

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

LAENA PERNOMIAN

Efeitos vasculares induzidos pelo peptídeo
natriurético tipo C (CNP) em aorta de ratos
normotensos e hipertensos renais

Ribeirão Preto
2011

LAENA PERNOMIAN

Efeitos vasculares induzidos pelo peptídeo natriurético tipo C (CNP) em
aorta de ratos normotensos e hipertensos renais

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lusiane Maria Bendhack

Ribeirão Preto

2011

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.

Pernomian, Laena

Efeitos vasculares induzidos pelo peptídeo natriurético tipo C (CNP) em aorta de ratos normotensos e hipertensos renais / Laena Pernomian; orientadora Prof.^a Dr.^a Lusiane Maria Bendhack, Ribeirão Preto, 2011.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Peptídeo natriurético tipo C, 2. Óxido nítrico, 3. Estresse oxidativo, 4. Cálcio citosólico, 5. Guanilil ciclase particulada, 6. Junções *gap* mioendoteliais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Laena Pernomian

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*“O bom mesmo é quando você se permite
A rir até parecer bobo,
E vê que no fim, por mais bobo que tenha parecido,
Bobos foram aqueles que se privaram de sentir”.*

Rafael Lebre

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz Antônio Pernomian e Eli Conceição Paraizo Pernomian, por todo o amor e dedicação empenhados para a realização de mais esta conquista. A minha irmã, Larissa Pernomian, pelo amor, apoio e compreensão em todos os momentos da minha vida. *In memoriam* de Luana Pernomian, luz que ilumina nossos caminhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela graça da vida e por todas as alegrias e experiências vividas ao longo desses anos.

Aos meus pais, Luiz Antônio e Eli, pelo amor, carinho, apoio, dedicação integral e ensinamentos que me proporcionaram, não medindo esforços para que eu conseguisse alcançar meus objetivos sempre com muita coragem e força para vencer os obstáculos que surgissem em meu caminho.

A minha irmã Larissa, que sempre esteve ao meu lado, sendo meu exemplo de vida, me protegendo quando era preciso, me ajudando nos momentos difíceis, compartilhando alegrias e tristezas, sendo minha companhia e por todos os ensinamentos durante toda a vida.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Lusiane Maria Bendhack, pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional, pelo carinho, dedicação e confiança que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros examinadores da banca, Prof.^a Dr.^a Eliana Hiromi Akamine e Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia, por toda a atenção e disponibilidade.

Ao meu grande amigo Vinícius A. H. Sato (Vini) que foi meu companheiro desde o início do estágio, que tanto me ajudou nos momentos difíceis, que compartilhou de inúmeros momentos felizes e até hilários, que para sempre estará na minha vida mesmo que a distância nos separe.

A minha companheira de grupo e grande amiga Fernanda Aparecida de Andrade (Feee), que se tornou mais que uma amiga em minha vida, que também compartilhou de momentos tristes e felizes, sempre me apoiando no que fosse preciso, dividindo comigo sua fé e alegria, essenciais para minha felicidade.

Ao meu outro grande amigo Vitor Silva Pereira (Vitão) que também desde o começo esteve comigo, participando de todos os momentos felizes e engraçados, dividindo as

tristezas e dificuldades encontradas pelo caminho e sempre me trazendo força e paciência para continuar em meus objetivos.

Ao meu outro grande amigo Alejandro Ferraz do Prado, que embora não tenha participado desde o começo desta história e de que quando eu o conheci não tenha tido uma boa impressão a respeito dele, hoje se tornou mais que um amigo, sempre me ajudando a superar as dificuldades, confiando em mim e no meu trabalho, me trazendo paz em sua companhia, além de boas gargalhadas com todas as situações vividas.

A minha amiga Hariane Côco (Hari) que também dividiu inúmeras situações inusitadas e divertidas comigo, mas também sempre me apoiou nas dificuldades, que me fez companhia inúmeras vezes e compartilhou comigo desta grande conquista.

Ao meu grande amigo Rafael Lebre (Rafa) que mesmo de longe sempre esteve ao meu lado, compartilhando dos momentos importantes, me trazendo alegria através de suas músicas e palavras amigas nos momentos difíceis.

A grande amiga e Prof.^a Dr.^a Carolina Baraldi A. Restini (Carol) por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho, assim como pela companhia, amizade e carinho ao longo dessa caminhada.

À Fabiana, técnica da citometria de fluxo, por todo o apoio técnico e pela grande amizade e cumplicidade que adquirimos, pelo carinho e atenção em todos os momentos.

A grande amiga Mayara Santos Gomes, pela companhia de sempre, apoio em diversos momentos importantes, auxílio técnico muito eficiente, pelos momentos de inúmeras gargalhadas.

Ao grande amigo Bruno Rodrigues Silva, que além de todo o apoio intelectual, também compartilhou de inúmeros momentos importantes em minha vida, e através do imenso carinho e respeito permanecemos grandes amigos.

Aos grandes amigos Felipe Munhoz e Simone Potje, que sempre estiveram ao meu lado e muito me ajudaram nos momentos difíceis, por toda a companhia e alegria que dividiram comigo.

Aos amigos Michelly e Rafael Nagai por todo o carinho e companhia de sempre, e grande amizade e cumplicidade.

Ao amigo Dr. Gerson Jhonathan Rodrigues, que além da amizade, foi peça fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, graças a sua experiência em ensaios de fluorescência.

A Dr.^a Roberta Costa pela amizade e disponibilidade para execução dos experimentos de osmolaridade.

A Loyanne Ramos por toda a amizade e carinho, assim como pelo apoio essencial para a execução dos experimentos de fluorescência.

Ao Prof. Dr. Roberto Santana da Silva pela atenção e total apoio para o entendimento e desenvolvimento dos experimentos de fluorescência.

Aos demais amigos do grupo de pesquisa, Dr.^a Alice Valença de Araújo, Dr. José Wilson do Nascimento Corrêa, Amanda Carvalho Pereira, Michele Paulo, Dr.^a Vânia de Rezende, Fabíola Zuchi, Dr.^a Luciana, Sheila, por toda a companhia e apoio.

Às técnicas Juliana Aparecida Vercesi, Marcella Grando, Flávia F. Salata e Miriam Cristina C. de Melo, pelo apoio técnico, boa convivência e amizade.

Aos bioteristas Reinaldo, Ramon e Antônio Flávio por todo o apoio técnico, paciência e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais amigos, Leandro Antero, Sara Hott e Laura León, Paulo Barros, Thiago de Lorena Fábio, Lorena Machado e Danielle Guimarães, Fernanda Bononi, Priscila, Camila Zanotto, Joyce, Mariza Duran, Alexandre Mansuê, Delton Couto da Silva Júnior, Viviane de Matos Santos, Samira V. Alves e Marieli Deolindo Vieira, Murilo Fagliari Martins e Maria Dolores (Nuchi) por todo o apoio e amizade de sempre.

Às Professoras do Laboratório da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), Ana Maria de Oliveira, Glória Emília Petto de Souza, Sâmia Regina Lourenço Joca e Sandra Y. Fukada Alves, pelo convívio agradável.

Aos demais amigos do Laboratório da Disciplina de Farmacologia da FCFRP-USP, Laura, Cassiano, Carina, David, Maria José, Juliano, Livia, Andréa, Denis, Tamy, Bruno pela amizade.

À Marlene Rodrigues da Silva, secretária da disciplina de farmacologia da FCFRP, pelo apoio, carinho e grande amizade.

À Aparecida Rosa da Silva (Dona Nina), funcionária da FCFRP, pela amizade e agradável convívio.

À Sonia Maria Stefanelli, Fátima Helena Petean e José Waldik Ramon, por todo apoio e amizade no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e professores do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao apoio financeiro da FAPESP, CAPES e CNPq.

RESUMO

Laena Pernomian. **Efeitos vasculares induzidos pelo peptídeo natriurético tipo C (CNP) em aorta de ratos normotensos e hipertensos renais**. 2011. 148f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O peptídeo natriurético tipo C (CNP) é descrito como agonista vasodilatador do músculo liso vascular de artérias e veias, podendo ser produzido e liberado do endotélio vascular frente a diversos estímulos. Este promove o relaxamento vascular através da interação com seu receptor associado à enzima guanilil ciclase particulada (GCp) de membrana, levando ao aumento dos níveis de GMPc ou pelo receptor NPR-C associado à inibição de enzima adenilil ciclase e ativação de enzima fosfolipase C e canais para K^+ , via proteína Gi. Esta vasodilatação é descrita envolver parcialmente a via NO-GCs-GMPc, estando relacionada com a mobilização intracelular de cálcio. O modelo de hipertensão 2R-1C está associada ao consumo de NO, no ambiente celular, via reação com espécies reativas de oxigênio (EROs), especialmente ânion superóxido (O_2^-), caracterizando um prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio. Desta forma, considerando as alterações descritas no modelo de hipertensão renovascular 2R-1C quanto ao estresse oxidativo e a importância do CNP como agonista vasodilatador, a hipótese do presente trabalho foi de que na aorta torácica isolada de ratos hipertensos 2R-1C, o relaxamento vascular induzido pelo CNP estaria prejudicado devido o estresse oxidativo. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi de elucidar os mecanismos celulares envolvidos nas respostas vasculares induzidas pelo CNP. Células endoteliais isoladas de aorta de ratos 2R-1C apresentaram menor $[NO]_c$ comparadas as de 2R, sugerindo disfunção endotelial. A exposição das células endoteliais à agente sequestrador de O_2^- (Tiron) demonstrou a participação deste ânion em 2R-1C, mas não em 2R. CNP promoveu relaxamento de anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, o qual foi mais pronunciado em preparações desprovidas de camada endotelial em 2R-1C. Hidroxicobalamina (sequestrador de NO^0), mas não L-NAME (inibidor de NOS), causou redução da potência do CNP em 2R-1C. ODQ (inibidor de GCs) reduziu a potência em 2R E+, atenuando isoladamente o efeito máximo e o número de Hill em preparações E- de 2R-1C ao nível controle. Em presença do inibidor seletivo de GK (Rp-8-Br-PET-cGMPS) ocorreu atenuação da potência do CNP em todos os grupos experimentais, porém o efeito máximo do CNP somente foi reduzido daquelas preparações E-. A inibição da SERCA reduziu da potência do CNP em todos os grupos experimentais, porém o efeito máximo em 2R-1C foi reduzido ao nível controle. Sobre pré-contração induzida pela EC_{50} de solução de cloreto de potássio (KCl) ocorreu atenuação de potência e efeito máximo do CNP em todos os grupos experimentais. Contudo, com a utilização de inibidores seletivos de canais para K^+ , apenas observou-se a participação de BK_{Ca} e SK_{Ca} em 2R e 2R-1C e de K_V em 2R-1C no relaxamento induzido pelo CNP. A inibição de NAD(P)H-oxidase (Apocinina) foi capaz de normalizar o efeito máximo em preparações E- de 2R-1C. A inibição de junções *gap* mioendoteliais (ácido 18- β -glicirretínico) promoveu redução da potência do CNP em 2R E+. Por fim, a inibição não-seletiva de COX (Indometacina) apenas reduziu a potência do CNP em preparações E+ de 2R. A partir da análise do conjunto de dados obtidos em estudos realizados em células endoteliais isoladas e funcionais pode-se concluir a participação do sistema de peptídeos natriuréticos sobre a modulação do tônus vascular em preparações isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Assim, o relaxamento vascular induzido pelo CNP não se encontra prejudicado em aorta torácica isolada de 2R-1C. O endotélio vascular modula negativamente o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos 2R e 2R-1C. Embora haja disfunção endotelial em 2R-1C, esta não é suficiente para alterar a mobilização de cálcio induzida pelo CNP. O relaxamento induzido pelo peptídeo envolve a participação de metabólitos de NOS e de espécie NO^0 , assim como as enzimas NAD(P)H oxidase, GCs, GK e SERCA parecem estar relacionadas com o efeito vasodilatador induzido pelo CNP mais pronunciado em 2R-1C. Assim também, a sinalização desencadeada pelo CNP leva à ativação de canais para K^+ em ambos os grupos, envolvendo a mediação através de junções *gap* mioendoteliais em 2R, mas não em 2R-1C.

Palavras-chave: Peptídeo natriurético tipo C – Óxido nítrico – Estresse oxidativo – Cálcio citosólico – Guanilil ciclase particulada – Junções *gap* mioendoteliais.

ABSTRACT

Laena Pernomian. **Vascular effects induced by C-type natriuretic peptide (CNP) on aorta from normotensive and renovascular hypertensive rats.** 2011. 148f. Thesis (Master degree) – School of Medicine from Ribeirão Preto, Universidade of São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

C-type natriuretic peptide (CNP) acts as a vasodilator agonist that relaxes vascular smooth muscle cells from arteries and veins, and it can be produced and released from the vascular endothelium by several stimuli. This peptide induces vascular relaxation through interaction with its receptor which is associated with particulate guanylyl cyclase (pGC), leading to the increase in cGMP levels or it can also interact with NPR-C receptor associated with the inhibition of adenylyl cyclase and the activation of phospholipase C and K^+ channels, via G_i protein. This vasodilation is related to partially involves NO-sGC-cGMP and intracellular calcium mobilization. 2K-1C hypertension is related to NO consumption, in the cellular environment through reaction with reactive oxygen species (ROS), mainly superoxide anion (O_2^-), characterizing impaired endothelium-dependent relaxation. So, in view of the changes in renovascular hypertension 2K-1C through oxidative stress and the importance of CNP like a vasodilator agonist, the hypothesis of the present work was on thoracic aorta isolated from renal hypertensive rats (2K-1C) the vascular relaxation induced by CNP would be impaired due to oxidative stress. In this context, the study aimed to demonstrate the cellular mechanisms involved on vascular responses induced by CNP. Endothelial cells isolated from 2K-1C rat aortas showed decreased $[NO]_e$ compared to 2K, suggesting endothelial dysfunction. In the presence of O_2^- scavenger (Tiron) there was the participation of this anion on endothelial cells from 2K-1C, but not on 2K ones. CNP caused relaxation of aortic rings from 2K and 2K-1C rats which was enhanced on denuded rings from 2K-1C. Hydroxycobalamine (NO^0 scavenger) but not L-NAME (NOS inhibitor) decreased the potency of CNP on intact aortic rings from 2K-1C. ODQ (sGC inhibitor) decreased potency in intact vascular rings from 2K, just reducing maximum effect and Hill number on denuded aortic rings from 2K-1C to a control level. In the presence of selective GK inhibitor (Rp-8-Br-PET-cGMPS) occurred an attenuation of CNP potency in all experimental groups, but the maximum effect of CNP was reduced only in aortic rings without endothelial layer. SERCA inhibition decreased CNP potency of all experimental groups, but maximum effect was reduced on 2K-1C to control levels. Under pre-contraction elicited by EC_{50} of potassium chloride (KCl) solution there was a decreased CNP potency and maximum effect in all experimental groups. However, the presence of selective inhibitor of K^+ channels showed the contribution of BK_{Ca} and SK_{Ca} on 2K and 2K-1C and K_v on 2K-1C in the CNP induced relaxation. NAD(P)H-oxidase inhibition (Apocinin) was able to normalize maximum effect of CNP on denuded vessels from 2K-1C. Myoendothelial gap junctions inhibition (18- β -glycicirrhetic acid) reduced CNP potency on intact aortic rings from 2K. Finally, the non-selective COX inhibition (Indometacin) induced a lower CNP potency on intact aortic rings from 2K. The analysis of the data obtained from isolated endothelial cells and functional studies allow us to conclude the participation of natriuretic peptide system in the modulation of vascular tone on aortic rings isolated from 2K and 2K-1C rats. Thus, the vascular relaxation induced by CNP is not impaired on aortic rings isolated from 2K-1C. Vascular endothelium negatively modulates the relaxation induced by CNP on 2K and 2K-1C rat aortas. Although 2K-1C exhibits endothelial dysfunction, it is not sufficient to impair calcium mobilization induced by CNP. CNP induced relaxation involves NOS metabolites and NO^0 specie, as well as the activity of NAD(P)H oxidase, sGC, GK and SERCA is related to the enhanced vasodilator effect induced by CNP on 2K-1C. Similarly, CNP pathway leads to K^+ channels activation in both experimental groups and the signal mediation through myoendothelial gap junctions on 2K aortas, but not on 2K-1C ones.

Key-words: C-type natriuretic peptide – Nitric oxide – Oxidative stress – Cytoplasmic calcium – Particulate guanylyl-cyclase – Myoendothelial gap junctions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Medida indireta dos níveis de NO em células endoteliais de aorta de ratos normotensos 2R e hipertensos 2R-1C, em condições basais.....	51
Figura 2 - Medida dos níveis de EROs em células endoteliais de aorta de ratos normotensos 2R e hipertensos 2R-1C, em condições basais ou em presença de sequestrador de O ₂ ⁻ , Tiron.....	52
Figura 3 - Medida da concentração citoplasmática de cálcio em células endoteliais de aorta de ratos normotensos 2R e hipertensos 2R-1C, em condições basais ou após estimulação com CNP.	53
Figura 4 - Medida da concentração citoplasmática de cálcio em células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C, em condições basais ou após estimulação com CNP, em ausência ou presença de Tiron.	54
Figura 5 - Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, em ausência e presença de endotélio.....	55
Figura 6 - Potência e relaxamento máximo induzido pelo CNP em anéis de aorta de 2R e 2R-1C em ausência u presença de endotélio.....	56
Figura 7 - Análise estatística do número de Hill de anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C em ausência ou presença de camada endotelial.	57
Figura 8 - Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, em ausência ou presença de L-NAME e em ausência ou presença de endotélio.	58
Figura 9 - Análise estatística de pD ₂ , Emax e número de Hill em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, em ausência ou presença de L-NAME e em ausência ou presença de endotélio.	59
Figura 10 - Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta com endotélio de 2R e 2R-1C, em ausência ou presença de Hidroxicobalamina.....	61

Figura 11 - Análise estatística de pD_2 , E_{max} e número de Hill de anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C com endotélio, em ausência ou presença de Hidroxicobalamina.....	62
Figura 12 - Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C em ausência ou presença de ODQ e em ausência ou presença de endotélio.....	64
Figura 13 - Análise estatística de pD_2 , E_{max} e número de Hill de anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C em ausência ou presença de ODQ, com ou sem endotélio.	65
Figura 14 – Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta de 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS e em ausência ou presença de endotélio. .	67
Figura 15 - Análise estatística de pD_2 , E_{max} e número de Hill de anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Rp-8-Br-PET-cGMS e em ausência ou presença de endotélio.	68
Figura 16 – Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta desprovidos de endotélio de 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Tapsigargina	70
Figura 17 – Análise estatística de pD_2 , E_{max} e número de Hill de anéis de aorta sem endotélio de ratos 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Tapsigargina	71
Figura 18 - Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta de 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Anantin e em ausência ou presença de endotélio.....	73
Figura 19 - Análise estatística de pD_2 , E_{max} e número de Hill de anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Anantin e em ausência ou presença de endotélio.	74
Figura 20 - Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, sobre pré-contracção com fenilefrena ou KCl em ausência ou presença de endotélio.	76
Figura 21 - Análise estatística de pD_2 , E_{max} e número de Hill de anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C sob pré-contracção com fenilefrina ou KCl em ausência ou presença de endotélio.	77

Figura 22 - Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta com camada endotelial de 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Paxiline.....	79
Figura 23 - Análise estatística de pD_2 , Emax e número de Hill de anéis de aorta com endotélio de ratos 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Paxiline	80
Figura 24 - Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta com camada endotelial com de 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Apamina.....	81
Figura 25 - Análise estatística de pD_2 , Emax e número de Hill de anéis de aorta com endotélio de ratos 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Apamina.....	82
Figura 26 - Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta com camada endotelial de 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Glibenclamida.....	83
Figura 27 - Análise estatística de pD_2 , Emax e número de Hill de anéis de aorta com endotélio de ratos 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Glibenclamida	84
Figura 28 - Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta com camada endotelial de 2R e 2R-1C em ausência ou presença de 4-aminopiridina	85
Figura 29 - Análise estatística de pD_2 , Emax e número de Hill de anéis de aorta com endotélio de ratos 2R e 2R-1C em ausência ou presença de 4-aminopiridina	86
Figura 30 - Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta de 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Tiron e em ausência ou presença de endotélio.....	88
Figura 31 - Análise estatística de pD_2 , Emax e número de Hill de anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Tiron e em ausência ou presença de endotélio...	89
Figura 32 - Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta de 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Apocinina e em ausência ou presença de endotélio	91
Figura 33 - Análise estatística de pD_2 , Emax e número de Hill de anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Apocinina e em ausência ou presença de endotélio	92

Figura 34 - Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta de 2R e 2R-1C em ausência ou presença de ácido 18- β -glicirretínico em presença de camada endotelial	93
Figura 35 - Análise estatística de pD_2 , E_{max} e número de Hill de anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C em ausência ou presença de ácido 18- β -glicirretínico, com endotélio	94
Figura 36 - Relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta de 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Indometacina e em ausência ou presença de endotélio	96
Figura 37 - Análise estatística de pD_2 , E_{max} e número de Hill de anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C em ausência ou presença de Indometacina e em ausência ou presença de endotélio	97
Figura 38 - Intensidade de fluorescência emitida por anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C com endotélio, marcados com a sonda fluorescente FLUO-3AM	99
Figura 39 - Traçado fluorimétrico representativo da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DAF-2 em comparação com DAF-2/DA.....	142
Figura 40 - Traçado fluorimétrico representativo da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DAF-2 em presença de solução saturada de NO ou composto macrocíclico de rutênio doador de NO Terpy.....	143
Figura 41 - Traçado fluorimétrico representativo da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DAF-2 em presença de CNP	144
Figura 42 - Traçado fluorimétrico representativo da intensidade de fluorescência emitida pela sonda FLUO-3 em comparação com FLUO-3AM.....	145
Figura 43 - Traçado fluorimétrico representativo da intensidade de fluorescência emitida pela sonda FLUO-3 em presença de solução saturada $CaCl_2$	145
Figura 44 - Traçado fluorimétrico representativo da intensidade de fluorescência emitida pela sonda FLUO-3 em presença de CNP	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de peso corporal e de pressão arterial sistólica (PAS) de ratos 2R e 2R-1C	50
Tabela 2 – Participação da GK sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos 2R e 2R-1C – valores de pD_2 , E_{max} e número de Hill.....	69
Tabela 3 – Participação de canais K^+ sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos 2R e 2R-1C – valores de pD_2 , E_{max} e número de Hill.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: Adenilil ciclase

ACh: Acetilcolina

AMPc: 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina

Ang II: Angiotensina II

ANP: Peptídeo natriurético atrial

ATP: Trifosfato de adenosina

BH₄: Tetrahidrobiopterina

BK: Bradicinina

BK_{Ca}: Canal para potássio de ampla condutância ativado por cálcio

BNP: Peptídeo natriurético tipo B (*Brain Natriuretic Peptide*)

[Ca²⁺]_c: Concentração citoplasmática de cálcio

CNP: Peptídeo natriurético tipo C

Cx: Conexina

DAG: Diacilglicerol

DNP: Peptídeo natriurético tipo D

ECA: Enzima conversora de angiotensina I

EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

EDRF: Fator relaxante derivado do endotélio

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FAD: Flavina-adenina-mononucleotídeo

FMN: Flavina-mononucleotídeo

GCp: Guanilil ciclase particulada

GCs: Guanilil ciclase solúvel

GIRK: Canal para potássio retificador de entrada associado à proteína G

GK: Proteína quinase dependente de GMPc

GMPc: 3'-5'-monofosfato cíclico de guanosina

HUVEC: Células endoteliais de veia umbilical humana

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

iNOS: Óxido nítrico sintase induzida

IP₃: 1,4,5-trisfosfato de inositol

IP₃R: Receptor para trisfosfato de inositol

IRAG: Substrato de G quinase associado ao IP₃R

K_{ATP}: Canal para potássio sensível à baixas concentrações de ATP

K_V: Canal para potássio sensível à voltagem

LOX: Lipoxigenase

NADPH: Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo

NAD(P)H oxidase: Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (fosfato) oxidase

nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NCX: Trocador sódio-cálcio

NPR: Receptor para peptídeo natriurético

NPS: Nitroprussiato de sódio

O₂⁻: Ânion superóxido

ONOO⁻: Peroxinitrito

PDE: Fosfodiesterase

PGI₂: Prostaciclina

PKC: Proteína quinase C

PLC: Fosfolipase C

SERCA: Ca-ATPase do retículo sarco/endoplasmático

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos

SHRSP: Ratos espontaneamente hipertensos *stroke prone*

SK_{Ca}: Canal para potássio de baixa condutância ativado por cálcio

SOD: Superóxido dismutase

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TRP: *Transient receptor potential channels*

VOC: Canal para cálcio controlado por voltagem

2R: Ratos normotensos dois rins

2R-1C: Ratos hipertensos dois rins – um clipe

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Animais.....	36
3.2 Cirurgia para indução da hipertensão renal (2R-1C) em ratos.....	36
3.2.1 Medida de peso corporal e da pressão arterial por pletismografia de cauda.....	36
3.3 Estudos por Citometria de Fluxo	37
3.3.1 Isolamento de células endoteliais de aorta de ratos.....	37
3.3.1.1 Protocolos Experimentais.....	37
3.3.1.1.1 Quantificação da concentração citosólica de NO ([NO] _c) em células endoteliais de aorta de ratos.....	37
3.3.1.1.2 Quantificação de EROs em células endoteliais de aorta de ratos.....	38
3.3.1.1.2.1 Contribuição de O ₂ ⁻ para a quantificação de EROs em células endoteliais de aorta de ratos.....	38
3.3.1.1.3 Quantificação da concentração citoplasmática de Ca ²⁺ ([Ca ²⁺] _c) em células endoteliais de aorta de ratos	39
3.3.1.1.3.1 Consequências da hipertensão renal sobre a [Ca ₂ ⁺] _c induzida pelo CNP em aorta de ratos.....	39
3.3.1.1.3.2 Contribuição de O ₂ ⁻ sobre a quantificação da [Ca ²⁺] _c em células endoteliais de aorta de ratos.....	39
3.3.1.2 Análise Estatística	40
3.4 Estudos de Reatividade Vascular.....	41
3.4.1 Protocolos Experimentais.....	41
3.4.1.1 Consequências da hipertensão renal sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos.....	41
3.4.1.2 Participação de metabólitos das NOS sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	42
3.4.1.3 Participação da espécie radicalar NO ⁰ sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	42
3.4.1.4 Participação de metabólitos da GCs sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	42
3.4.1.5 Participação da proteína quinase dependente de GMPc (GK) sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	42
3.4.1.6 Participação da Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP.....	43

3.4.1.7 Participação dos receptores NPR-A/B sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	43
3.4.1.8 Participação de canais para K^+ sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos.....	43
3.4.1.9 Participação dos canais BK_{Ca} sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos.....	44
3.4.1.10 Participação dos canais SK_{Ca} sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos.....	44
3.4.1.11 Participação dos canais K_{ATP} sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos.....	44
3.4.1.12 Participação dos canais K_V sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos.....	44
3.4.1.13 Participação de O_2^- sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos.....	45
3.4.1.14 Participação de metabólitos de NAD(P)H-oxidase sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos.....	45
3.4.1.15 Participação de junções <i>gap</i> mioendoteliais sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos.....	45
3.4.1.16 Participação de metabólitos de COX sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos.....	46
3.4.2 Análise Estatística	46
3.5 Estudos por Microscopia Confocal	46
3.5.1 Preparo das Amostras	46
3.5.1.1 Consequências da hipertensão renal sobre a mobilização de cálcio induzida pelo CNP em aorta de ratos.....	48
3.5.2 Análise Estatística	48
4. RESULTADOS	49
4.1 Análise do peso corporal e da PAS.....	50
4.2 Estudos por Citometria de Fluxo	50
4.2.1 Consequências da hipertensão renal sobre a quantificação da concentração citoplasmática de NO ($[NO]_c$) em células endoteliais de aorta de ratos.....	50
4.2.2 Consequências da hipertensão renal sobre a quantificação da concentração citoplasmática de EROs e participação do O_2^- em células endoteliais de aorta de ratos.....	51
4.2.3 Consequências da hipertensão renal sobre a mobilização Ca^{2+} citosólico induzida pelo CNP em aorta de ratos	52
4.2.4 Participação de EROs sobre a mobilização de cálcio induzida pelo CNP em aorta de ratos.....	53
4.3 Estudos de Reatividade Vascular.....	54
4.3.1 Consequências da hipertensão renal sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos.....	54
4.3.2 Participação de metabólitos da NOS sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos.....	57

4.3.3 Participação da espécie radicalar NO ⁰ sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	60
4.3.4 Participação de metabólitos da enzima GCs na mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	63
4.3.5 Participação da proteína quinase dependente de GMPc (GK) sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	66
4.3.6 Participação da Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP	69
4.3.7 Participação dos receptores NPR-A/B sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	72
4.3.8 Participação dos canais para K ⁺ sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	75
4.3.9 Participação dos canais BK _{Ca} sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	78
4.3.10 Participação dos canais SK _{Ca} sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	81
4.3.11 Participação dos canais K _{ATP} sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	83
4.3.12 Participação dos canais K _V sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	85
4.3.13 Influência das espécies reativas de oxigênio sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	87
4.3.14 Participação de produtos da enzima NAD(P)H-oxidase sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	90
4.3.15 Participação de junções <i>gap</i> mioendoteliais sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	93
4.3.16 Participação dos produtos das enzimas ciclooxigenases (COX) sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos	95
4.4 Estudos por Microscopia Confocal	98
4.4.1 Consequências da hipertensão renal sobre a mobilização de cálcio induzida pelo CNP em aorta de ratos	98
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	100
6. CONCLUSÃO	123
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
ANEXO	137

1. INTRODUÇÃO

Desde a primeira descrição do endotélio vascular, em 1862 por von Recklinghausen, como sendo uma simples barreira semipermeável que permitia a troca de fluido e solutos entre o sangue circulante e os tecidos, este vem assumindo um papel cada vez mais importante no controle da homeostase vascular, através da liberação de mediadores vasoativos que alteram o tônus e o crescimento do músculo liso adjacente, e também regulam a ativação de células sanguíneas (Vane et al., 1990; Ahluwalia, Hobbs, 2005).

Dentre os mediadores liberados pelas células endoteliais vasculares encontram-se fatores relaxantes, como óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Em 1980, Furchgott e Zawadzki demonstraram que a acetilcolina (ACh) é capaz de promover relaxamento de vasos sanguíneos isolados apenas na presença da camada endotelial intacta, e posteriormente, em 1987, Ignarro e colaboradores identificaram o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) como sendo o NO. A prostaciclina (PGI_2) formada pelo metabolismo do ácido araquidônico pela enzima ciclooxigenase (COX), exerce efeito antitrombótico e vasodilatador do músculo liso por ativação de receptor acoplado à enzima adenilil ciclase (AC), levando ao aumento nos níveis de 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c), reduzindo a concentração citosólica de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) nas células do músculo liso vascular (Botting et al., 1989). O EDHF promove a hiperpolarização da membrana das células musculares lisas vasculares adjacentes; entretanto, sua identidade ainda permanece desconhecida.

