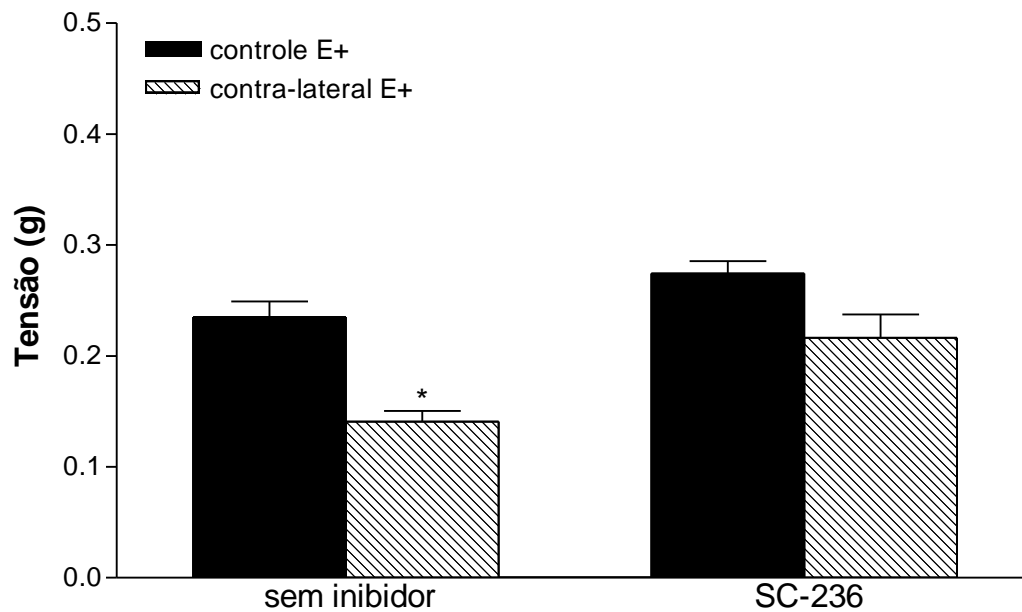
Entretanto, Indometacina chega a ser até 60 vezes mais potente como inibidor de COX-1 que de COX-2 (MITCHELL et al., 1994). Com o objetivo de melhor avaliar a participação de prostanóides no processo, também foi usado SC-236, um inibidor muito seletivo para COX-2.

Na presença de SC-236, o  $E_{max}$  do  $CaCl_2$ , adicionado gradualmente em meio contendo Phe, foi semelhante em artérias controle e contra-laterais com endotélio (Figuras 34 e 35, Tabela 22).

Na presença de SC-236 não houve alteração de potência entre artérias controle e contra-laterais (Tabela 22).



**Figura 34: Efeito de SC-236 na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com (E+) endotélio.** Curvas concentração-efeito para  $CaCl_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e SC-236 ( $10^{-10}$  mol/L). Os dados representam a média ± EPM.



**Figura 35: Efeito de SC-236 na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio (E+).** Representação do Emax obtido em curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$ mol/L) e SC-236 ( $10^{-10}$ mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \* indica diferença significativa em relação ao controle.

**Tabela 22: Valores de Emax (gramas de tensão) e  $pD_2$  para  $\text{CaCl}_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mmol/L) e SC-236 ( $10^{-10}$ mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença de endotélio.**

	Sem SC-236		Com SC-236	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>Emax</b>	0,24 $\pm$ 0,01 (n=11)	0,14 $\pm$ 0,01* (n=5)	0,27 $\pm$ 0,01 (n=7)	0,22 $\pm$ 0,02 (n=6)
<b><math>pD_2</math></b>	3,18 $\pm$ 0,02 (n=11)	3,25 $\pm$ 0,09 (n=5)	3,60 $\pm$ 0,09 (n=7)	3,54 $\pm$ 0,10 (n=6)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ; ANOVA, pós-teste de Newman-keuls).

**Conclusão Parcial:**

- *Há participação de prostanóides derivados de COX-2 na diminuição do influxo de cálcio extracelular induzido por Phe na artéria carótida contra-lateral, 4 dias após a lesão.*

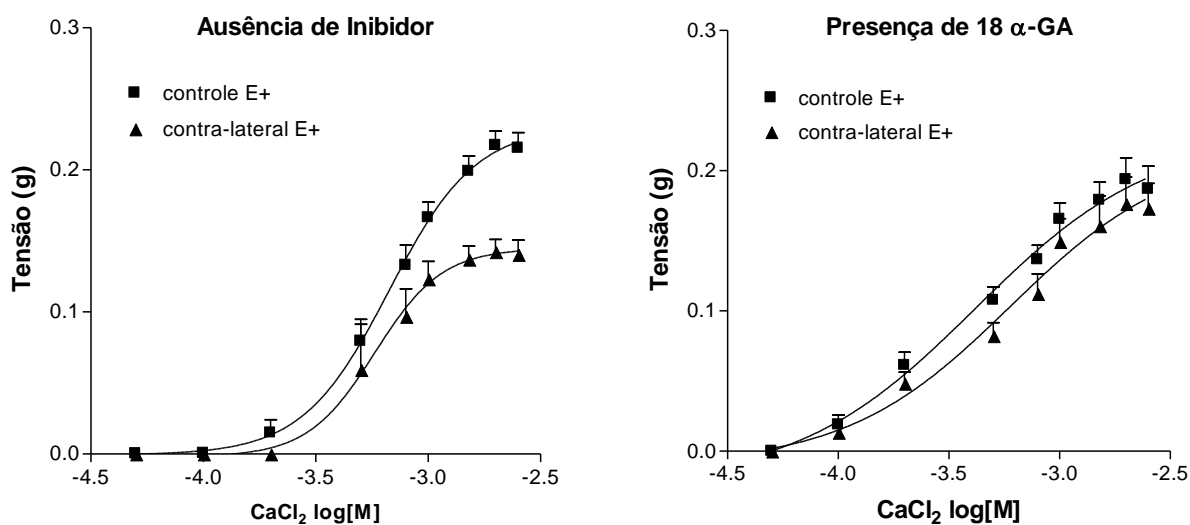


#### 4.3.5) A participação de junções intercelulares do tipo GAP no influxo de cálcio induzido por Phe

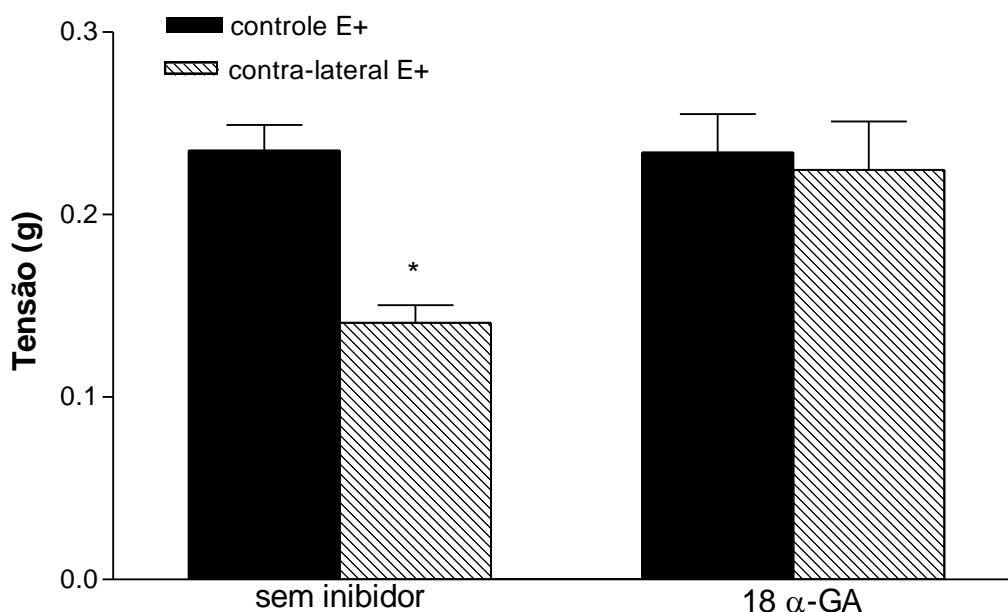
A participação de junções intercelulares do tipo GAP na redução do influxo de cálcio extracelular na artéria contra-lateral foi verificada utilizando o ácido 18  $\alpha$ -glicirretínico (18 $\alpha$ -GA), um inibidor específico destas junções.

Na presença de 18 $\alpha$ -GA observou-se aumento significativo do E<sub>max</sub> do CaCl<sub>2</sub> em artérias contra-laterais, sendo semelhante ao observado em artérias controle (Figura 36 e 37, Tabela 23).

A potência para CaCl<sub>2</sub> em meio contendo Phe em artérias controle e contra-laterais não foi alterada na presença de 18 $\alpha$ -GA (Tabela 23).



**Figura 36: Efeito de 18  $\alpha$ -GA na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio (E+).** Curvas concentração-efeito para CaCl<sub>2</sub> (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe (10<sup>-7</sup> mol/L) e 18  $\alpha$ -GA (5x10<sup>-6</sup> mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.



**Figura 37: Efeito de 18  $\alpha$ -GA na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, contendo endotélio.** Representação do Emax obtido em curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e 18  $\alpha$ -GA ( $5 \times 10^{-6}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \* indica diferença significativa em relação ao controle.

**Tabela 23: Valores de Emax (gramas de tensão) e  $pD_2$  para  $\text{CaCl}_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e 18  $\alpha$ -GA ( $5 \times 10^{-6}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença de endotélio.**

	Sem 18 $\alpha$ -GA		Com 18 $\alpha$ -GA	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>Emax</b>	0,24 $\pm$ 0,01 (n=11)	0,14 $\pm$ 0,01* (n=5)	0,23 $\pm$ 0,02 (n=6)	0,22 $\pm$ 0,02 (n=5)
<b><math>pD_2</math></b>	3,18 $\pm$ 0,02 (n=11)	3,25 $\pm$ 0,09 (n=5)	3,43 $\pm$ 0,10 (n=6)	3,19 $\pm$ 0,05 (n=5)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).

### **Conclusão:**

*Os resultados sugerem que a redução do influxo de cálcio induzida por Phe envolve a participação de junções do tipo GAP.*

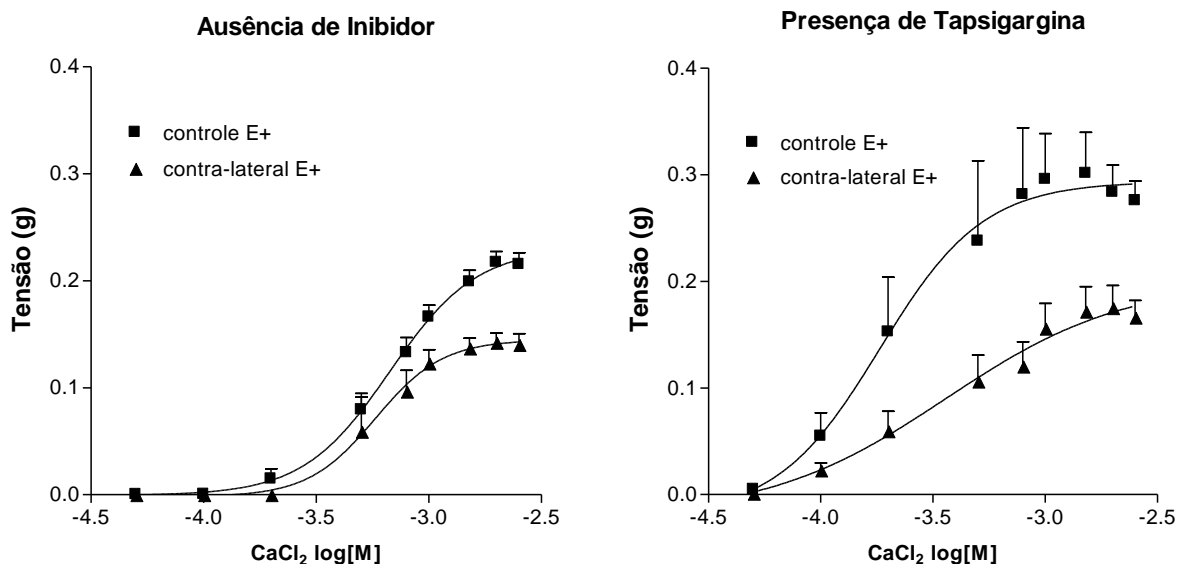
#### 4.3.6) Participação do retículo sarcoplasmático na mobilização de cálcio extracelular induzida por Phe:

O retículo sarcoplasmático atua como um importante regulador da concentração intracelular de cálcio, principalmente através da Ca-ATPase do retículo e dos receptores para  $IP_3$ .

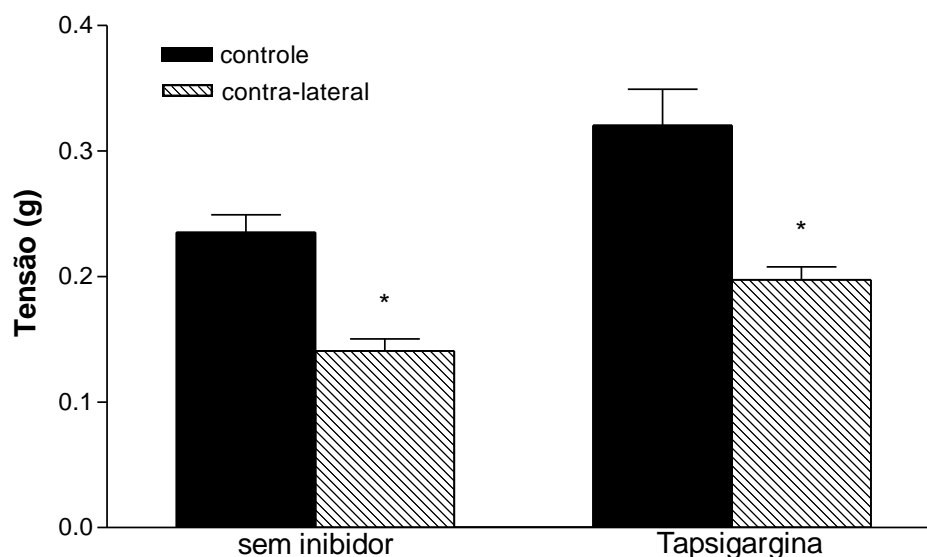
Para verificar a participação do retículo sarcoplasmático na resposta dependente do influxo de cálcio extracelular induzida por Phe, foram realizadas curvas concentração-resposta para  $CaCl_2$  na presença de Phe e de Tapsigargina, uma substância capaz de inibir a Ca-ATPase do retículo.

Tapsigargina promoveu aumento de  $E_{max}$  do  $CaCl_2$  em artérias controle. Em artérias contra-laterais, o  $E_{max}$  permaneceu reduzido em relação a artérias controle na presença de tapsigargina (Figura 38 e 39, Tabela 24).

A potência para  $CaCl_2$  em artérias contra-laterais foi semelhante à observada em artérias controle na presença de Tapsigargina (Tabela 24).



**Figura 38: Efeito da Tapsigargina na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio (E+).** Curvas concentração-efeito para  $CaCl_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e Tapsigargina ( $10^{-6}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.



**Figura 39: Efeito da Tapsigargina na mobilização do cálcio extracelular em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, contendo endotélio.** Representação do Emax obtido em curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e tapsigargina ( $10^{-6}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \* indica diferença significativa em relação ao controle.

**Tabela 24: Valores de Emax (gramas de tensão) e  $pD_2$  do  $\text{CaCl}_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) e Tapsigargina ( $10^{-6}$  mol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença de endotélio.**

	Sem Tapsigargina		Com Tapsigargina	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>Emax</b>	0,24 $\pm$ 0,01 (n=11)	0,14 $\pm$ 0,01* (n=5)	0,32 $\pm$ 0,03 (n=4)	0,20 $\pm$ 0,01* (n=5)
<b><math>pD_2</math></b>	3,18 $\pm$ 0,02 (n=11)	3,25 $\pm$ 0,09 (n=5)	3,61 $\pm$ 0,09 (n=4)	3,35 $\pm$ 0,13 (n=5)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).

### Conclusão

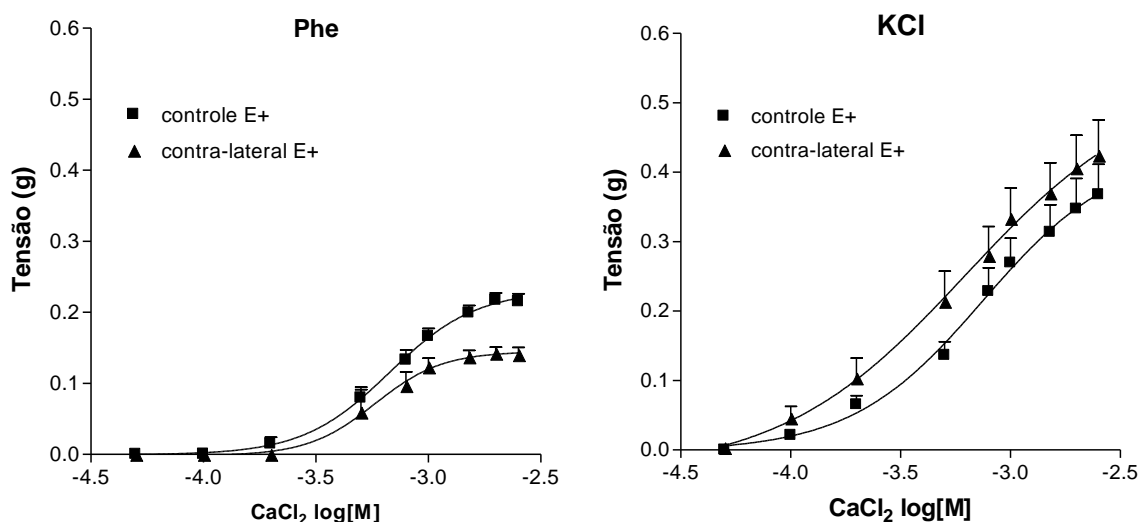
Os resultados obtidos sugerem que não há participação do retículo sarcoplasmático na redução do influxo de cálcio na artéria contra-lateral à lesão por cateter balão.

#### 4.4) Mobilização de cálcio extracelular independente de receptor

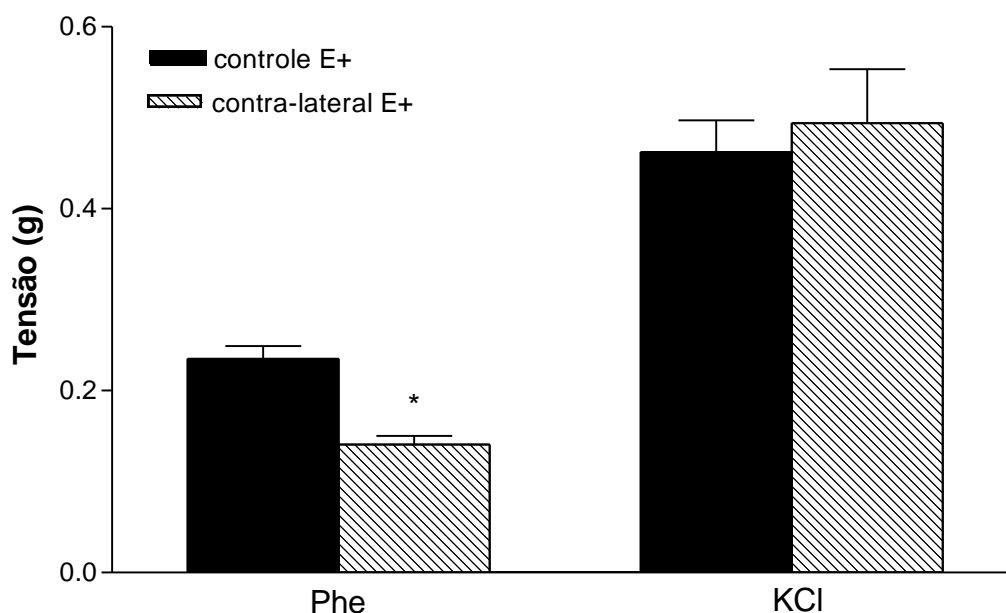
Em artérias contra-laterais à lesão por cateter balão foi observado aumento de  $E_{max}$  para Phe e redução na mobilização de cálcio extracelular induzida por Phe.