Embora haja mecanismos alternativos de geração de NO, como acidificação ou redução de nitritos, a maior parte do NO das células de mamíferos é enzimaticamente derivada de óxido nítrico sintases (NOS), que promovem a oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino do aminoácido L-arginina, sendo convertido em L-citrulina e NO, em um processo dependente de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADPH) e oxigênio molecular (Thomas et al., 2008). Até o momento, foram identificadas três isoformas de NOS, sendo duas delas constitutivas e dependentes do transiente de íons Ca^{2+} e de calmodulina para serem ativadas, a NOS endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS), e uma induzida por estímulo imunológico (iNOS) (Moncada et al., 1991).

A atividade enzimática da NOS tem como fatores regulatórios a disponibilidade de substrato e de cofatores, assim como a taxa de transferência de elétrons. Esses substratos e cofatores que controlam a atividade da NOS também se encontram envolvidos em outras vias metabólicas dentro das células, portanto, unindo a atividade da NOS a outros processos metabólicos. Em presença de cofatores, como NADPH, tetrahidrobiopterina (BH_4), flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) e flavina-mononucleotídeo (FMN), a atividade da NOS é dependente da disponibilidade de arginina e oxigênio molecular (Thomas et al., 2008). Por fim, tem sido demonstrado que em células endoteliais, a eNOS encontra-se em estruturas especializadas da membrana plasmática denominadas de cavéolas (Feron et al., 1998; Stan, 2002), em interação com a proteína caveolina-1, mantendo assim, a enzima inativa. Em presença de altas concentrações de Ca^{2+} , o complexo eNOS – caveolina-1 se dissocia, dando lugar ao complexo ativo cataliticamente eNOS – Ca^{2+} /calmodulina.

O NO produzido nas células endoteliais é capaz de difundir-se rapidamente, devido ao seu pequeno peso molecular e às suas características de solubilidade. Isso faz com que ele se difunda para as células musculares lisas e para o lúmen vascular. Dentre suas várias ações fisiológicas, este é capaz de produzir vasodilatação em diversos leitos vasculares, através de mecanismos que implicam nas diminuições da $[Ca^{2+}]_c$ e da sensibilidade do aparelho contrátil ao Ca^{2+} (Ignarro, 1989).

Uma vez no interior da célula muscular, o NO interage com o grupamento heme da enzima guanilil ciclase solúvel (GCs), promovendo sua ativação. A GCs catalisa a remoção de dois grupamentos fosfato da molécula de trifosfato de guanosina (GTP) resultando na formação de 3'- 5'- monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Este, por sua vez, promove a ativação da proteína quinase dependente de GMPc (GK), que através da fosforilação de proteínas específicas, leva ao relaxamento do músculo liso vascular. Embora a formação de GMPc represente a via clássica de efeitos celulares desencadeados pelo NO, esta molécula também pode promover efeitos independentes do GMPc através da ligação a resíduos de aminoácidos em várias proteínas, como na ativação da Na^+/K^+ -ATPase, modulação de

canais para Ca^{2+} e para K^+ e redução da sensibilidade a agentes vasoconstritores alterando suas funções (Bolotina et al., 1994; Kanagy et al., 1996; Paolocci et al., 2000).

Existem dois tipos de enzimas guanilil ciclases, ambas fontes de GMPc: uma trata-se da GCs, que é expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos e medeia importantes funções fisiológicas como inibição da agregação plaquetária, relaxamento do músculo liso, vasodilatação, transdução de sinais neuronais e imunomodulação (Collier et al., 1989), sendo ativada pelo NO e por compostos doadores de NO. A outra isoforma de guanilil ciclase é encontrada ligada à membrana e serve como receptor de peptídeos natriuréticos (Lucas et al., 2000), sendo denominada de guanilil ciclase particulada (GCp) de membrana.

O GMPc é o segundo mensageiro envolvido em muitos processos fisiológicos, tais como tônus do músculo liso, excitabilidade neural, transporte eletrolítico epitelial, foto-transdução na retina e proliferação celular (Rivero-Vilches et al., 2001). As vias que controlam os níveis de GMPc estão relacionadas com a expressão de enzimas fosfodiesterases (PDE), as quais hidrolisam o GMPc. Algumas PDE são solúveis no citoplasma, enquanto outras encontram-se ligadas à membrana. As ações intracelulares do GMPc são primeiramente mediadas por GK, porém muitos tipos de canais iônicos ativados por nucleotídeos cíclicos também parecem estar envolvidos (Rivero-Vilches et al., 2003).

Agentes que ativam as guanilil ciclases promovem relaxamento das células do músculo liso e agentes que elevam os níveis de GMPc, similarmente, tem demonstrado atenuar a disfunção endotelial induzida por oxidantes em alguns leitos vasculares. Apesar de sua enorme importância na fisiologia celular, muito pouca atenção tem sido dada ao fato de que sua formação não é uniformemente distribuída na célula. Sendo assim, o conceito de compartimentalização desse segundo mensageiro, de acordo com as diferentes origens de GMPc dentro da célula, tem sido sugerido, devido às suas elevações localizadas, ou seja, no citoplasma e membrana.

Rivero-Vilches e colaboradores (2003) demonstraram que a produção de GMPc via peptídeo natriurético tipo C (CNP)-GCp é maior que aquela induzida pela via NO-GCs,

embora o CNP tenha produzido um efeito relaxante mais moderado em relação ao NO. De maneira semelhante, Rautureau e colaboradores (2010) demonstraram que embora a produção de GMPc em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) em cultura induzida por CNP ou Nitroprussiato de Sódio (NPS) tenha sido semelhante quando em presença de inibidor não seletivo de fosfodiesterases IBMX, a degradação deste nucleotídeo foi maior quando sua produção foi estimulada por CNP do que por NPS quando em ausência de IBMX, sugerindo uma compartimentalização do GMPc produzido e uma possível co-localização de GCp e PDEs. Zolle e colaboradores (2000) demonstraram que a ativação da GCp inibe a extrusão de Ca^{2+} via Ca^{2+} -ATPase de membrana, enquanto que a ativação da GCs leva ao aumento da recaptação do Ca^{2+} para as reservas intracelulares. Neste ponto, as origens específicas de GMPc parecem ser de suma importância.

A família dos peptídeos natriuréticos de mamíferos possui funções complementares na regulação do volume sanguíneo e no tônus vascular, sendo de grande valia para a manutenção da homeostase cardiovascular. O peptídeo natriurético atrial (ANP) e o peptídeo natriurético tipo B (*brain natriuretic peptide*, BNP) que são liberados predominantemente dos átrios e ventrículos, respectivamente, em resposta ao estiramento mecânico, possuem ações endócrinas análogas e exercem efeitos periféricos e centrais, ambos na tentativa de diminuir o volume sanguíneo e a pressão arterial (Ahluwalia et al., 2005).

A importância desses “peptídeos natriuréticos cardíacos” tem sido demonstrada em modelos de animais geneticamente modificados, nos quais camundongos *knockout* para ANP exibem hipertensão sensível ao sal na sua forma crônica (John et al., 1995) e animais *knockout* para BNP apresentam pronunciada fibrose cardíaca em resposta à sobrecarga ventricular (Tamura et al., 2000). Membros adicionais da família dos peptídeos natriuréticos incluem a urodilatina, que trata-se de uma molécula semelhante ao ANP, mas que possui 32 resíduos de aminoácidos e atua exclusivamente na circulação renal; um peptídeo derivado da serpente *Dendroaspis angusticeps* (DNP) e o CNP identificado em 1990 (Sudoh et al., 1990).

Até o momento, três subtipos de receptores para peptídeos natriuréticos (NPR) foram clonados e caracterizados, sendo designados de NPR-A, NPR-B e NPR-C (Kone, 2001). ANP e BNP ligam-se com igual afinidade ao NPR-A, enquanto que o CNP parece ser o ligante endógeno do NPR-B. Ambos receptores NPR-A e NPR-B são acoplados à enzima GCp, a qual gera o segundo mensageiro intracelular GMPc, assim que ocorre a ligação do peptídeo ligante no domínio de ligação extracelular, e a consequente ativação de seu receptor. NPR-C apresenta afinidade semelhante aos três peptídeos natriuréticos, ANP, BNP e CNP, mas não é ligado a guanilil ciclases. Recentes trabalhos sugerem a existência de dois subtipos de NPR-C, um sendo responsável pela depuração (*clearance*) destes peptídeos da circulação sanguínea e o outro possuindo uma via de sinalização particular (Anand-Srivastava, 2005). Este último encontra-se associado à inibição da enzima AC, através de subunidade α da proteína Gi, e à ativação da fosfolipase C- β (PLC- β), através das subunidades $\beta\gamma$, com consequente hidrólise de fosfoinosítídeos (Matsukawa et al., 1999; Potter, 2005).

Numerosos trabalhos mostram que de acordo com diferentes estados patológicos, pode ocorrer alteração na expressão de receptores para peptídeos natriuréticos (Lee et al., 2002). Tem sido demonstrado que, no modelo de hipertensão sensível ao sal acetato de desoxicorticosterona (DOCA) e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) *stroke-prone* (SHRSP) ocorre aumento da expressão vascular de NPR-A e dos níveis de RNAm de NPR-A, e diminuição da expressão de NPR-A em estados hipertensivos induzidos por inibição prolongada da síntese de NO. Por outro lado, a expressão de NPR-C mostra-se diminuída em tecido aórtico de SHRSP, sendo revertida após tratamento com antagonistas do receptor AT₁ de angiotensina.

Ambos receptores NPR-A e NPR-C mostram-se com expressões diminuídas em modelos de hipertensão dois rins - um clipe (2R-1C) e L-NAME, mas com níveis de RNAm de receptor AT₁ e de ECA (enzima conversora de angiotensina I) significativamente aumentados, enquanto que estes últimos se mostram diminuídos em hipertensão sensível ao sal DOCA. Esses resultados sugerem uma regulação recíproca de receptores para

peptídeos natriuréticos pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) local, sendo a expressão de NPRs diminuída quando a expressão de componentes do SRAA é aumentada, e vice-versa.

O CNP é um peptídeo natriurético cuja seqüência de aminoácidos se mantém altamente conservada dentre as espécies, sendo identificado em humanos e em várias espécies primitivas (Inoue et al., 2003). Este pode ser sintetizado e estocado nas células endoteliais, e é encontrado em altas concentrações em condrócitos (Hagiwara et al., 1994), em células endoteliais expostas a citocinas (Suga et al., 1993), além de ser encontrado em baixas concentrações no plasma de indivíduos sadios (Stingo et al., 1992). Além disso, o CNP atua como um neuropeptídeo e como um modulador vasoativo derivado do endotélio (Suga et al., 1993), que é subsequentemente liberado por agonistas dependentes do endotélio, como ACh e bradicinina (BK).

Trata-se de um potente fator relaxante do músculo liso de artérias e veias (Suga et al., 1992), sendo em alguns leitos vasculares esta dilatação dependente do endotélio (Amin et al., 1996), porém, independente de NO na elevação dos níveis de GMPc (Griffith, 2004). Este peptídeo promove hiperpolarização de membrana das células do músculo liso vascular de artérias isoladas através da ativação do receptor NPR-C (Chauhan et al., 2003; Garcha et al., 2006), e que envolve canais BK_{Ca} (Brunner et al., 2001; Madhani et al., 2003), sendo em alguns leitos vasculares idealizado como EDHF (Anand-Srivastava, 2005), embora existam controversas a este respeito (Garland, Dora, 2008).

O controle do tônus vascular, além do efetivo equilíbrio entre os mediadores vasoativos liberados, necessita também da fina sincronia entre os pontos de comunicação entre as células endoteliais e do músculo liso adjacente ao longo de todo o vaso, através das junções comunicantes intercelulares, também denominadas de junções *gap*. Junções *gap* são canais intercelulares que conectam diretamente o citoplasma dentre e entre as camadas celulares (junções *gap* endoteliais, musculares lisas ou mioendoteliais), permitindo a passagem de corrente de pequenas moléculas sinalizadoras, com peso molecular inferior a 1 kDa, tais como Ca^{2+} , 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) ou AMPc; porém hemicanais

independentes podem permanecer não-pareados, se abrindo para liberar moléculas sinalizadoras como trifosfato de adenosina (ATP) ou NAD^+ de uma maneira parácrina. Esses canais intercelulares são formados por uma família de proteínas denominadas conexinas (Cx).

Estudos demonstraram que a expressão de Cx está alterada em vários modelos animais de doenças associadas a complicações vasculares, como hipertensão e diabetes. No tecido vascular, quatro tipos de Cx são demonstradas, compreendendo: Cx37, Cx40, Cx43 e Cx45. A camada de células endoteliais que revestem o lúmen das artérias é composta por Cx37, Cx40 e Cx43. Estudos recentes demonstraram que Cx43 está especificamente ligada à cavéola, mostrando-se diretamente interagir com a proteína caveolina-1, estando co-localizadas nas células nas quais são endogenamente expressas, principalmente nas membranas juncionais de contato celular (Schubert et al., 2002).

Ainda neste contexto, dados literários sugerem que a quantidade de cavéolas encontradas nas células endoteliais e do músculo liso vascular de aorta de ratos hipertensos 2R-1C encontra-se diminuída comparada ao controle normotenso (Rodrigues et al. 2010). Portanto, em artérias de animais hipertensos, pode existir um prejuízo na sinalização desenvolvida por junções *gap*.

A existência de um componente endotelial independente de NO ou PGI_2 no mecanismo de relaxamento dependente do endotélio tem sido demonstrado em diversos leitos vasculares. Este relaxamento está associado com a hiperpolarização da membrana das células do músculo liso vascular, sendo atribuído ao EDHF. Enquanto o NO é o mediador predominantemente responsável pelo relaxamento em grandes vasos, a participação do EDHF se torna mais proeminente à medida que o diâmetro do vaso e as camadas de músculo liso diminuem (Rummery et al., 2004).

Embora a identidade do EDHF permaneça controversa, tendo como potenciais membros íons K^+ , metabólitos do ácido araquidônico (ácidos epoxieicosatrienóicos e anandamida), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou ainda o CNP, é amplamente aceito que a resposta mediada pelo EDHF é iniciada no endotélio, e seguida de liberação de Ca^{2+} e

abertura dos canais K_{Ca} . A hiperpolarização resultante do endotélio se espalha para as células musculares lisas adjacentes através das junções *gap* miondoteliais, levando ao relaxamento do músculo liso vascular devido a um processo voltagem-dependente, envolvendo talvez o fechamento dos canais para Ca^{2+} controlados pela voltagem (VOC), inibição da enzima PLC, ou ainda liberação de Ca^{2+} intracelular (Rummery et al., 2004; Saliez et al., 2008). Deste modo, um ponto chave para a resposta mediada pelo EDHF é seu início pela elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} nas células endoteliais e abertura dos canais K_{Ca} , levando à hiperpolarização e conseqüente relaxamento mediado pelo EDHF.

“Disfunção endotelial” é o termo empregado, de um modo geral, para referir-se ao prejuízo da vasodilatação dependente do endotélio causada pela diminuição da biodisponibilidade de NO vascular, devido ao consumo do NO por espécies reativas de oxigênio (EROs), redução na expressão da NOS ou ainda por falta de substratos e/ou cofatores para a NOS (Crimi et al., 2007). Já “estresse oxidativo” descreve condições envolvendo aumento nos níveis de EROs, as quais são produzidas por todos os tipos de células vasculares, incluindo células endoteliais, musculares lisas e adventícias, podendo, estas espécies reativas, serem formadas por variadas fontes enzimáticas, como xantina oxidase, nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-(fosfato) [NAD(P)H]-oxidase, eNOS desacoplada, COX, lipoxigenase (LOX), sistema P_{450} monooxigenase ou ainda através de auto-oxidações mitocondriais (Paravicini et al., 2008). Diversos estudos apontam que a NAD(P)H-oxidase representa a maior fonte de ânion superóxido (O_2^-) nas células vasculares e em cardiomiócitos (Griendling et al., 2000), e que em células endoteliais não estimuladas por agonistas, existe uma significativa proporção de NAD(P)H-oxidase como um complexo intracelular funcional associado principalmente ao citoesqueleto (Li et al., 2002).

Muitas doenças cardiovasculares como hipertensão, aterosclerose e insuficiência cardíaca, têm sido associadas com alterações na capacidade de liberação dos mediadores vasoativos derivados do endotélio. A hipertensão é relacionada com disfunção endotelial, alterações na reatividade do músculo liso vascular a agentes contráteis (Lunardi et al., 2009) e estresse oxidativo, tanto em modelos animais como humanos, e observa-se uma

diminuição do relaxamento dependente do endotélio em artérias de ratos hipertensos de modelos variados, inclusive no modelo de hipertensão renal 2R-1C (Callera et al., 2000), que pode ser atribuída à diminuição da liberação de NO e/ou EDHF (Mantelli et al., 1995), alterações no potencial de membrana das células do músculo liso vascular (Callera et al., 2000), ou aumento da produção de O_2^- (Heitzer et al., 1999).

Nesse contexto, o modelo experimental de hipertensão 2R-1C é desencadeado pela ativação do SRAA, através de estenose da artéria renal, levando ao aumento da pressão arterial sistêmica devido a presença aumentada de angiotensina II (Ang II) no plasma e nos tecidos (fase aguda), cujo nível decai após a quarta semana (fase crônica) seguida da estenose da artéria renal, mas com manutenção da pressão arterial sistêmica elevada (Okamura et al., 1986; Martinez-Maldonado, 1991; Guan et al., 1992).

Uma das principais características das NAD(P)H-oxidases cardiovasculares é sua responsividade a hormônios, forças hemodinâmicas e alterações metabólicas locais, tendo sido claramente demonstrado um aumento na atividade produtora de O_2^- deste complexo enzimático pela Ang II em cultura de células musculares lisas vasculares (Griendling et al., 1994), e que em células endoteliais forças mecânicas como estresse de cisalhamento unidirecional ou oscilatório estimulam a atividade da NAD(P)H-oxidase, aumentando a produção de O_2^- (Chiu et al., 1997; Howard et al., 1997; de Keulenaer et al., 1998). Na presença de doenças vasculares, as células endoteliais são expostas a excesso de EROs, que podem alterar o seu fenótipo por induzir muitas vias de sinalização. Os segundos mensageiros gerados nestas vias modulam sua estrutura e organização das células endoteliais, gerando modificações na formação de junções paracelulares, prejudicando o funcionamento da barreira endotelial (Bradley et al., 1995).

Desta forma, considerando as alterações descritas no modelo de hipertensão renovascular 2R-1C quanto ao estresse oxidativo e a importância do CNP como agonista vasodilatador que parece ter suas ações parcialmente dependentes do endotélio vascular, a hipótese do presente trabalho foi de que na aorta torácica isolada de ratos hipertensos renais (2R-1C) o relaxamento vascular induzido pelo CNP estaria prejudicado devido o

estresse oxidativo. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi de elucidar os mecanismos celulares envolvidos nas respostas vasculares induzidas pelo CNP, avaliando a participação de mediadores endoteliais, de junções comunicantes intercelulares e do estresse oxidativo na modulação destes efeitos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos envolvidos na mediação e modulação do relaxamento vascular induzido pelo CNP em aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C) e os mediadores intracelulares envolvidos nestas respostas.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C:

A mobilização de Ca^{2+} induzida pelo CNP.

A participação do endotélio vascular na mediação e/ou modulação da resposta vasodilatadora induzida pelo CNP.

A participação do NO e metabólitos de NOS na modulação da resposta vasodilatadora induzida pelo CNP.

A participação da enzima GCs na modulação do efeito vasodilatador induzido pelo CNP.

A participação da enzima GK sobre a mediação do efeito vasodilatador induzido pelo CNP.

A participação da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) na mediação do relaxamento induzido pelo CNP.

O envolvimento de receptores NPR-A/B sobre a mediação e/ou modulação da resposta vasodilatadora induzida pelo CNP.

A participação de canais para K^+ sobre a modulação da resposta vasodilatadora induzida pelo CNP.

O envolvimento do estresse oxidativo na modulação das respostas celulares e funcionais induzidas pelo CNP.

O envolvimento de junções *gap* mioendoteliais na mediação da resposta vasodilatadora induzida pelo CNP.

A participação de prostanóides na modulação da resposta vasodilatadora induzida pelo CNP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar com aproximadamente 35 dias de idade (180 – 200g), provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campos de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos com livre acesso à água e ao alimento, em temperatura constante de 22°C e em ciclo de luz de 12 horas (claro/escuro). O uso de animais no projeto de pesquisa foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (nº 071/2009, aprovado em 27 de julho de 2009).

3.2 Cirurgia para indução da hipertensão renal (2R-1C) em ratos

Ratos Wistar com aproximadamente 35 dias de idade (180 - 200 g) não anestesiados tiveram a pressão arterial sistólica (PAS) aferida por pletismografia de cauda, e então, foram anestesiados com Tribromoetanol (250 mg/Kg – Sigma Aldrich), para a realização de laparotomia mediana e exposição do pedículo da artéria renal esquerda, onde foi implantado um clipe de prata com abertura de 0,2 mm (2R-1C). Posteriormente à implantação do clipe, a incisão foi suturada e o animal tratado com dose única (200 mg/Kg) de antibiótico Oxitetraciclina (Terramicina®/LA - Pfizer), por via intramuscular. Os animais controle, também denominados de sham-operados ou dois rins (2R) foram submetidos às mesmas condições cirúrgicas, porém sem a colocação de clipe de prata na artéria renal. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em biotério a 24°C, com ciclo claro/escuro de 12/12 h e com acesso livre à ração e à água.

3.2.1 Medida de peso corporal e da pressão arterial por pletismografia de cauda

Após seis semanas da cirurgia, todos os animais foram pesados em balança digital e a PAS foi determinada em animais não anestesiados, pela técnica de pletismografia de cauda (PowerLab 6.0 4/26 AD Instruments, NIBP Controller ADInstruments). Os animais que apresentaram a PAS \geq 160 mmHg na sexta semana após a cirurgia foram utilizados nos protocolos experimentais, pertencendo ao grupo de animais hipertensos 2R-1C. Os animais que não foram submetidos à implantação do clipe de prata tiveram sua PAS aferida,

pertencendo ao grupo de animais normotensos 2R. Todos os animais foram utilizados entre a sexta e oitava semanas após a cirurgia.

3.3 Estudos por Citometria de Fluxo

3.3.1 Isolamento de células endoteliais de aorta de ratos

Após o período de seis semanas, os animais dos grupos 2R e 2R-1C foram anestesiados com Isoflurano (1 mL/mL – Forane[®] Abbott) e sacrificados por decapitação. Segmentos de aorta torácica dos ratos (15 mm) foram dissecados dos tecidos adjacentes, isolados, cortados longitudinalmente e mantidos em solução de Hanks completa modificada (CaCl₂ 1,6 mmol/L; MgCl₂ 1,0 mmol/L; NaCl 120,0 mmol/L; KCl 5,0 mmol/L; NaH₂PO₄ 0,5 mmol/L; dextrose 10,0 mmol/L; HEPES 10,0 mmol/L; pH 7,4). A remoção das células endoteliais foi feita mecanicamente com o auxílio de uma haste plástica plana (rodinho). A suspensão de células obtida foi centrifugada a 200 xg por 5 min e concentrada em 500 µL de solução de Hanks contida em tubos de poliestireno para citometria de fluxo. Após esta etapa, as células permaneceram acondicionadas em estufa de CO₂ (37°C) até o momento do experimento. Cada *n* experimental representa um animal. A análise por citometria de fluxo foi realizada em Citômetro de Fluxo (FACS Canto, BD).

3.3.1.1 Protocolos Experimentais

3.3.1.1.1 Quantificação da concentração citosólica de NO ([NO]_c) em células endoteliais de aorta de ratos

Para a realização da medida da [NO]_c pela técnica de citometria de fluxo, a suspensão de células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C, sem qualquer estímulo, foi submetida à leitura, para verificar a emissão de fluorescência basal (Branco). A suspensão de células foi então incubada por 20 minutos com a sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2/DA - 10 µmol/L, excitada com laser azul em 488 nm, com emissão em 530/30,

utilizando detector D), que após ter sua porção diacetato clivada por esterases da membrana plasmática, reage com o produto de oxidação do NO, o trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), produzindo o composto fluorescente estável DAF-2T (Nakatsubo et al. 1998). A seguir, nova leitura da amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DAF-2/DA. Foi realizada a aquisição de 5000 eventos para cada protocolo realizado. A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando o software DIVA.

3.3.1.1.2 Quantificação de EROs em células endoteliais de aorta de ratos

Para a realização da medida de EROs pela técnica de citometria de fluxo, a suspensão de células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C, sem qualquer estímulo, foi submetida à leitura, para verificar a emissão de fluorescência basal (Branco). A suspensão de células foi então incubada por 20 minutos com a sonda fluorescente Dihidroetidina (DHE - 2,5 $\mu\text{mol/L}$ – excitada com laser azul em 488 nm, com emissão em 585/42, utilizando detector C). A sonda DHE permeia as membranas celulares, onde é oxidada à 2-hidroxi-etídio (2-OHEt^+) por O_2^- , ou à etídio (Et^+) por outras EROs, que por sua vez, são então intercalados ao DNA celular sob a forma de brometo de etídio, responsável pela emissão de fluorescência vermelha (de JULIIS et al., 2006). A seguir, nova leitura da amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DHE no interior das células endoteliais. Foi realizada a aquisição de 5000 eventos para cada protocolo realizado. A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando o software DIVA.

3.3.1.1.2.1 Contribuição de O_2^- para a quantificação de EROs em células endoteliais de aorta de ratos

Para avaliar a participação do O_2^- sobre a quantificação de EROs, a suspensão de células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C foi incubada por 20 minutos com a sonda

fluorescente DHE (2,5 $\mu\text{mol/L}$), em ausência ou presença de Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$), e submetida à leitura para verificar a emissão de fluorescência após estímulo com CNP.

3.3.1.1.3 Quantificação da concentração citoplasmática de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) em células endoteliais de aorta de ratos

Para a realização da medida da $[\text{Ca}_2^+]_c$ pela técnica de citometria de fluxo, a suspensão de células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C, sem qualquer estímulo, foi submetida à leitura, para verificar a emissão de fluorescência basal (Branco). A suspensão de células foi então incubada por 30 minutos com a sonda fluorescente FLUO-3AM (5 $\mu\text{mol/L}$ – excitada com laser azul em 488 nm, com emissão em 530/30, utilizando detector D) que, devido sua porção acetóxi-metil-éster, é capaz de permear a membrana plasmática, reagindo com o cálcio citosólico (Takahashi et al. 1999). A seguir, nova leitura da amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo FLUO-3AM. Foi realizada a aquisição de 5000 eventos para cada protocolo realizado. A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando o software DIVA.

3.3.1.1.3.1 Consequências da hipertensão renal sobre a $[\text{Ca}_2^+]_c$ induzida pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a mobilização de cálcio induzida pelo CNP, a suspensão de células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C foi incubada por 30 minutos com a sonda fluorescente FLUO-3AM (5 $\mu\text{mol/L}$) em ausência ou presença de CNP (1 $\mu\text{mol/L}$), e submetida à leitura para verificar a emissão de fluorescência após estímulo com CNP.

3.3.1.1.3.2 Contribuição de O_2^- sobre a quantificação da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ em células endoteliais de aorta de ratos

Para avaliar a participação do O_2^- na mobilização de cálcio induzida pelo CNP, a suspensão de células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C foi incubada por 30 minutos com a sonda fluorescente FLUO-3AM (5 $\mu\text{mol/L}$), em ausência ou presença de CNP (1

$\mu\text{mol/L}$) ou Tiron ($100 \mu\text{mol/L}$), e submetida à leitura para verificar a emissão de fluorescência após estímulo com CNP.

3.3.1.2 Análise Estatística

Nos estudos de citometria de fluxo, foram analisados os traçados citofluorográficos (histogramas) gerados pelo programa DIVA (Software DIVA) após leitura pelo citômetro. Os histogramas obtidos descrevem fenômenos de dispersão do laser que incide sobre as células, de absorção da luz e de emissão de fluorescência. Os histogramas biparamétricos correlacionam a luz dispersa lateralmente (*Side-scattered light*, SSC), proporcional à complexidade ou granulosidade interna da célula, em função da luz dispersa para frente (*Forward-scattered light*, FSC), proporcional à área da superfície celular. A correlação das medidas de SSC e FSC permitem diferenciar os tipos celulares em populações celulares heterogêneas, agrupadas em *gates* (fronteiras gráficas que definem as características de uma população celular). Logo, os histogramas biparamétricos gerados pela análise citofluorográfica foram utilizados para analisar a homogeneidade da população de células endoteliais empregada na leitura. Já histogramas monoparamétricos relacionam o número de eventos celulares adquiridos por leitura em função da intensidade de fluorescência emitida pela sonda fluorescente em análise e, portanto, foram utilizados para analisar a biodisponibilidade de NO, cálcio citosólico ou espécies reativas de oxigênio nas amostras empregadas durante a leitura.

Os resultados estão apresentados como a média das medianas da intensidade de fluorescência (IF) das células com marcação positiva (P3) para as sondas fluorescentes DAF-2/DA, FLUO-3AM ou DHE. A análise estatística foi feita pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.02, 2001). Os métodos estatísticos utilizados foram o Teste *t* de *Student* não pareado ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo dois grupos experimentais, Análise de Variância de um fator (*One-way ANOVA*), seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo três ou mais grupos experimentais apresentando apenas um fator, ou Análise de Variância de dois fatores (*Two-*

way ANOVA), seguida pela correção de Bonferroni ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo grupos com dois fatores.

3.4 Estudos de Reatividade Vascular

Preparações de anéis de aorta torácica isolada de ratos 2R e 2R-1C foram utilizadas para registro de tensão isométrica. Os ratos foram anestesiados com Isoflurano (1 mL/mL – Forane[®] Abbott), sacrificados por decapitação, a aorta torácica isolada, dissecada de tecidos adjacentes e foram cortados anéis de 4mm de comprimento. O endotélio vascular foi removido mecanicamente ou não, dependendo do protocolo a ser realizado e a efetividade da remoção ou manutenção do endotélio foi demonstrada pela ausência ou presença, respectivamente, de relaxamento à Acetilcolina (1 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta pré-contraídos com a EC_{50} da Fenilefrina (100 nmol/L). Os anéis foram montados entre dois ganchos de metal inseridos no lúmen da artéria para produzir tensão. Um dos ganchos permaneceu conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor de registro de força. O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs, pH 7,4, sob aeração constante com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2), a 37°C. As preparações permaneceram em repouso por 60 minutos sob tensão basal constante para estabilização. Em seguida, os anéis foram estimulados com Fenilefrina (100 nmol/L) até que as contrações se reproduzissem, dando início aos protocolos específicos. A tensão isométrica foi registrada através de transdutor acoplado a um polígrafo.

3.4.1 Protocolos Experimentais

3.4.1.1 Consequências da hipertensão renal sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para determinar se a hipertensão renal altera o efeito relaxante induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$) em aorta de ratos 2R e 2R-1C, em presença ou ausência da camada endotelial.