Para verificar se esta alteração na mobilização de cálcio era dependente da ativação de  $\alpha_1$ -adrenoceptores, foram realizadas curvas concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$  em meio contendo alta concentração de  $\text{K}^+$  (KCl 90 mmol/L), um agente despolarizante.

Em artérias contra-laterais, a mobilização de cálcio extracelular induzida por KCl foi igual à observada em artérias controle (Figura 40 e 41, Tabela 25).



**Figura 40: Mobilização do cálcio extracelular induzida por Phe ou KCl em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio.** Curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) ou KCl (90mmol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.



**Figura 41: Mobilização do cálcio extracelular induzida por Phe ou por KCl em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, contendo endotélio (E+).** Representação do Emax obtido em curvas concentração-efeito para  $\text{CaCl}_2$  (0,05 - 2,50 mmol/L), em meio sem cálcio contendo Phe ( $10^{-7}$  mol/L) ou KCl (90 mmol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \* indica diferença significativa em relação ao controle.

**Tabela 25: Valores de Emax (gramas de tensão) e  $pD_2$  do  $\text{CaCl}_2$  (0,05-2,50 mmol/L), na presença de Phe ( $10^{-7}$  mol/L) ou KCl (90mmol/L) representando a participação do cálcio extracelular na contração em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, na presença de endotélio.**

	Phe		KCl	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>Emax</b>	0,24 $\pm$ 0,01 (n=11)	0,14 $\pm$ 0,01* (n=5)	0,46 $\pm$ 0,04 (n=8)	0,50 $\pm$ 0,05 (n=6)
<b><math>pD_2</math></b>	3,18 $\pm$ 0,02 (n=11)	3,25 $\pm$ 0,09 (n=5)	3,18 $\pm$ 0,08 (n=8)	3,24 $\pm$ 0,09 (n=6)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-keuls).

### **Conclusão:**

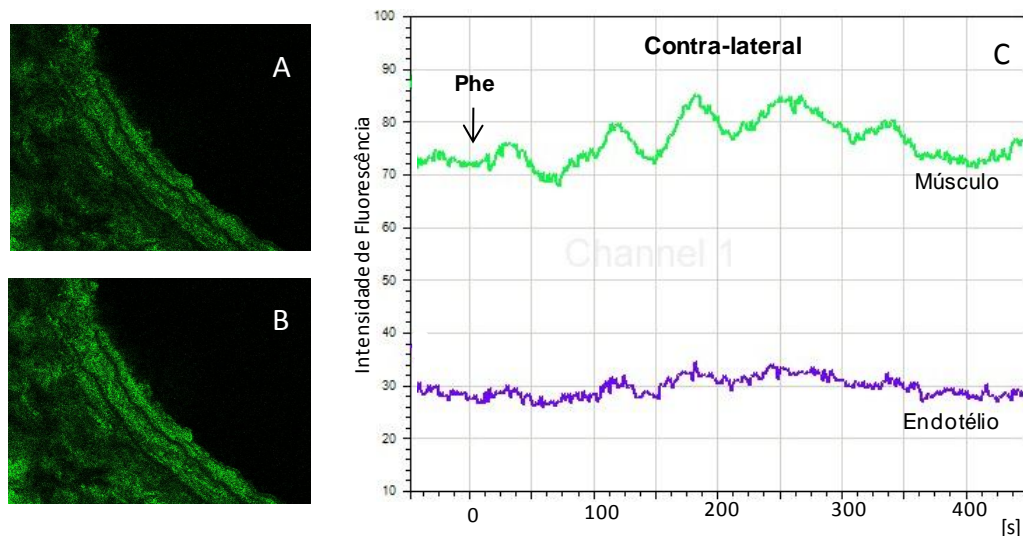
Com base nos resultados aqui apresentados, sugere-se que a redução na mobilização de cálcio extracelular é decorrente de alterações na via de sinalização ativada pela Phe.

#### **4.5) Avaliação da concentração de cálcio intracelular por microscopia confocal**

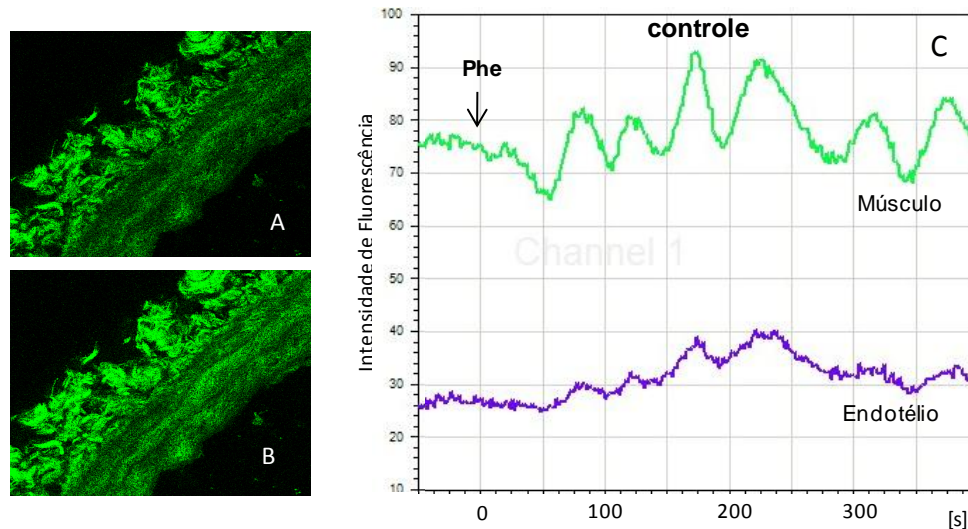
Para melhor avaliar a mobilização de cálcio extracelular induzida pela Phe em artérias contra-laterais à lesão, foi utilizada a técnica de microscopia confocal, usando como fluorocromo o Fluo 3-AM.

A razão da variação de fluorescência antes e após estimular com Phe ( $F-F_0$ ) em relação à fluorescência final ( $F-F_0/F$ ) apresentou-se reduzida nas artérias contra-laterais (Figura 42 e 44) em comparação com artérias controle (Figura 43 e Figura 44, Tabela 26), tanto em células da camada muscular quanto da camada endotelial.

Associando aos resultados anteriores, pode-se inferir que há comprometimento do influxo de cálcio induzido pela Phe em artérias contra-laterais à lesão por cateter balão.



**Figura 42: Variação da intensidade de fluorescência após estímulo com Phe ( $10^{-7}$  mol/L) em anéis de artérias carótidas contra-laterais à lesão por cateter balão. A- fluorescência basal. B- fluorescência 5 minutos após estímulo com Phe. C- Variação da intensidade de fluorescência em função do tempo pós-estímulo com Phe em células na camada muscular e endotelial de anéis de carótida.**



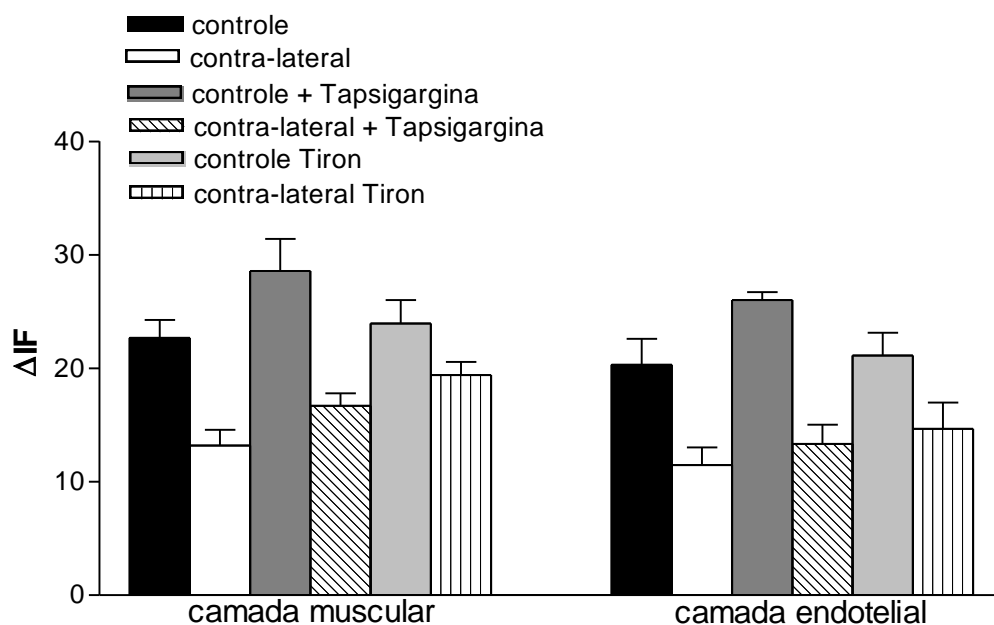
**Figura 43: Variação da intensidade de fluorescência após estímulo com Phe ( $10^{-7}$  mol/L) em anéis de artérias carótidas controle.** A- fluorescência basal. B- fluorescência 5 minutos após estímulo com Phe. C- Variação da intensidade de fluorescência em função do tempo pós-estímulo com Phe em células na camada muscular e endotelial de anéis de carótida.

Como o retículo é a principal fonte de cálcio intracelular, usou-se Tapsigargina, um inibidor da Ca-ATPase do retículo, para melhor avaliar se o influxo de cálcio extracelular estava comprometido.

Na presença de Tapsigargina, a intensidade de fluorescência após estímulo com Phe na artéria contra-lateral foi menor que a observada em artérias controle (Figura 44, Tabela 26), indicando a redução do influxo de cálcio extracelular na contra-lateral.

Os resultados apresentados anteriormente neste trabalho sugerem a participação de ânions superóxido na redução do influxo de cálcio extracelular induzido pela Phe na artéria contra-lateral. Para confirmar o envolvimento deste oxidante no processo, foram realizados experimentos na presença de Tapsigargina e Tiron. Na presença destes inibidores, a intensidade de fluorescência após estímulo com Phe, foi semelhante em artérias controle e contra-laterais (Figura 44, Tabela 26), confirmando que ânions superóxido promovem alterações na artéria contra-lateral à lesão, reduzindo o influxo de cálcio extracelular induzido pela Phe.





**Figura 44: Aumento da intensidade de fluorescência ( $\Delta IF$ , %) após estimular com Phe ( $10^{-7}$  mol/L). Efeito da Phe e Tapsigargina ( $10^{-6}$  mol/L) e/ou Tiron ( $10^{-3}$  mol/L) na concentração de cálcio em células da camada muscular e endotelial de anéis de artérias controle e contra-laterais.**

**Tabela 26: Valores correspondentes ao aumento na intensidade de fluorescência ( $\Delta IF$ , %) após estimulação com Phe ( $10^{-7}$  mol/L), na camada endotelial e muscular de anéis de artérias controle e contra-laterais, na ausência e na presença de Tapsigargina ( $10^{-6}$  mol/L) e/ou Tiron ( $10^{-3}$  mol/L).**

		Controle	Contra-lateral
<b>Sem inibidor</b>	<b>Músculo</b>	22,69±1,59 (n=4)	13,20±1,40* (n=7)
	<b>Endotélio</b>	20,32±2,28 (n=6)	11,47±1,56* (n=6)
<b>Tapsigargina</b>	<b>Músculo</b>	28,60±2,81 (n=3)	16,70±1,10* (n=4)
	<b>Endotélio</b>	26,02±0,70 (n=3)	13,34±1,68* (n=6)
<b>Tiron + Tapsigargina</b>	<b>Músculo</b>	23,95±2,07 (n=3)	19,40±1,15 (n=4)
	<b>Endotélio</b>	21,14±2,00 (n=6)	14,70±2,30 (n=4)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. (\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (test T de Student).

### **Conclusão:**

✓ Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o aumento de Emax para Phe na artéria contra-lateral à lesão não está relacionado ao aumento na mobilização de cálcio pela Phe;

✓ Observou-se redução do influxo de cálcio extracelular induzido pela Phe na artéria contra-lateral à lesão;

✓ Na redução do influxo de cálcio extracelular induzido pela Phe não há participação de NO nem de GCs. Também não há envolvimento do retículo sarcoplasmático.

✓ Na redução do influxo de cálcio extracelular induzido pela Phe há participação de:

- ✓ eNOS,
- ✓ BK<sub>Ca</sub>
- ✓ ânion superóxido
- ✓ prostanóides derivados da COX-2
- ✓ junções do tipo GAP

✓ Trata-se de um processo dependente da ativação de receptores alfa<sub>1</sub>-adrenérgicos.

#### **4.6) Mecanismos celulares envolvidos na alteração do influxo de cálcio e no aumento do Emax para Phe**

Alterações celulares no endotélio resultaram em redução do influxo de cálcio e aumento do Emax para Phe na carótida contra-lateral à lesão por cateter balão.

Conforme resultados descritos anteriormente, eNOS, BK<sub>Ca</sub>, ROS, COX-2 e junções do tipo GAP modulam negativamente o influxo de cálcio induzido por Phe na contra-lateral.

Para verificar se os fatores que estão envolvidos na redução do influxo de cálcio também participam do aumento de Emax da Phe, foram realizadas curvas concentração-resposta para Phe na presença de inibidores específicos.

##### **4.6.1) Avaliação da participação de eNOS no aumento de Emax para Phe na carótida contra-lateral**

A participação de eNOS no aumento de Emax da Phe na contra-lateral foi verificada utilizando o inibidor específico L-NNA.

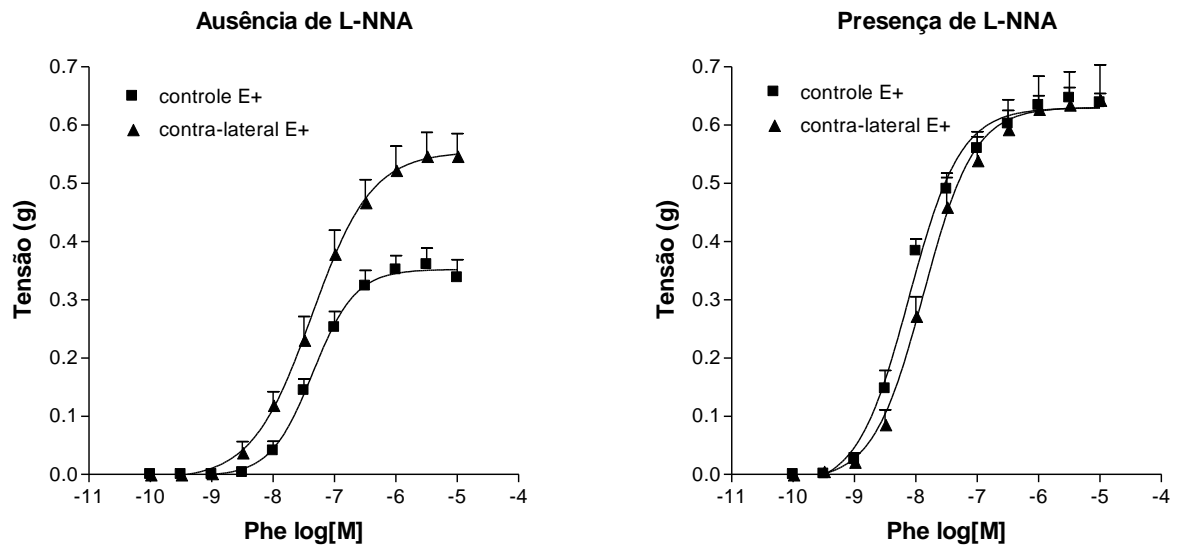
Na presença de L-NNA observou-se aumento significativo do Emax da Phe em artérias controle, mas o mesmo não ocorreu na artéria contra-lateral. Na artéria contra-lateral o Emax praticamente não foi alterado (Figura 47 e 48, Tabela 27).

A potência da Phe foi semelhante entre os grupos controle e contra-lateral na presença de L-NNA (Tabela 27).

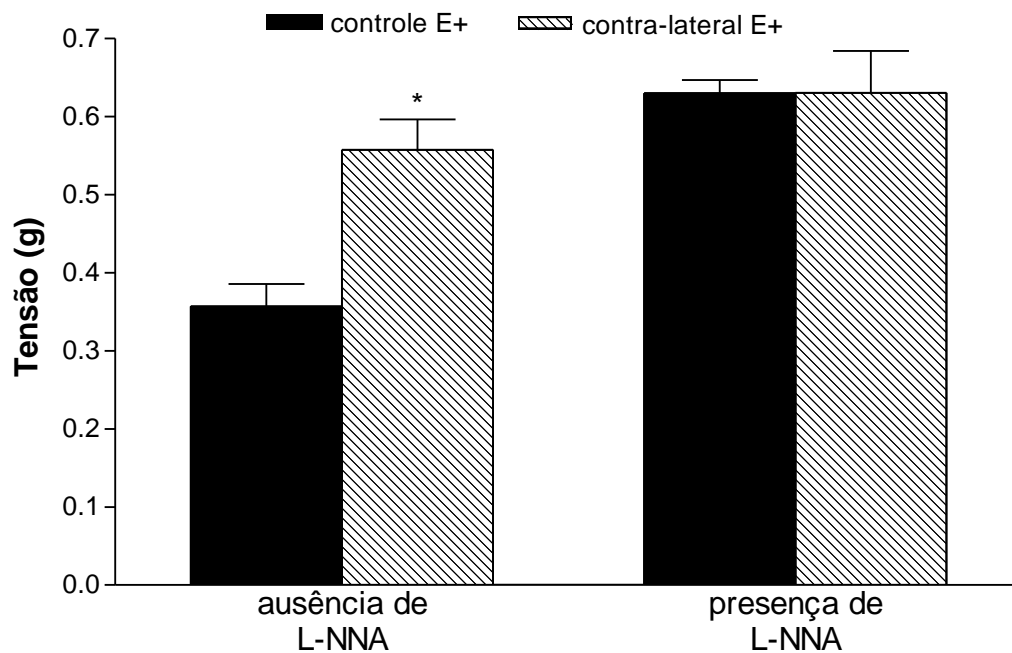
**Tabela 27: Valores de Emax (gramas de tensão) e de pD<sub>2</sub> da Phe em artérias carótidas controle e contra-laterais com endotélio, na presença e na ausência de L-NNA (10<sup>-4</sup> mol/L).**

	Ausência de L-NNA		Presença de L-NNA	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>Emax</b>	0,36 ± 0,03 (n=6)	0,56 ± 0,04* (n=9)	0,63 ± 0,02 (n=6)	0,63 ± 0,05 (n=5)
<b>pD<sub>2</sub></b>	7,33 ± 0,05 (n=6)	7,37 ± 0,14 (n=9)	8,12 ± 0,05 (n=6)	7,88 ± 0,03 (n=5)

Os dados representam a média ± EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\*P<0,05; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).



**Figura 47: Efeito induzido pela Phe em artérias carótidas controle e contra-laterais com endotélio (E+), 4 dias após a lesão, na presença e ausência de L-NNA ( $10^{-4}$  mmol/L).** Os dados, obtidos em curvas concentração-efeito para Phe ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  mol/L), representam a média  $\pm$  EPM.



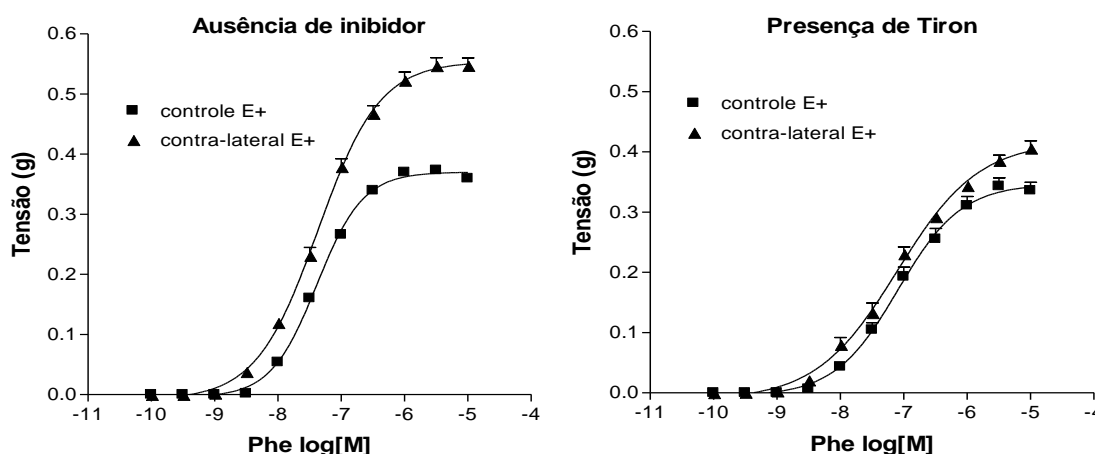
**Figura 48: Emax da Phe em artérias carótidas controle e contra-laterais com endotélio, na presença e ausência de L-NNA ( $10^{-4}$  mol/L).** Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-Keuls).

#### 4.6.2) Avaliação da participação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no aumento de Emax para Phe na carótida contra-lateral.

A participação de ROS no aumento de Emax para Phe na contra-lateral foi avaliada usando Tiron, um seqüestrador de ânions superóxido.

Os resultados obtidos na presença de Tiron mostraram o envolvimento de ROS no aumento de Emax para Phe na contra-lateral. O Tiron promoveu redução do Emax na contra-lateral para níveis do controle (Figura 49 e 50, Tabela 28).

A potência da Phe na contra-lateral foi semelhante ao controle na presença de Tiron (Tabela 28).

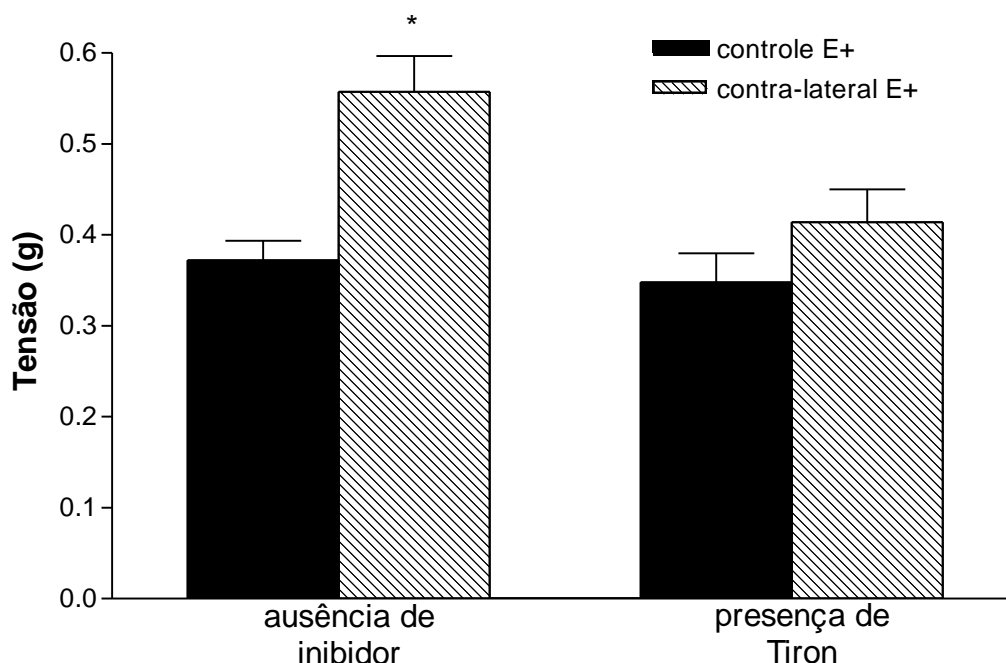


**Figura 49: Efeito do Tiron na resposta para Phe em artérias controle e contra-laterais, com endotélio (E+).** Curvas concentração-efeito para Phe ( $10^{-10}$  –  $10^{-5}$  mol/L), na ausência e na presença de Tiron ( $10^{-3}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

**Tabela 28: Valores de Emax (gramas de tensão) e  $pD_2$  para Phe ( $10^{-10}$  –  $10^{-5}$  mol/L), na ausência e na presença de Tiron ( $10^{-3}$  mol/L) em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão.**

	Sem Tiron		Com Tiron	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>Emax</b>	0,36 $\pm$ 0,03 (n=6)	0,56 $\pm$ 0,04* (n=9)	0,35 $\pm$ 0,03 (n=5)	0,41 $\pm$ 0,04 (n=6)
<b><math>pD_2</math></b>	7,33 $\pm$ 0,05 (n=6)	7,37 $\pm$ 0,14 (n=9)	7,05 $\pm$ 0,18 (n=5)	7,16 $\pm$ 0,25 (n=6)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).



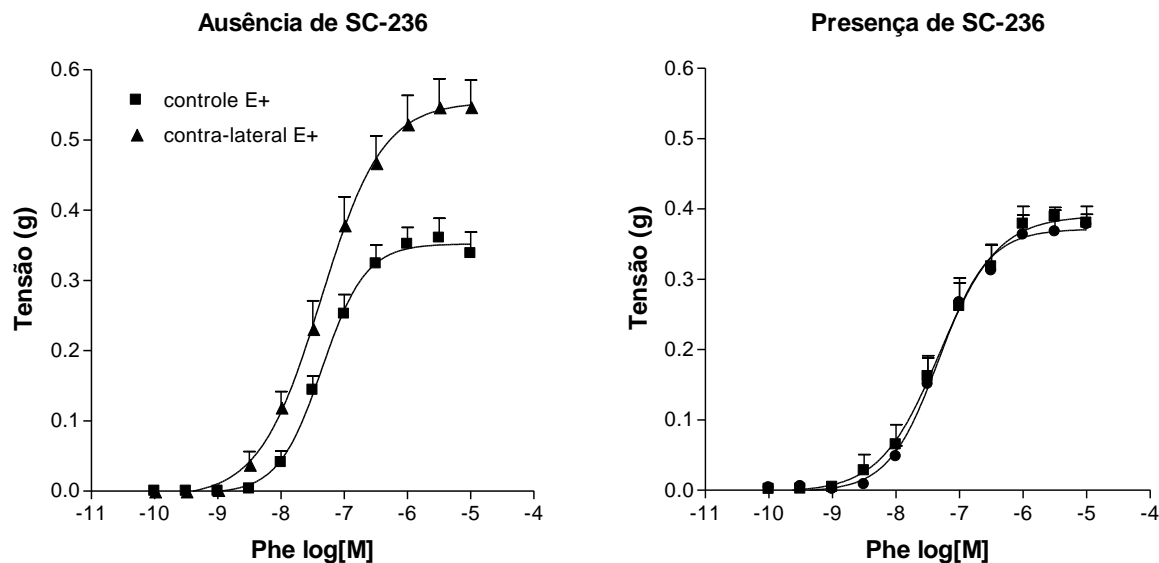
**Figura 50: Efeito do Tiron na resposta para Phe em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, contendo endotélio (E+).** Representação do Emax obtido em curvas concentração-efeito para Phe ( $10^{-10}$  –  $10^{-5}$  mol/L), na ausência e na presença de Tiron ( $10^{-3}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-Keuls).

#### 4.6.3) Avaliação da participação de COX-2 no aumento de Emax para Phe na carótida contra-lateral.

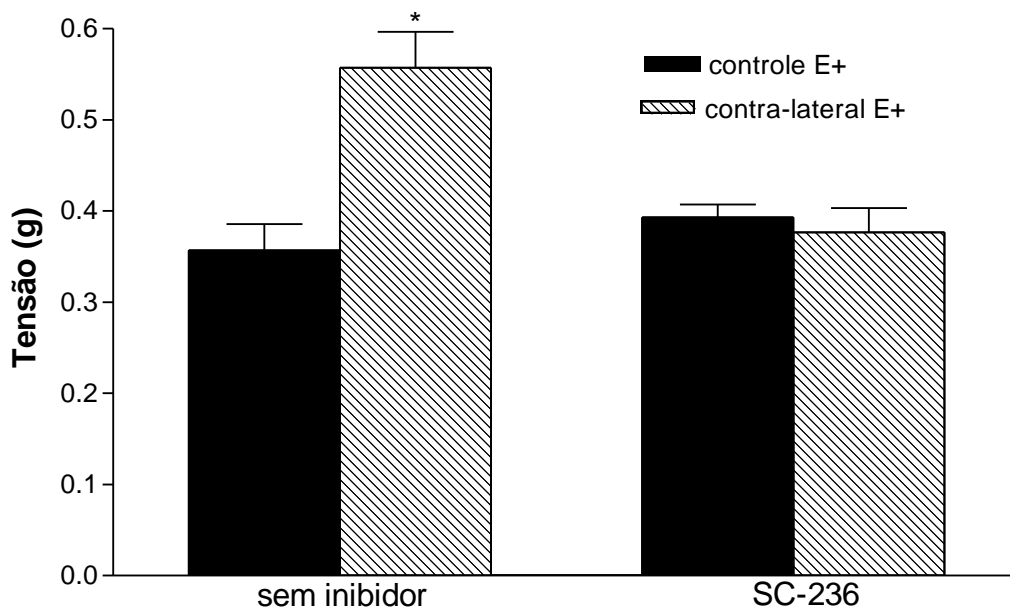
SC-236 é um inibidor altamente seletivo para COX-2, sendo usado para verificar se existe a participação de prostanóides derivados da COX-2 no aumento de Emax para Phe na contra-lateral.

No presente estudo, os resultados mostraram que na presença de SC-236 o Emax da Phe na contra-lateral foi reduzido, ficando semelhante ao controle (Figura 51 e 52, Tabela 29).

A potência da Phe na contra-lateral foi semelhante ao controle na presença de SC-236 (Tabela 29).



**Figura 51: Efeito induzido pela Phe em artérias carótidas controle e contra-laterais com endotélio, 4 dias após a lesão, na presença e ausência de SC-236 ( $10^{-10}$  mol/L).** Os dados, obtidos em curvas concentração-efeito para Phe ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  mol/L), representam a média  $\pm$  EPM.



**Figura 52: Emax da Phe em artérias carótidas controle e contra-laterais com endotélio, na presença e ausência de SC-236 ( $10^{-10}$  mol/L).** Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-Keuls).

**Tabela 29: Valores de Emax (gramas de tensão) e  $pD_2$  para Phe ( $10^{-10}$  –  $10^{-5}$  mol/L), na ausência e na presença de SC-236 ( $10^{-10}$  mol/L) em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão.**

	Sem SC-236		Com SC-236	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>Emax</b>	0,36 ± 0,03 (n=6)	0,56 ± 0,04* (n=9)	0,39 ± 0,01 (n=5)	0,37 ± 0,03 (n=5)
<b><math>pD_2</math></b>	7,33 ± 0,05 (n=6)	7,37 ± 0,14 (n=9)	7,31 ± 0,16 (n=5)	7,31 ± 0,11 (n=5)

Os dados representam a média ± EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).

#### 4.6.4) Avaliação da participação de $K_{Ca}$ no aumento de Emax para Phe na carótida contra-lateral

A participação de canais de potássio do tipo  $K_{Ca}$  no aumento de Emax para Phe na contra-lateral foi verificada utilizando o inibidor específico caribdotoxina.

Na presença de caribdotoxina observou-se aumento significativo de Emax em artérias controle. Em artérias contra-laterais o Emax não praticamente não foi alterado pela presença de caribdotoxina (Figura 53 e 54, Tabela 30).

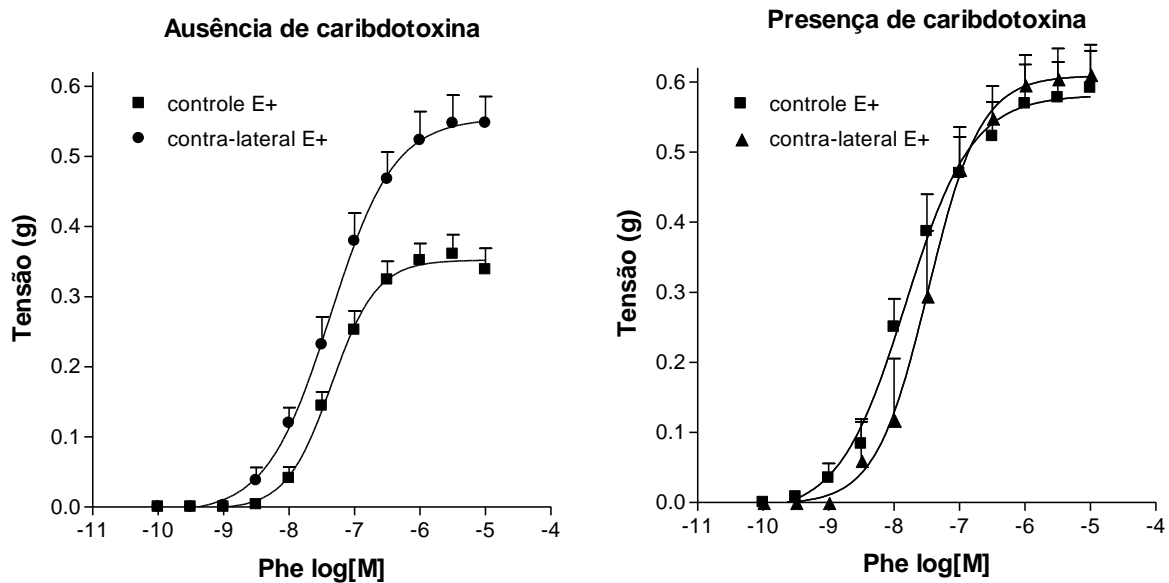
A potência para Phe na presença de caribdotoxina foi semelhante entre os grupos controle e contra-lateral (Tabela 30).

**Tabela 30: Valores de Emax (gramas de tensão) e  $pD_2$  para Phe ( $10^{-10}$  –  $10^{-5}$  mol/L), na ausência e na presença de caribdotoxina ( $10^{-7}$  mol/L) em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão.**

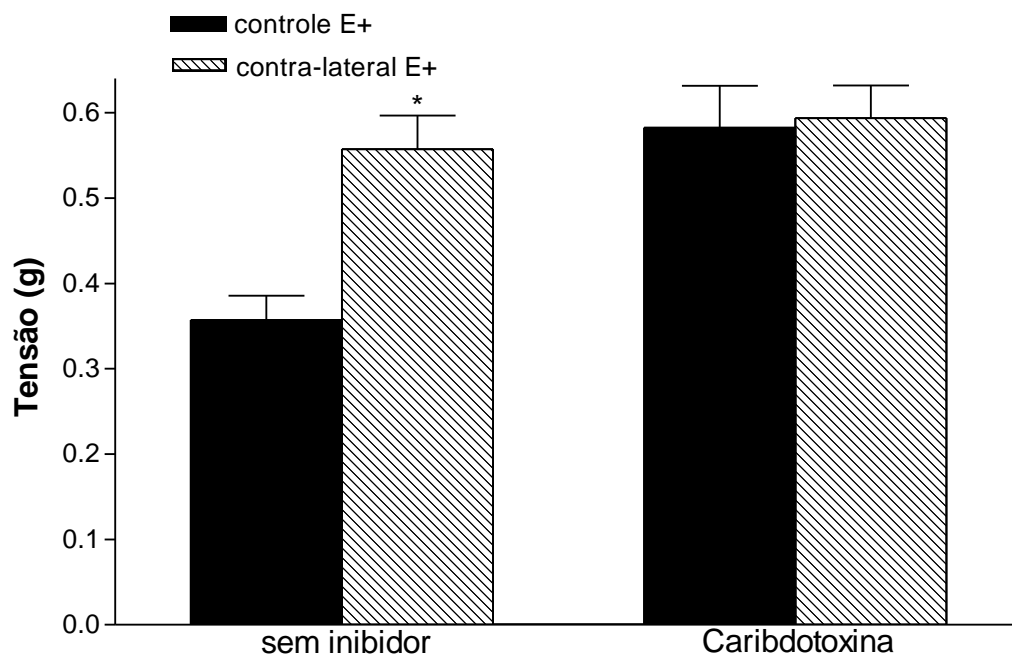
	Sem caribdotoxina		Com caribdotoxina	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>Emax</b>	0,36 ± 0,03 (n=6)	0,56 ± 0,04* (n=9)	0,58 ± 0,05 (n=6)	0,59 ± 0,04 (n=4)
<b><math>pD_2</math></b>	7,33 ± 0,05 (n=6)	7,37 ± 0,14 (n=9)	7,66 ± 0,12 (n=6)	7,57 ± 0,24 (n=4)

Os dados representam a média ± EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-keuls).





**Figura 53: Efeito induzido pela Phe em artérias carótidas controle e contra-laterais com endotélio, na presença e ausência de caribdotoxina ( $10^{-7}$  mol/L).** Os dados, obtidos em curvas concentração-efeito para Phe ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  mol/L), representam a média  $\pm$  EPM.



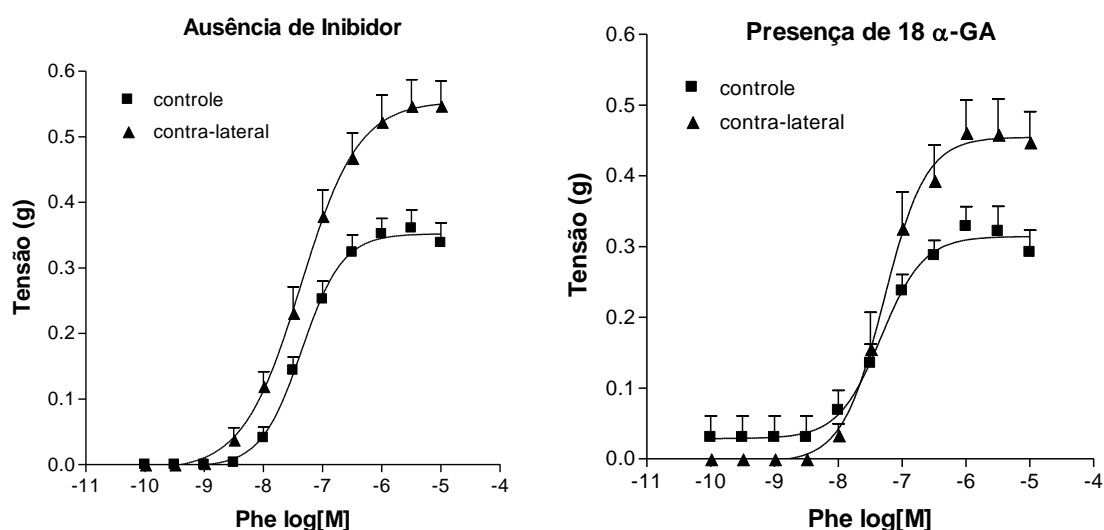
**Figura 54: Emax da Phe em artérias carótidas controle e contra-laterais com endotélio, na presença e ausência de caribdotoxina ( $10^{-7}$  mol/L).** Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-Keuls).