3.4.1.2 Participação de metabólitos das NOS sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a participação de metabólitos da NOS sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para CNP (1 pmol/L a 0,5 µmol/L) em presença de inibidor não seletivo das isoformas de NOS L-NAME (100 µmol/L – 30 minutos) em aorta de ratos 2R e 2R-1C, em presença ou ausência de endotélio.

3.4.1.3 Participação da espécie radicalar NO⁰ sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para verificar a participação da espécie radicalar NO⁰ sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para CNP (1 pmol/L a 0,5 µmol/L) em presença de sequestrador intracelular de NO⁰ Hidroxicobalamina (100 µmol/L – 30 minutos) em aorta de ratos 2R e 2R-1C, em presença de endotélio.

3.4.1.4 Participação de metabólitos da GCs sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a participação de metabólitos de GCs sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para CNP (1 pmol/L a 0,5 µmol/L) em presença de inibidor seletivo de GCs ODQ (1*H*-[1,2,4]-oxadiazolo [4,3-*a*] quinoxalin-1-ona, 1 µmol/L – 30 minutos) em aorta de ratos 2R e 2R-1C, em presença ou ausência da camada endotelial.

3.4.1.5 Participação da proteína quinase dependente de GMPc (GK) sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para analisar a participação da GK sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para CNP (1 pmol/L a 0,5

$\mu\text{mol/L}$) em presença de inibidor seletivo da GK Rp-8-Bromo ($10 \mu\text{mol/L}$ – 30 minutos) em aorta de ratos 2R e 2R-1C, em presença ou ausência de camada endotelial.

3.4.1.6 Participação da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP

Para avaliar a participação da SERCA sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito para o CNP (1 pmol/L a $0,5 \mu\text{mol/L}$) em presença de inibidor seletivo de SERCA, Tapsigargina ($1 \mu\text{mol/L}$ – 30 minutos) em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, desprovidos de camada endotelial (E-).

3.4.1.7 Participação dos receptores NPR-A/B sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para verificar a participação dos receptores NPR-A/B sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para CNP (1 pmol/L a $0,5 \mu\text{mol/L}$) em presença de antagonista não seletivo de NPR-A/B Anantin ($0,1 \mu\text{mol/L}$ – 30 minutos) em aorta de ratos 2R e 2R-1C, em presença ou ausência de camada endotelial.

3.4.1.8 Participação de canais para K^+ sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para determinar a participação de canais K^+ sobre o relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para CNP (1 pmol/L a $0,5 \mu\text{mol/L}$) sobre pré-contração com Fenilefrina (PE, 100 nmol/L) ou alta concentração extracelular de KCl (45 mmol/L) em aorta de ratos 2R e 2R-1C, em presença ou ausência de camada endotelial.

3.4.1.9 Participação dos canais BK_{Ca} sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a participação dos canais BK_{Ca} sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 µmol/L) foram realizadas em ausência ou presença de inibidor seletivo de BK_{Ca}, Paxiline (1 µmol/L – 30 minutos) em anéis de aorta com camada endotelial intacta (E+) de ratos 2R e 2R-1C.

3.4.1.10 Participação dos canais SK_{Ca} sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a participação dos canais SK_{Ca} sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 µmol/L) foram realizadas em ausência ou presença de inibidor seletivo de SK_{Ca}, Apamina (1 µmol/L – 30 minutos) em anéis de aorta com camada endotelial intacta (E+) de ratos 2R e 2R-1C.

3.4.1.11 Participação dos canais K_{ATP} sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a participação dos canais K_{ATP} sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 µmol/L) foram realizadas em ausência ou presença de inibidor seletivo de K_{ATP}, Glibenclamida (3 µmol/L – 30 minutos) em anéis de aorta com camada endotelial intacta (E+) de ratos 2R e 2R-1C.

3.4.1.12 Participação dos canais K_v sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a participação dos canais K_v sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 µmol/L)

foram realizadas em ausência ou presença de inibidor seletivo de K_v , 4-aminopiridina (4-AP, 1 mmol/L – 30 minutos) em anéis de aorta com camada endotelial intacta (E+) de ratos 2R e 2R-1C.

3.4.1.13 Participação de O_2^- sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para determinar a participação do O_2^- sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em presença de sequestrador de O_2^- Tiron (100 μ mol/L – 30 minutos em aorta de ratos 2R e 2R-1C, em presença ou ausência da camada endotelial).

3.4.1.14 Participação de metabólitos de NAD(P)H-oxidase sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para verificar a participação de metabólitos de NAD(P)H-oxidase sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em presença de inibidor seletivo de NAD(P)H-oxidase Apocinina (100 μ mol/L – 30 minutos) em aorta de ratos 2R e 2R-1C, em presença ou ausência da camada endotelial.

3.4.1.15 Participação de junções *gap* mioendoteliais sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para analisar a participação de junções *gap* mioendoteliais sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em presença de inibidor não seletivo de junções *gap* ácido 18- β -glicirretínico (100 μ mol/L – 30 minutos) em aorta de ratos 2R e 2R-1C, em presença de endotélio.

3.4.1.16 Participação de metabólitos de COX sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para determinar a participação de metabólitos de COX sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em presença de inibidor não seletivo de isoformas de COX Indometacina (10 μ mol/L – 30 minutos) em aorta de ratos 2R e 2R-1C, em presença ou ausência da camada endotelial.

3.4.2 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.) de pelo menos 4 amostras diferentes. As determinações da EC_{50} (concentração que produz 50% da resposta máxima), de efeito máximo (Emax) e do número de Hill (inclinação da curva) foram realizadas utilizando o método de regressão não-linear dos mínimos quadrados, utilizando-se o programa GraphPad Prism (graphPad software, versão 3.00, 2001). Para a análise da potência do agonista, foi utilizado o valor de pD_2 ($-\log EC_{50}$), que assume distribuição normal, compatível com manipulações e comparações estatísticas. A comparação entre quatro ou mais médias, supondo distribuições normais para a mesma população, foi realizada pela análise de variância, *One-way* ANOVA ($P < 0,05$) com pós-teste de *Newman-Keuls* ou *Two-way* ANOVA ($P < 0,05$) com correção de Bonferroni, ou ainda a análise será feita através de Teste *t* de *Student* ($P < 0,05$).

3.5 Estudos por Microscopia Confocal

3.5.1 Preparo das Amostras

Para os estudos por microscopia confocal, os animais dos grupos 2R e 2R-1C foram anestesiados com Isoflurano (1 mL/mL – Forane[®] Abbott) e sacrificados por decapitação. Segmentos de aorta torácica dos ratos (15 mm) foram dissecados dos tecidos adjacentes, isolados e anéis com endotélio, possuindo uma espessura menor que 100 μ m, foram

cortados com o auxílio de lâmina de bisturi cirúrgico (em aço carbono estéril nº 24 Embramac®), sendo mantidos umedecidos por solução de Hanks completa modificada (CaCl₂ 1,6 mmol/L; MgCl₂ 1,0 mmol/L; NaCl 120,0 mmol/L; KCl 5,0 mmol/L; NaH₂PO₄ 0,5 mmol/L; dextrose 10,0 mmol/L; HEPES 10,0 mmol/L; pH 7,4). Estes anéis foram plaqueados em laminulas para microscopia confocal (42 mm de diâmetro, AZ Labor), pré-tratadas com poli-L-lisina 100% para aderência, acondicionadas em placas de Petri e mantidas em estufa de CO₂ a 5% em temperatura de 37°C. No momento de incubação com a sonda fluorescente seletiva para Ca²⁺ FLUO-3AM (10 µmol/L – 30 minutos), as preparações foram mantidas em solução de Hanks completa modificada, a temperatura de 25°C, para marcação apenas de cálcio citosólico e também foram protegidas de luminosidade. A sonda FLUO-3AM foi excitada com laser de argônio em 488 nm, sendo a intensidade de emissão de fluorescência emitida medida em 510 nm. As preparações foram analisadas em microscópio confocal (Leica TSC SP5), focadas usando objetiva de imersão em água (aumento de 63x). O software de análise temporal *Leica Application Suite – Advanced Fluorescence Lite 2.3.0* (LAS-AF Lite, *Leica Microsystems*, 1997-2010) foi utilizado para capturar as imagens das células em intervalos de 1,314 segundo (xyt) ao longo do tempo, durante 10 minutos (600 segundos) no modo de aquisição *Live Data Mode*, e para calcular o transiente de Ca²⁺. Este transiente foi obtido pela mudança na intensidade de fluorescência (IF), que é diretamente proporcional à [Ca²⁺]_c. Foi calculada a diferença (Δ) entre a intensidade de fluorescência inicial (IF_i) e final (IF_f), sendo esta diferença convertida em % em função da [Ca²⁺]_c basal inicial. Sendo assim, a quantidade de Ca²⁺ foi expressa como “Δ IF Basal (%)”, calculada pela fórmula abaixo. A intensidade de fluorescência inicial ou basal foi obtida antes da adição de CNP (1 µmol/L).

$$\Delta \text{ IF Basal (\%)} = (IF_f - IF_i / IF_i) \times 100$$

3.5.1.1 Consequências da hipertensão renal sobre a mobilização de cálcio induzida pelo CNP em aorta de ratos

Após o preparo das amostras, os anéis de aorta torácica com endotélio de ratos 2R e 2R-1C foram devidamente incubados com a sonda fluorescente FLUO-3AM (10 $\mu\text{mol/L}$ – 30 minutos) e realizada leitura da concentração citoplasmática de cálcio basal (IF_i). Posteriormente, os anéis foram estimulados com CNP (1 $\mu\text{mol/L}$) e realizada nova leitura de fluorescência (IF_t), durante 10 minutos (600 segundos).

3.5.2 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.) em unidades de fluorescência (U), de pelo menos 4 amostras diferentes, utilizando-se o programa GraphPad Prism (graphPad software, versão 3.00, 2001). A comparação entre quatro ou mais médias, supondo distribuições normais para a mesma população, foi realizada pela análise de variância, *One-way ANOVA* ($P < 0,05$) com pós-teste de *Newman-Keuls* ou ainda a análise foi feita através de Teste *t* de *Student* ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Análise do peso corporal e da PAS

Após seis semanas da cirurgia de indução da hipertensão renal 2R-1C, todos os animais, 2R e 2R-1C, foram pesados e a pressão arterial sistólica (PAS) foi determinada pela técnica de pletismografia de cauda digital. A tabela 1 mostra os valores obtidos em cada análise.

Tabela 1: Valores de peso corporal e de pressão arterial sistólica (PAS) de ratos 2R e 2R-1C.

<i>Grupos</i>	<i>2R</i>	<i>2R-1C</i>
<i>Peso corporal (g)</i>	511,43 ± 13,67	511,67 ± 14,12
<i>PAS (mmHg)</i>	127,59 ± 5,01	201,56 ± 2,58 *

Dados são representados como média ± E.P.M. de 2R (n=7) e 2R-1C (n=12). Os animais tiveram o peso corporal (g) e a PAS (mmHg) aferida na sexta semana após a cirurgia de indução de hipertensão renovascular. Significativamente diferente de 2R (*). $P < 0,001$ (Teste *t* de Student).

4.2 Estudos por Citometria de Fluxo

4.2.1 Consequências da hipertensão renal sobre a quantificação da concentração citoplasmática de NO ([NO]_c) em células endoteliais de aorta de ratos

Para a quantificação indireta da concentração citosólica de NO, foi executada a técnica de citometria de fluxo, utilizando-se células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C, expostas à sonda fluorescente DAF-2/DA, que uma vez clivada sua porção diacetato, esta torna-se permeável à membrana citoplasmática, sendo passível de reação com N₂O₃ e formação do composto estável fluorescente DAF-2T (Nakatsubo et al. 1998). Como pode ser observado, na figura 1, em células endoteliais de aorta de ratos hipertensos 2R-1C (1286,8 U ± 110,51, n=6) houve menor concentração de NO basal quando comparado a ratos normotensos 2R (1965,6 U ± 175,42, n=5).

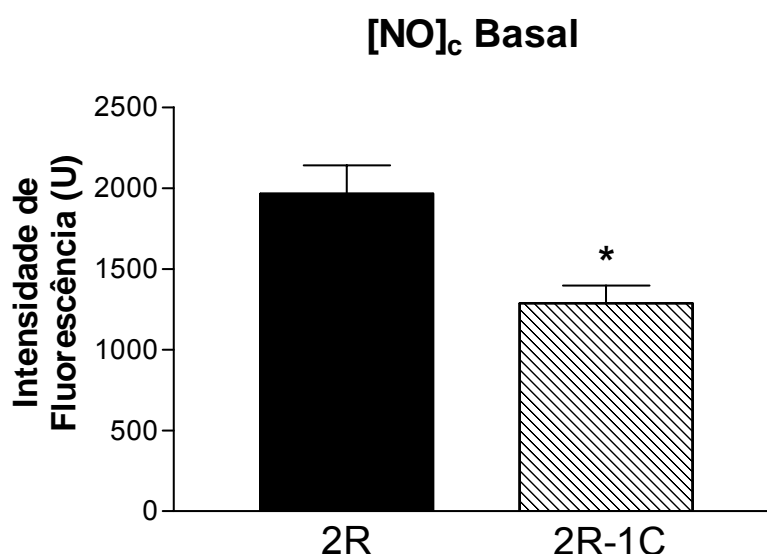


Fig. 1: Medida indireta dos níveis de NO em células endoteliais de aorta de ratos normotensos 2R e hipertensos 2R-1C, em condições basais. As células endoteliais de aorta de ambos grupos de ratos foram expostas à sonda fluorescente DAF-2/DA (10 $\mu\text{mol/L}$), durante 20 minutos e realizadas leituras em citômetro de fluxo. Dados são representados como média das medianas das células com marcação positiva $P3 \pm \text{EPM}$ (n=5-6). Significativamente diferente de 2R (*), $P < 0,01$ (teste *t* de Student).

4.2.2 Consequências da hipertensão renal sobre a quantificação da concentração citoplasmática de EROs e participação do O_2^- em células endoteliais de aorta de ratos

Em relação à concentração citoplasmática basal de EROs (CO), tanto as células endoteliais de aorta de ratos 2R quanto de 2R-1C não apresentaram diferenças significativas. Para avaliar a participação do O_2^- sobre a quantificação de EROs, as células endoteliais de aorta de 2R e 2R-1C foram previamente expostas ao sequestrador de O_2^- , Tiron e a intensidade de fluorescência emitida foi quantificada. Observou-se que, embora as concentrações basais de EROs em ambos os grupos não apresentassem alterações significativas entre si, as espécies reativas envolvidas nas repostas mostravam-se diferentes. Enquanto que em presença de Tiron ocorreu aumento da intensidade de fluorescência basal em células endoteliais de 2R (Tiron: $124537,40 \text{ U} \pm 9800,02$, n=8), sob a mesma condição de exposição ao Tiron, as células endoteliais de 2R-1C tiveram sua concentração de EROs basal diminuída (Tiron: $11885,4 \text{ U} \pm 652,65$, n=5), demonstrando a possível participação do O_2^- na produção de espécies reativas na condição basal em células endoteliais de aorta de ratos hipertensos.

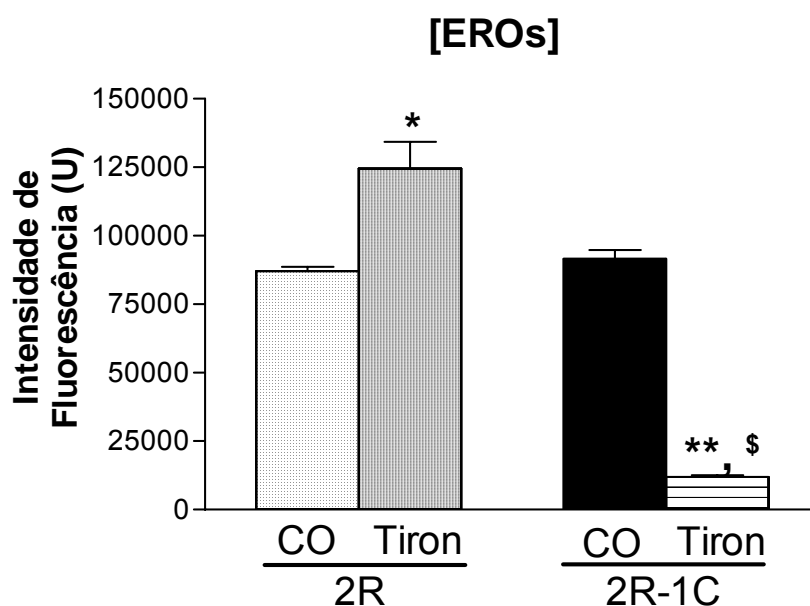


Fig. 2: Medida dos níveis de EROs em células endoteliais de aorta de ratos normotensos 2R e hipertensos 2R-1C, em condições basais (CO) ou em presença de sequestrador de O_2^- , Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$, 30 minutos). Células endoteliais de aorta foram expostas a sonda fluorescente DHE (2,5 $\mu\text{mol/L}$) durante 20 minutos, em ausência ou presença de Tiron, e posteriormente, verificada a intensidade de fluorescência emitida, pela técnica de citometria de fluxo. Dados são representados como média das medianas das células com marcação positiva $P3 \pm \text{EPM}$ (n=5-8). Significativamente diferente de 2R CO (*); 2R-1C CO (**); 2R + Tiron (\$), $P < 0,01$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls).

4.2.3 Consequências da hipertensão renal sobre a mobilização Ca^{2+} citosólico induzida pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ em células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C, células foram expostas à sonda fluorescente sensível ao cálcio FLUO-3AM, em condições basais (CO) e após estímulo com CNP. Como pode ser observado na figura 3, a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ não foi diferente entre as células endoteliais de 2R (1202,0 U \pm 15,85) e 2R-1C (2R-1C: 1209,14 U \pm 40,23, n=4-7). A presença de CNP (1 $\mu\text{mol/L}$, durante 30 minutos) promoveu aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de células endoteliais de aorta de ambos os grupos (2R+CNP: 1410,6 U \pm 53,74; 2R-1C+CNP: 1494,86 U \pm 47,31, n=5-7), quando comparado ao basal, mas que não foi diferente entre os grupos 2R e 2R-1C.

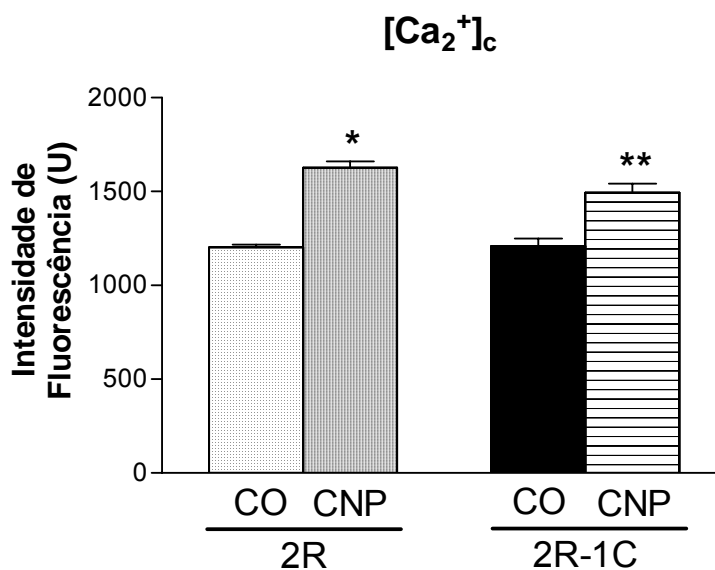


Fig. 3: Medida da concentração citoplasmática de cálcio em células endoteliais de aorta de ratos normotensos 2R e hipertensos 2R-1C, em condições basais (CO) ou após estimulação com CNP (1 $\mu\text{mol/L}$). Células endoteliais de aorta foram expostas a sonda fluorescente FLUO-3AM (10 $\mu\text{mol/L}$) durante 20 minutos, em ausência ou presença de CNP, e posteriormente, verificada a intensidade de fluorescência emitida, pela técnica de citometria de fluxo. Dados são representados como média das medianas das células com marcação positiva $P3 \pm \text{EPM}$ ($n=4-7$). Significativamente diferente de 2R CO (*); diferente de 2R-1C CO (**), $P < 0,01$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls).

4.2.4 Participação de EROs sobre a mobilização de cálcio induzida pelo CNP em aorta de ratos

Com o objetivo de verificar a participação de EROs sobre a mobilização de cálcio induzida pelo CNP, as células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C, após serem incubadas com a sonda fluorescente FLUO-3AM (10 $\mu\text{mol/L}$), foram expostas ao sequestrador de O_2^- , Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$, por 30 minutos) e posteriormente, estimuladas com CNP (1 $\mu\text{mol/L}$, durante 30 minutos). Na presença de Tiron, a concentração basal de EROs não foi alterada em ambos os grupos (2R: $1142,20 \pm 35,61$; 2R-1C: $1155,25 \pm 80,98$; $n=4-5$). Após a estimulação com o CNP houve aumento do conteúdo de Ca^{2+} nos dois grupos. Na presença de Tiron (CNP+Tiron), o aumento na intensidade de fluorescência induzido pelo CNP em 2R foi parcialmente reduzido ($1410,60 \pm 53,74$; $n=5$), permanecendo-se elevado quando comparada à condição basal, porém esse aumento foi abolido em células endoteliais de aorta de 2R-1C, retornando aos valores da condição basal. A intensidade de fluorescência emitida pelas células endoteliais de 2R-1C em presença de CNP e Tiron foi menor que aquela emitida pelas células endoteliais de 2R na mesma condição.

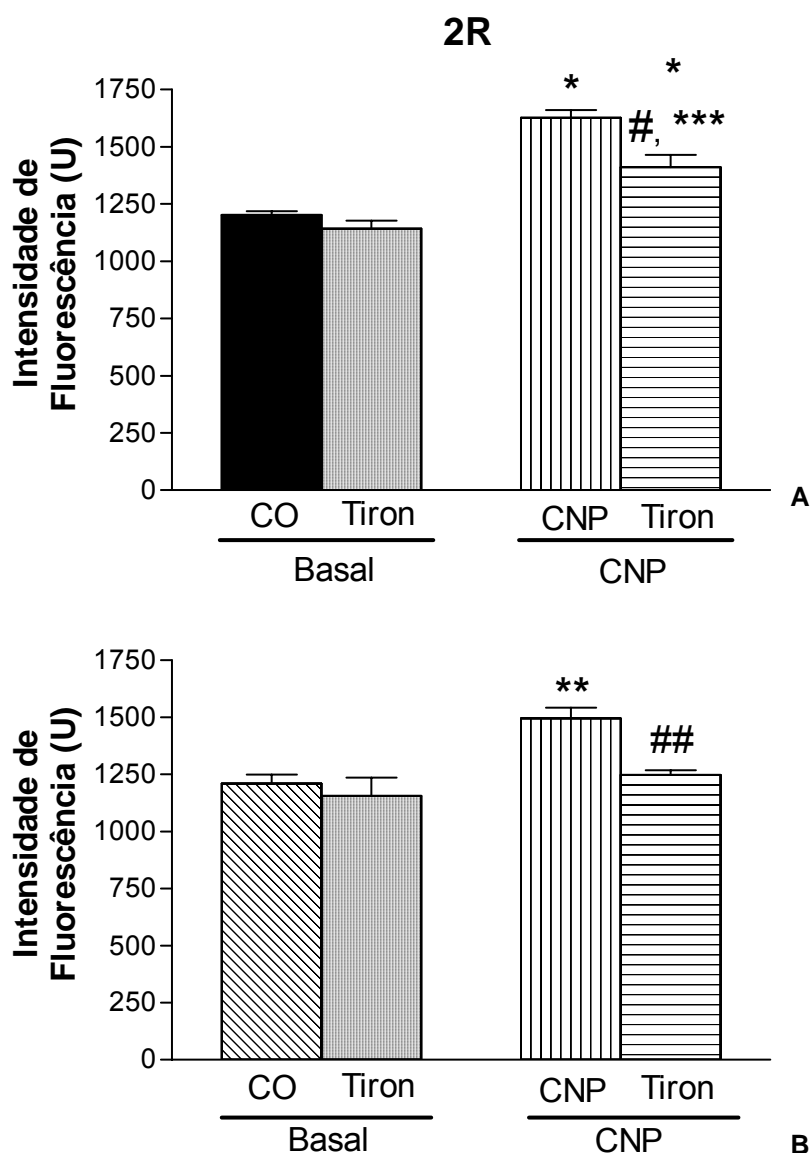


Fig. 4: Medida da concentração citoplasmática de cálcio em células endoteliais de aorta de ratos 2R (A) e 2R-1C (B), em condições basais ou após estimulação com CNP (1 μmol/L) em ausência ou presença de Tiron (100 μmol/L). Células endoteliais de aorta foram expostas a sonda fluorescente FLUO-3AM (10 μmol/L) durante 20 minutos. Células endoteliais de aorta foram incubadas por 30 min com CNP e/ou Tiron, e posteriormente, verificada a intensidade de fluorescência emitida, por citômetro de fluxo. Dados são representados como média das medianas das células com marcação positiva $P3 \pm EPM$ (n=4-7). Significativamente diferente de 2R CO basal (*); 2R+CNP (#); 2R Tiron basal (**); 2R-1C CO (**); 2R-1C+CNP (##). $P < 0,01$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls; Two-way Anova, correção de Bonferroni).

4.3 Estudos de Reatividade Vascular

4.3.1 Consequências da hipertensão renal sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Como pode ser observado na figura 5, o CNP promoveu relaxamento de forma concentração-dependente em anéis de aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-

1C), pré-contraídos com Fenilefrina (100 nmol/L), tanto em ausência (E-) quanto em presença (E+) de endotélio. Embora os parâmetros farmacológicos de pD_2 e E_{max} não tenham sido diferentes em anéis de aorta de 2R E+ e 2R-1C E+, como mostrado nas figuras 5 e 6, o relaxamento em anéis de aorta de 2R-1C E- apresentou um efeito máximo maior em relação ao grupo 2R-1C E+ (E+: $101,39 \pm 2,04$; E-: $117,46 \pm 4,12$, n=9). Além disso, o relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta E-, no grupo 2R-1C E- houve um E_{max} maior quando comparado aquele induzido no grupo 2R E+ (2R E+: $95,49 \pm 3,07$, n=11) e 2R E- (2R E-: $95,96 \pm 3,34$; 2R-1C E- $117,46 \pm 4,12$, n=9-11).

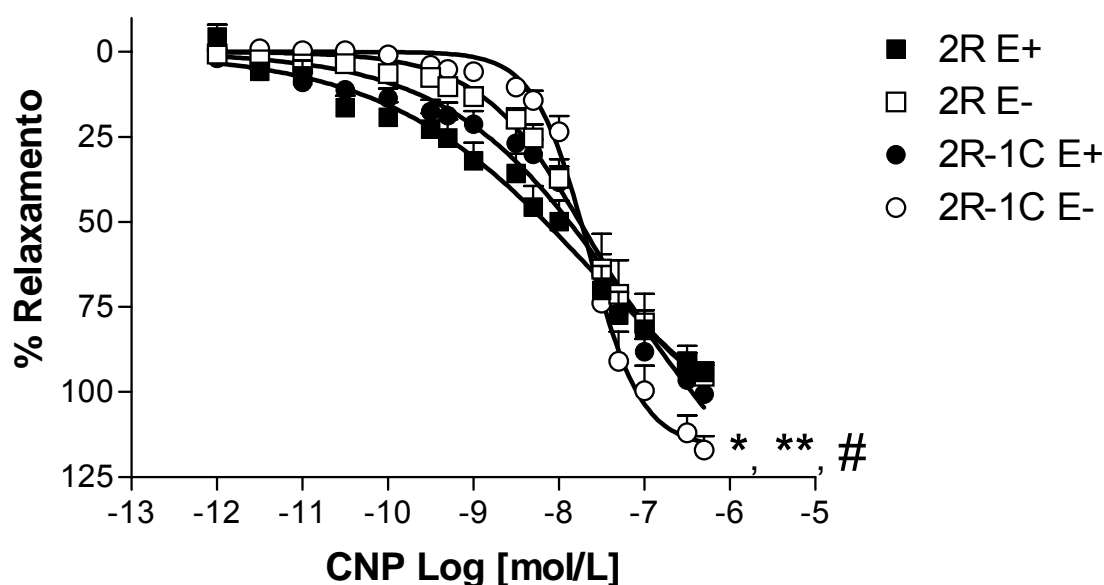


Fig. 5: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em anéis de aorta de ratos 2R (quadrados) e 2R-1C (círculos) em ausência (E-, símbolos brancos) e presença (E+, símbolos pretos) de endotélio. As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R E- (**); 2R-1C E+ (#); $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni n=9-11).

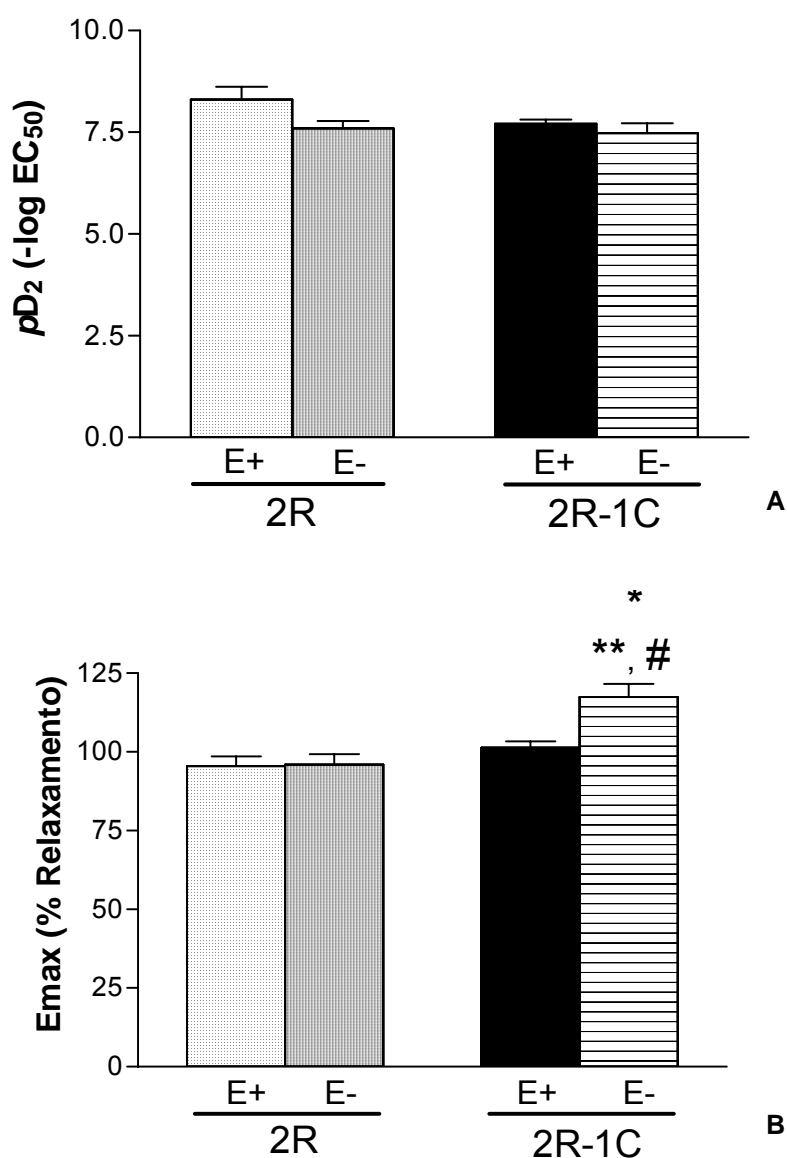


Fig. 6: Potência (A) e relaxamento máximo (B) induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em anéis de aorta de 2R e 2R-1C em ausência (E-) ou presença de endotélio (E+). As respostas são representadas como $-\log EC_{50}$ em A, e porcentagem de efeito máximo (Emax) induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L) em B. Significativamente diferente de 2R E- (**), 2R-1C E+ (#). $P < 0,01$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, n=9-11).