#### 4.6.5) Avaliação da participação de junções intercelulares do tipo GAP no aumento de $E_{max}$ para Phe na carótida contra-lateral

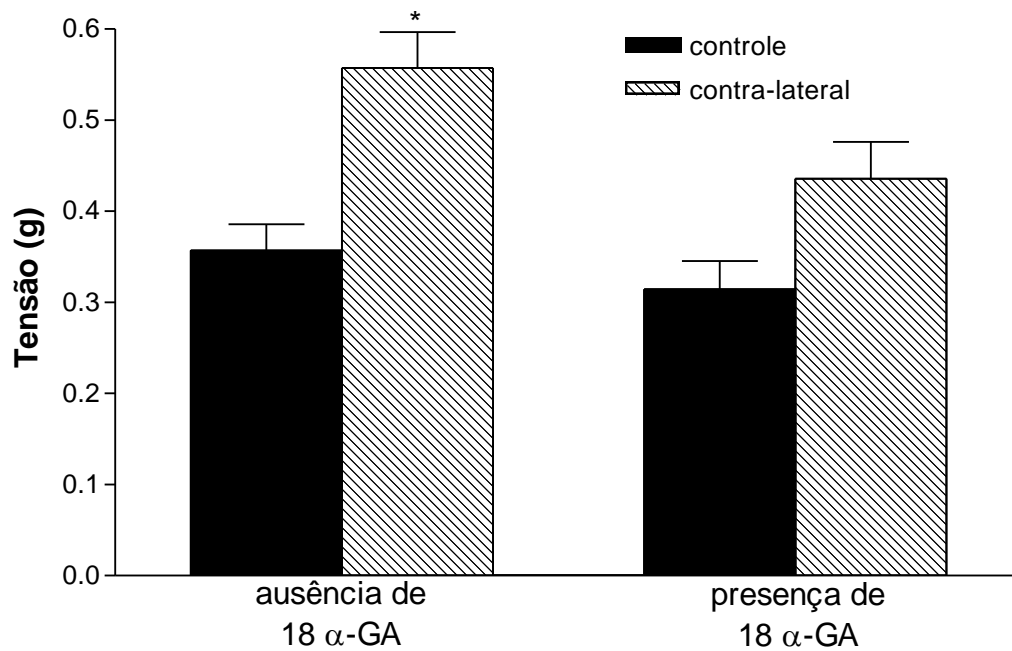
A participação de junções intercelulares do tipo GAP no aumento de  $E_{max}$  para Phe na contra-lateral foi verificada utilizando o ácido 18  $\alpha$ -glicirretínico (18 $\alpha$ -GA), um inibidor específico destas junções.

Na presença de 18 $\alpha$ -GA observou-se redução significativa de  $E_{max}$  em artérias contra-laterais, estando semelhante ao observado em artérias controle (Figura 55 e 56, Tabela 31).

A potência para Phe em artérias controle e contra-laterais não foi alterada na presença de de 18 $\alpha$ -GA (Tabela 31).



**Figura 55: Efeito induzido pela Phe em artérias carótidas controle e contra-laterais com endotélio, na presença e ausência de 18  $\alpha$ -GA ( $5 \times 10^{-6}$  mol/L). Os dados, obtidos em curvas concentração-efeito para Phe ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  mol/L), representam a média  $\pm$  EPM.**



**Figura 56: Emax da Phe em artérias carótidas controle e contra-laterais com endotélio, na presença e ausência de 18 α-GA ( $5 \times 10^{-6}$  mol/L).** Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-Keuls).

**Tabela 31: Valores de Emax (gramas de tensão) e  $pD_2$  para Phe ( $10^{-10}$  –  $10^{-5}$  mol/L), na ausência e na presença de 18 α-GA ( $5 \times 10^{-6}$  mol/L) em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão.**

	Sem 18 α-GA		Com 18 α-GA	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>Emax</b>	0,36 $\pm$ 0,03 (n=6)	0,56 $\pm$ 0,04* (n=9)	0,31 $\pm$ 0,03 (n=4)	0,44 $\pm$ 0,04 (n=6)
<b><math>pD_2</math></b>	7,33 $\pm$ 0,05 (n=6)	7,37 $\pm$ 0,14 (n=9)	7,35 $\pm$ 0,11 (n=4)	7,24 $\pm$ 0,08 (n=6)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-Keuls).

### **Conclusão Parcial:**

➤ *A redução do influxo de cálcio e o aumento do Emax para Phe na carótida contra-lateral à lesão por cateter balão envolvem processos dependentes do endotélio, com a participação de:*

- *Ânion superóxido,*
- *prostanóides derivados da COX-2,*
- *junções intercelulares do tipo GAP*

➤ *eNOS e BK<sub>Ca</sub> estão envolvidos na redução do influxo de cálcio induzido pela Phe, mas os resultados sugerem que não participam do aumento de Emax para Phe na artéria carótida contra-lateral à lesão por cateter balão.*

#### **4.7) Consequência da resposta neurocompensatória ao cateter balão na ativação de Rho-quinase na artéria carótida contra-lateral à lesão**

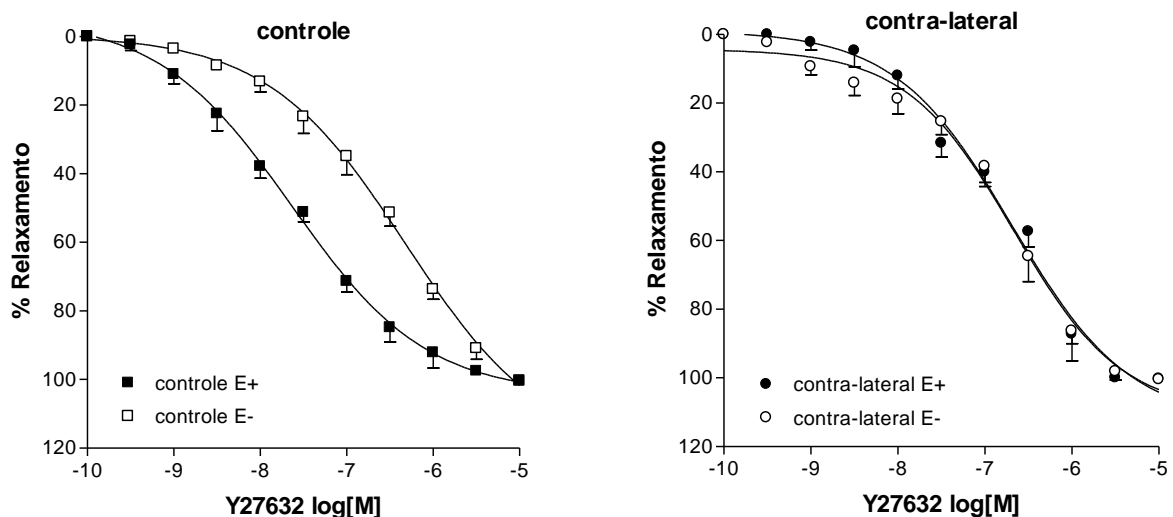
A Rho-quinase é um fator contrátil independente de cálcio, que atua no processo de sensibilização dos miofilamentos ao cálcio.

A participação de Rho-quinase na contração desencadeada pela Phe na contra-lateral, foi avaliada utilizando-se um inibidor de Rho-quinase, Y27632 .

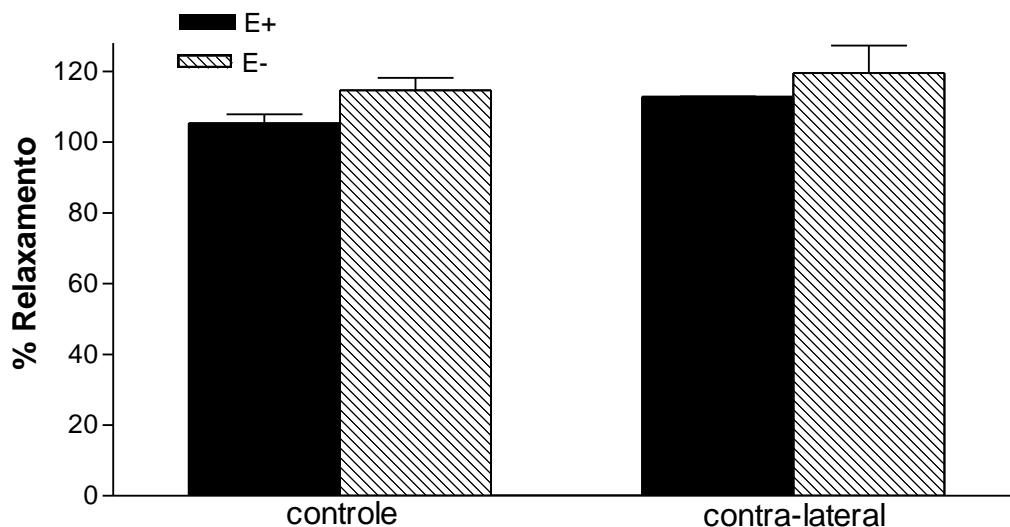
Y27632 promoveu relaxamento concentração-dependente em artérias pré-contraídas com Phe ( $10^{-7}$ M) (Figuras 57 e 58, Tabela 32).

A remoção do endotélio promoveu um deslocamento da curva de relaxamento com Y27632, para a direita (Figuras 57 e 58). A análise do  $pD_2$  mostrou uma diminuição da potência de Y27632 em relaxar artérias sem de endotélio (Figuras 57 e 59, Tabela 33). O mesmo foi observado para artérias contra-laterais com endotélio (Figuras 57 e 59, Tabela 33).

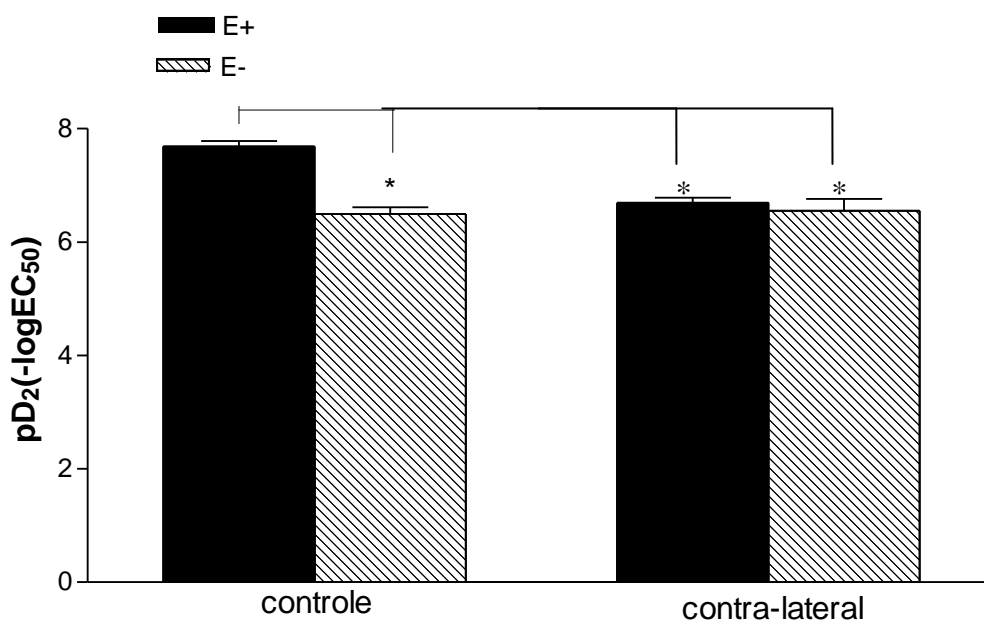
Este resultado sugere que há aumento da atividade da Rho-quinase na artéria contra-lateral à lesão.



**Figura 57: Efeito do Y27632 na contração desencadeada pela Phe, em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com (E+) e sem (E-) endotélio. Curvas concentração-efeito para Y27632 ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  mol/L), após pré-contração com Phe ( $10^{-7}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.**



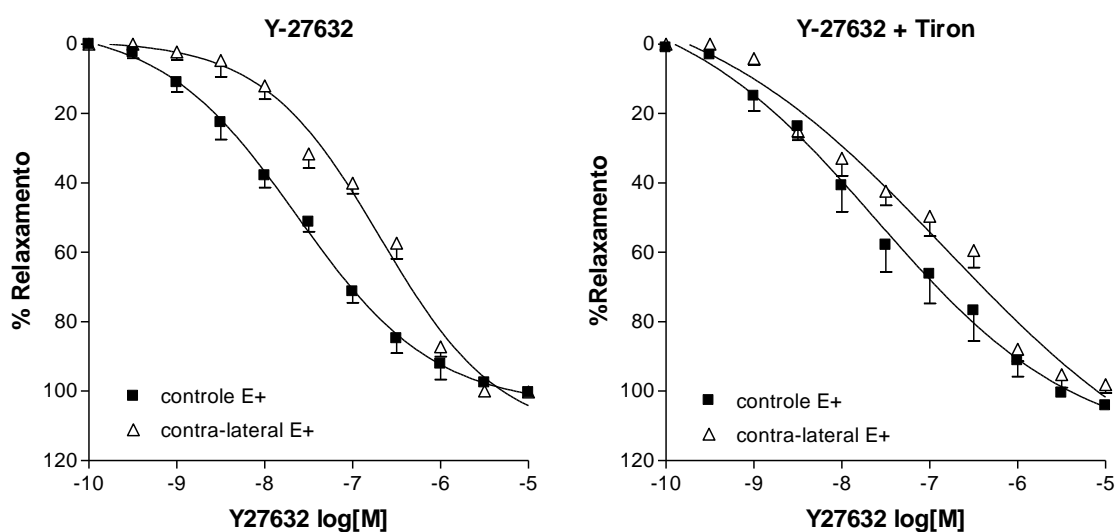
**Figura 58: Efeito do Y27632 na contração desencadeada pela Phe, em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com (E+) e sem (E-) endotélio.** Representação do Emax (gramas de tensão) obtido em curvas concentração-efeito para Y27632 ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  mol/L), após pré-contração com Phe ( $10^{-7}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.



**Figura 59: Efeito do Y27632 na contração desencadeada pela Phe, em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com (E+) e sem (E-) endotélio.** Representação do  $pD_2$  obtido em curvas concentração-efeito para Y27632 ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  mol/L), após pré-contração com Phe ( $10^{-7}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa.

Como ânions superóxido podem contribuir para o aumento na atividade da Rho-quinase (Jin et al., 2004), foi usado Tiron para verificar se havia participação destas espécies reativas na alteração da atividade de Rho-quinase.

Na presença de Tiron, o Emax e a potência para Y27632 na artéria contra-lateral foram semelhantes ao controle (Figuras 60 e 61, Tabela 32 e 33), sugerindo que a presença de ânions superóxido na artéria contra-lateral contribui para o aumento da atividade da Rho-quinase.

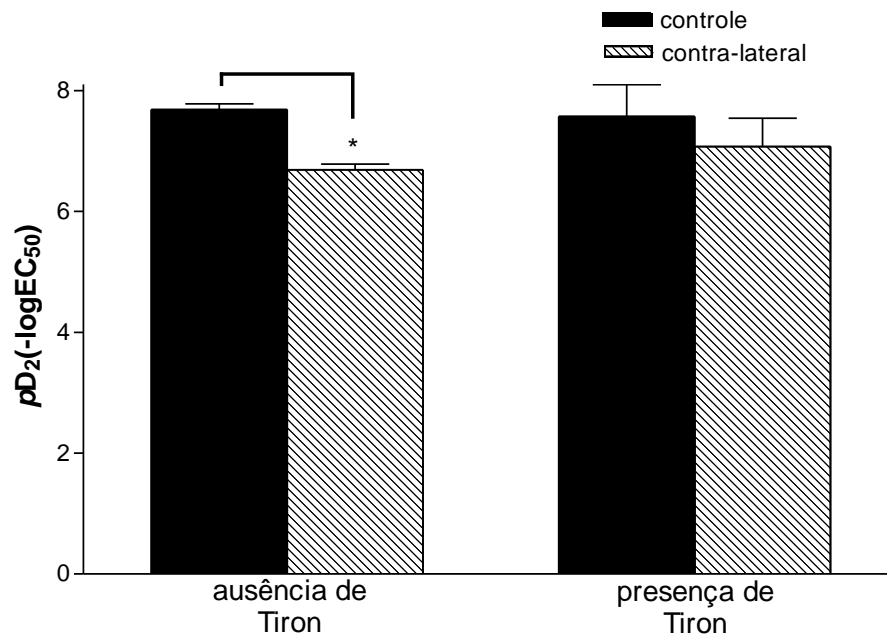


**Figura 60:** Efeito do Tiron no relaxamento induzido por Y-27632 em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio (E+). Curvas concentração-efeito para Y-27632 ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  mol/L), após pré-contracção com Phe ( $10^{-7}$  mol/L) na ausência e na presença de Tiron ( $10^{-3}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

**Tabela 32:** Valores de Emax (gramas de tensão) do Y-27632 ( $10^{-5}$ - $10^{-10}$  mol/L), após pré-contracção com Phe ( $10^{-7}$  mol/L) na ausência e na presença de Tiron ( $10^{-3}$  mol/L) em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com (E+) e sem (E-) endotélio.

	Sem Tiron		Com Tiron	
	Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
<b>Emax</b>				
<b>E+</b>	105,4 $\pm$ 2,52 (n=6)	112,9 $\pm$ 0,15 (n=3)	105,73 $\pm$ 4,25 (n=4)	109,58 $\pm$ 4,91 (n=5)
<b>E-</b>	114,7 $\pm$ 3,53 (n=5)	119,6 $\pm$ 7,71 (n=5)	-	-

Os dados representam a média  $\pm$  EPM.



**Figura 61:** Efeito do Tiron no relaxamento induzido por Y-27632 em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com endotélio. Representação do  $pD_2$  obtido em curvas concentração-efeito para Y-27632 ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  mol/L), após pré-contracção com Phe ( $10^{-7}$  mol/L) na ausência e na presença de Tiron ( $10^{-3}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

**Tabela 33:** Valores de  $pD_2$  do Y-27632 ( $10^{-5}$ - $10^{-10}$  mol/L), após pré-contracção com Phe ( $10^{-7}$  mol/L) na ausência e na presença de Tiron ( $10^{-3}$  mol/L) em artérias controle e contra-laterais à lesão por cateter balão, com (E+) e sem (E-) endotélio.

		Sem Tiron		Com Tiron	
		Controle	Contra-lateral	Controle	Contra-lateral
$pD_2$	E+	7,69 $\pm$ 0,10 (n=6)	6,69 $\pm$ 0,09*	7,57 $\pm$ 0,53 (n=4)	7,07 $\pm$ 0,47 (n=5)
	E-	6,50 $\pm$ 0,12* (n=5)	6,55 $\pm$ 0,21* (n=5)	-	-

Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (E+) (\* $P < 0,05$ ; ANOVA, pós-teste de Newman-keuls).

### Conclusão:

➤ Os resultados sugerem que há aumento da atividade da Rho-quinase na artéria contra-lateral, processo que envolve a participação de ânions superóxido.