Ao analisarmos o parâmetro farmacológico do Número de Hill, que diz respeito à inclinação da curva concentração-efeito cumulativa, observamos que a remoção da camada endotelial promoveu aumento significativo desse parâmetro tanto nas preparações de 2R (E-: $1,10 \pm 0,12$, n=11) quanto de 2R-1C (E-: $1,65 \pm 0,15$, n=9) (figuras 5 e 7). Entretanto, ao compararmos a inclinação das curvas de 2R (E+: $0,54 \pm 0,11$, n=11) e 2R-1C (E+: $0,79 \pm 0,19$, n=9) na presença de endotélio, não houve diferenças significativas. Além disso, no grupo 2R-1C, a ausência de endotélio promoveu um aumento no número de Hill em relação à presença de endotélio (E+: $0,79 \pm 0,19$; E-: $1,65 \pm 0,15$, n=9) e também em relação ao grupo controle 2R E+

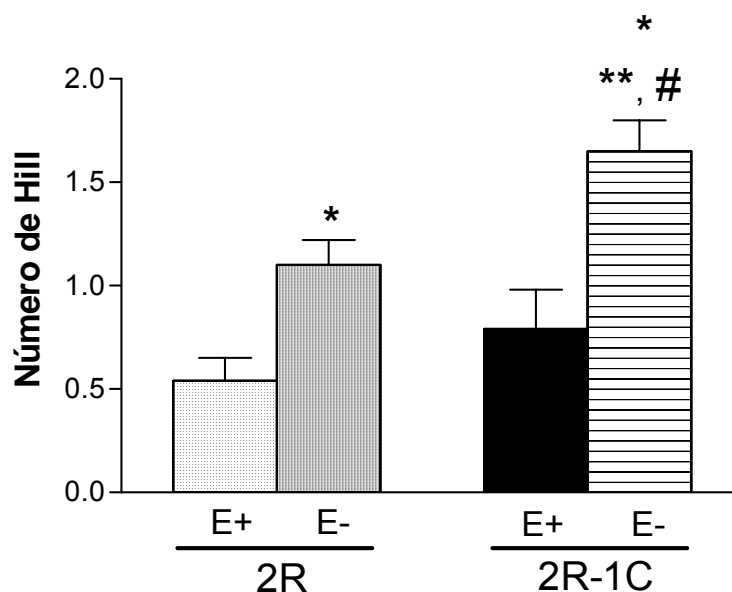


Fig. 7: Análise estatística do Número de Hill de anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C em ausência (E-) ou presença (E+) de camada endotelial. Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos os quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 µmol/L), pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R E+ (*); 2R E-(**); 2R-1C E+(#). $P < 0,001$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, n=9-11).

4.3.2 Participação de metabólitos da NOS sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Com o objetivo de investigar a participação de metabólitos da enzima NOS sobre o relaxamento induzido pelo CNP foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o peptídeo na ausência ou presença do inibidor não-seletivo de isoformas de NOS L-NAME (100 µmol/L), em anéis de aorta de 2R e 2R-1C sem (E-) ou com (E+) de endotélio. Tanto o relaxamento induzido pelo CNP em 2R quanto em 2R-1C, na ausência ou presença de endotélio, pareceram não sofrer alterações significativas em relação à potência e efeito máximo após exposição ao L-NAME quando comparados aos seus controles, como pode ser visualizado nas figuras 8 e 9 (A e B). Porém, no grupo 2R, quando em presença de L-NAME e remoção endotelial, ocorreu uma atenuação da potência do CNP comparado ao controle 2R E+ (pD_2 2R CO E+: $8,30 \pm 0,32$; 2R + L-NAME E-: $6,75 \pm 0,26$, n=7-11). Entretanto, a inibição promovida pelo L-NAME em anéis de aorta de 2R-1C E- mostrou-se mais intensa que em 2R-1C E+, sendo responsável pela diminuição de potência observada na condição de remoção endotelial (pD_2 2R-1C + L-NAME E+: $8,09 \pm 0,23$; 2R-1C + L-NAME E-: $6,75 \pm 0,26$; n=7-9).

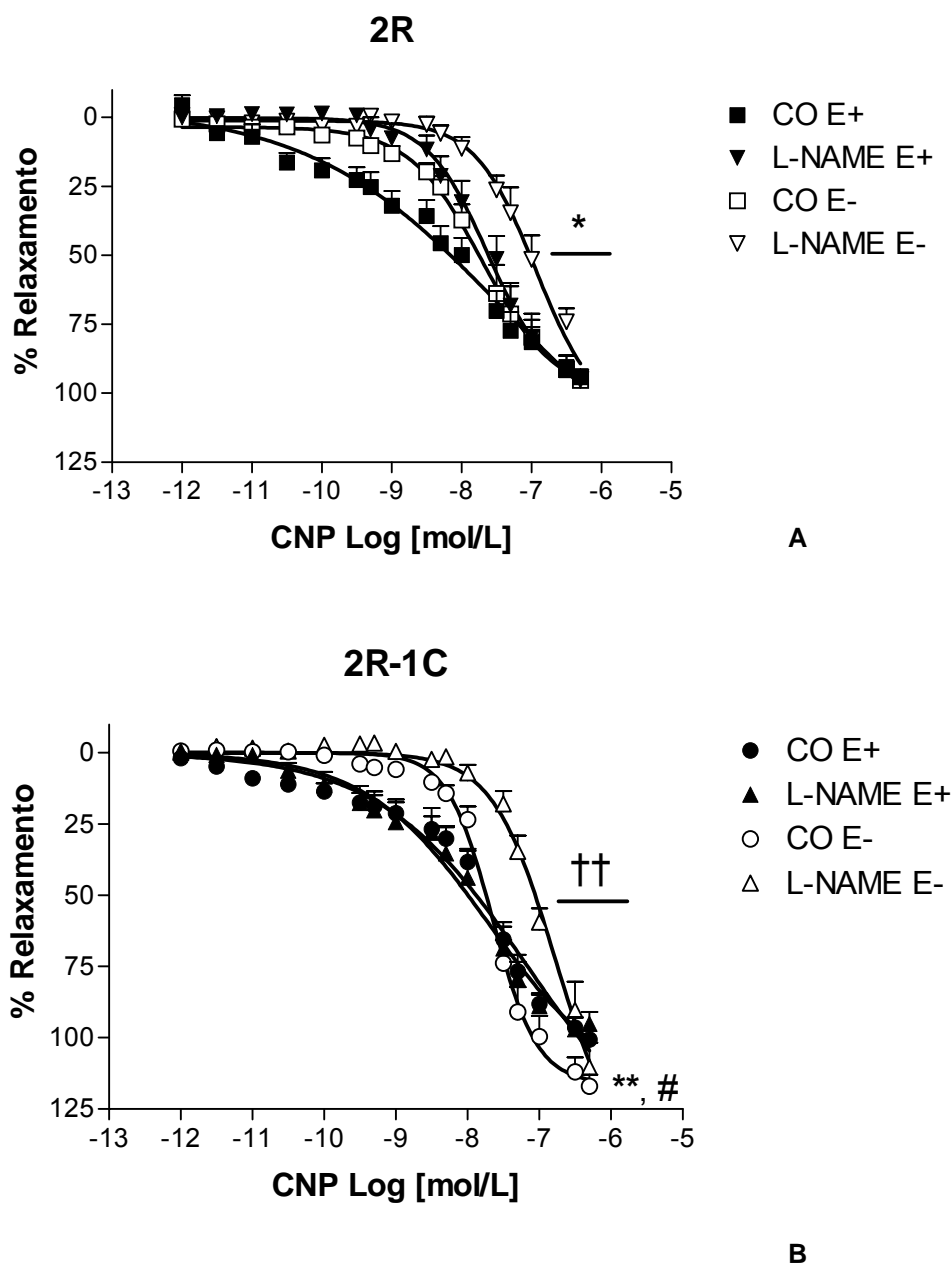


Fig. 8: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta de 2R (**A**) em ausência (CO) ou presença de L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$); e 2R-1C (**B**) em ausência (CO) ou presença de L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$). Os símbolos pretos representam a condição de presença de camada endotelial e os símbolos brancos representam a condição de ausência de camada endotelial. As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R CO E- (**); 2R-1C CO E+ (#); 2R-1C + L-NAME E+ (††). $P < 0,01$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=7-11$).

Em relação à análise de inclinação das curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP, observou-se que além das diferenças existentes pela remoção endotelial tanto em 2R quanto em 2R-1C, apenas em preparações de 2R E+, ocorreu um aumento do número de Hill na presença de L-NAME (CO: $0,54 \pm 0,11$; L-NAME: $1,23 \pm 0,12$; $n=10-11$) quando comparado ao controle (figura 9).

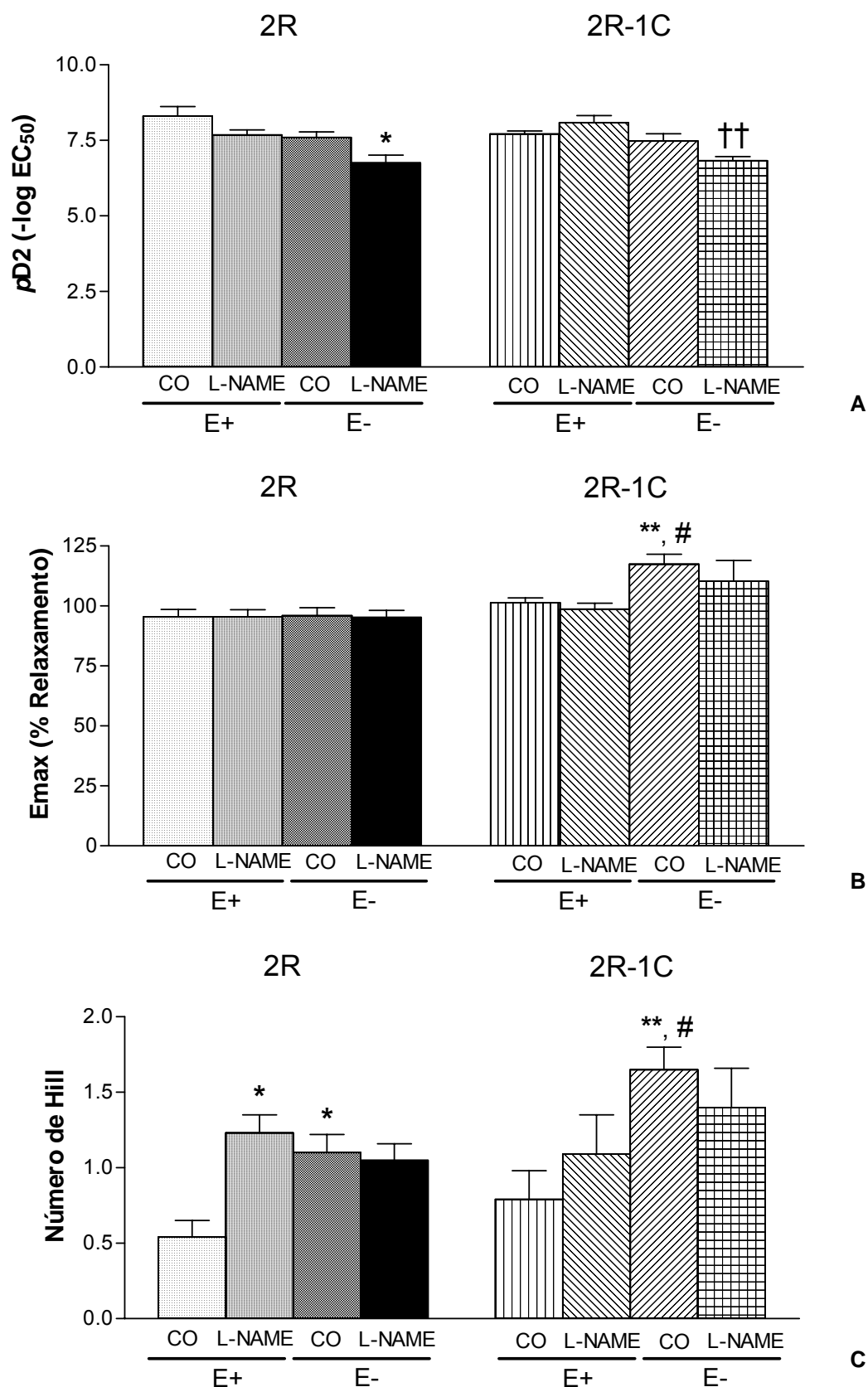


Fig. 9: Análise estatística de pD_2 (A), E_{max} (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E+ e E- de ratos 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$), E+ ou E-, pré-contraídos com Fenilefrina (100 nmol/L), em ausência ou presença de L-NAME. Significativamente diferente de 2R CO E+ (*); 2R CO E- (**); 2R-1C CO E+ (#); 2R-1C + L-NAME E+ (††). $P < 0,01$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=7-11$).

4.3.3 Participação da espécie radicalar NO^0 sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a participação da espécie radicalar NO^0 sobre o relaxamento induzido pelo CNP foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP em ausência ou presença do sequestrador intracelular da espécie NO^0 Hidroxicobalamina (OHCob, 100 $\mu\text{mol/L}$), em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C em presença de camada endotelial (E+). O relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta de 2R em presença de OHCob (figura 10) mostrou-se semelhante àquele da situação controle, não apresentando diferenças significativas em relação à potência ou efeito máximo. Entretanto, no grupo 2R-1C a presença de OHCob promoveu um deslocamento da curva concentração-efeito cumulativa para o CNP em direção à direita, indicando uma diminuição de potência (pD_2 2R-1C CO: $7,71 \pm 0,10$; OHCob: $6,56 \pm 0,37$, $n=7-9$). Além disso, a presença de OHCob em 2R-1C promoveu uma diminuição mais acentuada da potência da curva concentração-efeito cumulativa para o CNP quando comparada ao grupo 2R com OHCob (pD_2 2R + OHCob: $7,76 \pm 0,34$; 2R-1C + OHCob: $6,56 \pm 0,37$; $n=7-10$) e comparada ao grupo 2R CO (pD_2 2R CO: $8,30 \pm 0,32$, $n=11$). Assim também o efeito máximo foi maior em 2R-1C + OHCob (E_{max} 2R CO: $95,49 \pm 3,07$; 2R-1C + OHCob: $114,73 \pm 10,19$, $n=7-11$) mostrou-se maior quando comparado ao controle 2R.

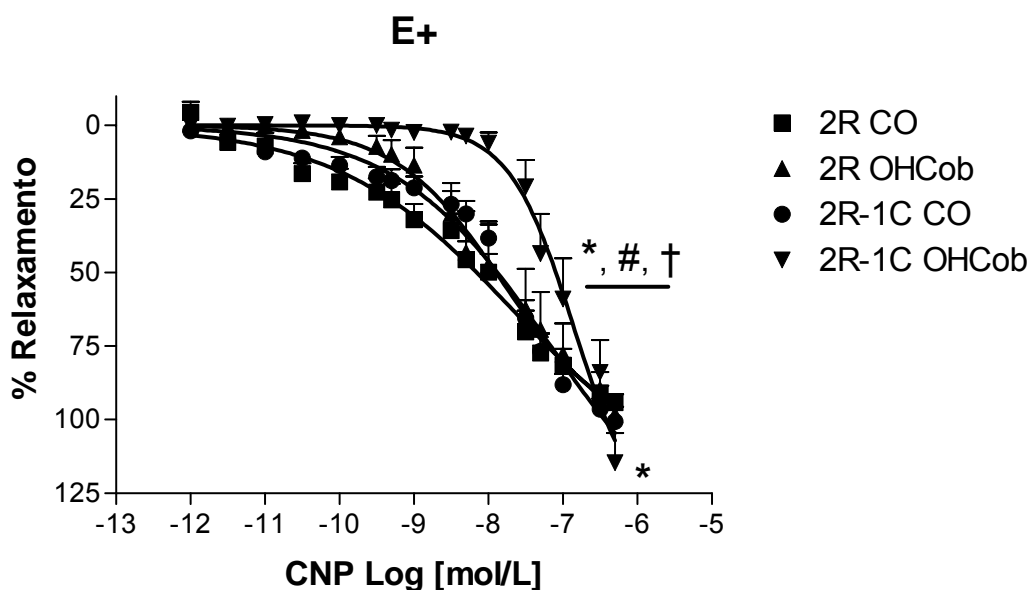


Fig. 10: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em anéis de aorta com endotélio de 2R e 2R-1C, em ausência (CO) ou presença de HidroxicoBALAMINA (OHCob, 100 μ mol/L). As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R-1C CO (#); 2R + OHCob (†). $P < 0,01$ (*One-way Anova*, pós-teste Newman-Keuls, *Two-way Anova*, correção de Bonferroni, $n = 7-11$).

Embora os parâmetros farmacológicos de potência e efeito máximo não tenham apresentado diferenças significativas no grupo 2R, ao analisarmos a inclinação das curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (figura 11) ocorreu um aumento significativo do número de Hill em 2R quando em presença de OHCob (2R CO: $0,54 \pm 0,11$; 2R + OHCob: $1,49 \pm 0,29$, $n = 10-11$), assim como quando comparado o grupo 2R-1C + OHCob (Hill 2R-1C + OHCob: $1,43 \pm 0,18$, $n = 7$). Quando esse parâmetro foi analisado no grupo 2R-1C, não houve diferença significativa em comparação ao grupo controle.

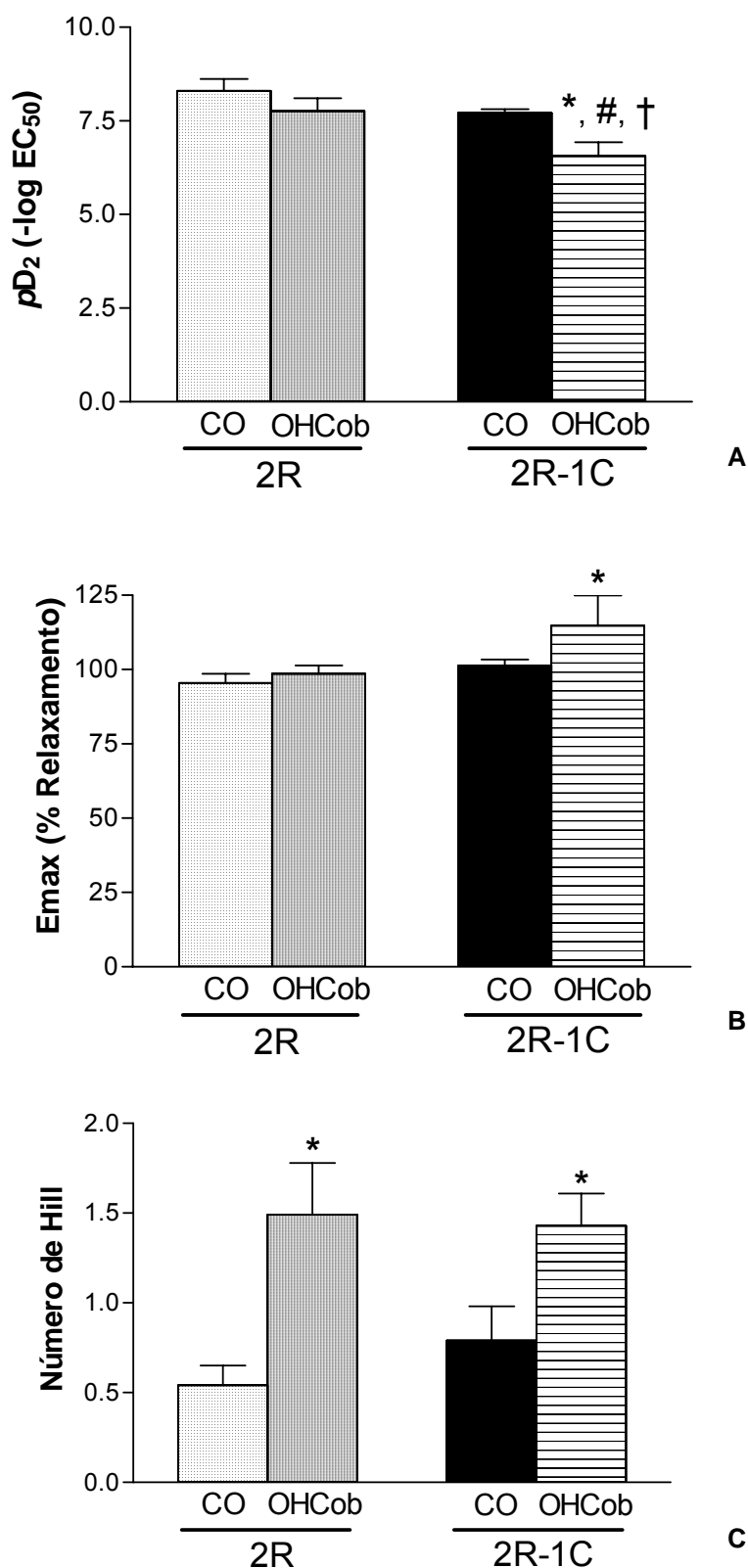


Fig. 11: Análise estatística de pD_2 (A), Emax (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E+ de ratos 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de Hidroxocobalamina (OHcob, 100 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$), pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L), em ausência ou presença de OHcob. Significativamente diferente de 2R CO (*); 2R-1C CO (#); 2R + OHcob (†). $P < 0,01$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=7-11$).

4.3.4 Participação de metabólitos da enzima GCs na mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Com o objetivo de investigar a participação de metabólitos da enzima GCs sobre o relaxamento induzido pelo CNP foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o peptídeo em ausência ou presença do inibidor seletivo de GCs, ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$), em anéis de aorta de 2R e 2R-1C em ausência (E-) ou presença (E+) de endotélio. Em presença de ODQ, o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de 2R E+ sofreu atenuação em sua potência (pD_2 2R E+ CO: $8,30 \pm 0,32$; 2R + ODQ: $7,22 \pm 0,15$; $n=7-11$), assim como ocorreu em 2R + ODQ E- (pD_2 2R + ODQ E-: $6,99 \pm 0,22$, $n=7$) (figura 12). Ao analisarmos o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de 2R1C, além do aumento observado no Emax de 2R-1C E- em relação ao 2R1C E+ e 2R E-, como previamente descrito, percebeu-se uma diminuição de Emax em 2R-1C + ODQ E- quando comparado ao seu controle sem endotélio (Emax 2R-1C CO E-: $117,46 \pm 4,12$; 2R-1C + ODQ E-: $102,65 \pm 6,92$; $n=6-9$).

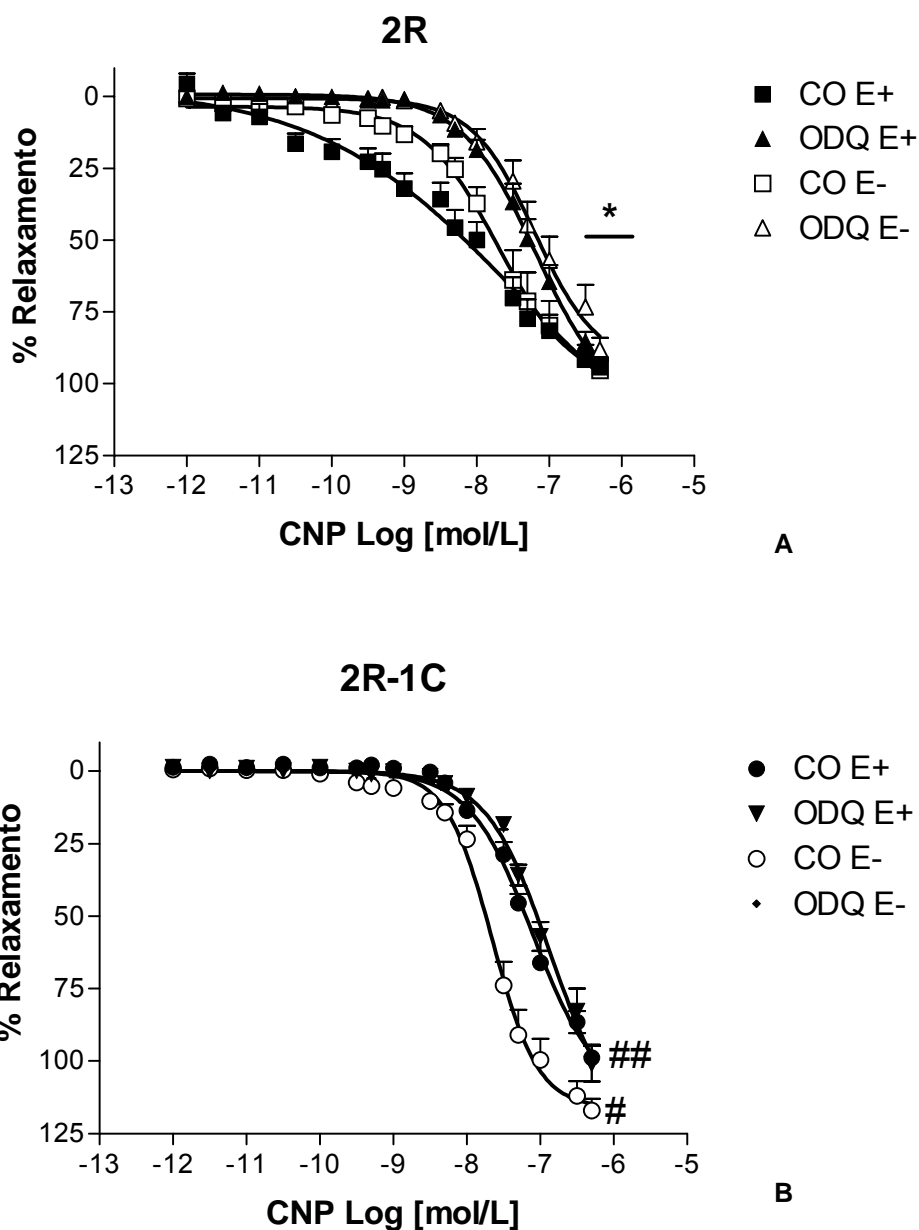


Fig. 12: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em anéis de aorta de 2R (A) em ausência (CO) ou presença de ODQ (1 μ mol/L); e 2R-1C (B) em ausência (CO) ou presença de ODQ (1 μ mol/L). Os símbolos pretos referem-se a anéis de aorta em presença de endotélio (E+) e os símbolos brancos referem-se a anéis de aorta em ausência de endotélio (E-). As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R CO E+ (*); 2R-1C CO E+ (#); 2R-1C CO E- (##). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, n=6-11).

Embora a presença de ODQ não tenha causado alterações significativas quanto à inclinação da curva concentração-efeito cumulativa para o CNP em 2R, esta condição foi suficiente para reduzir o número de Hill da curva concentração-efeito cumulativa para o CNP em 2R-1C E-, fazendo com que a curva tivesse sua inclinação normalizada ao nível do controle E- (figura 13 C).

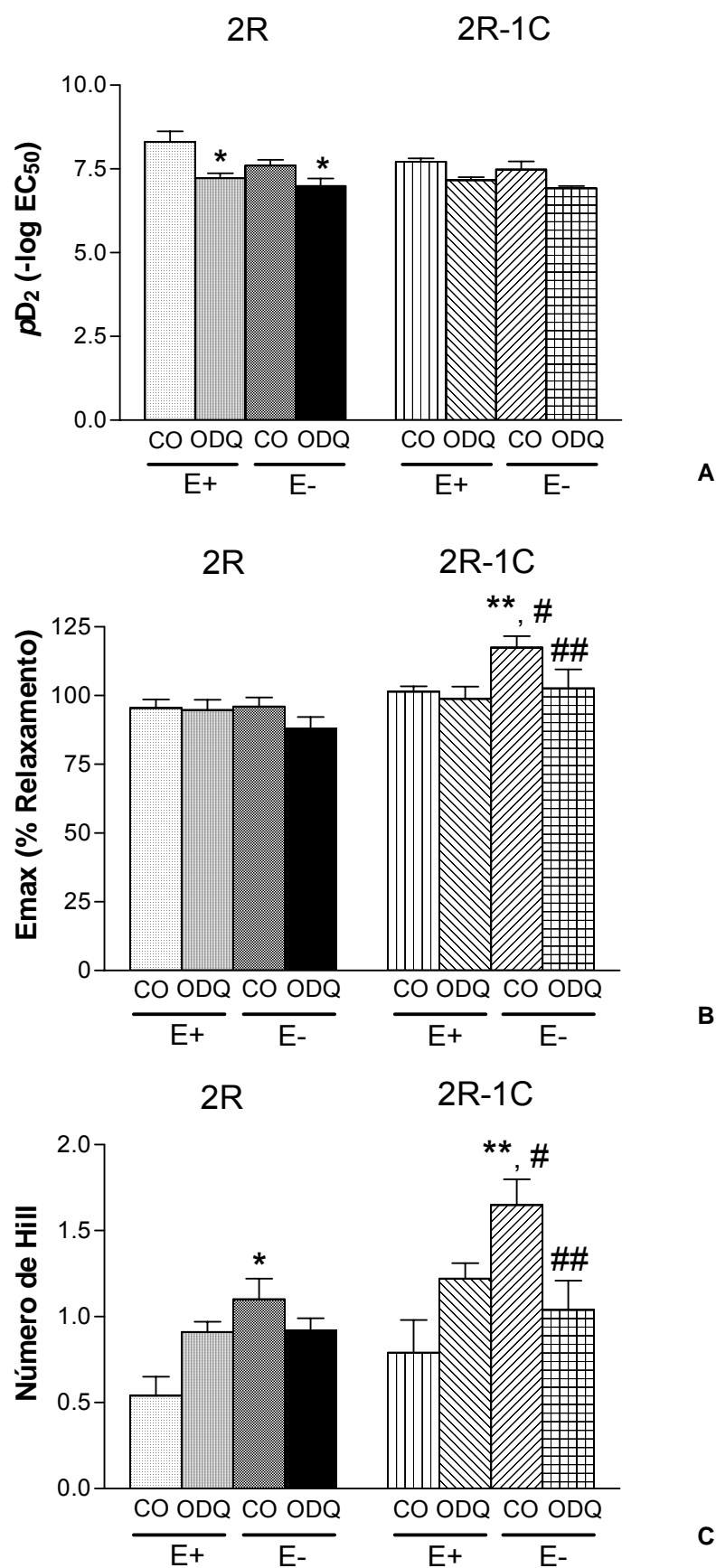


Fig. 13: Análise estatística de pD_2 (A), E_{max} (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E+ e E- de ratos 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$), E+ ou E-, pré-contraídos com Fenilefrina (100 nmol/L), em ausência ou presença de ODQ. Significativamente diferente de 2R CO E+ (*); 2R CO E- (**); 2R-1C CO E+ (#); 2R-1C CO E- (##). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, $n=6-11$).

4.3.5 Participação da proteína quinase dependente de GMPc (GK) sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a participação da GK sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para CNP em presença de inibidor seletivo da GK, Rp-8-Bromo-PET-cGMPS (Rp, 10 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, em ausência (E-) ou presença (E+) de camada endotelial. Como demonstrado na tabela 2 e figuras 14 e 15, em relação à potência da curva concentração-efeito cumulativa induzida pelo CNP, ocorreu diminuição de pD_2 em todos os grupos analisados, tanto em ausência quanto em presença de camada endotelial, quando em comparação ao controle. Entretanto, apenas na condição E- ambos os grupos 2R e 2R-1C tiveram seu E_{max} significativamente diminuído quando em presença de Rp, em comparação ao controle, não sendo alterado na condição E+. Embora as curvas concentração-efeito para o CNP tenham sido modificadas em relação aos parâmetros de potência e eficácia, suas inclinações não sofreram alterações quando comparadas às curvas controle. Assim, apenas no grupo 2R-1C + Rp E- ocorreu aumento do número de Hill em relação ao grupo 2R-1C + Rp E+ (Hill 2R-1C +Rp E+: $0,62 \pm 0,08$; E-: $1,40 \pm 0,17$; n=6-7), além de ter permanecido aumentado em relação ao 2R + Rp E- (Hill Rp E- 2R: $0,77 \pm 0,05$; 2R-1C: $1,40 \pm 0,17$; n=7).

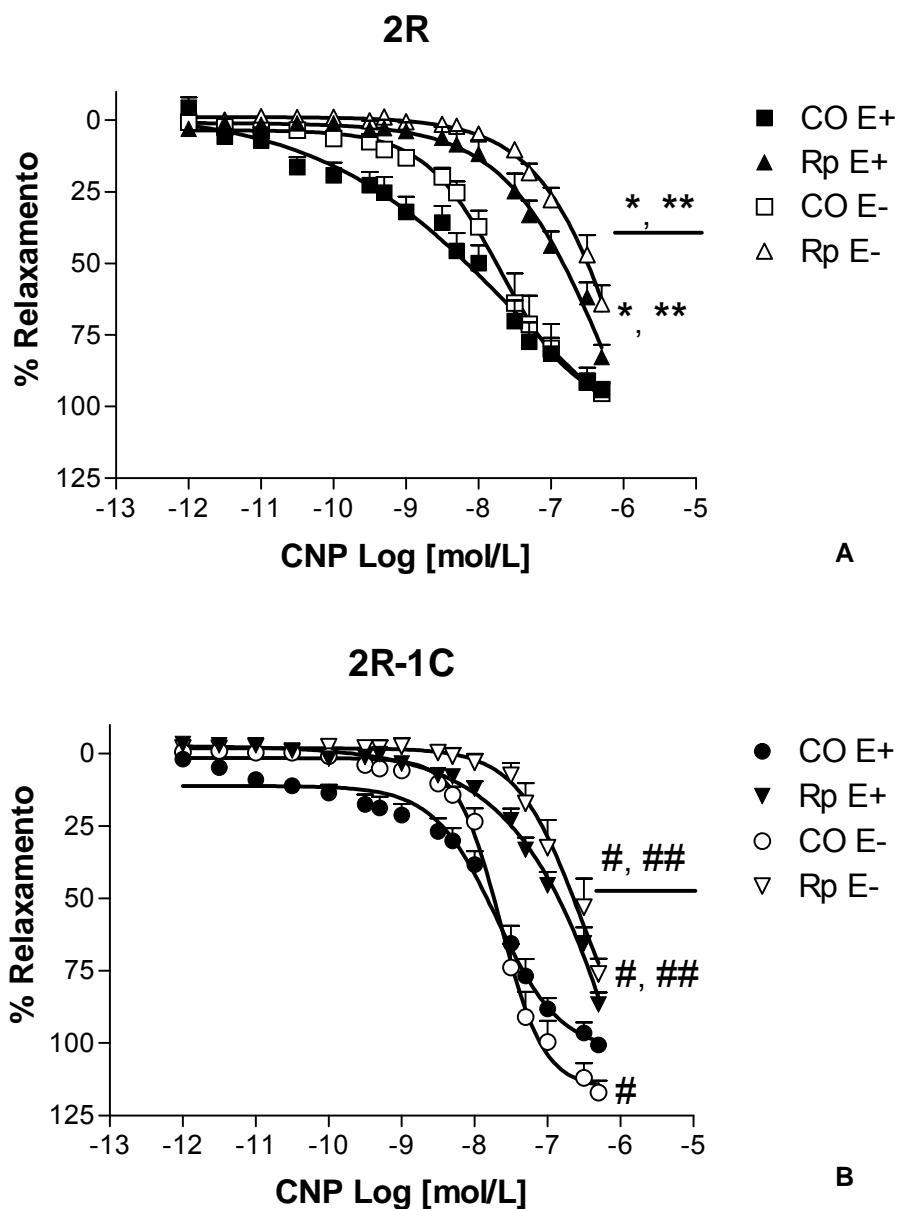


Fig. 14: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta de 2R (A) em ausência (CO) ou presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS (Rp, 10 $\mu\text{mol/L}$); e 2R-1C (B) em ausência (CO) ou presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS (Rp, 10 $\mu\text{mol/L}$). Os símbolos pretos referem-se a anéis de aorta em presença de endotélio (E+) e os símbolos brancos referem-se a anéis de aorta em ausência de endotélio (E-). As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R CO E+ (*); 2R CO E- (**); 2R-1C CO E+ (#); 2R-1C CO E- (##). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n = 6-11$).

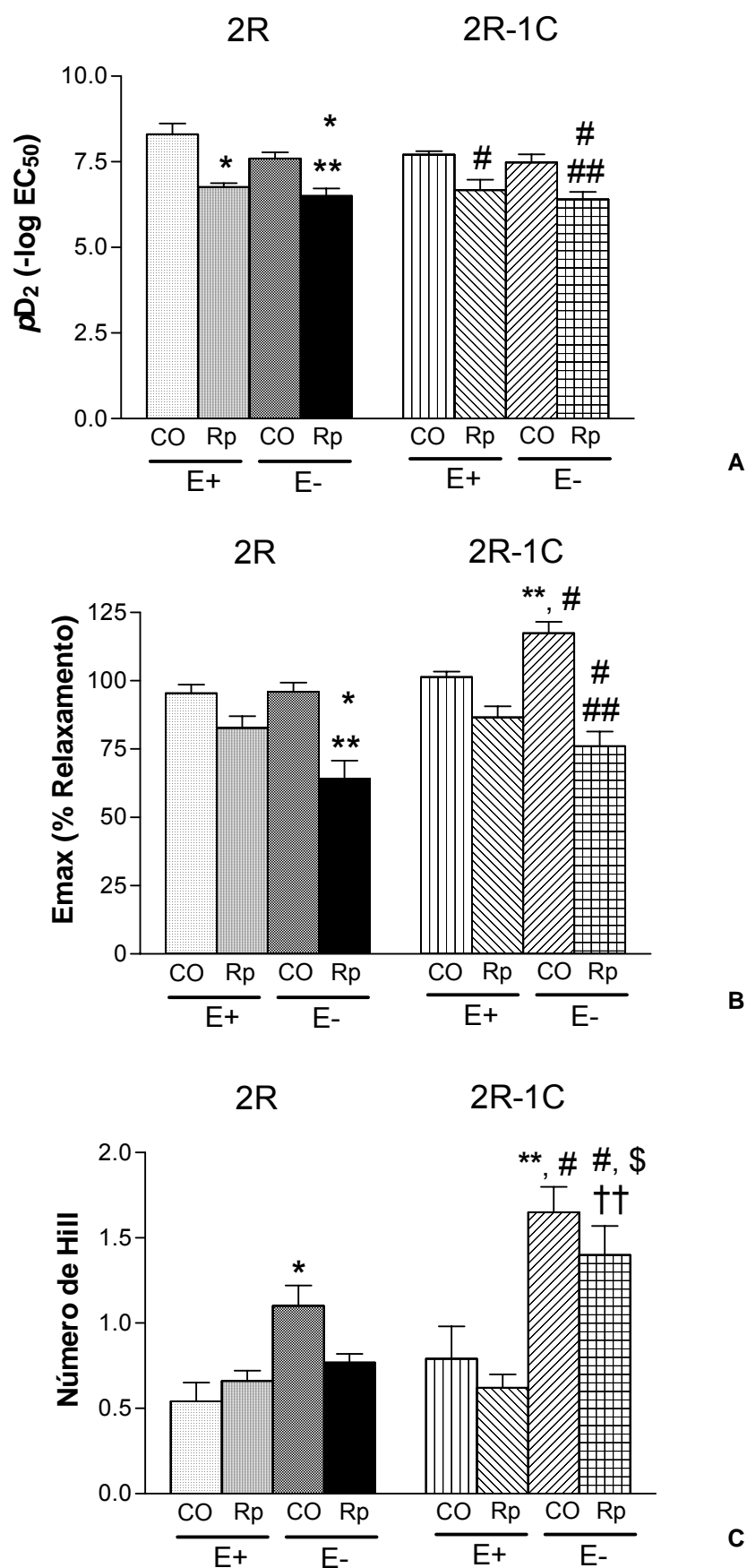


Fig. 15: Análise estatística de pD_2 (A), Emax (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E+ e E- de ratos 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de Rp-8-Br-PET-cGMS (Rp, 10 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$), E+ ou E-, pré-contraídos com Fenilefrina (100 nmol/L), em ausência ou presença de Rp. Significativamente diferente de 2R CO E+ (*); 2R CO E- (**); 2R-1C CO E+ (#); 2R-1C CO E- (##); 2R Rp E- (\$) ; 2R-1C Rp E+ (††). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=6-11$).

Tabela 2: Participação da GK sobre a modulação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos 2R e 2R-1C – valores de pD_2 , E_{max} e número de Hill.

Grupos	pD_2		E_{max}		Hill	
	CO	Rp	CO	Rp	CO	Rp
2R E+	8,30 ± 0,32	6,76 ± 0,12*	95,49 ± 3,07	82,74 ± 4,26	0,54 ± 0,11	0,66 ± 0,06
2E E-	7,60 ± 0,18	6,50 ± 0,22***	95,96 ± 3,34	64,19 ± 6,57*,**	1,10 ± 0,12*	0,77 ± 0,05
2R-1C E+	7,71 ± 0,10	6,67 ± 0,31#	101,39 ± 2,04	86,64 ± 4,06	0,79 ± 0,19	0,62 ± 0,08
2R-1C E-	7,48 ± 0,24	6,40 ± 0,22#.##	117,46 ± 4,12**#	76,13 ± 5,27#.##	1,65 ± 0,15**#	1,40 ± 0,17#††

Diferente de 2R E+ (*); 2R E- (**); 2R-1C E+ (#); 2R-1C E- (##); 2R Rp E- (\$); 2R-1C Rp E+ (††). $P < 0,01$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=6-11$).

2R ratos normotensos dois rins

2R-1C ratos hipertensos dois rins - um clipe

E+ presença de endotélio

E- ausência de endotélio

CO controle

Rp inibidor de GK (10 $\mu\text{mol/L}$)

4.3.6 Participação da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP

Para avaliarmos a participação da SERCA sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o peptídeo em ausência ou presença de inibidor seletivo de SERCA, Tapsigargina (Tapsig, 1 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C desprovidos de camada endotelial (E-) (figuras 16 e 17). Em presença de Tapsigargina, ocorreu atenuação de potência em 2R e 2R-1C, comparados aos seus respectivos controles E- (pD_2 2R CO: 7,60 ± 0,18; 2R + Tapsig: 6,37 ± 0,24; 2R-1C CO: 7,48 ± 0,24; 2R-1C + Tapsig: 6,36 ± 0,28, $n=5-11$). Assim também evidenciou-se redução da potência do CNP em 2R-1C + Tapsig comparado a 2R E-. Entretanto, ao analisarmos o efeito máximo, observou-se que em presença de Tapsigargina, ocorreu redução do E_{max} apenas em 2R-1C E- (E_{max} 2R-1C CO: 117,46 ± 4,12; 2R-1C + Tapsig: 94,49 ± 9,04, $n=5-9$), que se tornou normalizado em relação ao controle normotenso. Contudo, a inibição da SERCA não foi suficiente para promover alterações significativas em relação à inclinação da curva concentração-efeito do CNP em ambos os grupos.

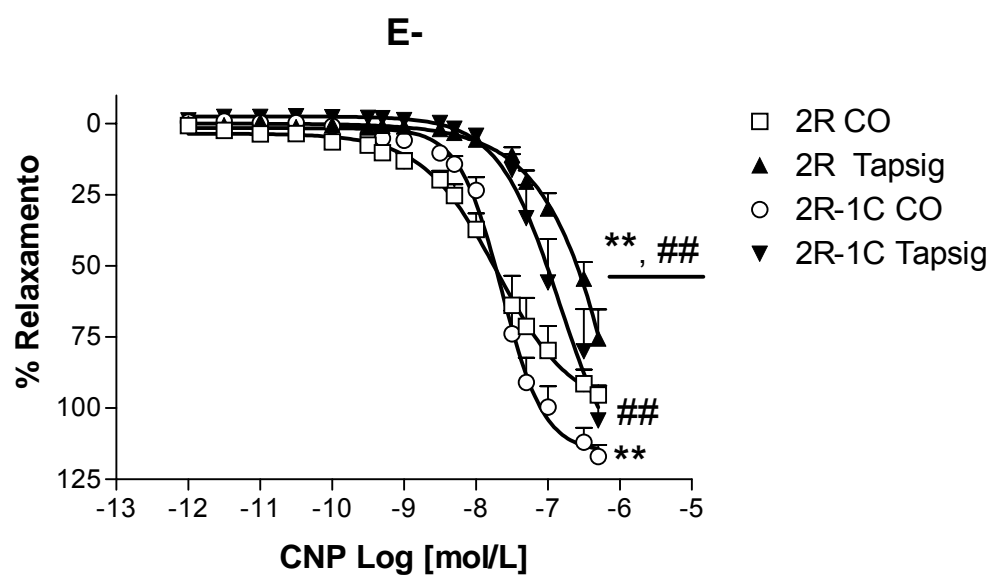


Fig. 16: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 μmol/L) em anéis de aorta desprovidos de endotélio (E-) de 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de Tapsigargina (Tapsig, 1 μmol/L). As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R CO E- (**); 2R-1C CO E- (##). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, n= 5-11).

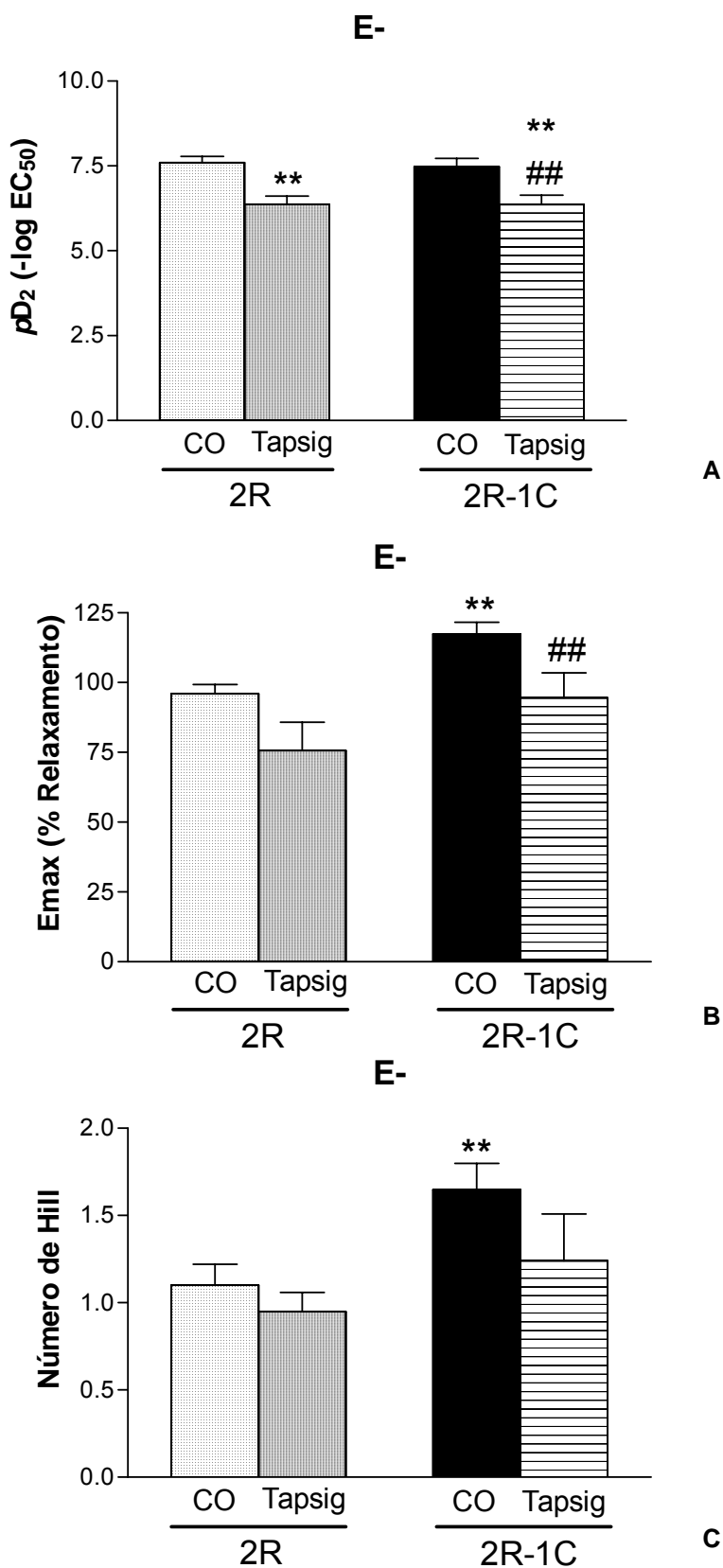


Fig. 17: Análise estatística de pD_2 (A), E_{max} (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E- de ratos 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de Tapsigargin (Tapsig, 1 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 $\mu\text{mol/L}$ a 0,5 $\mu\text{mol/L}$) E-, pré-contraídos com Fenilefrina (100 nmol/L), em ausência ou presença de Tapsig. Significativamente diferente de 2R CO E- (**); 2R-1C CO E- (##). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=5-11$).

4.3.7 Participação dos receptores NPR-A/B sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores NPR-A/B sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para CNP em ausência ou presença de antagonista não seletivo de NPR-A/B, Anantin (0,1 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, em ausência (E-) ou presença (E+) de camada endotelial. Em relação aos parâmetros farmacológicos analisados de potência, efeito máximo e inclinação da curva concentração-efeito do agonista, nenhuma alteração significativa em relação à presença do antagonista Anantin foi encontrada quando comparada a situação controle no grupo 2R. Contudo, ao compararmos 2R CO E+ e 2R + Anantin E- observou-se que a potência do CNP no segundo grupo foi menor (pD_2 2R CO E+: $8,30 \pm 0,32$; 2R + Anantin E-: $7,07 \pm 0,16$, $n=7-11$). Entretanto, no grupo 2R-1C o perfil de inibição em preparações desprovidas de endotélio foi diferente ao analisarmos o E_{max} e o número de Hill, ou seja, o E_{max} de 2R-1C + Anantin E- permaneceu maior que aquele observado em 2R + Anantin E- (E_{max} Anantin E- 2R: $87,09 \pm 4,17$; 2R-1C: $113,58 \pm 10,42$; $n=7$), enquanto que o número de Hill de 2R-1C + Anantin E- mostrou-se aumentado quando comparado a 2R-1C + Anantin E+ (Hill 2R-1C Anantin E+: $0,68 \pm 0,08$; E-: $1,62 \pm 0,44$; $n=7$) e 2R-1C CO E+ (Hill 2R-1C CO E+: $0,79 \pm 0,19$, $n=9$).

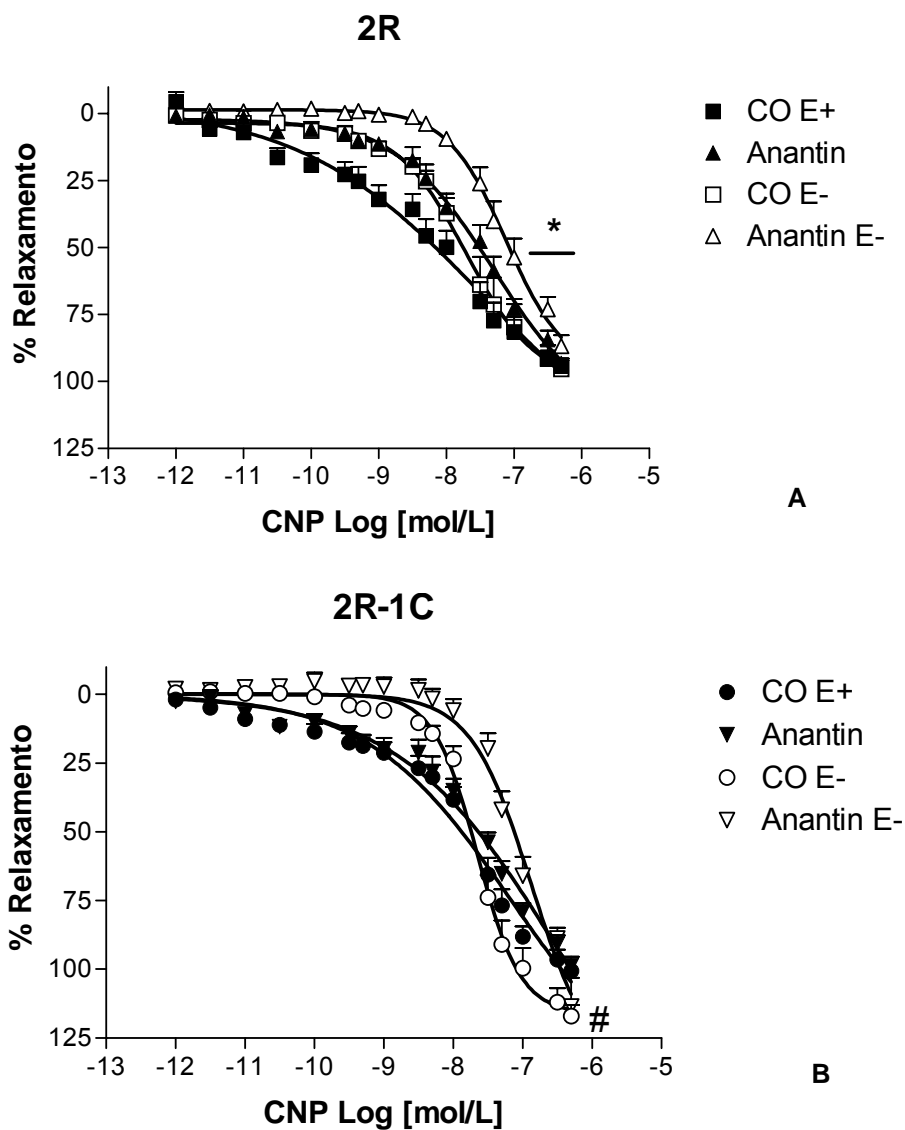


Fig. 18: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta de 2R (A) em ausência (CO) ou presença de Anantín (Ana, 0,1 $\mu\text{mol/L}$); e 2R-1C (B) em ausência (CO) ou presença de Anantín (Ana, 0,1 $\mu\text{mol/L}$). Os símbolos pretos referem-se a anéis de aorta em presença de endotélio (E+) e os símbolos brancos referem-se a anéis de aorta em ausência de endotélio (E-). As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R-1C CO E+ (#). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n = 7-11$).

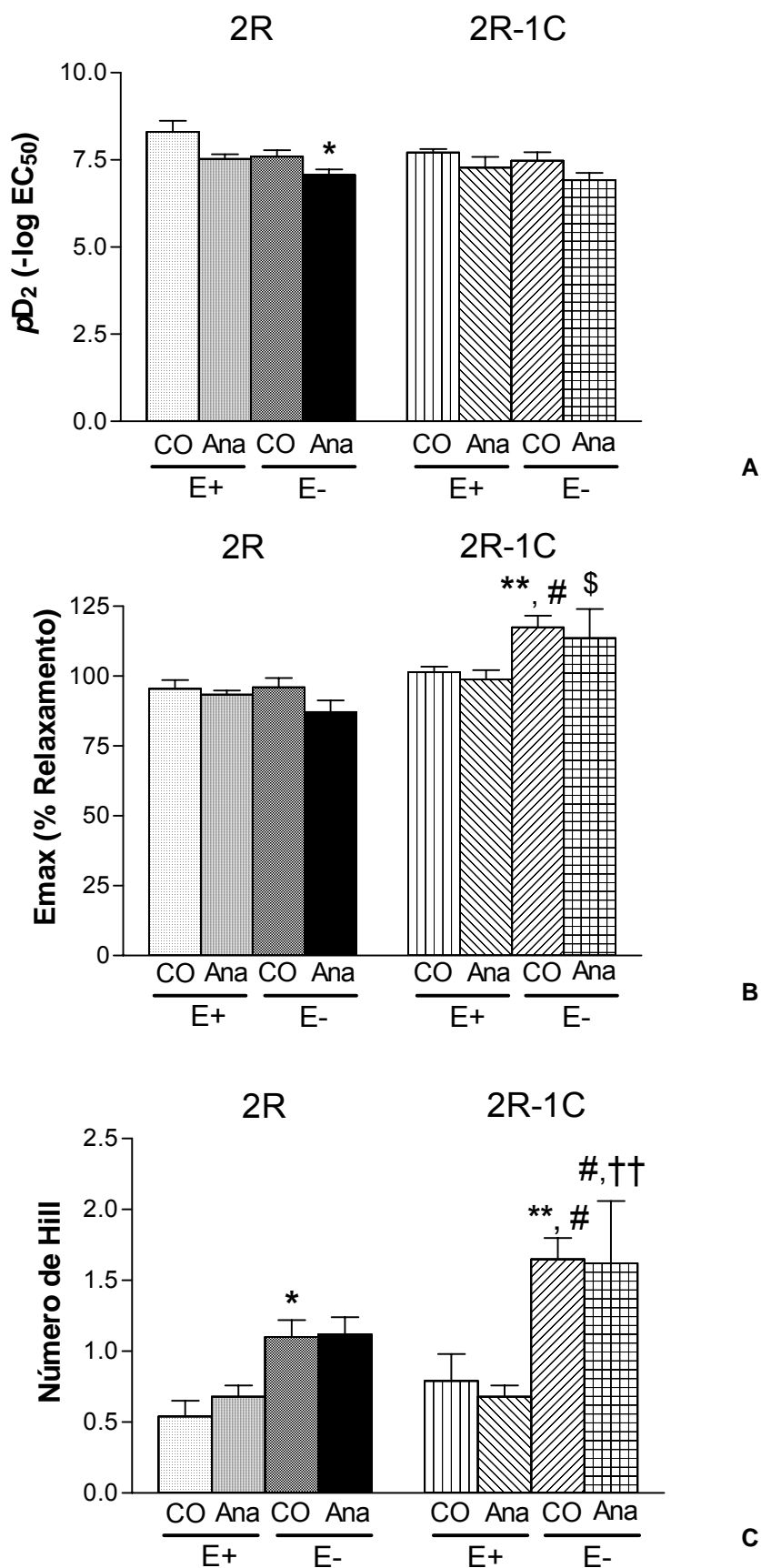


Fig. 19: Análise estatística de pD_2 (A), Emax (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E+ e E- de ratos 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de Anantín (Ana, 0,1 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$), E+ ou E-, pré-contraídos com Fenilefrina (100 nmol/L), em ausência ou presença de Anantín. Significativamente diferente de 2R CO E+ (*); 2R CO E- (**); 2R-1C CO E+ (#); 2R Ana E- (\$) ; 2R-1C Ana E+ (††). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=7-11$).

4.3.8 Participação dos canais para K⁺ sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a participação dos canais K⁺ sobre o relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP sobre pré-contracção com Fenilefrina (PE, 100 nmol/L) ou alta concentração extracelular de KCl (45 mmol/L), em anéis de aorta de 2R e 2R-1C (figura 20 e 21), em ausência (E-) ou presença (E+) de endotélio. Observou-se que em ambos os grupos 2R e 2R-1C, a pré-contracção desencadeada pelo KCl promoveu uma diminuição na potência e no efeito máximo do relaxamento induzido pelo CNP, tanto em preparações em ausência ou presença de camada endotelial, não alterando o número de Hill das curvas quando comparados aos controles. Entretanto, em preparações cuja a pré-contracção foi induzida por KCl em 2R-1C E- o valor de Hill foi maior que aquele encontrado em KCl 2R E- (Hill KCl E- 2R: $0,90 \pm 0,15$; 2R-1C: $1,59 \pm 0,27$; n=7). Os valores de pD_2 , E_{max} e número de Hill são listados na tabela 3.