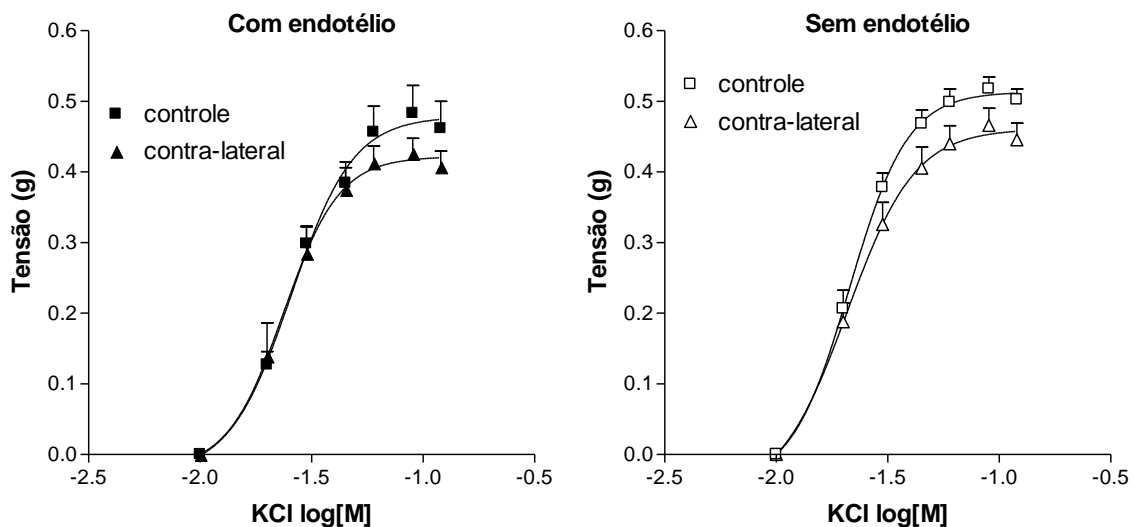


#### **4.8) Consequência da resposta neurocompensatória ao cateter balão na contração induzida pelo KCl na carótida contra-lateral à lesão:**

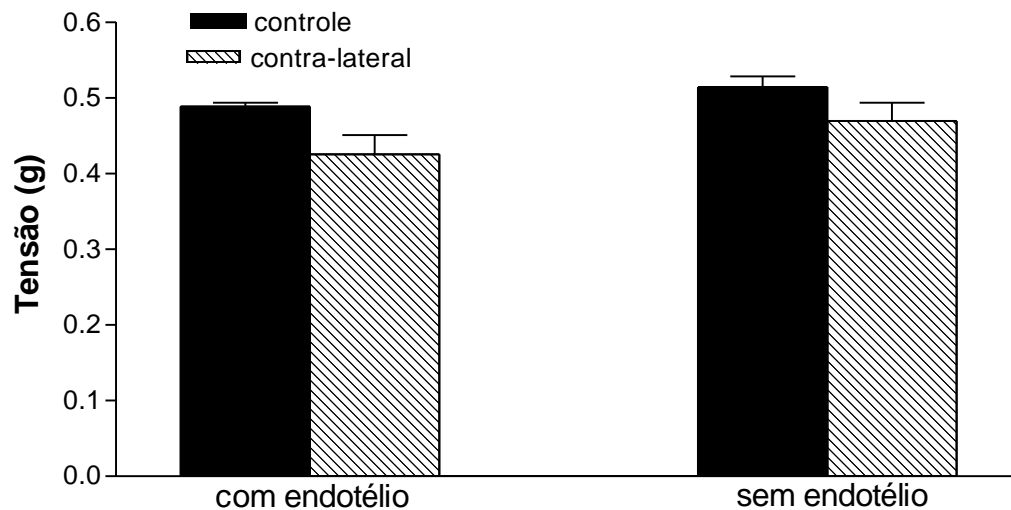
Com o intuito de avaliar a capacidade contrátil da artéria carótida contra-lateral à lesão, foi feito um estudo temporal da contração induzida pelo KCl. Simultaneamente, avaliou-se a participação do endotélio nesta contração.

O KCl desencadeou contração concentração-dependente nas artérias carótidas de animais controle e operados. A capacidade contrátil das artérias contra-laterais, 4 dias após à lesão, não apresentou alteração quando comparadas às artérias controle (Figuras 62 e 63, Tabela 34).

Não foram observadas alterações de potência entre os grupos estudados (Tabela 35).



**Figura 62: Efeito contrátil do KCl em artérias carótidas controle e contra-lateral, na presença e ausência de endotélio.** Os dados, obtidos em curva concentração-efeito para KCl (10-120 mmol/L), representam a média  $\pm$  EPM.



**Figura 63: Efeito contrátil do KCl em artérias carótidas isoladas de animais controle e operados, na presença e ausência de endotélio.** Emax para KCl (gramas de tensão) em carótidas controle e contra-laterais à lesão. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. (ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls).

**Tabela 34: Valores de Emax (gramas de tensão) do KCl obtidos em curvas concentração-resposta para KCl (10-120 mmol/L) em preparações isoladas de artérias carótidas de animais controle e operados, com (E+) e sem (E-) endotélio.**

	Controle	Contra-lateral
<b>E+</b>	0,49 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,03
<b>Emax</b>	(n=6)	(n=8)
<b>E-</b>	0,51 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,02
	(n=6)	(n=8)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

**Tabela 35: Valores de  $pD_2$  do KCl obtidos em curvas concentração-resposta para KCl (10-120 mmol/L) em preparações isoladas de artérias carótidas de animais controle e operados, com (E+) e sem (E-) endotélio.**

		Controle	Contra-lateral
$pD_2$	E+	1,59 ± 0,03 (n=6)	1,79 ± 0,14 (n=8)
	E-	1,69 ± 0,03 (n=6)	1,77 ± 0,11 (n=8)

Os dados representam a média ± EPM.

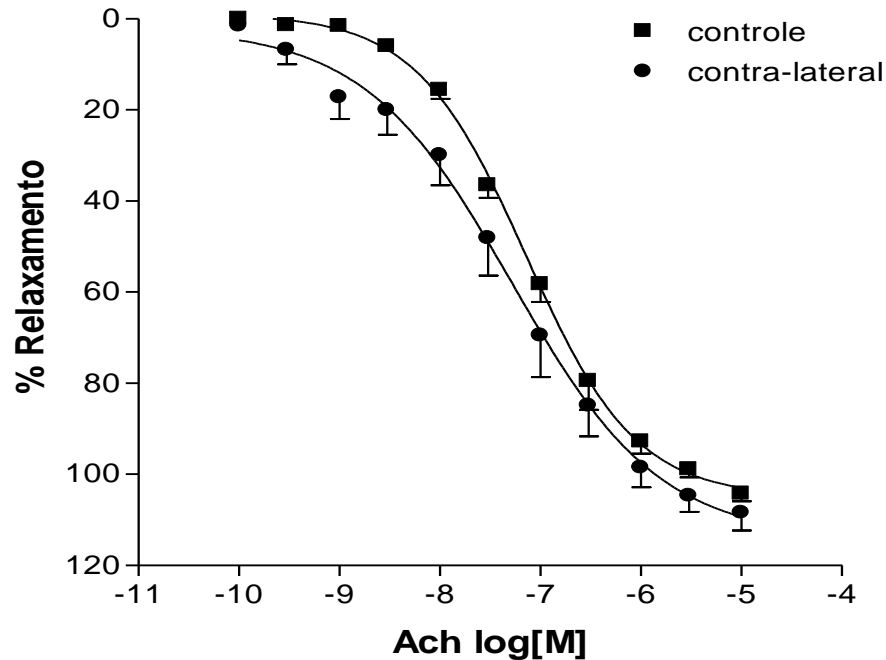
### **Conclusão:**

➤ *A contração desencadeada por KCl na artéria contra-lateral, 4 dias após a lesão, é semelhante ao controle.*

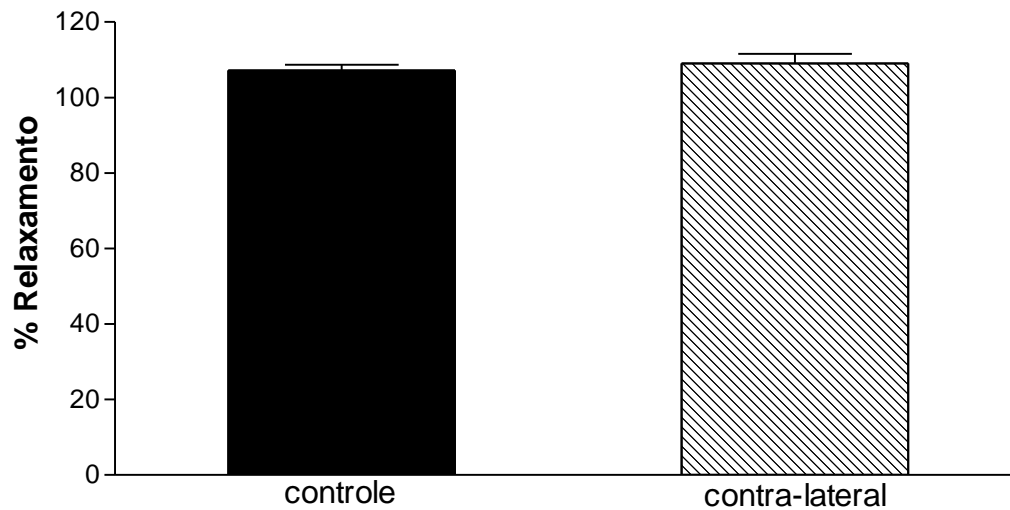
#### **4.9) Conseqüência da resposta neurocompensatória ao cateter balão sobre o relaxamento induzido pela Acetilcolina (ACh).**

A acetilcolina é um agonista capaz de produzir vasorelaxamento concentração-dependente, na presença de endotélio. O estudo da reatividade à ACh teve o objetivo de avaliar se a lesão por cateter balão comprometia o vasorelaxamento na artéria contra-lateral à lesão.

Não foram observadas alterações nos valores de  $E_{max}$  e de  $pD_2$  para ACh em animais operados comparados ao controle (Figuras 64 e 65, Tabelas 36 e 37).



**Figura 64: Relaxamento induzido pela ACh em artérias carótidas de animais controle e operados.** A figura representa a curva concentração-efeito para ACh ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M). Os dados representam a média  $\pm$  EPM.



**Figura 65: Relaxamento induzido pela ACh em artérias carótidas isoladas de animais controle ou operados, na presença de endotélio.** Emax para ACh (%Relaxamento) em artérias isoladas de animais controle e operados. Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

**Tabela 36: Valores de Emax (%Relaxamento) da ACh em curvas concentração-resposta para ACh ( $10^{-5}$ - $10^{-10}$  mmol/L) em preparações isoladas de artérias carótidas de animais controle e operados, com endotélio.**

	Controle	Contra-lateral
<b>Emax</b>	107,20 $\pm$ 1,46	109,00 $\pm$ 2,54
	(n=6)	(n=6)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

**Tabela 37: Valores de  $pD_2$  da ACh em curvas concentração-resposta para ACh ( $10^5$ - $10^{-10}$  mmol/L) em preparações isoladas de artérias carótidas de animais controle e operados, com endotélio.**

	<b>Controle</b>	<b>Contra-lateral</b>
<b><math>pD_2</math></b>	$7,10 \pm 0,07$	$7,32 \pm 0,21$
	(n=6)	(n=6)

Os dados representam a média  $\pm$  EPM.

### **Conclusão:**

➤ *A lesão por cateter balão não altera o relaxamento dependente de endotélio na artéria contra-lateral à lesão.*

## ***5- DISCUSSÃO***

O presente estudo mostrou que a lesão por cateter balão promoveu aumento do Emax da Phe na artéria carótida contra-lateral 4 dias após a lesão. Trata-se de um processo endotélio dependente, já que a remoção do endotélio na carótida contra-lateral não alterou o Emax da Phe em relação ao controle. A potência do agonista na artéria contra-lateral permaneceu semelhante ao controle 1, 2, 4 e 15 dias após a lesão. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com Accorsi-Mendonça et al. (2004) e Olivon (2006).

Dentre os fatores que alteram o Emax e o  $pD_2$  de um agonista num tecido temos a densidade de receptores, a eficácia intrínseca do agonista, a sua afinidade pelos receptores, da transdução do estímulo em resposta e outras características intrínsecas do tecido em estudo (FURCHGOTT; BURSZTYN, 1967; KENAKIN, 1997). Os efeitos desencadeados pelos agonistas farmacológicos podem ser influenciados ainda por fatores como a geração de substâncias pelos tecidos estudados. Essas substâncias estabelecem interações sinérgicas ou antagônicas com os agonistas, modulando a atividade vasomotora dos mesmos. Esses moduladores locais podem modificar o perfil de curvas concentração-efeito (KENAKIN, 1997).

A reatividade à Phe na artéria contra-lateral pode estar alterada em decorrência de alterações na liberação de fatores relaxantes não endoteliais (musculares ou de adventícia) e/ou fatores de contração liberados pelo endotélio (WILSON, 2004). O tônus no músculo liso vascular resulta da interação entre os fatores vasoconstritores e vasorelaxantes liberados pelo endotélio (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

A Phe é um agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico. O receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico possui sete domínios transmembrana e encontra-se acoplado à proteína Gq (MINNEMAN, 1988). Promove vasoconstrição através da mobilização de cálcio intracelular e extracelular, principalmente pela geração de  $IP_3$  e DAG, respectivamente, com conseqüente ativação de PKC (MINNEMAN, 1988; ZHANG et al., 1998; ZHONG E MINNEMAN, 1999). Também ocorre ativação e abertura de canais de cálcio operados por receptor, permitindo o influxo de cálcio do meio extra para o meio intracelular (FASOLATO et al., 1994). A Phe promove ainda ativação de Rho-quinase, geração de ROS e formação de ácido araquidônico (SEASHOLTZ et al., 1999; GARCÍA-CAZARÍN et al., 2008; ZHONG



E MINNEMAN, 1999). No endotélio, a ativação do receptor adrenérgico resulta em vasodilatação, através da liberação de NO (BOER et al., 1999; FILIPPI et al., 2001).

Neste estudo, observamos que o aumento do Emax da Phe na artéria contra-lateral não era decorrente de alterações morfológicas, uma vez que a análise histológica de artérias contra-laterais mostrou-se semelhante ao controle. Entretanto, alterações foram observadas na artéria ipsi-lateral em decorrência da lesão vascular. Resultados similares em análise morfológica em artérias ipsi e contra-laterais à lesão foram observados previamente (CLOWES, 1983a,b; SHIBATA et al., 2001; LI et al., 2007).

O aumento do Emax da Phe na carótida contra-lateral à lesão também não envolveu alterações na função contrátil da musculatura lisa vascular, já que a reatividade ao KCl, um agente despolarizante que não utiliza receptores para induzir seus efeitos (BRIZZOLARA et al 1994; ENGLISH; 2000), foi semelhante entre artérias controle e contra-laterais à lesão. Concentrações aumentadas de KCl no meio extracelular promovem despolarização da membrana plasmática e abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem, levando ao aumento da concentração de cálcio citoplasmática e conseqüentemente à contração muscular (BERRIDGE et al., 2005).

O aumento do Emax da Phe na artéria contra-lateral não é devido à ausência de integridade endotelial, pois curvas concentração-efeito para ACh, um agonista muscarínico ( $m_3 - G_q$ ) que produz vasodilatação dependente do endotélio, não apresentaram diferença em relação ao controle. Como a ACh é capaz promover efeitos por mecanismos dependentes ou não de NO (BUUS et al., 2000), sugerimos que na artéria contra-lateral à lesão, o endotélio está preservado.

Dentre os fatores celulares determinantes da resposta contrátil à Phe, a concentração intracelular de cálcio assume grande importância (SOMLYO; SOMLYO, 2003). Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o aumento no Emax da Phe na artéria contra-lateral à lesão, não está relacionado a alteração na mobilização do cálcio intracelular. Por outro lado, surpreendentemente, observamos que há redução significativa no influxo de cálcio extracelular induzido pela Phe na artéria contra-lateral com endotélio.

Os mecanismos que controlam a homeostase de cálcio intracelular são altamente regulados pelo influxo e efluxo de cálcio citoplasmático (FLOREA; BLATTER, 2007; BERRIDGE et al., 2005). Os estímulos que promovem alteração na concentração de cálcio citoplasmático são transitórios e modulados por despolarização da membrana, pela ação de agonistas extracelulares e/ou segundos mensageiros (BERRIDGE et al., 2005), como prostanóides, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS), além de canais para potássio, junções do tipo Gap e várias enzimas.

A via de sinalização ativada pelo NO resulta na diminuição da concentração de cálcio intracelular (IGNARRO, 2000). O NO é formado no endotélio e na camada muscular através da ação das enzimas NOS. Na camada muscular promove ativação da enzima GCs, produção de GMP cíclico (GMPc) e ativação da proteína quinase dependente de GPMc (PKG), o que resulta no relaxamento vascular (MONCADA et al., 1991; IGNARRO, 2000; HANAFY et al., 2001). O NO também atua, independente de PKG promovendo a hiperpolarização muscular (BOLOTINA et al., 1994).

A participação da via de sinalização do NO na redução do influxo de cálcio induzido pela Phe na artéria contra-lateral foi avaliada através da inibição da NOS e de suas isoformas, seqüestro de NO e inibição da GCs. Observamos a participação de eNOS sem no entanto, haver envolvimento de NO ou de GCs na redução do influxo de cálcio na contra-lateral. Este resultado associado ao fato de o Emax da Phe na presença de L-NNA (inibidor de eNOS) não ter sido alterado, sugere que há redução de NO na artéria contra-lateral, corroborando os resultados obtidos por Olivon (2006).

Um dos principais fatores responsáveis pela redução na biodisponibilidade de NO é o estresse oxidativo. Um aumento de ânions superóxido em artérias contra-laterais à lesão por cateter balão foi observado anteriormente por Olivon (2006). Nossos resultados mostraram que ROS reduzem o influxo de cálcio induzido pela Phe na artéria contra-lateral e, sugerem que a espécie responsável seja o ânion superóxido, já que na presença de Tempol (SOD-mimético) e Tiron (ZHENG et al., 2003; JIN et al., 2004; SHI et al., 2007) a resposta na contra-lateral foi semelhante ao controle. Apesar da associação Tempol+catalase não ter alterado a mobilização de cálcio extracelular pela Phe na artéria contra-lateral em relação à observada na presença de Tempol ou Tiron,

a participação de outras ROS derivadas do ânion superóxido, como peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, não pode ser excluída (VALKO et al., 2007).

O estresse oxidativo vascular é modulado tanto por estímulos fisiológicos quanto patológicos e, pode ser gerado no tecido adjacente ou mesmo na própria parede do vaso (WOLIN et al., 2005), exercendo um importante efeito modulatório na função vascular. ROS originam-se tanto na camada muscular quanto no endotélio, principalmente da COX-2, NAD(P)H oxidase e do desacoplamento da NOS. Estas espécies reativas, além de reduzirem a biodisponibilidade e/ou a síntese de NO, podem alterar canais para cálcio e de potássio, bem como a ativação de receptores e outras proteínas sinalizadoras como a Rho-quinase (LOUNSBURY et al., 2000; JIN et al., 2004; GUTTERMAN et al., 2005; ZHU et al.; 2006). O estresse oxidativo aumenta a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub>, D, e C, ativa proteínas quinases como PKC, tirosina quinases e MAPK (GOPALAKRISHNA; JAKEN, 2000). Agentes oxidantes, em níveis fisiológicos, atuam como sinalizadores em diversos processos celulares. A cadeia lateral de aminoácidos, especialmente resíduos de tirosina, cisteína e metionina, é susceptível à oxidação, podendo ocorrer alteração de estrutura e inibição da função normal de proteínas (VALKO et al., 2007; HIDALGO; DONOSO, 2008; IGNARRO, 2000).