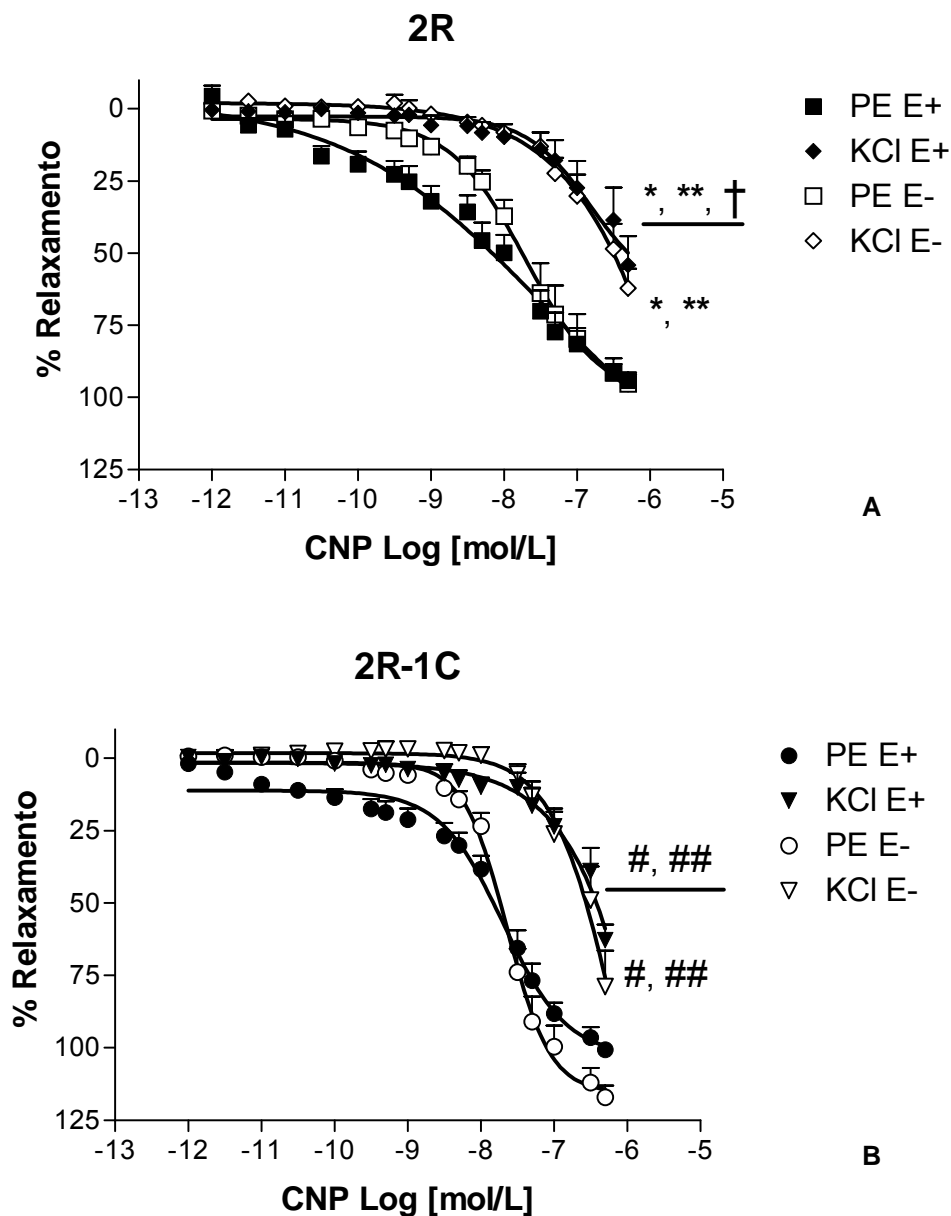


Fig. 20: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em anéis de aorta sobre pré-contracção com fenilefina (PE, 100 nmol/L) ou KCl (45 mmol/L) em 2R (A) e 2R-1C (B). Os símbolos pretos referem-se a anéis de aorta em presença de endotélio (E+) e os símbolos brancos referem-se a anéis de aorta em ausência de endotélio (E-). A concentração utilizada para pré-contracção com KCl foi obtida a partir de uma curva concentração-efeito cumulativa para KCl, utilizando-se a concentração equivalente à EC_{50} do agente contrátil. As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraidas com PE ou KCl. Significativamente diferente de 2R CO E+ (*); 2R CO E- (**); 2R KCl E+ (†); 2R-1C CO E+ (#); 2R-1C CO E- (##). $P < 0,01$ (One-way Anova, pós-teste Newman Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=7-11$).

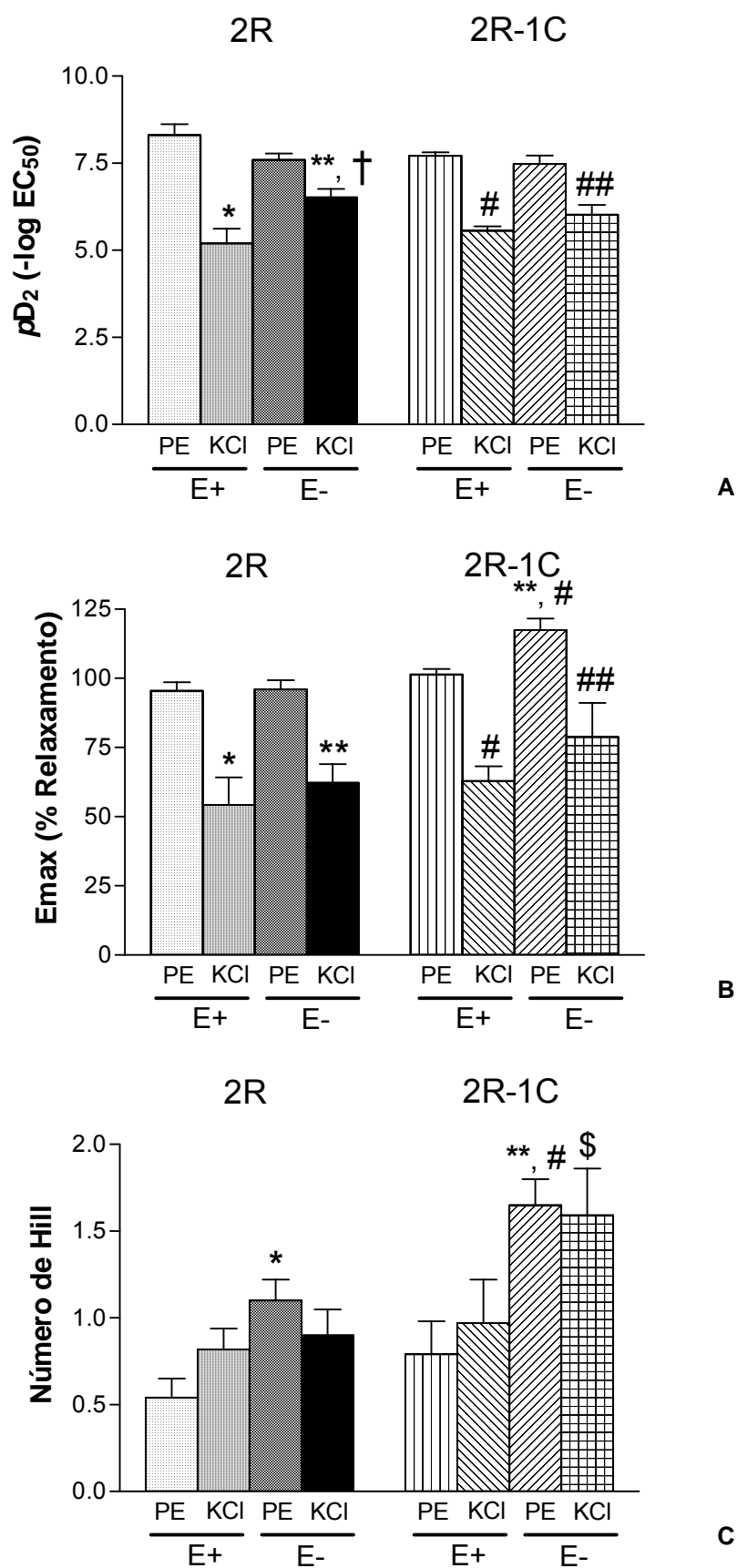


Fig. 21: Análise estatística de pD_2 (A), $Emax$ (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E+ e E- de ratos 2R e 2R-1C sob pré-contracção com Fenilefrina (PE, 100 nmol/L) ou cloreto de potássio (KCl, 45 mmol/L). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L), E+ ou E-, pré-contráidos com PE ou KCl. Significativamente diferente de 2R CO E+ (*); 2R CO E- (**); 2R-1C CO E+ (#); 2R-1C CO E- (##); 2R KCl E+ (†); 2R KCl E- (\$). $P < 0,01$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, n=7-11).

Tabela 3: Participação de canais K^+ sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos 2R e 2R-1C – valores de pD_2 , E_{max} e número de Hill.

Grupos	pD_2		E_{max}		Hill	
	PE	KCl	PE	KCl	PE	KCl
2R E+	8,30±0,32	5,20±0,42*	95,49±3,07	54,21±10,00*	0,54±0,11	0,82±0,12
2E E-	7,60±0,18	6,52±0,24***†	95,96±3,34	62,19±6,82***	1,10±0,12	0,90±0,15
2R-1C E+	7,71±0,10	5,56±0,13 [#]	101,39±2,04	62,84±5,37 [#]	0,79±0,19	0,97±0,25
2R-1C E-	7,48±0,24	6,02±0,28 ^{##}	117,46±4,12	78,77±12,30 ^{##}	1,65±0,15	1,59±0,27 ^{#,§}

A concentração utilizada para pré-contracção com KCl foi obtida a partir de uma curva concentração-efeito cumulativa para KCl, utilizando-se a concentração equivalente à EC_{50} do agente contrátil. Diferente de 2R E+ (*); 2R E- (**); 2R-1C E+ (#); 2R-1C E- (##). $P < 0,01$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, n=7-11).

4.3.9 Participação dos canais BK_{Ca} sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a participação dos canais BK_{Ca} sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, curvas concentração-efeito cumulativas para o peptídeo foram realizadas em ausência ou presença de inibidor seletivo de BK_{Ca} , Paxiline (1 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta com camada endotelial intacta (E+) de ratos 2R e 2R-1C. Desta forma, observou-se que apenas em preparações E+ de animais 2R ocorreu redução da potência do CNP quando em presença do inibidor seletivo de BK_{Ca} (pD_2 2R CO: $8,30 \pm 0,32$; 2R + Pax: $7,01 \pm 0,25$, n=6-11), o que não ocorreu em preparações de animais hipertensos. Assim também, a potência do CNP observada em 2R-1C + Paxiline (pD_2 2R-1C + Pax: $7,13 \pm 0,27$, n=6) foi menor que aquela em 2R CO. Entretanto, nem o efeito máximo ou número de Hill se mostraram alterados pela presença de Paxiline (figuras 22 e 23).

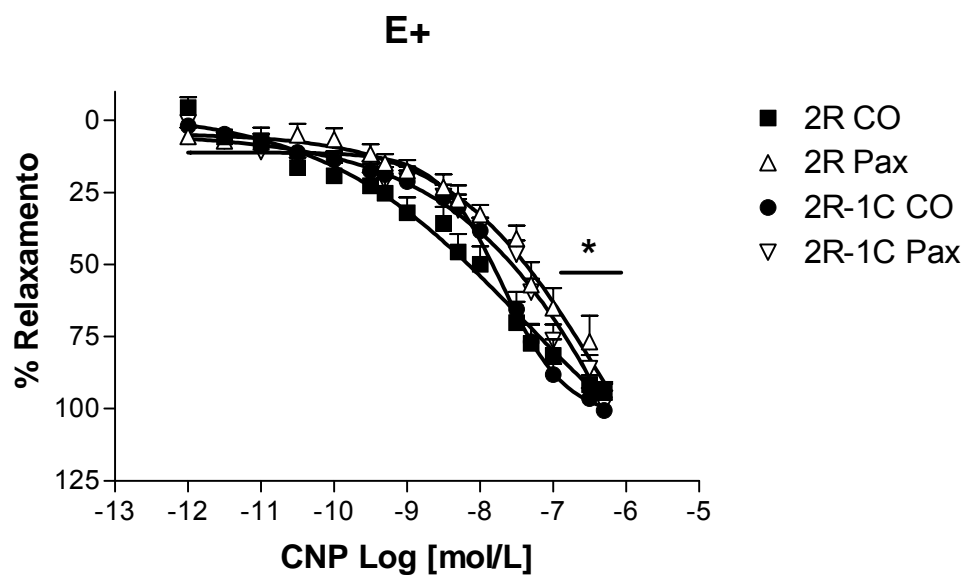


Fig. 22: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em anéis de aorta com camada endotelial (E+) de 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de Paxilina (Pax, 1 μ mol/L). As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R CO E+ (*). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, n= 6-11).

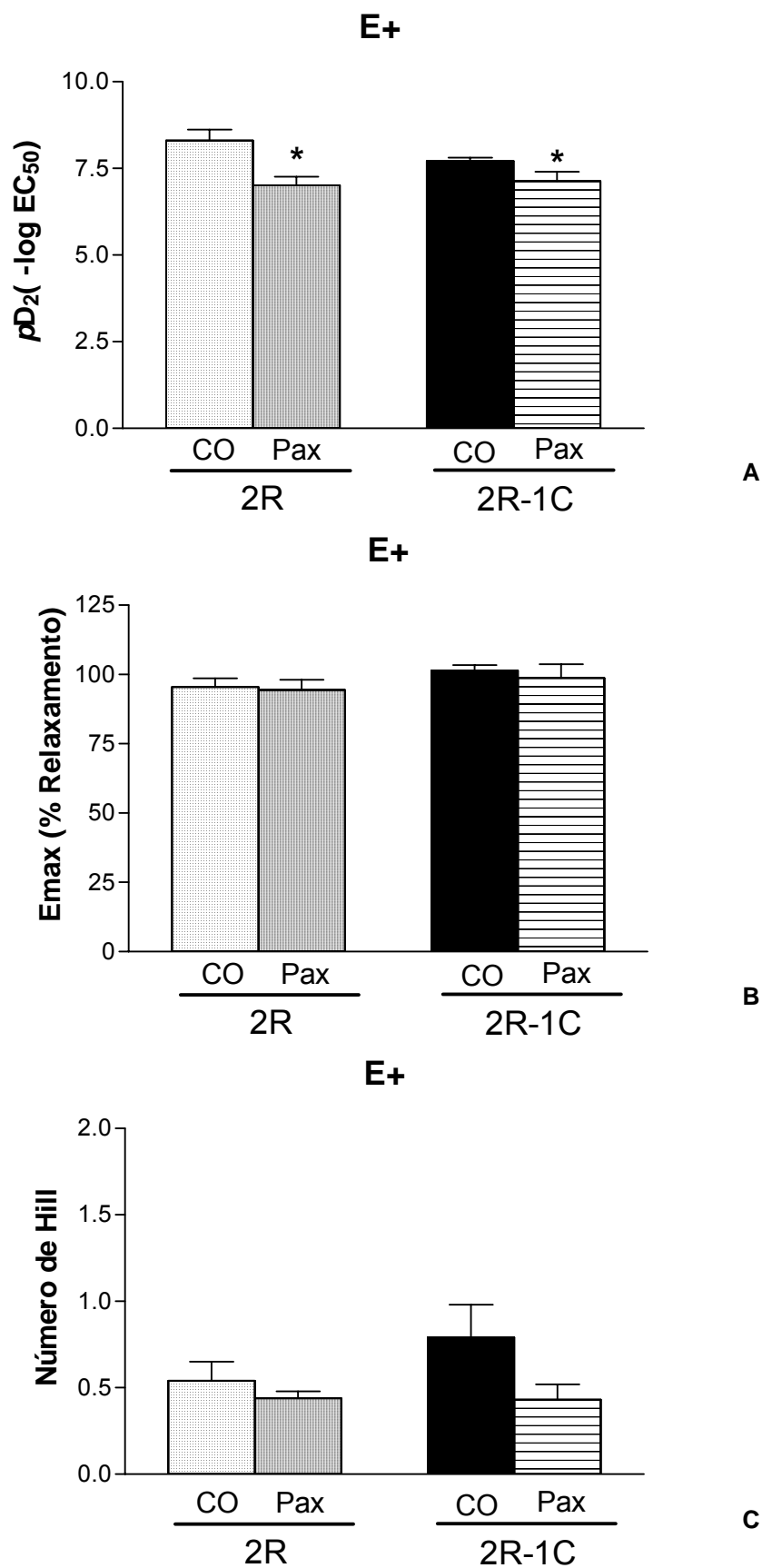


Fig. 23: Análise estatística de pD_2 (A), Emax (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E+ de ratos 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de Paxilina (Pax, 1 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$), E+ pré-contraídos com Fenilefrina (100 nmol/L), em ausência ou presença de Paxilina. Significativamente diferente de 2R CO E+ (*). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, n=6-11).

4.3.10 Participação dos canais SK_{Ca} sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a participação de canais SK_{Ca} sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o peptídeo em ausência ou presença de inibidor seletivo de SK_{Ca} , Apamina (Apa, mol/L), em anéis de aorta com endotélio de ratos 2R e 2R-1C. Neste contexto, a presença do inibidor seletivo de SK_{Ca} , Apamina promoveu redução da potência do CNP em preparações E+ de 2R (pD_2 2R CO: $8,30 \pm 0,32$; 2R + Apamina: $6,66 \pm 0,52$, $n=6-11$), não alterando o relaxamento observado em preparações de animais hipertensos. Assim também ocorreu atenuação da potência do CNP em 2R-1C + Apamina quando comparado ao controle normotenso (pD_2 2R-1C + Apamina: $6,97 \pm 0,24$, $n=6$). Entretanto, o efeito máximo e o número de Hill não se mostraram alterados pela presença de Apamina em ambos os grupos.

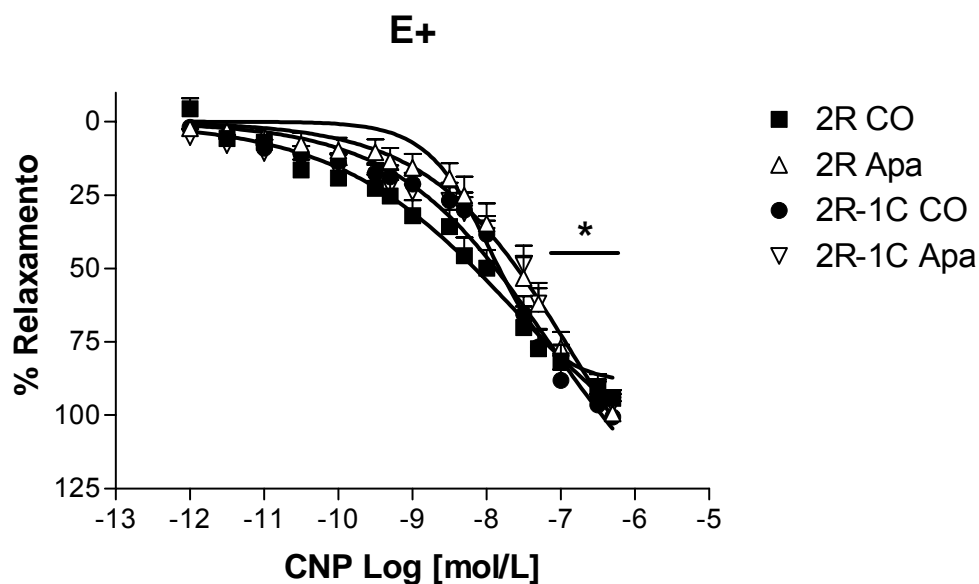


Fig. 24: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em anéis de aorta com camada endotelial (E+) de 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de Apamina (Apa, 1 μ mol/L). As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R CO E+ (*). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=6-11$).

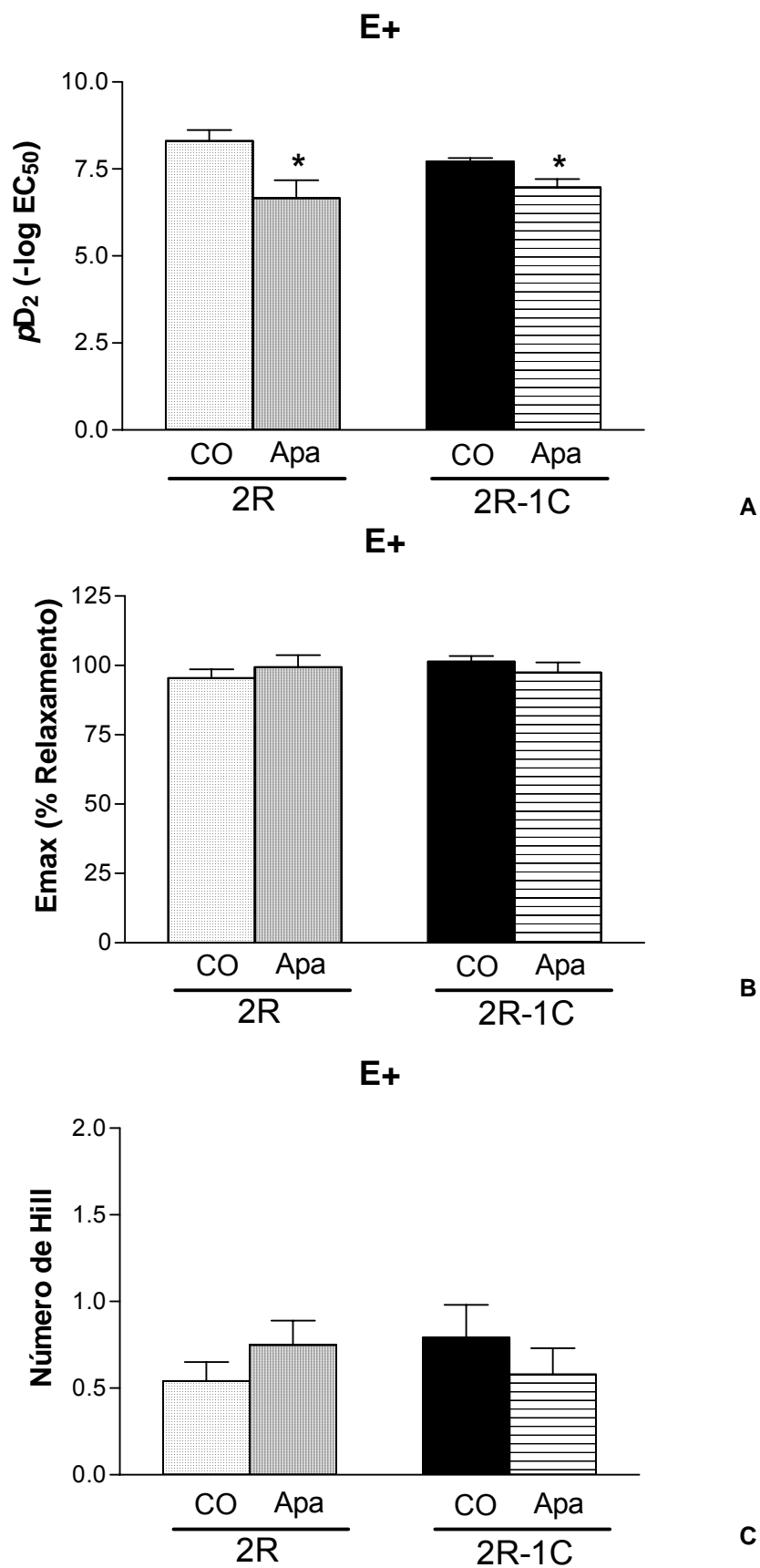


Fig. 25: Análise estatística de pD_2 (A), Emax (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E+ de ratos 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de Apamina (Apa, 1 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 $\mu\text{mol/L}$ a 0,5 $\mu\text{mol/L}$), E+ pré-contraídos com Fenilefrina (100 nmol/L), em ausência ou presença de Apamina. Significativamente diferente de 2R CO E+ (*). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=6-11$).

4.3.11 Participação dos canais K_{ATP} sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Com o objetivo de avaliar a participação dos canais K_{ATP} sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o peptídeo na presença de inibidor seletivo de canais K_{ATP} , Glibenclamida (Glib, 3 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta com camada endotelial intacta, de ratos 2R e 2R-1C. Desta forma, observou-se que a presença de Glibenclamida não promoveu alterações significativas em relação aos controles, em ambos os grupos 2R e 2R-1C.

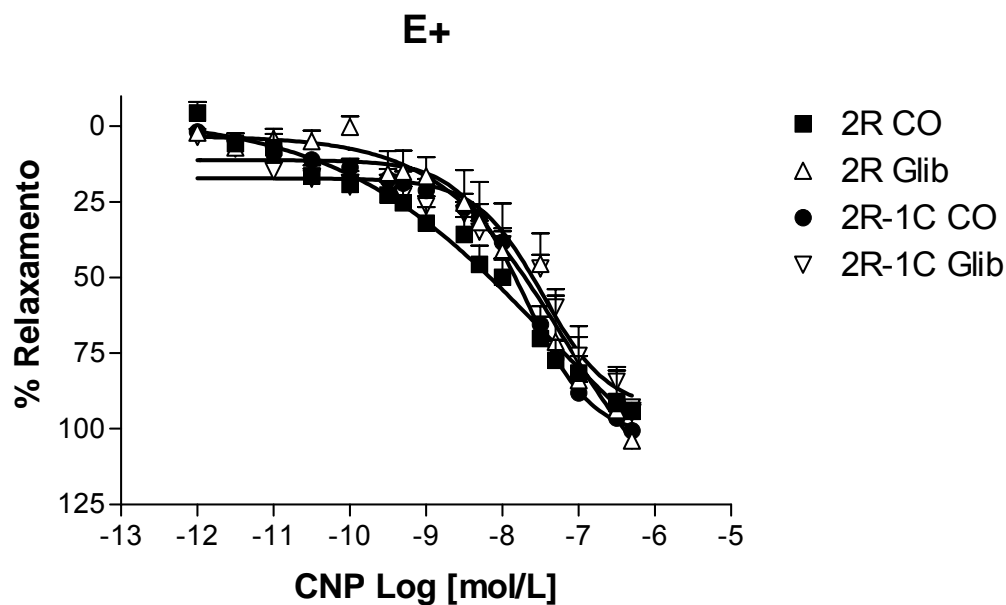


Fig. 26: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta com camada endotelial (E+) de 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de Glibenclamida (Glib, 1 $\mu\text{mol/L}$). As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R CO E+ (*). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n = 5-11$).

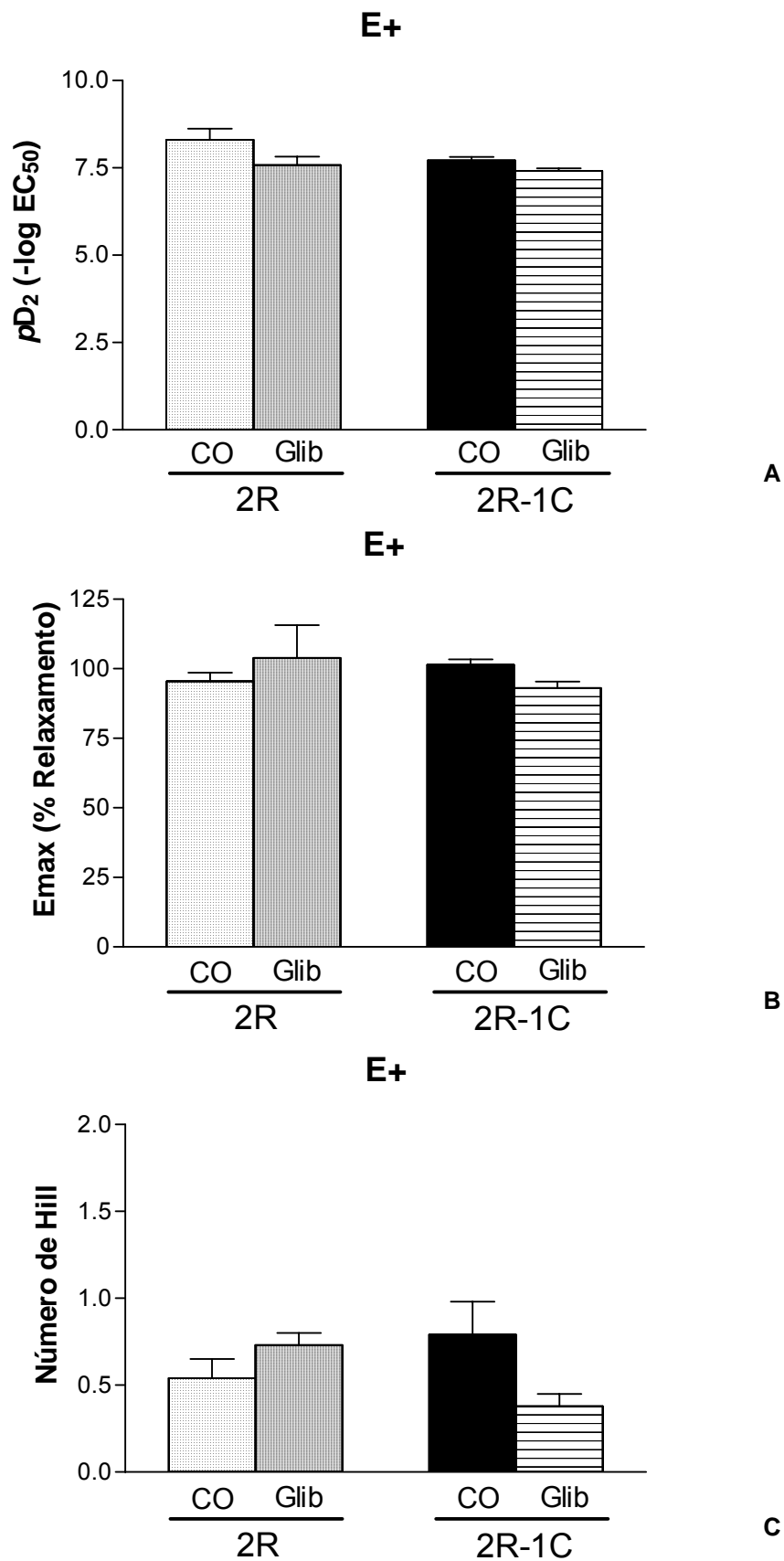


Fig. 27: Análise estatística de pD_2 (A), E_{max} (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E+ de ratos 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de Glibenclamida (Glib, 1 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$), E+ pré-contraídos com Fenilefrina (100 nmol/L), em ausência ou presença de Glibenclamida. Significativamente diferente de 2R CO E+ (*). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=5-11$).

4.3.12 Participação dos canais K_v sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a participação dos canais K_v sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP em anéis de aorta com endotélio de ratos 2R e 2R-1C em presença de inibidor seletivo de K_v , 4-aminopiridina (4-AP, 1 mmol/L). Assim, em preparações de 2R-1C E+ em presença de 4-AP ocorreu uma diminuição da potência do CNP apenas quando comparado ao controle normotenso (pD_2 2R CO: $8,30 \pm 0,32$; 2R-1C + Apa: $7,17 \pm 0,03$, $n= 6-11$), assim como ocorre com o número de Hill, que aumenta em 2R-1C + Apamina quando comparado ao controle 2R (Hill 2R CO: $0,54 \pm 0,11$; 2R-1C + Apamina: $1,16 \pm 0,17$, $n=6-11$). Entretanto, o efeito máximo do CNP não foi alterado pela presença de Apamina em ambos os grupos.

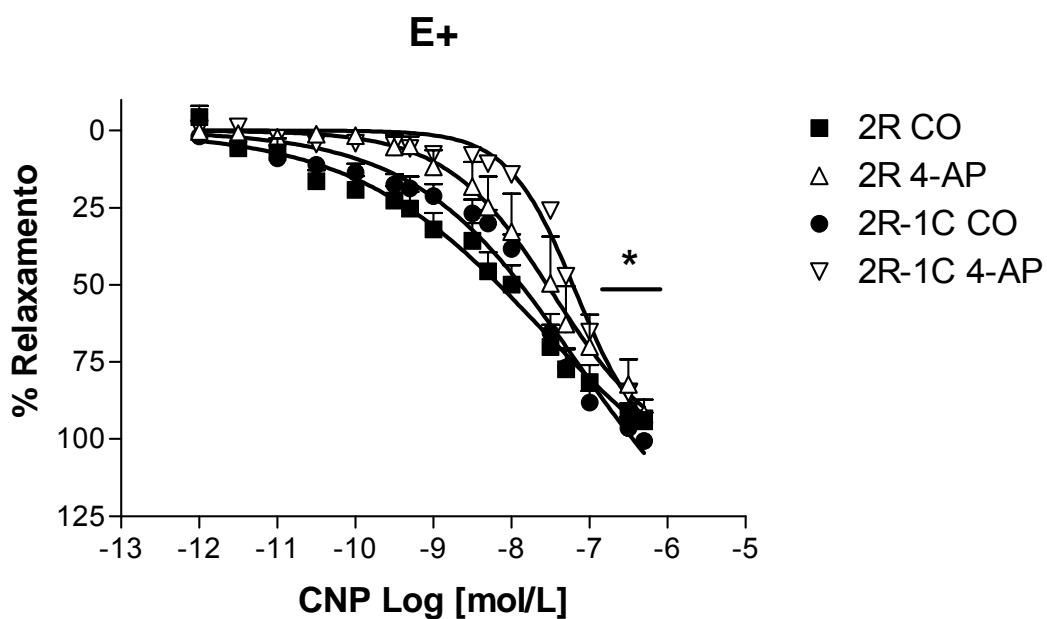


Fig. 28: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em anéis de aorta com camada endotelial (E+) de 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de 4-aminopiridina (4-AP, 1 μ mol/L). As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R CO E+ (*). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n= 6-11$).