Com base nos resultados obtidos, a ausência de participação de NO/GCs associada à participação de eNOS e de ânion superóxido na redução do influxo de cálcio na artéria contra-lateral sugere que a eNOS esteja desacoplada. A transferência de elétrons durante a síntese de NO pela NOS é um processo sensível à oxidação. Quando desestabilizado, ocorre a formação de ânions superóxido em vez de NO, processo denominado desacoplamento (FORSTERMANN; MUNZEL, 2006). O desacoplamento ocorre em condições de escassez de L-arginina ou do cofator BH<sub>4</sub>, por ação de arginases e estresse oxidativo. O desacoplamento agrava o estresse oxidativo, sendo portanto, causa e consequência deste processo.

Schulz et al. (2008) verificaram a ocorrência de desacoplamento da eNOS na hipertensão arterial, devido à oxidação de BH<sub>4</sub> por ação de peroxinitrito, produto resultante da inativação do NO por ânions superóxido. O peroxinitrito é um potente oxidante que pode alterar quimicamente aminoácidos, ácidos nucleicos, lipídios e

proteínas contendo grupo tiol. A presença de nitrotirosina é um bioindicador de estresse nitrosativo/oxidativo por ação do peroxinitrito (VALKO et al., 2007; HIDALGO; DONOSO, 2008; IGNARRO, 2000). Peroxinitrito produz vasorelaxamento, geralmente através de hiperpolarização, ativando canais para potássio e inibindo o influxo de cálcio (PAN et al.; 2004). Olivon (2006), mostrou que os níveis de peroxinitrito apresentaram-se reduzidos na artéria contra-lateral à lesão, confirmando a redução na biodisponibilidade de NO.

Em condições de estresse oxidativo, também ocorre a formação de isoprostanos, derivados do ácido araquidônico por oxidação. Alguns isoprostanos possuem propriedades vasoconstritoras (JANSSEN et al., 2001; JANSSEN, TAZZEO, 2002; YI et al., 2006), enquanto outros são vasodilatadores (ZHANG et al., 2003; ZHANG et al., 2005).

Os agentes oxidantes são importantes moduladores da homeostase do cálcio, podendo inibir ou estimular, conforme o tipo celular e a duração da exposição, concentração, localização e o tipo de espécie reativa envolvida (HIDALGO; DONOSO, 2008). Oxidantes podem inibir o transporte de cálcio pelas Ca-ATPases da membrana e do retículo, ativar a liberação de cálcio do retículo via  $IP_3R$  e RyR, ativar ou inibir canais para cálcio dependentes de voltagem e operados por estoque (HIDALGO; DONOSO, 2008).

Espécies reativas de oxigênio podem alterar a atividade de canais para potássio (LIU et al., 2005, LIU; GUTTERMAN, 2002; BRAKEMEIER et al., 2003). Neste trabalho, observamos a participação de  $BK_{Ca}$  na redução do influxo de cálcio por Phe na artéria contra-lateral, mas não no aumento de  $E_{max}$  para Phe. Os canais para potássio são importantes moduladores do tônus vascular, pois regulam o potencial de membrana e interagem com os canais para cálcio na homeostase intracelular de cálcio (SOBEY, 2001; GUTTERMAN et al., 2005).

$BK_{Ca}$  é o mais importante no sistema vascular. É ativado por aumento na concentração intracelular de cálcio e por despolarização, contribuindo na manutenção do potencial de membrana (NELSON; QUAYLE, 1995). Os canais do tipo  $BK_{Ca}$  podem ser ativados por NO diretamente ou via PKG (ZHAO et al., 1997), mas os resultados

obtidos neste estudo com oxihemoglobina e ODQ excluem esta via de ativação. Estes canais também podem ser ativados por prostaciclina, via PKA (DONG et al., 1998).

GEBREMEDHIN et al. (2008) observaram que ânions superóxido podem ativar  $BK_{Ca}$  e reduzir influxo de cálcio em artérias cerebrais de ratos. Ânions superóxido podem inativar a Ca-ATPase da membrana, aumentando a concentração intracelular de cálcio e ativando  $BK_{Ca}$  em artérias cerebrais de gato (WEI et al., 1996). Ao ativar canais para potássio, agentes oxidantes promovem hiperpolarização e fechamento de canais para cálcio dependentes de voltagem, resultando na diminuição do influxo de cálcio (SCHACH et al., 2007).

A Ca-ATPase do retículo também é um fator importante na modulação da concentração intracelular de cálcio e pode ser influenciada por ROS (HIDALGO; DONOSO, 2008). No entanto, utilizando tapsigargina, observamos que não há envolvimento desta Ca-ATPase na redução do influxo de cálcio pela Phe na artéria contra-lateral. Em condições de hiperglicemia, Kimura et al. (1998) sugerem que o estresse oxidativo altera a homeostase de cálcio intracelular, inibindo a entrada de cálcio ativada por cálcio e a Ca-ATPase do retículo em célula endotelial. Grover e Samson (1988) observaram resultados semelhantes.

O estresse oxidativo também pode resultar na ativação de COX, gerando prostanóides e ânion superóxido (SHI; VANHOUTTE, 2008). Investigamos a possibilidade de prostanóides estarem modulando o influxo de cálcio na artéria contra-lateral à lesão utilizando Indometacina. No entanto, a presença de Indometacina não reverteu a alteração observada no influxo de cálcio. A Indometacina é um inibidor de COX não seletivo, sendo muito mais potente inibidor de COX-1 (MITCHELL et al., 1994). De Angelis (2004) observou que indometacina possui outros efeitos no sistema cardiovascular além de inibir COX, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Sendo assim, foi utilizado SC-236, um inibidor com alta seletividade para COX-2. Na presença de SC-236 a resposta desencadeada pela mobilização de cálcio extracelular induzida por Phe, assim como o Emax da Phe na artéria contra-lateral com endotélio, apresentaram-se semelhantes ao controle. Os resultados obtidos sugerem que produtos da COX-2 estão envolvidos na redução do influxo de cálcio e no

aumento do Emax para Phe na artéria contra-lateral e corroboram com aqueles de Accorsi-Mendonça et al. (2004) e Olivon (2006).

Os prostanóides desempenham um importante papel na regulação do tônus vascular. Tromboxano A<sub>2</sub> é um potente vasoconstritor, enquanto a prostaciclina produz vasorelaxamento, estimulando a síntese de AMPc, a abertura de canais para potássio e a redução dos níveis de cálcio citosólico (BRUNTON et al., 2006; DONG et al., 1998). No endotélio vascular, em condições fisiológicas, atua predominantemente a COX-2, cujo produto principal é prostaciclina (FETALVERO et al., 2007). A prostaciclina atua como regulador da homeostase vascular, modulando os efeitos vasoconstritores de outros prostanóides (DONG et al., 1998).

Observamos ainda a participação de junções do tipo Gap na redução da mobilização de cálcio extracelular pela Phe. As junções do tipo Gap permitem a troca de metabólitos, íons e moléculas sinalizadoras entre células adjacentes (BRUZZONE et al., 1996; KUMAR; GILULA, 1996). São formadas por conexinas, proteínas que estabelecem conexão e permitem o acoplamento celular durante a propagação da sinalização, assumindo grande importância nas respostas mediadas pelo cálcio (FANCHAOUY et al., 2005; PARTHASARATHI et al., 2006) e assim, regulando o tônus vascular (BRISSET et al., 2009; CHRIST, 1996).

Christ (1995) mostrou que a resposta desencadeada por alfa<sub>1</sub>-adrenoceptores envolve a participação de junções do tipo Gap. Yeh et al. (1997), observou que junções do tipo Gap também atuam no estágio inicial da resposta vascular à lesão por cateter balão, promovendo remodelamento em carótida de ratos.

Dados da literatura indicam que estas junções intercelulares permitem a transferência do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (KARAGIANNIS et al., 2004) e também de ROS para as células musculares (TANG e VANHOUTTE, 2008; YANG et al., 2003). Podemos então, sugerir que ânions superóxidos gerados no endotélio alcançam a camada muscular provavelmente através de junções do tipo Gap.

Estimulando o influxo de cálcio com KCl em vez de Phe, não observamos nenhuma alteração na artéria contra-lateral em relação ao controle. Accorsi-Mendonça et al. (2004) verificaram que a resposta contrátil decorrente da ativação de receptores para Ang II na artéria contra-lateral, 4 dias após a lesão, foi igual ao controle. Com base

nestes resultados, podemos inferir que a lesão por cateter balão resulta em alterações na sinalização celular da artéria contra-lateral que interferem na resposta desencadeada pela ativação do receptor alfa<sub>1</sub>-adrenérgico.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que ânions superóxidos promovem o desacoplamento da eNOS, a ativação de COX-2 e de canais para potássio, o que resulta na redução no influxo de cálcio induzido pela Phe na artéria contra-lateral à lesão por cateter balão. Sendo assim, avaliamos se estes fatores também estavam envolvidos no aumento de Emax da Phe na artéria contra-lateral.

Observamos que tanto ROS quanto produtos da COX-2 e junções do tipo Gap atuam no aumento de Emax da Phe na contra-lateral. A formação de prostanóides vasoconstritores, ativada pelo estresse oxidativo, provocou alteração da reatividade vascular à Phe em artéria femoral de ratos diabéticos (SHI et al, 2007; SHI, VANHOUTTE, 2008). Na aorta de ratos hipertensos, prostanóides e isoprostano estão envolvidos no aumento da reatividade à Phe e Alvarez et al. (2005) sugerem que o processo seja devido à maior ativação de COX-2 endotelial. Tang e Vanhoutte (2008) mostraram que em aorta de ratos hipertensos, a contração dependente do endotélio envolve a participação de junções do tipo Gap.

Nossos resultados mostram que não há envolvimento de eNOS ou canais para potássio dependentes de cálcio no aumento de Emax da Phe na artéria contra-lateral. Em artérias controle, a presença de inibidores específicos da eNOS ou de canais para potássio dependentes de cálcio resultou em aumento significativo do Emax da Phe, mostrando a importância destes fatores na modulação do tônus vascular. Por outro lado, a inibição destes fatores não promoveu alteração no Emax da Phe na contra-lateral e indica que existem alterações relevantes na sinalização celular ativada pela Phe na artéria carótida contra-lateral à lesão. Estas alterações podem ser decorrentes de um aumento de ânions superóxido.

Nossos resultados sugerem que o aumento do Emax da Phe não está relacionado a um aumento na mobilização de cálcio. e envolve a participação de Rho-quinase. A Rho-quinase atua por sensibilização ao cálcio, no qual observa-se um aumento da fosforilação da miosina independente de aumento nos níveis intracelulares de cálcio (KIMURA et al., 1996). Os resultados obtidos com Y27632, inibidor de Rho-

quinase, sugerem que a hiper-reatividade à Phe observada na contra-lateral, é acompanhada de maior ativação de Rho-quinase, já que a potência de Y27632 em promover vasorelaxamento na artéria contra-lateral com endotélio, foi menor que no controle e semelhante àquela observada em artérias sem endotélio. Estes resultados corroboram com os obtidos por Olivon (2006).

Este fato indica alterações no endotélio da artéria contra-lateral, pois na presença de endotélio, a atividade da Rho-quinase deveria ser menor, devido à presença de NO (BUDZYN et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2005). NO e Rho-quinase são fatores inversamente relacionados, de modo que o aumento na atividade de Rho-quinase poderia ser devido à redução de NO (SAUZEAU et al., 2000).

A atividade da Rho-quinase também é modulada pelo estresse oxidativo, motivo pelo qual investigamos a participação de ânions superóxidos no aumento de atividade da Rho-quinase na artéria contra-lateral. Observamos que na presença de tiron, a potência do Y27632 em promover relaxamento na artéria contra-lateral foi semelhante à observada em artérias controle, mostrando mais uma vez a participação deste agente oxidante no aumento de Emax para Phe na artéria contra-lateral. Resultados semelhantes foram observados em aorta (JIN et al., 2004) e em artéria pulmonar de ratos (KNOCK et al (2009).

Os resultados obtidos sugerem que as alterações de reatividade observadas na contra-lateral envolvem mecanismos compensatórios para manter o tônus vascular. Segundo Milner et al. (1997), ocorre uma resposta neurocompensatória desencadeada pela lesão por cateter balão. Milner et al. (1997) observaram que a lesão por cateter balão promove aumento da inervação sensorial contendo SP e CGRP na artéria carótida contra-lateral à lesão. A inervação sensorial perivascular altera a liberação de substâncias vasoativas de origem endotelial em microvasos cerebrais, sugerindo que essa alteração seja compensatória, já que há interação entre nervos sensoriais perivasculares e o endotélio em microvasos cerebrais (MILNER et al., 1995; RALEVIC, 2002). Burnstock (1990) observou que o equilíbrio entre o tonus vasodilatador derivado do endotélio e o tonus vasoconstritor simpático é alterado em condições fisiológicas e patológicas, devido a interações entre nervos perivasculares e células endoteliais. De acordo com Burnstock e Ralevic (1994), nervos perivasculares e células endoteliais



interagem modulando o tônus vascular em condições patológicas ou após injúria mecânica.

O aumento da inervação sensorial perivascular pode ser o fator desencadeante do estresse oxidativo, já que a ação da SP pode gerar ânions superóxidos (CHIEN et al., 2003; BARDELLI et al., 2005 ; KAREN et al., 2007) além de neurônios sensoriais conterem ciclooxigenases (VASKO et al, 1994), o que pode contribuir na geração desta espécie reativa. Os resultados mostraram o envolvimento de ânion superóxido em todas as alterações na via de sinalização por alfa<sub>1</sub>-adrenoceptores na artéria contra-lateral à lesão.

## ***6- CONCLUSÕES***

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que na carótida contra-lateral à lesão por cateter balão existem alterações nas vias de sinalização celular envolvidas no processo de contração da musculatura lisa vascular em resposta à Phe. Estas alterações resultam de mecanismos neurocompensatórios, provavelmente interações entre nervos sensoriais perivasculares e células endoteliais, modificando a liberação de substâncias moduladoras do tônus vascular.

Rho-quinase, ânions superóxido, COX-2 e junções do tipo GAP estão envolvidos no aumento do Emax da Phe, processo dependente do endotélio que não decorre de aumento na mobilização de cálcio. Havendo aumento de Emax para Phe, o fato surpreendente foi a observação de que a mobilização de cálcio extracelular pela Phe está reduzida.

Os resultados obtidos mostraram que as alterações são dependentes da ativação do receptor alfa<sub>1</sub>-adrenérgico e provavelmente são desencadeadas por um estresse oxidativo causado por excesso de ânions superóxidos no endotélio da artéria contra-lateral, que alcança a camada muscular através das junções do tipo Gap. Este estresse oxidativo pode estar sendo gerado pela ação da SP e da COX-2 ativada na resposta neurocompensatória, sendo amplificado pela ativação do receptor alfa-adrenérgico. Ânions superóxidos promovem o desacoplamento da eNOS e maior ativação de COX-2, o que aumenta ainda mais o estresse oxidativo, resultando na redução de NO, ativação de Rho-quinase e de canais para potássio. CGRP também promove ativação de canais para potássio, que juntamente com ânions superóxidos, reduzem a mobilização de cálcio pela Phe (Figura 66).

O aumento no Emax da Phe e a redução da mobilização de cálcio observados na contra-lateral indicam a existência de mecanismos compensatórios, decorrentes da resposta neurocompensatória, que são ativados para manter o tônus vascular. Estudos posteriores serão realizados para melhor esclarecer este processo.

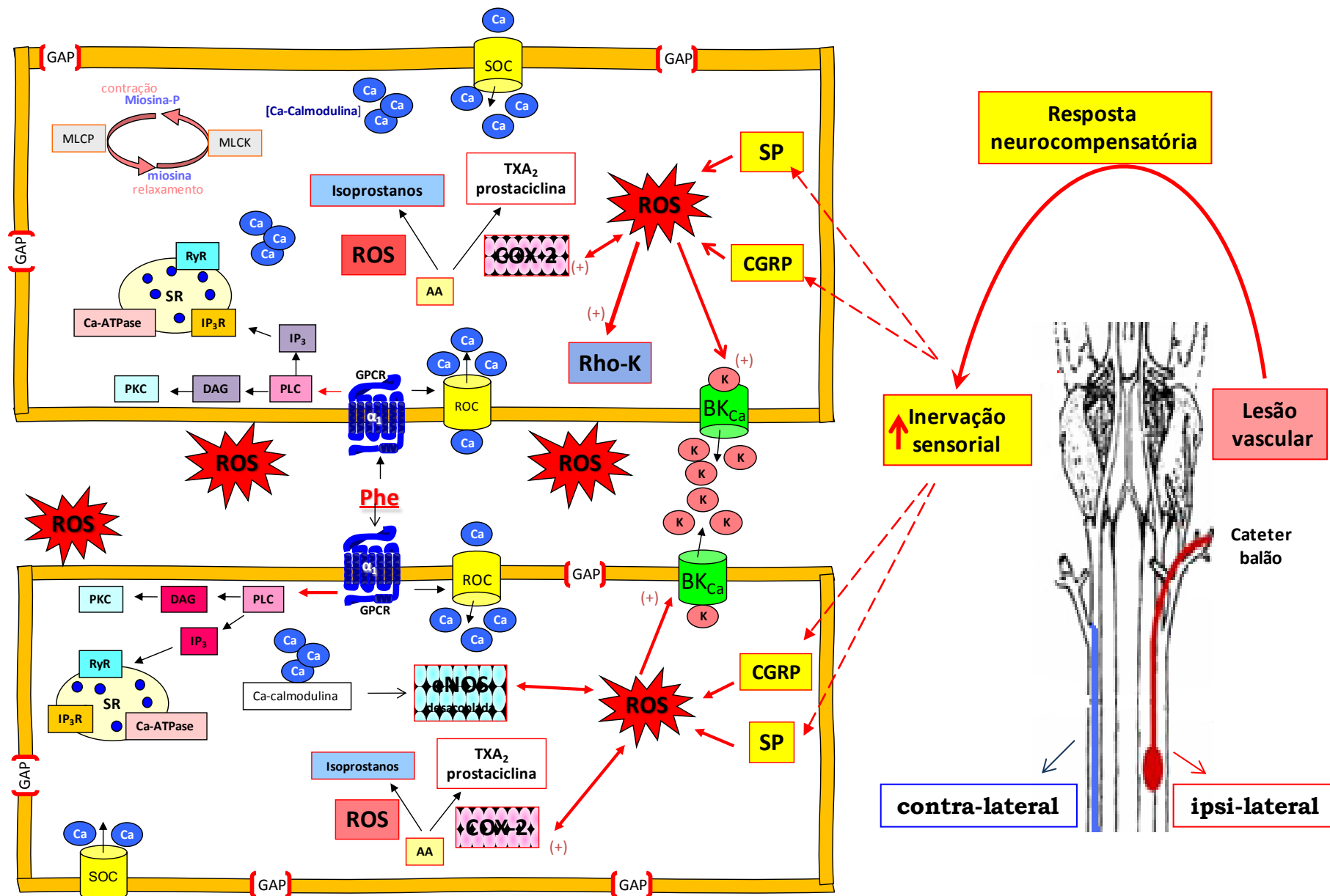


Figura 66: Esquema representando as alterações desencadeadas por ROS na artéria contra-lateral à lesão.