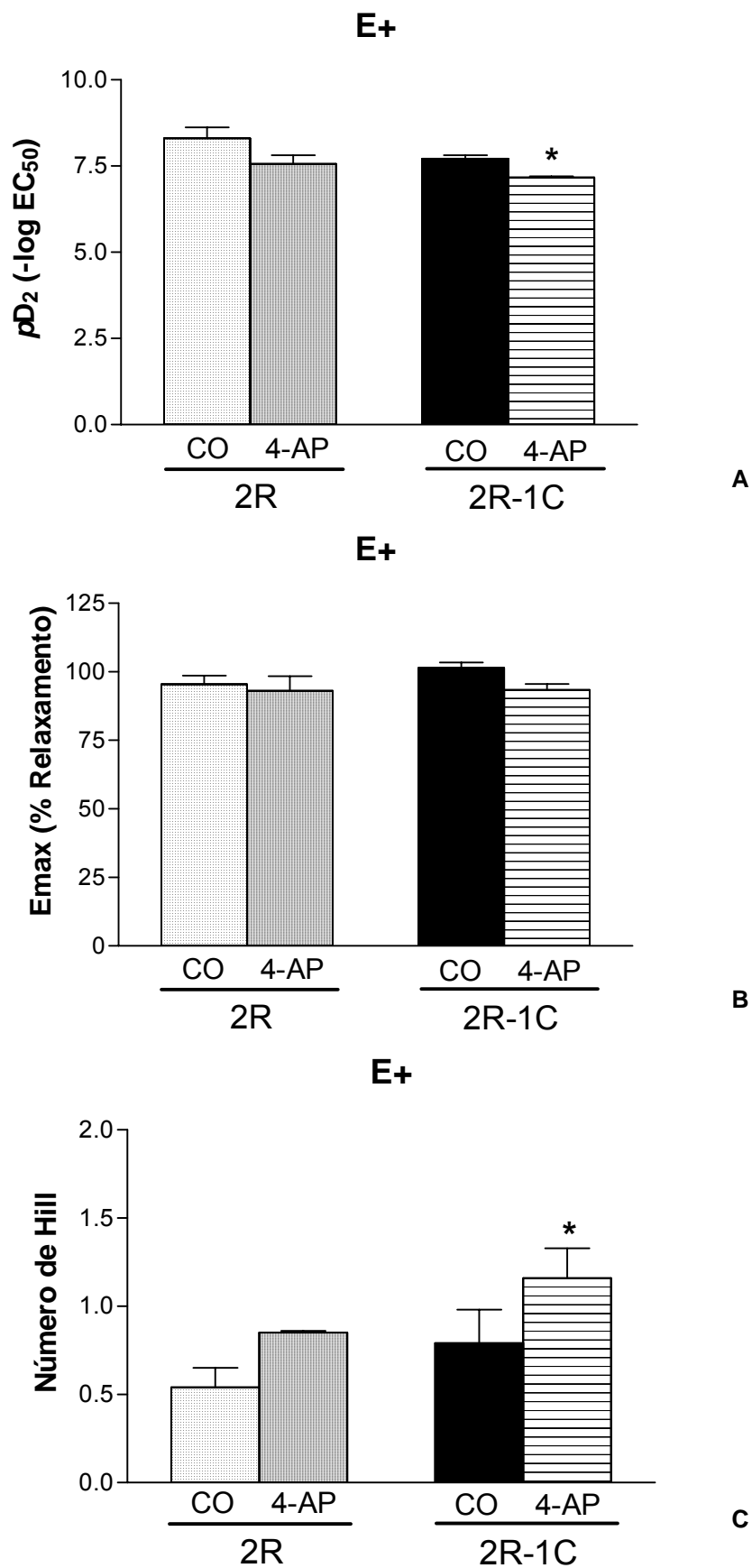


Fig. 29: Análise estatística de pD_2 (A), Emax (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E+ de ratos 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de 4-aminopiridina (4-AP, 1 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$), E+ pré-contraídos com Fenilefrina (100 nmol/L), em ausência ou presença de 4-AP. Significativamente diferente de 2R CO E+ (*). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=6-11$).

4.3.13 Influência das espécies reativas de oxigênio sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a participação de EROs sobre o relaxamento induzido pelo CNP foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o peptídeo em ausência ou presença do sequestrador de ânion superóxido (O_2^-) Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$), em anéis de aorta de 2R e 2R-1C (figura 30) em ausência (E-) ou presença (E+) de endotélio. A exposição ao Tiron não promoveu alterações significativas quanto aos parâmetros farmacológicos de pD_2 ou E_{max} em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, tanto na condição de ausência ou presença de endotélio. Entretanto, ao analisarmos a inclinação da curva concentração-efeito cumulativa para o CNP, ocorreu aumento do número de Hill ($1,54 \pm 0,33$; $n=8$) em 2R + Tiron E- quando comparado à 2R + Tiron E+ ($0,77 \pm 0,09$; $n=9$), ou comparado ao controle E+ (Hill 2R CO E+: $0,54 \pm 0,11$, $n=11$).

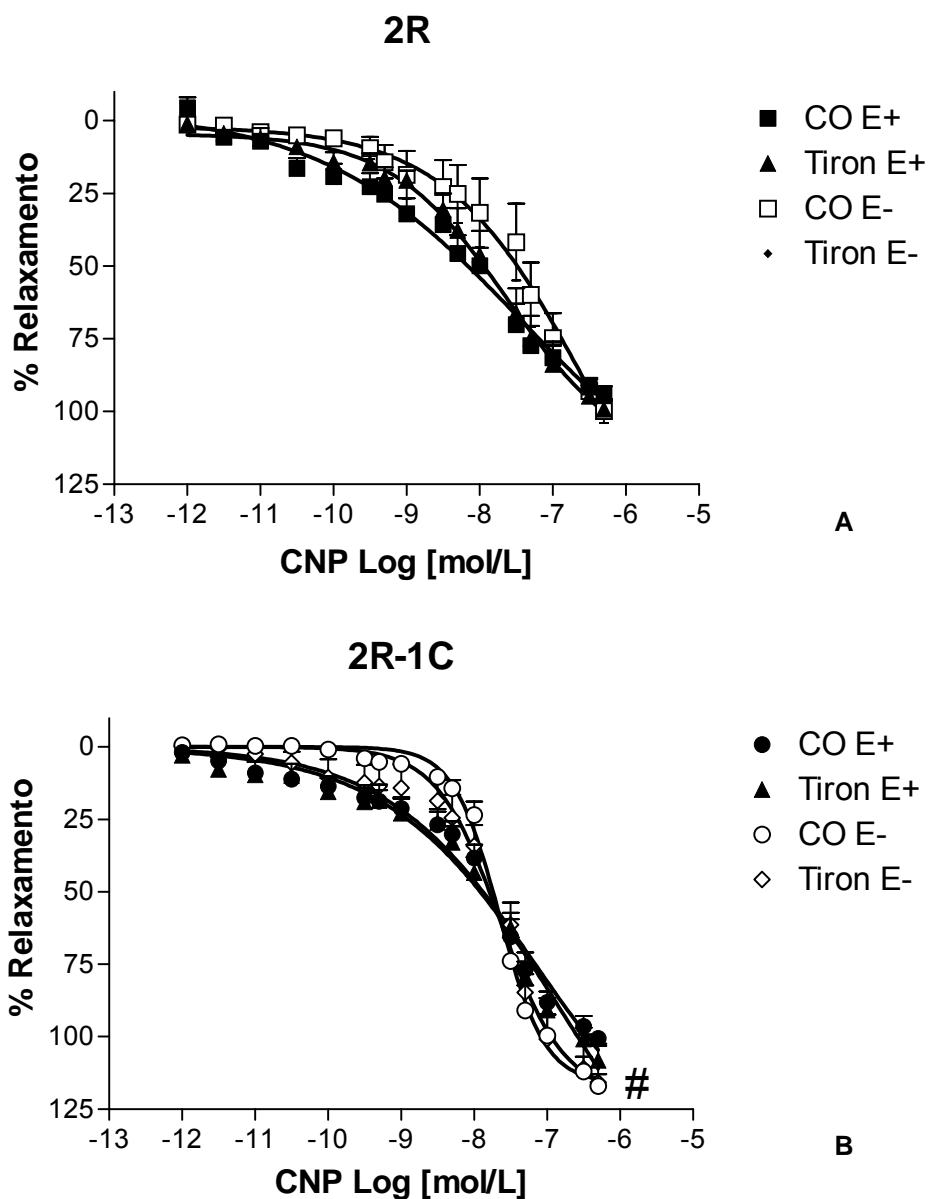


Fig. 30: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta de 2R (A) em ausência (CO) ou presença de Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$); e 2R-1C (B) em ausência (CO) ou presença de Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$). Os símbolos pretos referem-se a anéis de aorta em presença de endotélio (E) e os símbolos brancos referem-se a anéis de aorta em ausência de endotélio (E). As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R-1C CO E+ (#). $P < 0,01$ (*One-way Anova*, pós-teste Newman-Keuls, *Two-way Anova*, correção de Bonferroni, $n=7-11$).

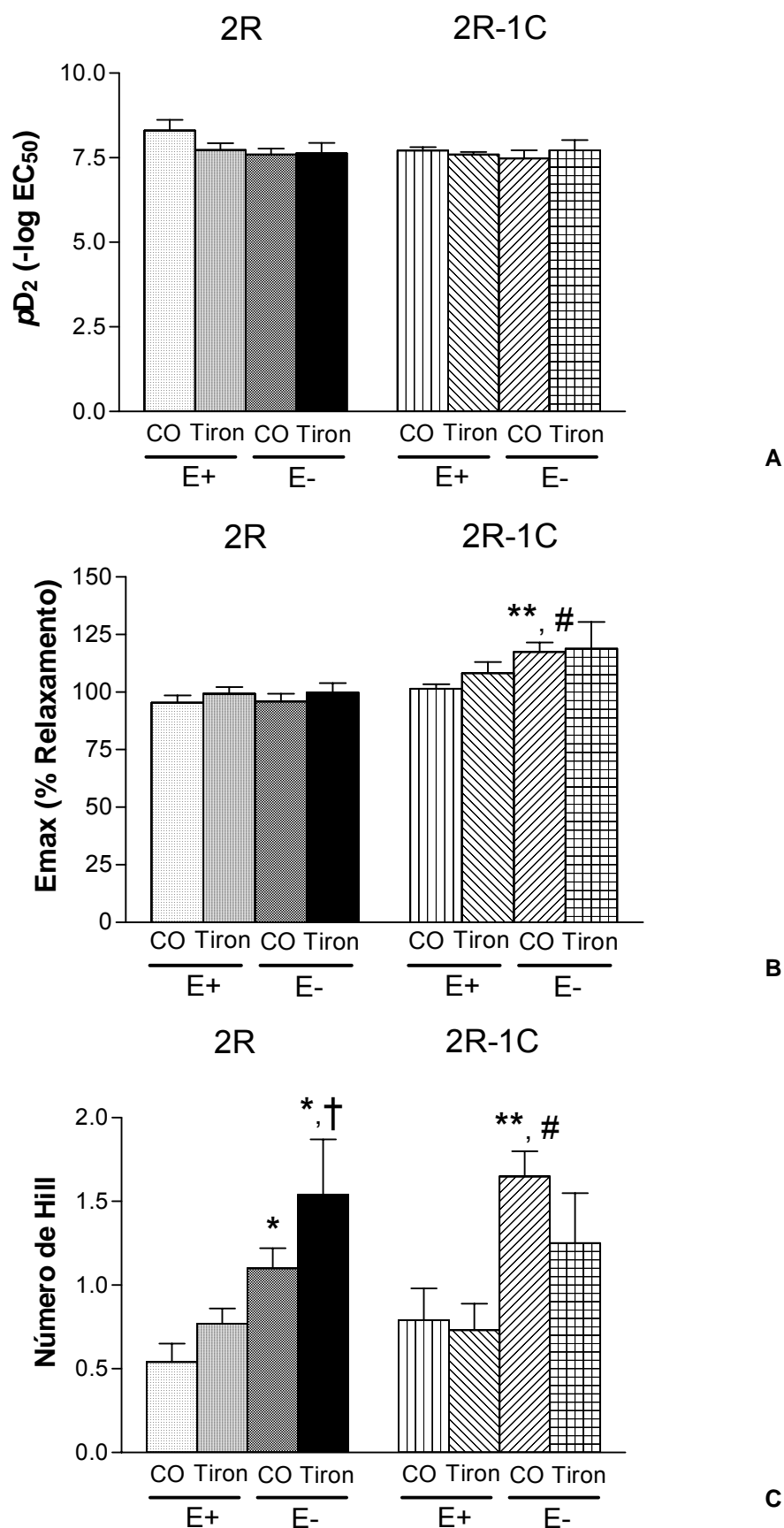


Fig. 31: Análise estatística de pD_2 (A), E_{max} (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E+ e E- de ratos 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$), E+ ou E-, pré-contraídos com Fenilefrina (100 nmol/L), em ausência ou presença de Tiron. Significativamente diferente de 2R CO E+ (*); 2R CO E- (**); 2R-1C CO E+ (#); 2R + Tiron E+ (†). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=7-11$).

4.3.14 Participação de produtos da enzima NAD(P)H-oxidase sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a participação de produtos da enzima NAD(P)H-oxidase sobre o relaxamento induzido pelo CNP foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o peptídeo em ausência ou presença do inibidor seletivo de NAD(P)H-oxidase Apocinina (100 $\mu\text{mol/L}$), em anéis de aorta de 2R e 2R-1C (figura 32), em ausência (E-) ou presença (E+) de endotélio. As curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP em aortas E+ dos grupos 2R e 2R-1C em presença de Apocinina não apresentaram diferenças significativas em relação ao pD_2 , E_{max} ou número de Hill, quando comparadas às curvas controle (figuras 32 e 33). No entanto, o aumento da E_{max} ao CNP observado em 2R-1C E- foi reduzido na presença de Apocinina (CO: $117,46 \pm 4,12$; Apo: $92,35 \pm 3,42$, $n=9$), sem alteração de pD_2 ou número de Hill. Entretanto, nenhuma diferença significativa em relação a exposição ao inibidor de NAD(P)H oxidase foi observada no grupo 2R E-.

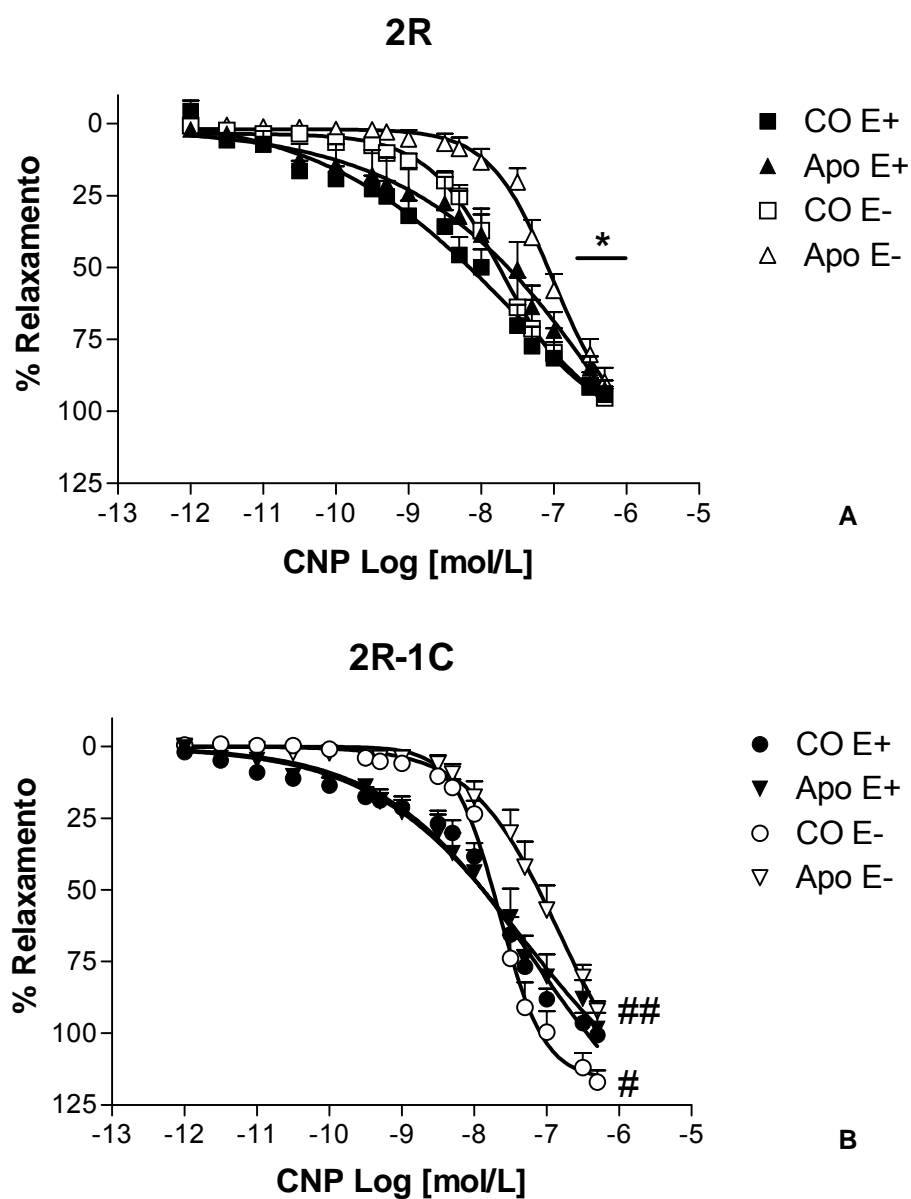


Fig. 32: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em anéis de aorta de 2R (A) em ausência (CO) ou presença de Apocinina (Apo, 100 μ mol/L); e 2R-1C (B) em ausência (CO) ou presença de Apocinina (100 μ mol/L). Os símbolos pretos referem-se a anéis de aorta em presença de endotélio (E+) e os símbolos brancos referem-se a anéis de aorta em ausência de endotélio (E-). As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R-1C CO E+ (#); 2R-1C CO E- (##), $P < 0,01$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=9-11$).

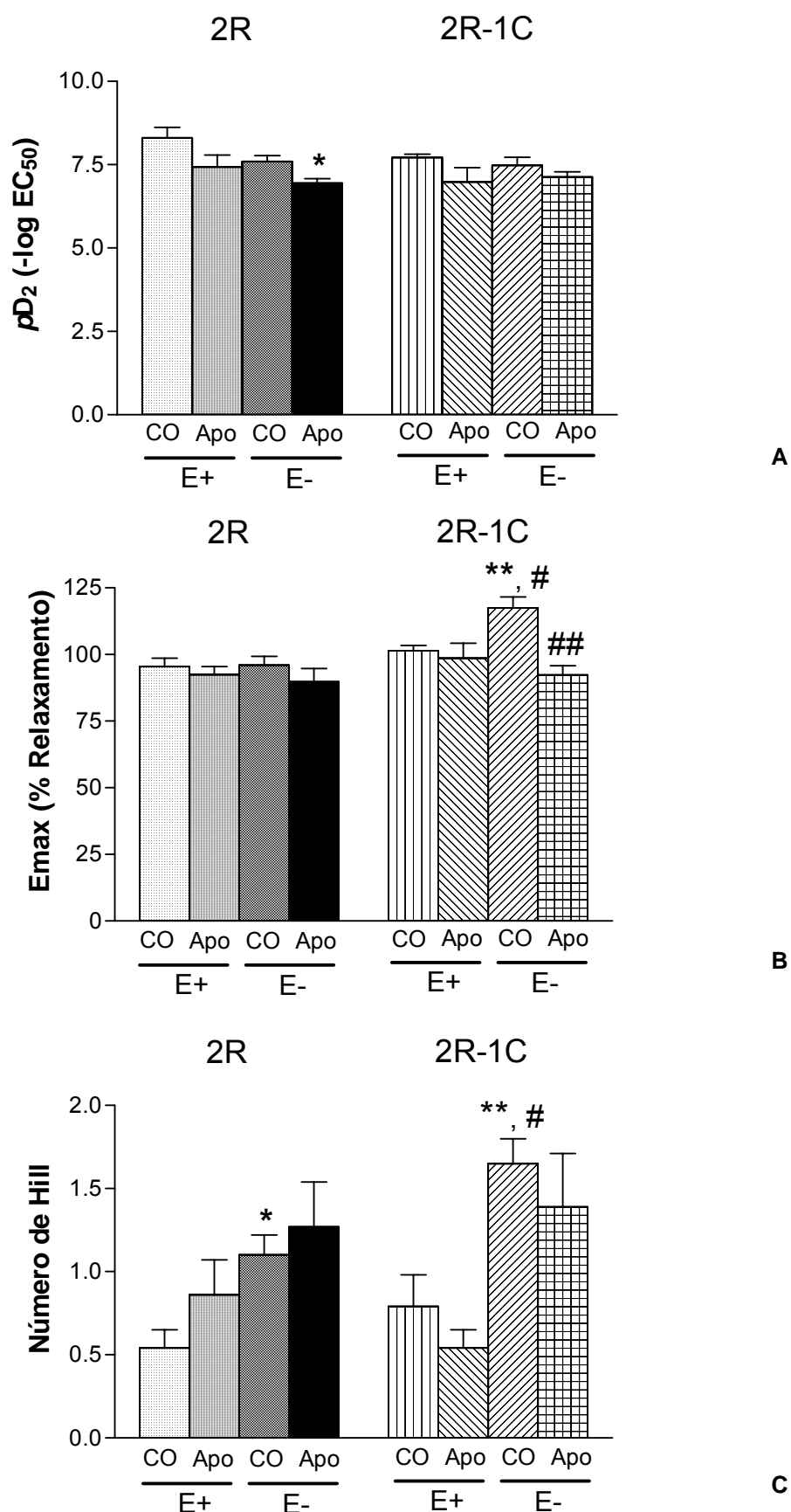


Fig. 33: Análise estatística de pD_2 (A), E_{max} (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E+ e E- de ratos 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de Apocinina (100 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$), E+ ou E-, pré-contraídos com Fenilefrina (100 nmol/L), em ausência ou presença de Apocinina. Significativamente diferente de 2R CO E+ (*); 2R CO E- (**); 2R-1C CO E+ (#); 2R-1C CO E- (##). $P < 0,01$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=9-11$).

4.3.15 Participação de junções *gap* mioendoteliais sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Para verificar a participação das junções *gap* mioendoteliais sobre a mediação do relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP em ausência (CO) ou presença de inibidor de junções *gap*, ácido 18- β -glicirretínico (18BGA, 100 μ mol/L), em anéis de aorta de 2R e 2R-1C em presença de camada endotelial. Em aorta de 2R, a presença do inibidor de junções *gap* promoveu redução da potência do efeito vasodilatador do CNP (figuras 34 e 35), sem alterar a eficácia do agonista ou a inclinação de sua curva concentração-efeito (pD_2 2R CO: $8,30 \pm 0,32$; 18BGA: $6,89 \pm 0,25$; $n=7-11$). De maneira semelhante, a potência do CNP em anéis E+ de 2R-1C em presença de 18BGA foi menor que aquela observada no controle normotenso (pD_2 2R-1C + 18BGA: $7,29 \pm 0,24$, $n=7$). Entretanto, não houve qualquer alteração no perfil do relaxamento induzido pelo CNP que fosse observada em aorta de 2R-1C em presença do inibidor de junções *gap*.

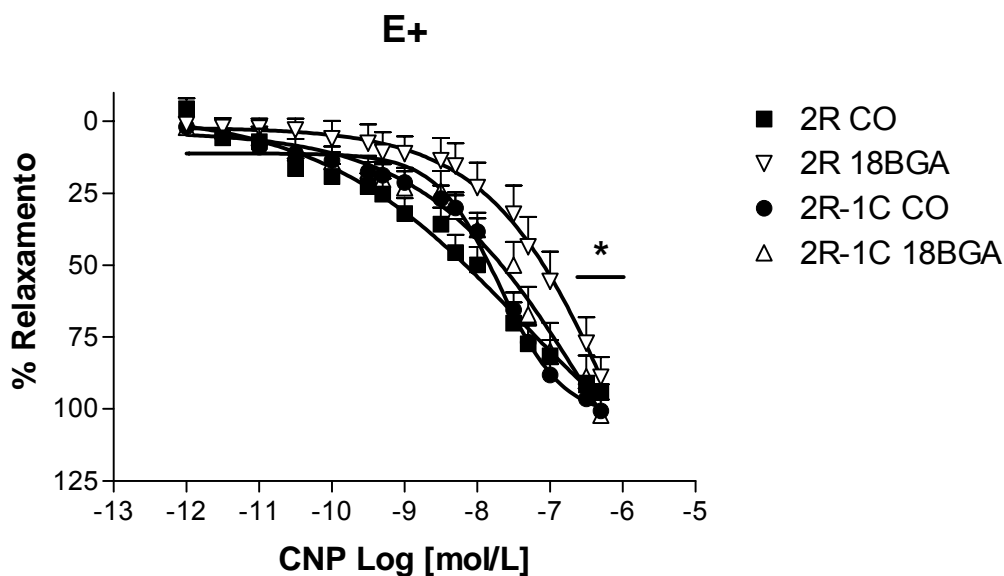


Fig. 34: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em anéis de aorta de 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de ácido 18- β -glicirretínico (18BGA, 100 μ mol/L) em presença de camada endotelial. As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R CO (*), $P<0,01$ (*One-way Anova*, pós-teste Newman-Keuls, *Two-way Anova*, correção de Bonferroni, $n=7-11$).

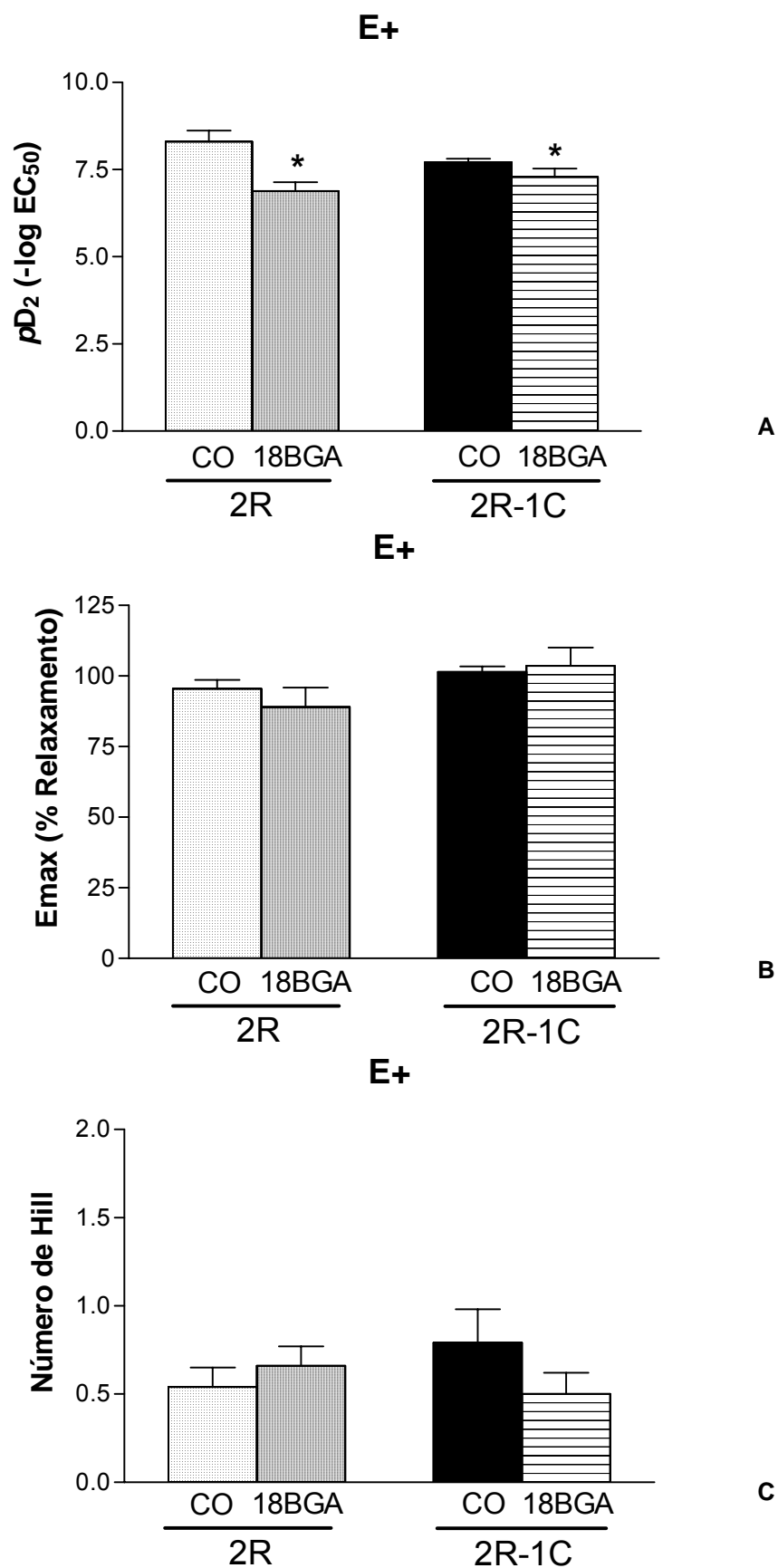


Fig. 35: Análise estatística de pD_2 (A), Emax (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E+ de ratos 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de ácido 18- β -glicirretínico (18BGA, 100 μ mol/L). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L), E+, pré-contráidos com Fenilefrina (100 nmol/L), em ausência ou presença de 18BGA. Significativamente diferente de 2R CO E+ (*). $P < 0,01$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=7-11$).

4.3.16 Participação dos produtos das enzimas ciclooxigenases (COX) sobre o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos

Com o objetivo de avaliar a participação de produtos das enzimas COX sobre o relaxamento induzido pelo CNP, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP em ausência ou presença do inibidor não-seletivo de COX, Indometacina (10 $\mu\text{mol/L}$), em anéis de aorta de 2R e 2R-1C (figura 36), em ausência (E-) ou presença (E+) de endotélio. O relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta de 2R E+ teve sua potência atenuada quando em presença de Indometacina (CO: $8,30 \pm 0,32$; Indo: $6,52 \pm 0,42$, $n=7-11$). Entretanto, no grupo 2R-1C, a presença de Indometacina não reduziu o aumento da E_{max} ao CNP promovido pela retirada do endotélio. Os valores de número de Hill não se mostraram significativamente diferentes entre si quando comparada a presença de Indometacina.