***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

ACCORSI-MENDONÇA, D.; CORREA, F.M.A.; PAIVA, T.B.; DE SOUZA, T.B.; LAURINDO, F.R.M.; DE OLIVEIRA, A.M. The balloon catheter induces an increase in contra-lateral carotid artery reactivity to angiotensin II and phenylefrine: vascular change in distant uninjured artery. **British Journal of Pharmacology**, v.142, p.79-88, 2004.

ALVAREZ, Y.; BRIONES, A.M.; BALFAGÓN, G.; ALONSO, M.J.; SALAICES, M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. **Journal of Hypertension**, v.23(4), p.767-777, 2005.

AMANO, M.; ITO, M.; KIMURA, K.; FUKATA, Y.; CHIHARA, K.; NAKANO, T.; MATSUURA, Y.; KAIBUCHI, K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Journal of Biological Chemistry**, v.271(34), p.20246-20249, 1996.

AREVALO-LEON, L.E.; GALLARDO-ORTIZ, I.A.; URQUIZA-MARIN, H.; VILLALOBOS-MOLINA, R. Evidence for the role of  $\alpha_{1D}$ - and  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors in contraction of the rat mesenteric artery. **Vascular Pharmacology**, v.40, p.91– 96, 2003.

AZAMBUJA, MIR.; FOPPA, M.; MARANHÃO, M.F.C.; ACHUTTI, A.C. Economic Burden of Severe Cardiovascular Diseases in Brazil: an Estimate Based on Secondary Data. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.91(3), p.148-155, 2008.

BALU, S.; THOMAS, J. Incremental Expenditure of treating hypertension in the United States. **American Journal of Hypertension**, v.19, p.810-816. 2006.

BARDELLI, C.; GUNELLA, G.; VARSALDI, F.; BALBO, P.; DEL BOCA, E.; BERNARDONE, I.S.; AMORUSO, A.; BRUNELLESCHI, S. Expression of functional NK1 receptors in human alveolar macrophages: superoxide anion production, cytokine release and involvement of NF-KB pathway. **British Journal of Pharmacology** v.145, p.385–396, 2005.

BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M.D.; RODERICK, H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. **Nature**, v.4, p.517-529, 2005.

BLACK, P.H. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.16, p.622–653, 2002.

BLEEKE, T.; ZHANG, H.; MADAMANCHI, N.; PATTERSON, C.; FABER, J.E. Catecholamine-Induced Vascular Wall Growth Is Dependent on Generation of Reactive Oxygen Species. **Circulation Research**, v.94, p.37-45, 2004.

BOER, C.; SCHEFFER, G.J.; DE LANGE, J.J.; WESTERHOF, N.; SIPKEMA, P. Alpha1-adrenoceptor stimulation induces nitric oxide release in rat pulmonary arteries. **Journal of Vascular Research**, v.36, p.79–81, 1999.

BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v.368, p.850 - 853, 1994.

BONEV, A.D.; JAGGAR, J.H.; RUBART, M.; NELSON, M.T. Activators of protein kinase C decrease calcium spark frequency in smooth muscle cells from cerebral arteries. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v.273, p.2090-2095, 1997.

BRAIN, S.D.; COX, H.M. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. **British Journal of Pharmacology**, v.147, p.S202–S211, 2006.

BRAKEMEIER, S.; EICHLER, I.; KNORR, A.; FASSHEBER, T.; KOHLER, R.; HOYER, J. Modulation of calcium-activated potassium channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species. **Kidney International**, v.64, p.199–207, 2003.

BRISSET, A.C.; ISAKSON, B.E.; KWAK, B.R. Connexins in Vascular Physiology and Pathology. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.11(2), p.267–282, 2009.

BRIZZOLARA, A.L.; STEWART-LEE, A.; BURNSTOCK, G. Responses of rabbit basilar arteries to vasoconstrictor and vasodilator agents: the effects of atherosclerosis, age and sex. **Journal of Vascular Research**, v.31, p.106-113, 1994.

BRUIJNS, R.H.J.; VAN KLEEF, E.M.; SMITS, J.F.M.; DE MEY, J.G.R.; DAEMEN, M.J.A.P. Effects of chemical sympathectomy on angiotensin II-induced neointimal growth in the balloon-injured rat carotid artery. **Journal of Vascular Research**, v.35, p.124-133, 1998.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. ed.11.

BRUZZONE, R.; WHITE, T.W.; PAUL, D.L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. **European Journal of Biochemistry**, v.238, p.1–27, 1996.

BUDZYN, K., MARLEY, P.D., SOBEY, C.G. Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease. **Trends Pharmacol Science**. v.27(2), p.97-104, 2006.

BURNSTOCK, G. Local mechanisms of blood flow control by perivascular nerves and endothelium. **Journal of Hypertension Supplement**, v.8(7), p.S95-S106, 1990.

BURNSTOCK, G.; RALEVIC, V. New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. **British Journal of Plastic Surgery**, v.47, p. 527-543, 1994.

BUUS, N.H.; SIMONSEN, U.; PILEGAARD, H.K.; MULVANY, M.J. Nitric oxide, prostanoid and non-NO, non-prostanoid involvement in acetylcholine relaxation of isolated human small arteries. **British Journal of Pharmacology** v.129, p.184-192, 2000.

CAMBELL, G.R.; CAMPBELL, J.H.; MANDERSON, J.A.; HERRIGAN, S.; RENNICK, R.E. Arterial smooth muscle. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.112, p.977-986, 1988.

CAMILLERI, J.P.; FIESSINGER, J.N.; BARIETY, J.; BERRY, C.L. **Diseases of the Arterial Wall**. Springer-Verlag, London, 1989. 693 p.

CHALOTHORN, D.; MCCUNE, D.F.; EDELMANN, S.E.; GARCIA-CAZARIN, M.L.; TSUJIMOTO, G.; PIASCIK, M.T. Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor subtypes. **Molecular Pharmacology**, v.61, p.1008-1016, 2002.

CHIEN, C.T.; YU, H.J.; LIN, T.B.; LAI, M.K.; HSU, S.M. Substance P via NK1 receptor facilitates hyperactive bladder afferent signaling via action of ROS. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**, v.284, p.F840–F851, 2003.

CHRIST GJ. Minireview: Modulation of  $\alpha_1$ -adrenergic contractility in isolated vascular tissues by heptanol: a functional demonstration of the potential importance of intercellular communication to vascular response generation. **Life Science**, v.56, p.709-721, 1995.

CHRIST, G.J.; SPRAY, D.C.; EL-SABBAN, M.; MOORE, L.K.; BRINK, P.R. Gap Junctions in Vascular Tissues - Evaluating the Role of Intercellular Communication in the Modulation of Vasomotor Tone. **Circulation Research**, v.79(4), p.631-646, 1996.

CLOWES, A.W.; REIDY, M.A.; CLOWES, M.M. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. **Laboratory Investigation**, v.49, p.327-333. 1983a.

CLOWES, A.W.; REIDY, M.A.; CLOWES, M.M. Mechanisms of stenosis after injury. **Laboratory Investigation**, v.49(2): 208-215, 1983b.

DAVIES, M.G.; HAGEN, P. The vascular endothelium – a new horizon. **Annals of Surgery**, v.218, p.593-609, 1993.

de ANDRADE, C.L.; FUKADA, S.Y.; OLIVON, V.C.; DE GODOY, M.A.F.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N.; CUNHA, F.Q.; DE SOUZA, H.P.; LAURINDO, F.R.M.; DE OLIVEIRA, A.M.  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor-induced relaxation on rat carotid artery is impaired during the endothelial dysfunction evoked in the early stages of hyperhomocysteinemia. **European Journal of Pharmacology**, v.543, p. 83–91, 2006



de ANDRADE, C.R.; TIRAPELLI, C.R.; CORREA, F.M.A.; RAMALHO, L.N.Z.; DE OLIVEIRA, A.M. Total stenosis triggers compensatory responsiveness of carotid and basilar arteries to endothelin-1 and phenylephrine. **Pharmacological Research**, v.57, p.32–42, 2008.

de ANGELIS, A.; RINALDI, B.R.; CAPUANO, A.; ROSSI, F.; FILIPPELLI, A. Indomethacin potentiates acetylcholine-induced vasodilation by increasing free radical production. **British Journal of Pharmacology**, v.142, p.1233–1240, 2004.

de OLIVERIA, A.M.; CAMPOS-MELLO, C.; LEITÃO, M.C.; CORREA, F.M.A. Maturation and aging-related differences in responsiveness of rat aorta and carotid arteries to  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation. **Pharmacology**, v.57, p.305-313, 1998.

DONG, H.; WALDRON, G.J.; COLE, W.C.; TRIGGLE, C.R. Roles of calcium-activated and voltage-gated delayed rectifier potassium channels in endothelium-dependent vasorelaxation of the rabbit middle cerebral artery. **British Journal of Pharmacology**, v.123, p.821-832, 1998.

DONG, Y.L.; VEGIRAJU, S.; YALLAMPALLI, C.  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in human fetoplacental vasculature: effect of CGRP on umbilical vein smooth muscle cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. **American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology**, v.289, p.H960-967, 2005.

D'ORLEANS-JUSTE, P. ; DION, S.; DRAPEAU, G. ; REGOLI, D. Different receptors are involved in the endothelium-mediated relaxation and the smooth muscle contraction of the rabbit pulmonary artery in response to substance P and related neurokinins. **European Journal of Pharmacology** 125 (1), 37–44, 1986.

ENGLISH, K.M.; JONES, R.D.; JONES, T.H.; MORICE, A.H.; CHANNER, K.S. aging reduces the responsiveness of coronary arteries from male Wistar rats to the vasodilatory action of testosterone. **Clinical Science (Lond)**, v.99, p.77-82, 2000.

ERAMI, C.; ZHANG, H.; HO, J.G.; FRENCH, D.M.; FABER, J.E.  $\alpha_1$ -Adrenoceptor stimulation directly induces growth of vascular wall in vivo. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v.283, p.H1577–H1587, 2002.

FANCHAOUY, M.; SERIR, K.; MEISTER, J.J.; BENY, J.L.; BYCHKOV, R. Intercellular communication: role of gap junctions in establishing the pattern of ATP-elicited  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent currents in freshly isolated aortic smooth muscle cells. **Cell Calcium**, v.37, p.25–34, 2005.

FASOLATO, C.; INNOCENTI, B.; POZZAN, T. Receptor-activated calcium influx: how many mechanisms for how many channels? **Trends in Pharmacology Science**, v.15, p. 77–83, 1994.

FAXON, D.P.; WILLIAM, C.; CURRIER, J. Remodeling of the coronary artery after vascular injury. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v.42(2), p.129-140, 1997.

FENG, J.; ITO, M.; KUREISHI, Y.; ICHIKAWA, K.; AMANO, M. Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.26157-26164. 1999.

FETALVERO, K.M.; MARTIN, K.A.; HWA, J. Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**. 82, 109–118. 2007.

FILIPPI, S.; PARENTI, A.; DONNINI, S.; GRANGER, H.J.; FAZZINI, A.; LEDDA, F. Alpha(1D)-adrenoceptors cause endothelium-dependent vasodilatation in the rat mesenteric vascular bed. **Journal of Pharmacology Experimental Therapy**, v.296, p.869–875, 2001.

FLOREA, S.M.; BLATTER, L.A.; The effect of oxidative stress on Ca<sup>2+</sup> release and capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in vascular endothelial cells. **Cell Calcium**. v.43. p.405-415. 2008.

FÖRSTERMANN, U.; MÜNDEL, T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease From Marvel to Menace. **Circulation**, v.113, p.1708-1714, 2006.

FRESQUET, F. ; POURAGEAUD, F. ; LEBLAIS, V. ; BRANDES, R.P. ; SAVINEAU, J. ; MARTHAN, R. ; MULLER, B. Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia. **British Journal of Pharmacology**, v.148, p.714–723, 2006.

FUDER, H.; SELBACH, M. Characterization of sensory neurotransmission and its inhibition via  $\alpha_2$ B-adrenoceptors and via non- $\alpha_2$ - adrenoceptors in rabbit iris. **Naunyn-Schmiedebergs Archives Pharmacology**, v.347, p.394–401, 1993.

FUKADA, S.; CORRÊA, F.; RAMALHO, L.; MIZUSAKI, C.; DE OLIVEIRA, A.M. Perivascular injury leads to a reduction in vascular reactivity of the collared and to an enhancement on contra-lateral carotid artery of rats. **Cardiovascular Pathology**, v.13, p.251–9, 2004.

FURCHGOTT, R.F.; BURSZTYN, P. Comparison of dissociation constants and of relative efficacies of selected agonists acting on parasympathetic receptors. **Annals of the New York Academy of Science**, v.139, p.882-899. 1967.

GARCÍA-CAZARÍN, M.L.; SMITH, J.L.; OLSZEWSKI, K.A.; MCCUNE, D.F.; SIMMERMAN, L.A.; HADLEY, R.W.; KRANER, S.D.; PIASCIK, M.T. The  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptor is expressed intracellularly and coupled to increases in intracellular calcium and reactive oxygen species in human aortic smooth muscle cells. **Journal of Molecular Signaling**, v.3(6), p.1-9, 2008.

GARVEY, E.P.; OPLINGER, J.A.; FURFINE, E.S.; KIFF, R.J.; LASZLO, F.; WHITTLE, B.J.R.; KNOWLES, R.G. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of

inducible nitric-oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272(8), p.4959–4963, 1997.

GEBREMEDHIN, D.; YAMAURA, K.; HARDER, D.R. Role of 20-HETE in the hypoxia-induced activation of calcium-activated potassium channel currents in rat cerebral arterial muscle cells. **American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology**, v.294, p.H107–H120, 2008.

GLAGOV, S. Intimal hyperplasia, vascular remodeling and the restenosis problem. **Circulation** v.89, p.2888-2891, 1994.

GLIBBONS, G.H.; DZAU, V.J. The emerging concept of vascular remodeling. **New England Journal of Medicine**, v.330, p.1431-1438, 1994.

GÓMEZ-ZAMUDIO, J.; LÁZARO-SUÁREZ, M.L.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; URQUIZA-MARÍN, H. Evidence for the Use of Agonists to Characterize  $\alpha$ 1-Adrenoceptors in Isolated Arteries of the Rat. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v.45, p.159-160, 2002.

GOPALAKRISHNA, R.; JAKEN, S. Protein Kinase C Signaling and Oxidative Stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28(9), p.1349–1361, 2000.

GRAY, D. W. AND MARSHALL, I. Human CGRP stimulates adenylate cyclase and guanylate cyclase and relaxes rat thoracic aorta by releasing nitric oxide. **British Journal of Pharmacology**, v.107, p.691-696, 1992.

GRECH, E.D. ABC of interventional cardiology: percutaneous coronary intervention. II: the procedure. **British Medical Journal**, v.326, p.1137-1140. 2003.

GREENBERG, S.; DIECKE, F.P.; PEEVY, K.; TANAKA, T.P. The endothelium modulates adrenergic neurotransmission to canine pulmonary arteries and veins. **European Journal of Pharmacology**, v.162, p.67–80, 1989.

GROVER, A.K.; SAMSON, S.E. Effect of superoxide radical on  $Ca^{2+}$  pumps of coronary artery. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v.255, p.297-303, 1988.

GUPTA, P.K.; SUBRAMANI, J.; LEO, M.D.M.; SIKARWAR, A.S.; PARIDA, S.; PRAKASH, V.R.; MISHRA, S.K. Role of voltage-dependent potassium channels and myo-endothelial gap junctions in 4-aminopyridine-induced inhibition of acetylcholine relaxation in rat carotid artery. **European Journal of Pharmacology** 591, 171–176. 2008.

GUTTERMAN, D.D.; MIURA, H.; LIU, Y. Redox Modulation of Vascular Tone: Focus of Potassium Channel Mechanisms of Dilation. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v.25, p.671-678, 2005.

HÄBLER, H.J.; WASNER, G.; JÄNIG, W. Interaction of sympathetic vasoconstriction and antidromic vasodilatation in the control of skin blood flow. **Experimental Brain Research**, v.113, p.402–410, 1997.

HANAFY, K.A.; KRUMENACKER, J.S.; MURAD, F. NO, nitrotyrosine and GMPc in signal transduction. **Medical Science Monitor**, v.7(4), p. 801-819, 2001.

HERNANZ, R.; ALONSO, M.J.; ZIBRANDTSEN, H.; ALVAREZ, Y.; SALAICES, M.; SIMONSEN, U. Measurements of nitric oxide concentration and hyporeactivity in rat superior mesenteric artery exposed to endotoxin. **Cardiovascular Research**, v.62, p.202–211, 2004.

HIDALGO, C.; DONOSO, P. Crosstalk Between Calcium and Redox Signaling: From Molecular Mechanisms to Health Implications. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, v.10, p. 1-38, 2008

HIEBLE, J.P.; BONDINELL, W.E.; RUFFOLO, R.R.Jr. Alpha- and beta-adrenoceptors: from the gene to the clinic. Molecular biology and adrenoceptor subclassification. **Journal of Medicinal Chemical**, v.38(18), p.3415-44, 1995.

Hiperdia – Sistema de Cadastramento e Acompanhamento de Hipertensos e Diabéticos. Ministério da Saúde. <http://hiperdia.datasus.gov.br/> Acesso em 01/08/2006.

HOOD, J.S.; MCMAHON, T.J.; KADOWITZ, P.J. Influence of lemakalim on the pulmonary vascular bed of the cat. **European Journal of Pharmacology**, v.202, p. 101-107, 1991.

HOWE, L.R.; MARSHALL, C.J. Lysophosphatidic acid stimulates mitogen-activated protein kinase activation via a G-protein-coupled pathway requiring p21ras and p74raf-1. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.20717–20720, 1993.

HUSHANG, J. Development of carotid plaque. **American Journal of Surgery**, v.138, p.224-227, 1979.

HUSSAIN, M.B.; MARSHALL, I. Characterization of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. **British Journal of Pharmacology**, v.122, p.849-858, 1997.

IGNARRO, L.J. **Nitric oxide - biology and pathobiology**. San diego, Califórnia: Academic Press, 2000. 1003p.

JANSSEN, L.J.; PREMJI, M.; NETHERTON, S.; CORUZZI, J.; LU-CHAO, H.; COX, P.G. Vasoconstrictor actions of isoprostanes via tyrosine kinase and Rho kinase in human and canine pulmonary vascular smooth muscles. **British Journal of Pharmacology**, v.132, p.127–134, 2001.

JANSSEN, L.J.; TAZZEO, T. Involvement of TP and EP3 receptors in vasoconstrictor responses to isoprostanes in pulmonary vasculature. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**, v.301, p.1060–1066, 2002.

JIN, L.; YING, Z.; WEBB, C. Activation of Rho/Rho-quinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v.287, p.H1495-H1500, 2004.

KARAGIANNIS, J.; RAND, M.; LI, C.G. Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasodilatation in rat renal artery. **Acta Pharmacologica Sin**, v.25: p.1031–1037, 2004.

KAREN, L.R.; STANLEY, J.H.; CARY, B.A.; SCOTT, P.; ADAM, C.G.; ARTHUR, F.S.; JAMES, M.B. A neurokinin-1 receptor antagonist that reduces intra-abdominal adhesion. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal Liver Physiology**, v.293, p.G544–G551, 2007.

KAWASAKI, H.; NUKI, C.; SAITO, A.; TAKASAKI, K. Adrenergic modulation of CGRP-containing nerve-mediated vasodilatation in the rat mesenteric resistance vessels. **Brain Research**, v.506, p.287–90, 1990.

KENAKIN, T.P. Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction. **Efficacy Lippincort-Raven**, 3.ed, p. 289-330, 1997.

KIMURA, C.; OIKE, M.; ITO, Y. Acute glucose overload abolishes calcium oscillation in cultured endothelial cells from bovine aorta - A Possible Role of Superoxide Anion. **Circulation Research**, v.82, p.677-685, 1998.

KIMURA, K.; ITO, M.; AMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M.; YAMAMORI, B.; FENG, J.; NAKANO, T.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; KAIBUCHI, K. Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase). **Science**, 273, 245-248. 1996.

KITAZAWA, T.; ETO, M.; WOODSOME, T.P.; BRAUTIGAN, D.L. Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.9897–9900, 2000.

KNOCK, G.A.; SNETKOV, V.A.; SHAIFTA, Y.; CONNOLLY, M.; DRNDARSKI, S.; NOAH, A.; POURMAHRAM, G.E.; BECKER, S.; AARONSON, P.I.; WARD, J.P.T. Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated  $Ca^{2+}$  sensitization. **Free Radical Biology & Medicine**, v.46, p.633–642, 2009.

KOCHER, O.; GABBIANI, F.; GABBIANI, G.; REIDY, M.A.; COKAY, M.S.; PETERS, H. Phenotypic features of smooth muscle cells during the evolution of experimental carotid artery intima thickening. **Biochemical and morphological studies. Laboratory Investigation**, v.65; p.459-470, 1991

KOSHIMIZU, T.; YAMAUCHI, K.; HIRASAWA, A.; TANOUE, A.; TSUJIMOTO, G. Recent Progress in  $\alpha_1$ -Adrenoceptor Pharmacology. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.25(4), p.401-408, 2002.

KOYAMA, M.; ITO, M.; FENG, J.; SEKO, T.; SHIRAKI, K.; TAKASE, K.; Hartshorne, D.J.; Nakano, T. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. **FEBS Lett.** 475, 197–200. 2000.

KUMAR, N.M.; GILULA, N.B. The gap junction communication channel. **Cell**, v.84, p.381–388, 1996.

LI, J.; ZHANG, X.; NELSON, P.R.; ODGREN, P.R.; NELSON, J.D.; VASILIU, C.; PARK, J.; MORRIS, M.; LIAN, J.; CUTLER, B.S.; NEWBURGER, P.E. Temporal evolution of gene expression in rat carotid artery following balloon angioplasty. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.101, p.399–410, 2007

LIU, J.; HUANG, C.X.; JIANG, H.; BAO, M.W.; CAO, F.; WANG, T. Characteristics of hyperpolarization-activated inward current in rabbit pulmonary vein muscle sleeve cells. **Chinese Medical Journal (Engl)**, v.118(23), p.2014-9, 2005.

LIU, Y.; GUTTERMAN, D.D. The coronary circulation in diabetes: Influence of reactive oxygen species on K<sup>+</sup> channel-mediated vasodilation. **Vascular Pharmacology**, v.38, p. 43– 49, 2002.

LOUNSBURY, K.M.; HU, Q.; ZIEGELSTEIN, R.C. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. **Free Radical Biology & Medicine**. 28(9): 1362–1369. 2000.

LUSIS, A.J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233-241, 2000.

MAGGI, C.A. Tachykinins and Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) as Co-Transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Progress in Neurobiology**, 45. 1-98, 1995.

MAJESKY, M.W.; GIACHELLI, C.M.; REIDY, M.A.; SCHWARTZ, S.M. Rat carotid neointimal smooth muscle cells re-express a developmentally regulated mRNA phenotype during repair of arterial injury. **Circulation Research**, v.71, p.759– 68, 1992

MARTIN, W.; VILLANI, G.M.; JOTHIANANDAN, D.; FURCHGOTT, R.F. Selective Blockade of Endothelium-Dependent and Glyceryl Trinitrate-Induced Relaxation by Hemoglobin and by Methylene Blue in the Rabbit Aorta. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.232(3), p. 708-716. 1985.

MERHI, M.; HELME, R.D.; KHALIL, Z. Age-related changes in sympathetic modulation of sensory nerve activity in rat skin. **Inflammation Research**, v.47, p. 239–244, 1998.

MILNER, P.; BODIN, P.H.; LOESCH, A.; BURNSTOCK, G. Interactions between sensory perivascular nerves and the endothelium in brain microvessels. **Journal of Vascular Research**, v.15, p.1-9, 1995.

MILNER, P.; CROWE, R.; LOESCH, A.; ANGLING, S.; BURNSTOCK, G.; MCEWAN, J.R. Neurocompensatory responses to balloon-catheter-induced injury of the rat carotid artery. **Journal of Vascular Research**, v.34, p.31-40. 1997.

MINNEMAN, K.P. Alfa<sub>1</sub>-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell calcium. **Pharmacology Review**, v.40, p.87–119, 1988.

MIONE, M. C.; CAVANAGH, J. F. R.; KIRKPATRICK, K. A.; BURNSTOCK, G. Plasticity in expression of CGRP and SP immunoreactivity in ganglia and fibers following guanethidine and/or capsaicin denervation. **Cell Tissue Research**, v.29, p.491-504, 1992.

MITCHELL, J.A.; AKARASEREENONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R.J.; VANE, J.R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 11693-11697, 1994.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacology Review**, 43, 109 ± 142, 1991.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **The American Journal of Physiology – Cell Physiology**. v.268, p. C799–C822, 1995.

NISHIO E, WATANABE Y. The involvement of reactive oxygen species and arachidonic acid in  $\alpha$ 1-adrenoceptor-induced smooth muscle cell proliferation and migration. **British Journal of Pharmacology**, v.121, p.665–670, 1997.

NURKIEWICZ, T.R.; BOEGEHOLD, M.A. High salt intake reduces endothelium-dependent dilation of mouse arterioles via superoxide anion generated from nitric oxide synthase. **The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.292, p.R1550–R1556, 2007.

OLIVEIRA, A.P.S.; LUNARDI, C.N.; RODRIGUES, G.J.; BENDHACK, L.M. Relaxation induced by calcium ionophore is impaired in carotid arteries from 2K-1C rats due to failed effect of nitric oxide on the smooth muscle cells, **Vascular Pharmacology**, doi: 10.1016/j.vph.2008.11.010. 2008

OLIVON, V.C. **Mecanismos celulares envolvidos no aumento da reatividade vascular para fenilefrina na artéria contra-lateral após lesão por cateter balãoismo**. 2006. 152f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2006.

OLTMAN, C.L.; KANE, N.L.; MILLER, F.J.; SPECTOR, A.A.; WEINTRAUB, N.L.; DELLSPERGER, K.C. Reactive oxygen species mediate arachidonic acid-induced dilation in porcine coronary microvessels. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v.285, p.H2309–H2315, 2003.

PAN, B.X.; ZHAO, G.L.; HUANG, X.L.; JIN, J.Q.; ZHAO, K.S. Peroxynitrite induces arteriolar smooth muscle cells membrane hyperpolarization with arteriolar hyporeactivity in rats. **Life Sciences**, v.74, p.1199–1210, 2004.

PARTHASARATHI, K.; ICHIMURA, H.; MONMA, E.; LINDERT, J.; QUADRI, S.; ISSEKUTZ, A.; BHATTACHARYA, J. Connexin 43 mediates spread of  $Ca^{2+}$ -dependent proinflammatory responses in lung capillaries. **Journal of Clinical Investigation** v.116, p.2193–2200, 2006.

PERNOW B. SP – a putative mediate of antidromic vasodilation. **Genetic Pharmacology**, v.14, p.13-16, 1983.

RALEVIC, V. Endothelial nitric oxide modulates perivascular sensory neurotransmission in the rat isolated mesenteric arterial bed. **British Journal of Pharmacology**, v.137, p.19 - 28, 2002.

RICHARDSON, J.D.; VASKO, M.R. Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. **Journal of Pharmacology Experimental Therapy** , 302, 839-845, 2002.

ROSS, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. **New England Journal Medical**, v.340, p.115-126,1999.

SAH, V.P.; HOSHIJIMA, M.; CHIEN, K.R.; BROWN, J.H. Rho is required for  $G_{\alpha q}$  and  $G_{\alpha i}$ -adrenergic receptor signaling in cardiomyocytes. Dissociation of Ras and Rho pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.31185–31190, 1996.

SAKURADA, S.; OKAMOTO, H.; TAKUWA, N.; SUGIMOTO, N.; TAKUWA, Y. Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v.281, p.C571-C578, 2001.

SAKURADA, S.; TAKUWA, N.; SUGIMOTO, N.; WANG, Y.; SETO, M.; SASAKI, Y.; TAKUWA, Y.  $Ca^{2+}$ -Dependent activation of Rho and Rho Kinase in membrane depolarization–induced and receptor stimulation–induced vascular smooth muscle contraction. **Circulation Research**.93, 548. 2003.

SAUZEAU, V.; LE JEUNE, H.; CARIO-TOUMANIANTZ, C.; SMOLENSKI, A.; LOHMANN, S.M.; BERTOGLIO, J.; CHARDIN, P.; PACAUDI, P.; LOIRANDI, G. Cyclic GMP-dependent Protein Kinase Signaling Pathway Inhibits RhoA-induced Calcium Sensitization of Contraction in Vascular Smooth Muscle. **Journal of Biological Chemistry**, 275 (28), 21722–21729. 2000.



SCHACH, C.; XU, M.; PLATOSHYN, O.; KELLER, S.H.; YUAN, J.X.J. Thiol oxidation causes pulmonary vasodilation by activating potassium channels and inhibiting store-operated calcium channels. **American Journal of Physiology Lung Cellular Molecular Physiology**, v. 292, p.L685–L698, 2007.

SCHULZ, E.; JANSEN, T.; WENZEL, P.; DAIBER, A.; MÜNDEL, T. Nitric Oxide, Tetrahydrobiopterin, Oxidative Stress, and Endothelial Dysfunction in Hypertension. **Antioxidants & Redox Signal**, v.10(6), p.1115–1126, 2008.

SCHWARTZ, R.S. Neointima and arterial injury: dogs, rats, pigs and more. **Laboratory Investigation**, v.71, n.6, p.789-791, 1994.

SCHWARTZ, R.S.; HENRY, T.D. Pathophysiology of coronary artery restenosis. **Reviews in Cardiovascular Medicine**, v.3, p.S4-S9. 2002.

SCOTLAND, R.S.; VALLANCE, P.J.T.; AHLUWALIA, A. Endogenous factors involved in regulation of tone of arterial vasa vasorum: implications for conduit vessel physiology. **Cardiovascular Research**, v.46, n.3. p.403-411, 2000.

SEASHOLTZ, T.M.; MAJUMDAR, M.; BROWN, J.H. Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling. **Mol.Pharmacol.** 55(6), 949–956. 1999.

SHEARMAN, M. S.; SEKIGUCHI, K.; NISHIZUKA, Y. Modulation of ion channel activity: a key function of the protein kinase C enzyme family. **Pharmacological Reviews**, v. 41, p.211-238, 1989.

SHI, Y.; SO, K.F.; MAN, R.Y.K.; VANHOUTTE, P.M. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium dependent contractions in femoral arteries of rats with streptozotocin-induced diabetes. **British Journal of Pharmacology**, v.152, p.1033–1041, 2007.

SHI, Y.; VANHOUTTE, P.M. Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats. **British Journal of Pharmacology**, 1–13, 2008.

SHIBATA, R.; KAI, H.; SEKI, Y.; KATO, S.; MORIMATSU, M.; KAIBUCHI, K.; IMAIZUMI, T. Role of Rho-Associated Kinase in Neointima Formation After Vascular Injury. **Circulation**. 103, 284-289. 2001.

SHIRAHASE, H.; KANDA, M.; KURAHASHI, K.; NAKAMURA, S.; USUI, H.; SHIMIZU, Y. Endothelium-dependent contraction in intrapulmonary arteries: mediation by endothelial NK1 receptors and TXA<sub>2</sub>. **British Journal of Pharmacology**, v.115, p.1215-1220, 1995.

SHIRAO, S.; KASHIWAGI, S.; SATO, M.; MIWA, S.; NAKAO, F.; KUROKAWA, T.; TODOROKI-IKEDA, N.; MOGAMI, K.; MIZUKAMI, Y.; KURIYAMA, S.; HAZE, K.; SUZUKI, M.; KOBAYASHI, S. Sphingosylphosphorylcholine Is a Novel Messenger for

Rho-Kinase–Mediated Ca Sensitization in the Bovine Cerebral Artery: Unimportant Role for Protein Kinase C. **Circulation Research**. 91, 112-119. 2002.

SOBEY, C.G. Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v.21, p.28-38. 2001.

SOMLYO AP, SOMLYO AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **Journal of Physiology**, v. 522, p.177–185. 2000.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, v.83, p.1325–1358, 2003.

TANG, E.H.C.; VANHOUTTE, P.M. Gap Junction Inhibitors Reduce Endothelium-Dependent Contractions in the Aorta of Spontaneously Hypertensive Rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327(1), p.148–153, 2008.

TEIXEIRA, C.E.; JIN, L.; YING, Z.; PALMER, T.; PRIVIERO, F.B.M.; WEBB, R.C. Expression and functional role of the RhoA/Rho-kinase pathway in rat coeliac artery. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.32, p.817–824, 2005.

TERENGI, G.; ZHANG, S.Q.; UNGER, W. G.; POLAK, J. M. Morphological changes of sensory CGRP-immunoreactive and sympathetic nerves in peripheral tissues following chronic denervation. **Histochemistry**, v.86, p.89-95, 1986.

TIRAPELLI, C.R.; AL-KHOURY, J.; BKAILY, G.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; LANCHOTE, V.L.; UYEMURA, S.R.; DE OLIVEIRA, A.M. Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**, v.316, p.233-241, 2006.

TIRAPELLI, C.R.; CASOLARI, D.A.; YOGI, A.; MONTEZANO, A.C.; TOSTES, R.C.; LEGROS, E.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; DE OLIVEIRA, A.M. Functional characterization and expression of endothelin receptors in rat carotid artery: involvement of nitric oxide, a vasodilator prostanoid and the opening of K<sup>+</sup> channels in ET<sub>B</sub>-induced relaxation. **British Journal of Pharmacology**, v.146, p. 903–912, 2005.

TOSTES, R.C.A.; STORM, D.S.; CHI, D.H.; WEBB, R.C. Intracellular Calcium Stores and Oscillatory Contractions in Arteries from Genetically Hypertensive Rats. **Hypertension Research**, v.19, p.103-111, 1996.

TOSTES, R.C.A.; TRAUB, O.; BENDHACK, L.M.; WEBB, R.C. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> uptake is not decreased in aorta from DOCA hypertensive rats: Functional assessment with cyclopiazonic acid. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.73, p.1536-1545, 1995.

UNGER, W. G.; TERENGI, G.; ZHANG, S. Q.; POLAK, J. M. Alteration in the histochemical presence of tyrosine hydroxylase and CGRP immunoreactivities in the eye following chronic sympathetic or sensory denervation. **Current Eye Research**, v.7, p.761-769, 1988.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p. 44–84, 2007.

VASKO, M.R.; CAMPBELL, W.B.; WAITE, K.J. Prostaglandin-E<sub>2</sub> enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. **Journal of Neuroscience**, v.14, p.4987-4997, 1994.

VILLALBA, N.; STANKEVICIUS, E.; GARCIA-SACRISTA, A.; SIMONSEN, U.; PRIETO, D. Contribution of both calcium entry and calcium sensitization to the  $\alpha$ 1-adrenergic vasoconstriction of rat penile small arteries. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v.292, p.H1157–H1169, 2007.

VILLALOBOS-MOLINA, R.; IBARRA, M. Alpha 1-adrenoceptors mediating contractions in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the  $\alpha$ <sub>1D</sub> or  $\alpha$ <sub>1A</sub> subtypes. **European Journal of Pharmacology**, v.298, p.257–63, 1996.

WEI, E.P.; KONTOS, H.A.; BECKMAN, J.S. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide and peroxynitrite. **American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology**, v. 271, p.H1262-H1266, 1996.

WILSON, A.J. Vascular hyper-reactivity following arterial balloon injury: distant and delayed effects. **British Journal of Pharmacology**, v.142, p.3-4. 2004.

WOLIN, M.S.; AHMAD, M.; GUPTA, S.A. The sources of oxidative stress in the vessel wall. **Kidney International**. V.67, p.1659-1661. 2005.

XIAO, L.; PIMENTEL, D.R.; WANG, J.; SINGH, K.; COLUCCI, W.S.; SAWYER, D.B. Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in  $\alpha$ 1-adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v.282, p.C926–C934, 2002.

YANG, D.; FELETOU, M.; LEVENS, N.; ZHANG, J.N.; VANHOUTTE, P.M. A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR. **Hypertension** v.41, p.143–148, 2003.

YEH, H.I.; LUPU, F.; DUPONT, E.; SEVERS, N.J. Upregulation of connexin43 gap junctions between smooth muscle cells after balloon catheter injury in the rat carotid artery. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, v.17, p.3174 –3184, 1997.

YI, S.L.; KANTORES, C.; BELCASTRO, R.; CABACUNGAN, J.; TANSWELL, K.; JANKOV, R.P. 8-Isoprostane-induced endothelin-1 production by infant rat pulmonary

artery smooth muscle cells is mediated by Rho-kinase. **Free Radical Biology & Medicine**, v.41, p. 942–949, 2006.

ZHANG, C.; YANG, J.; JENNINGS, L.K. Attenuation of neointima formation through the inhibition of DNA repair enzyme PARP-1 in balloon-injured rat carotid. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v.287(2), p.H659-H666. 2004.

ZHANG, H.; FABER, J.E. Trophic effect of norepinephrine on arterial intima-media and adventitia is augmented by injury and mediated by different  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes. **Circulation Research**, v.89, p.815–822, 2001.

ZHANG, Y.; PERTENS, E.; JANSSEN, L.J. 8-isoprostaglandin E2 activates  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  current via cyclic AMP signaling pathway in murine renal artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 520, p.22–28, 2005.

ZHANG, Y.; TAZZEO, T.; HIROTA, S.; JANSSEN, L.J. Vasodilatory and Electrophysiological Actions of 8-iso-Prostaglandin E2 in Porcine Coronary Artery. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.305, p.1054–1060, 2003.

ZHANG, S.; HIRAOKA, M.; HIRANO, Y. Effects of  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation on L-type calcium current in rat ventricular myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.30, p.1955–1965, 1998.

ZHAO, Y.J.; WANG, J.; RUBIN, L.J.; YUAN, X.J. Inhibition of Kv and KCa channels antagonizes NO-induced relaxation in pulmonary artery. **American Journal of Physiology**, v.272, p.H904-H912, 1997.

ZHENG, J.S.; YANG, X.Q.; LOOKINGLAND, K.J.; FINK, G.D.; HESSLINGER, C.; KAPATOS, G.; KOVESDI, I.; CHEN, A.F. Gene Transfer of Human Guanosine 5-Triphosphate Cyclohydrolase I Restores Vascular Tetrahydrobiopterin Level and Endothelial Function in Low Renin Hypertension. **Circulation**, v.108, p.1238-1245, 2003.

ZHONG, H.; MINNEMAN, K.P.  $\alpha_1$  - Adrenoceptor subtypes. **European Journal of Pharmacology**. 375, 261-276. 1999.

ZHU, J.; DRENJANCEVIC-PERIC, I.; MCEWEN, S.; FRIESEMA, J.; SCHULTA, D.; YU, M.; ROMAN, R.J.; LOMBARD, J.H. Role of superoxide and angiotensin II suppression in salt-induced changes in endothelial calcium signaling and NO production in rat aorta. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v.291, p.929-938, 2006.