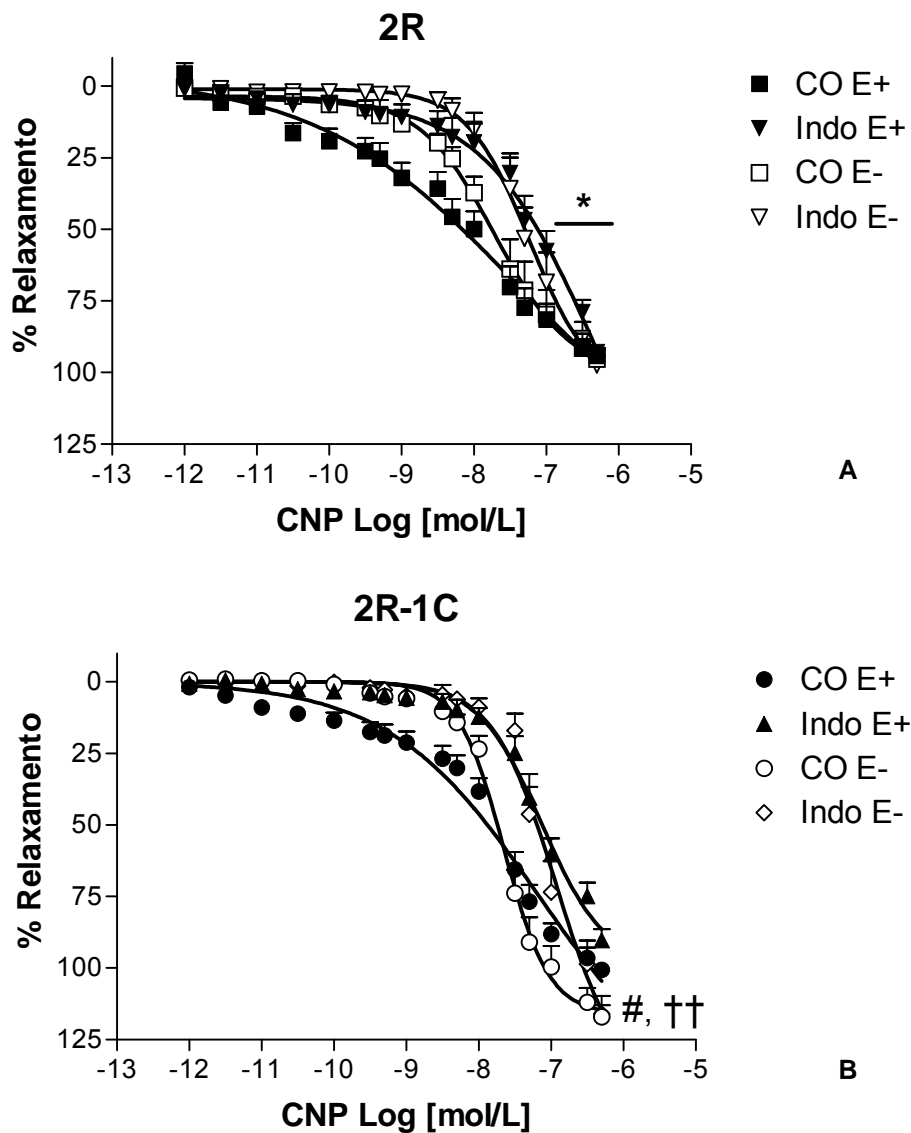


Fig. 36: Relaxamento induzido pelo CNP (1 pmol/L a 0,5 μ mol/L) em anéis de aorta de 2R (A) em ausência (CO) ou presença de Indometacina (Indo, 10 μ mol/L); e 2R-1C (B) em ausência (CO) ou presença de Indometacina (10 μ mol/L). Os símbolos pretos referem-se a anéis de aorta em presença de endotélio (E+) e os símbolos brancos referem-se a anéis de aorta em ausência de endotélio (E-). As respostas são representadas como porcentagem de relaxamento induzido pelo CNP em artérias pré-contraídas com Fenilefrina (100 nmol/L). Significativamente diferente de 2R CO E+ (*); 2R-1C CO E+ (#); 2R-1C + Indo E+ (††). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=6-11$).

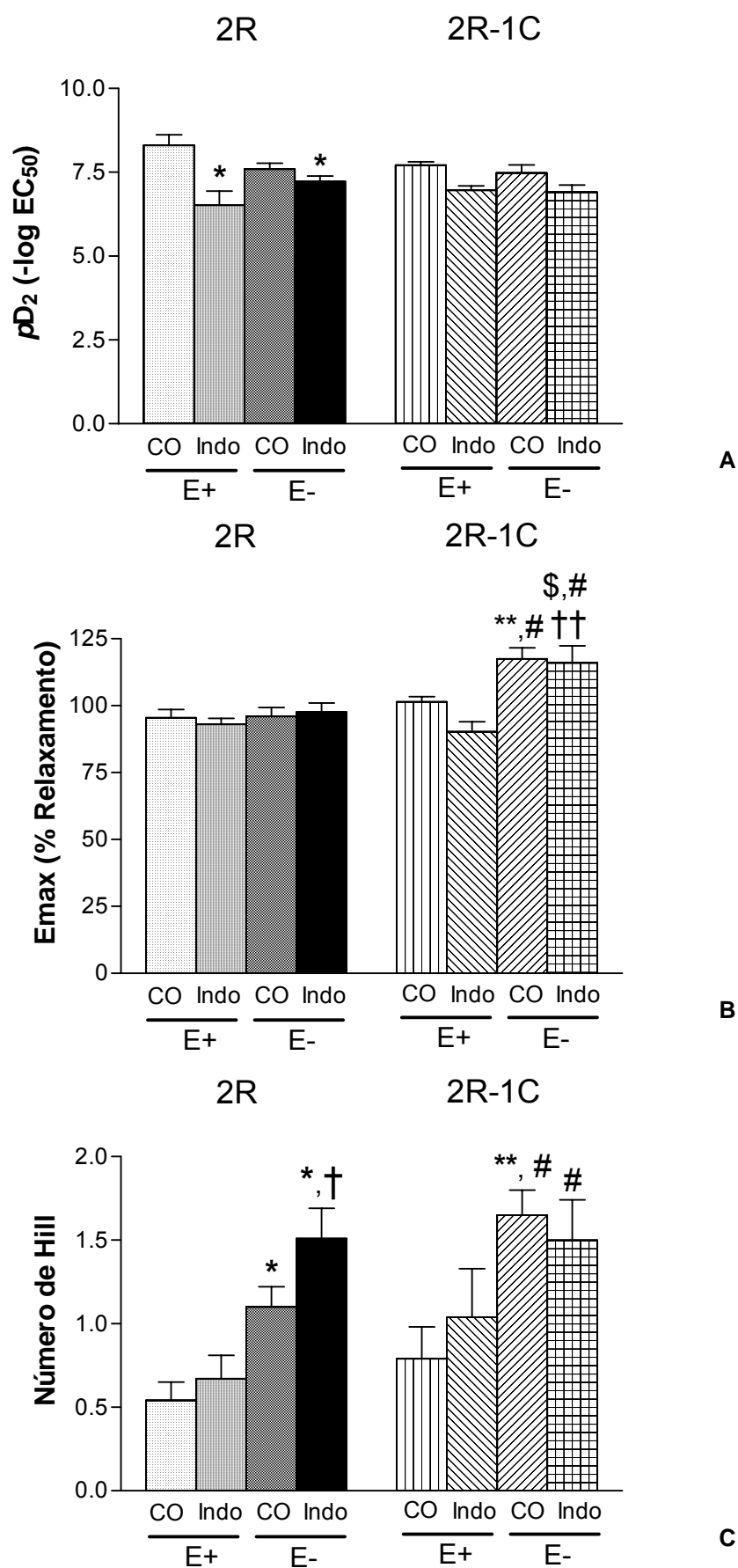


Fig. 37: Análise estatística de pD_2 (A), E_{max} (B) e número de Hill (C) de anéis de aorta E+ e E- de ratos 2R e 2R-1C em ausência (CO) ou presença de Indometacina (10 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta em análise correspondem aos mesmos nos quais foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$), E+ ou E-, pré-contraídos com Fenilefrina (100 nmol/L), em ausência ou presença de Indometacina. Significativamente diferente de 2R CO E+ (*); 2R CO E- (**); 2R-1C CO E+ (#); 2R Indo E+ (†); 2R Indo E- (\$); 2R-1C Indo E+ (††). $P < 0,05$ (One-way Anova, pós-teste Newman-Keuls, Two-way Anova, correção de Bonferroni, $n=6-11$).

4.4 Estudos por Microscopia Confocal

4.4.1 Consequências da hipertensão renal sobre a mobilização de cálcio induzida pelo CNP em aorta de ratos

Para avaliar a mobilização de cálcio induzida pelo CNP, anéis de aorta torácica com endotélio (E+) de ratos 2R e 2R-1C foram devidamente incubados com a sonda fluorescente FLUO-3AM (10 $\mu\text{mol/L}$ – 30 minutos) e a leitura da concentração citoplasmática de cálcio basal (IF_i) foi realizada. Posteriormente, os anéis foram estimulados com CNP (1 $\mu\text{mol/L}$) e realizada nova leitura de fluorescência (IF_f), no decorrer de 10 minutos (600 segundos). De acordo com a figura 28, que mostra a porcentagem do delta de fluorescência basal, pode-se observar que após a estimulação das preparações com CNP ocorreu uma diminuição da concentração citoplasmática de cálcio nas células endoteliais (2R: $-31,94 \pm 5,15\%$; 2R-1C: $-27,48 \pm 3,54\%$; $n=5-7$) e também nas células musculares lisas vasculares (2R: $-25,93 \pm 4,16\%$; 2R-1C: $-35,37 \pm 2,74\%$; $n=5-7$), que foi da mesma amplitude em 2R e 2R-1C.

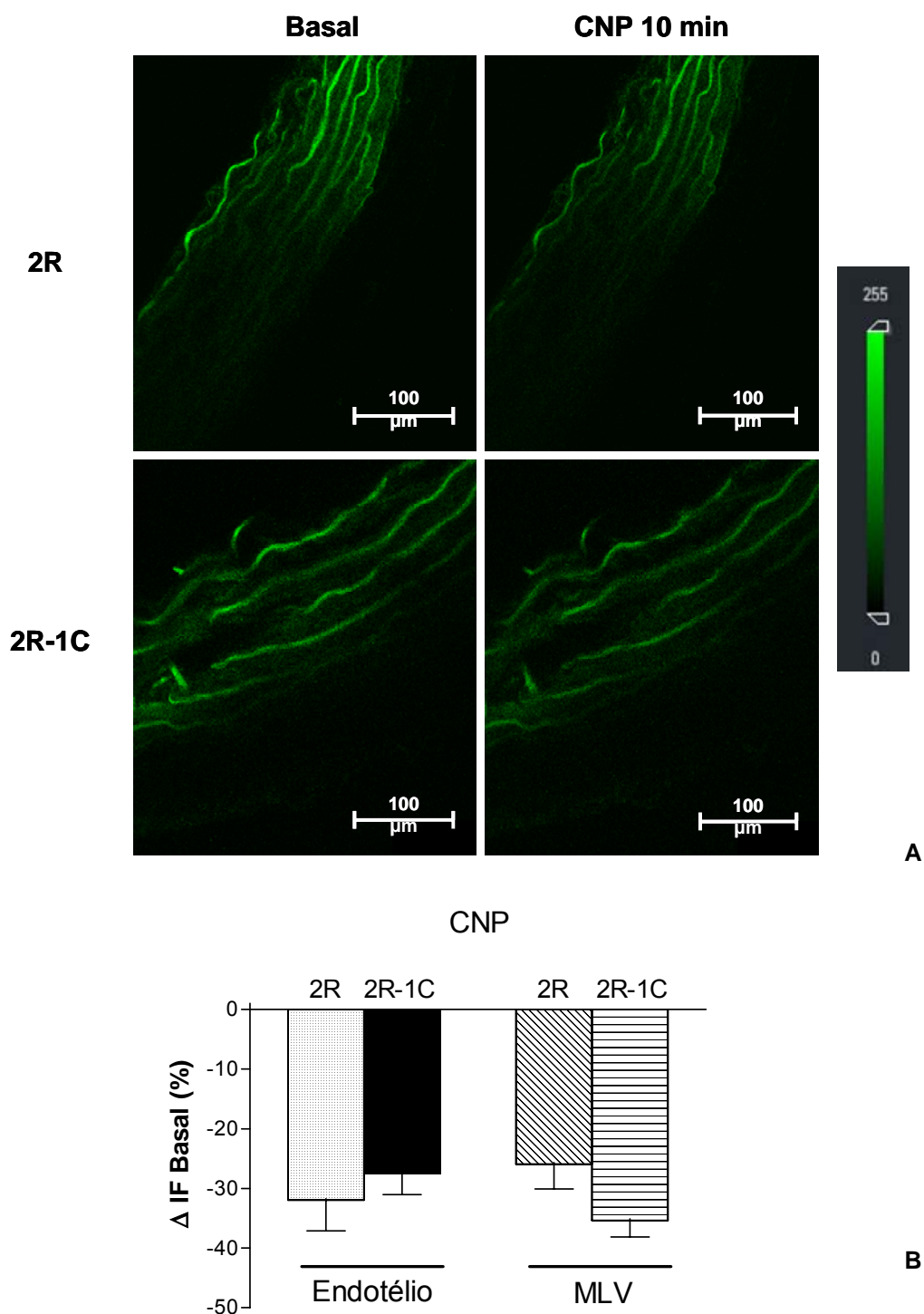


Fig. 38: Intensidade de fluorescência emitida por anéis de aortas E+, marcados com a sonda fluorescente FLUO-3AM. Em **A** observa-se as fotos evidenciando a IF emitida pela sonda FLUO-3AM antes (Basal) e após 10 minutos de exposição ao CNP, obtidas dos experimentos com anéis E+ de aorta de ratos 2R e 2R-1C. Em **B** observa-se a quantificação da ΔIF Basal (%). Os dados representam a média \pm E.P.M ($n=5-7$) da intensidade de fluorescência basal e final (após estímulo com CNP 1 $\mu\text{mol/L}$) do endotélio e do músculo liso vascular (MLV) de anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C. $P>0,05$ (Teste *t* de Student).

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Doenças crônicas, especialmente aquelas relacionadas ao sistema cardiovascular, são consideradas problemas de saúde pública em diversos países em desenvolvimento, especialmente afetando a população idosa. Porém, atualmente este retrato vem se transformando ao longo dos anos devido, entre outros fatores, à implantação de hábitos pouco saudáveis na população em geral, incluindo muitas vezes jovens, e à maior expectativa de vida, estando nem sempre associadas a condições de saúde pública adequadas (KEENAN, ROSENDORF, 2011). Desta forma, estudos epidemiológicos relacionados às doenças cardiovasculares tornam-se necessários para a compreensão do perfil populacional de cada região em estudo, permitindo assim, um melhor desenvolvimento da pesquisa em saúde para se ter a adequação de abordagens terapêuticas estratégicas que permitam a redução dos riscos e a previsão futura do desenvolvimento destas doenças.

No Brasil, poucos estudos trazem informações a respeito da ocorrência e desenvolvimento de doenças cardiovasculares específicas na população, sendo a maioria dos dados fornecidos pelo Ministério da Saúde (DATASUS). Entretanto, dados relacionados à principal causa de hospitalização no Brasil, durante o ano de 2006, apontam que as doenças cardiovasculares representam a terceira maior causa de internação, sendo estas altamente relacionadas com a insuficiência cardíaca e hipertensão sistêmica (Bocchi et al., 2009).

Outra entidade clínica frequentemente observada como causa de hipertensão não controlada é a estenose da artéria renal, que pode levar à deterioração progressiva da função renal (Vashist et al. 2002). Dados de estudos clínicos apontam que aproximadamente 16% dos pacientes em hemodiálise apresentam hipertensão não controlada associada à estenose da artéria renal aterosclerótica, contribuindo para a insuficiência renal (Keddis et al. 2010).

Desta forma, uma ferramenta experimental muito utilizada para o estudo da hipertensão não controlada causada por estenose da artéria renal tem sido a indução cirúrgica de hipertensão renovascular em diversos modelos animais. Dentre eles, os mais estudados são os modelos de hipertensão renovascular de Golblatt dois rins – um clipe (2R-

1C) e um rim – um clipe (1R-1C). Em nosso trabalho foi escolhido estudar a influência da hipertensão renovascular 2R-1C sobre os efeitos vasculares induzido pelo peptídeo natriurético tipo C (CNP).

Assim, para a validação do modelo de hipertensão 2R-1C, 6 semanas após a cirurgia, os animais tiveram sua pressão arterial sistólica aferida e confirmou-se a indução da hipertensão no grupo 2R-1C, como pode ser visualizado na tabela 1. O peso corporal dos animais também foi avaliado, devido inúmeros dados literários que demonstram a correlação entre obesidade e desenvolvimento de hipertensão dependente do SRAA (Aneja et al. 2004). Como o peso corporal entre os animais dos grupos 2R e 2R-1C foi semelhante e a pressão arterial sistólica dos animais do grupo 2R-1C foi maior que aquela do grupo 2R, sugere-se que obteve-se animais hipertensos em decorrência do sucesso da cirurgia experimental para indução de hipertensão renovascular de Goldblatt 2R-1C.

Algumas doenças cardiovasculares como hipertensão arterial sistêmica, aterosclerose e insuficiência cardíaca, estão associadas com alterações na capacidade de liberação dos mediadores vasoativos derivados do endotélio. A hipertensão tem sido relacionada com disfunção endotelial, alterações na responsividade do músculo liso vascular a agentes contráteis (Lunardi et al. 2009) e estresse oxidativo, tanto em modelos animais como humanos. Observa-se redução do relaxamento dependente do endotélio em artérias de ratos hipertensos de modelos variados, inclusive no modelo de hipertensão 2R-1C (Callera et al. 2000). Este prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio vascular pode ser atribuído à redução da liberação de NO e/ou EDHF (Mantelli et al. 1995), alterações no potencial de membrana das células do músculo liso vascular (Callera et al. 2000), ou aumento da produção de O_2^- (Heitzer et al. 1999). Sendo assim, vias alternativas ao sistema nitrérgico que levem ao relaxamento vascular são consideradas importantes nestes modelos nos quais existe menor biodisponibilidade de NO.

Deste modo, a sinalização dos efeitos induzidos pelo CNP envolve a produção de GMPc diretamente através da ativação da enzima GCp de membrana, conseqüentemente, levando aos efeitos celulares comuns desencadeados por este segundo mensageiro.

Paralelamente a esta via, a interação dos peptídeos natriuréticos com seu terceiro subtipo de receptor, NPR-C, que por sua vez, não se apresenta como uma fonte produtora de GMPc, parece ser responsável não apenas pela depuração dos peptídeos da circulação sanguínea, mas também por uma sinalização particular que pode envolver os efeitos desencadeados pelo NO, além de efeitos relacionados à hiperpolarização de membrana de células musculares lisas vasculares.

Considerando as alterações anteriormente descritas no seguinte modelo de hipertensão renovascular, a quantificação da concentração citoplasmática basal de NO em células endoteliais torna-se uma medida importante. Assim, um dos objetivos iniciais do trabalho foi o de avaliar a disponibilidade de NO na condição basal, em células endoteliais de animais hipertensos.

Deste modo, células endoteliais isoladas de aorta de ratos 2R-1C ao serem expostas à análise citofluorimétrica, apresentaram menor concentração basal de NO citoplasmático ($[NO]_c$) quando comparada aos animais 2R (figura 1). Este resultado corrobora com aqueles encontrados por Rodrigues *et al.* (2008) no qual as células do músculo liso vascular (MLV) de aorta de ratos 2R-1C apresentam $[NO]_c$ basal menor em relação às células MLV dos animais 2R. Estes resultados sugerem que no endotélio de animais hipertensos 2R-1C pode haver uma produção deficiente de NO pelas enzimas NOS, em decorrência de uma menor disponibilidade de cofatores essenciais para a atividade enzimática de NOS ou ainda devido ao desacoplamento das porções diméricas de NOS levando à formação de EROs ao invés de NO ou redução da expressão protéica da enzima. Além destas possibilidades, pode existir um desequilíbrio nas fontes produtoras de EROs, no sentido de aumento da formação de espécies reativas que, então, poderiam reagir com o NO, diminuindo assim sua disponibilidade (Paravicini e Touyz 2008), ou ainda, estas espécies reativas poderiam reagir com os cofatores de NOS, levando ao seu desacoplamento (Widder *et al.* 2007).

Embora segmentos de aorta desprovidos de camada endotelial de 2R-1C apresentem maior concentração citoplasmática basal de EROs ($[EROs]_c$) em relação a 2R (Rodrigues *et al.*, 2008), ao avaliarmos a $[EROs]_c$ basal em células endoteliais, como

mostrado na figura 2, observou-se que não houve diferença significativa entre animais 2R e 2R-1C. Da mesma maneira, Gao e Lee (2001) descrevem que o tecido vascular, incluindo células endoteliais, musculares lisas vasculares e fibroblastos são todas fontes de EROs. Entretanto, com a utilização do sequestrador de O_2^- Tiron, percebeu-se um aumento na $[EROs]_c$ basal de 2R (figura 2), sugerindo a formação ou presença de outra EROs no endotélio de animais normotensos 2R. Em segmentos de aorta de ratos 2R, desprovidos de camada endotelial, uma vez em presença de enzima Superóxido Dismutase (SOD), observa-se maior concentração de espécies reativas quando compara a condição basal, em ausência de SOD (Rodrigues, 2010). Deste modo, pode-se sugerir que outra EROs, provavelmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) esteja presente em células endoteliais e musculares lisas vasculares de aorta de ratos normotensos 2R.

Em células endoteliais de animais hipertensos, a presença do sequestrador de O_2^- promoveu uma diminuição na $[EROs]_c$ basal sugerindo que a principal espécie reativa de oxigênio encontrada no endotélio de ratos hipertensos 2R-1C parece ser o O_2^- (figura 2). Corroborando com estes resultados, Rodrigues et al (2008) demonstraram que segmentos de aorta de ratos hipertensos 2R-1C, desprovidos de endotélio, quando em presença do antioxidante Vitamina C (ácido ascórbico), apresentaram menor concentração de O_2^- em relação aos controles, sugerindo uma intensa presença de O_2^- em células do músculo liso vascular de aorta de ratos hipertensos 2R-1C.

Inúmeros trabalhos demonstram hiperreatividade do músculo liso vascular de diversos leitos em ratos hipertensos de modelos variados, como os espontaneamente hipertensos (SHR), os sensíveis ao sal DOCA, além do modelo 2R-1C, a agonistas α_1 -adrenérgicos, serotoninérgicos e ao H_2O_2 (Thakali et al. 2006). Além da disfunção endotelial e do estresse oxidativo, alterações no potencial de membrana das células musculares lisas vasculares, maior ativação do sistema RhoA-Rho-quinase ou ainda as vias de captação e influxo/efluxo de cálcio parecem ser os possíveis responsáveis por estas respostas características em vasos de animais hipertensos (Callera, Varanda e Bendhack, 2001; Lee; Webb e Jin, 2004; Thakali et al. 2006; Tang et al. 2007).

Desta maneira, efetuou-se a medida da concentração citoplasmática de cálcio em células endoteliais isoladas de aorta de ratos 2R e 2R-1C, e observou-se que corroborando com os resultados obtidos em células endoteliais de aorta de ratos *Wistar-Kyoto* (WKY) e SHR (Tang et al. 2007), as células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C não apresentaram diferenças significativas em relação à concentração basal de cálcio (figura 3). Estes resultados permitem sugerir que apesar de existir uma menor concentração de NO basal no endotélio de aorta de ratos hipertensos 2R-1C, e este fato ser acompanhado de estresse oxidativo caracterizado pelo aumento de O_2^- , o processo hipertensivo parece não alterar a resultante dos processos controladores dos níveis basais de cálcio endotelial.

O CNP é amplamente descrito como vasodilatador de diversos leitos vasculares, incluindo artérias e veias, sendo seus efeitos parcialmente dependentes do endotélio (Suga et al. 1992; Wei et al. 1993; Amin et al., 1996). Um de seus subtipos de receptores, o NPR-B, encontra-se associado à atividade da enzima GCp de membrana, envolvendo a formação de GMPc imediatamente após a interação do peptídeo com o domínio extracelular de ligação do ligante, levando à ativação de proteína quinase dependente de GMPc, GK (Brunner e Wölkart, 2001; Rivero-Vilches et al. 2003; Potter, Abbey-Hosch and Dickey, 2006).

As ações do GMPc estão relacionadas ao relaxamento vascular, através da redução da concentração citoplasmática do cálcio, seja por ativação de captação pela Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), extrusão através da Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática ou ativação de trocadores de cátions. Ainda em relação aos efeitos desencadeados pela formação de GMPc, encontram-se aqueles que induzem a redução da sensibilidade do aparelho contrátil ao cálcio, como redução da fosforilação da cadeia leve de miosina e inibição da atividade de RhoA-Rho quinase (Chitaley e Webb 2002).

Diversos trabalhos relacionam as ações do CNP com a ativação de NPR-B e formação de GMPc. Neste contexto, Zolle e colaboradores (2000) demonstraram que a ativação da GCp inibe a extrusão de Ca^{2+} via Ca^{2+} -ATPase de membrana, enquanto que a

ativação da GCs leva ao aumento da recaptação do Ca^{2+} para as reservas intracelulares via SERCA.

Entretanto, dados literários indicam que os efeitos vasculares induzidos pelo CNP podem ser atribuídos a interação do peptídeo com o receptor NPR-C, o qual não está associado à atividade guanilil-ciclase (Anand-Srivastava 2005). Este, por sua vez, encontra-se relacionado com a atividade de proteína G_i , a qual seria responsável pela inibição da atividade da enzima adenilil-ciclase, através da subunidade α_i , diminuindo o conteúdo de AMPc intracelular. As subunidades $\beta\gamma_i$ também apresentariam efeitos vasculares, no sentido de ativação de fosfolipase C- β da membrana e ativação de canais para K^+ retificadores de entrada associados à proteína G (GIRKs) (Kurachi e Ishii, 2003). Desta maneira, o CNP levaria à degradação de fosfolípides de membrana, com formação de diacilglicerol (DAG) e IP_3 , e a consequente liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, aumentando o conteúdo de Ca^{2+} intracelular.

Ainda neste contexto, alguns dados demonstram que a expressão de receptores de peptídeos natriuréticos, NPR-A e NPR-C, encontram-se com a sua expressão protéica e conteúdo de RNAm diminuídos nos modelos de hipertensão 2R-1C e L-NAME (Lee et al., 2002). Desta maneira, tornou-se oportuno a quantificação da concentração citoplasmática de cálcio frente estimulação com CNP, tanto em células endoteliais de aorta de ratos quanto em anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C.

Assim, ao analisarmos os resultados obtidos através da técnica de microscopia confocal, utilizando-se anéis intactos de aorta de ratos 2R e 2R-1C, observou-se uma redução tanto no endotélio quanto na camada muscular lisa vascular (figura 28) com a mesma amplitude de resposta entre os grupos. Entretanto, ao quantificarmos a concentração citoplasmática de cálcio em células endoteliais isoladas de aorta de ratos 2R e 2R-1C obtivemos resposta diferente: após a estimulação com CNP ocorreu um aumento na concentração de Ca^{2+} em ambos os grupos (figura 3).

Tal discrepância entre os resultados pode ser explicada por uma possível ação bifásica do CNP, sendo primeiramente através da interação do CNP com o receptor NPR-B,

levando a uma possível formação de GMPc e conseqüente redução da $[Ca^{2+}]_c$ por ativação de mecanismos intracelulares de captação de cálcio. Secundariamente a este efeito, ocorreria uma maior sensibilização do receptor NPR-C, levando a degradação de fosfolipídeos de membrana e formação de IP_3 , sendo este o responsável pelo aumento intracelular de cálcio. Esta maior sensibilização do receptor NPR-C poderia ocorrer devido à redução da $[Ca^{2+}]_c$, como um mecanismo de regulação dos níveis de cálcio.

Poucos trabalhos na literatura apresentam evidências sobre mecanismos de auto-regulação entre os tipos de receptores para peptídeos natriuréticos. Entretanto, Potter e Hunter (2000) demonstraram que após ativação de proteína quinase C (PKC) por PMA (forbol-12-miristato-13-acetato), em células de rim embrionário humano em cultura, ocorre desfosforilação do resíduo Ser⁵²³ do NPR-B e conseqüente dessensibilização do receptor. Além disso, Lelièvre et al. (2001) demonstraram efeitos proliferativos e anti-proliferativos induzidos por peptídeos natriuréticos ANP e CNP de maneira dependentes da concentração de exposição das culturas celulares indicando uma resposta bifásica induzida pelos peptídeos. Neste contexto, Madhani e colaboradores (2003) demonstraram existir uma interação a nível funcional entre receptores NPR-A e NPR-B em aorta de camundongos *knockout* para eNOS, que poderia indicar auto-regulação desses receptores. Entretanto, faltam trabalhos na literatura que demonstrem especificamente as ações induzidas pelo CNP em células vasculares isoladas, assim como os mecanismos de regulação do cálcio citoplasmático.

Cabe ressaltar que ambas as análises de fluorescência foram executadas em tempos diferentes, sendo a análise por microscopia confocal referente à exposição imediata ao CNP e subsequente leitura de intensidade de fluorescência emitida, enquanto a análise por citometria de fluxo é referente à exposição prévia, durante 30 minutos, à quantificação de fluorescência. Desta forma, podemos sugerir uma ação bifásica induzida pelo CNP em relação à mobilização de cálcio intracelular, parecendo envolver primariamente receptores NPR-B e posteriormente receptores NPR-C.

Saha e colaboradores (2008) demonstraram que aorta e coração de ratos SHR e coração de ratos hipertensos ao sal DOCA e 1R-1C apresentam níveis de RNAm e expressão protéica de proteína Gi aumentados em relação aos seus controles normotensos. Além disso, células do músculo liso vascular de SHR apresentam expressão protéica de proteína Gi subunidade α aumentada, cuja expressão protéica é normalizada frente à exposição a antioxidantes, sugerindo uma participação importante do estresse oxidativo no aumento dos níveis protéicos de proteína Gi α em SHR.

Neste contexto, de acordo com os resultados obtidos pela análise de citometria de fluxo em relação à quantificação da $[Ca^{2+}]_c$ após estimulação induzida pelo CNP e pelos dados literários indicativos de alteração da expressão protéica de proteína Gi, procurou-se avaliar a participação do estresse oxidativo sobre esta resposta induzida pelo CNP.

Em células endoteliais isoladas de aorta de ratos 2R, após estimulação com o CNP e em presença de sequestrador de O_2^- Tiron ocorreu atenuação da resposta induzida pelo CNP (figura 4 A). Entretanto, em células endoteliais de aorta de ratos 2R-1C, a estimulação com CNP em presença de Tiron, promoveu abolição da resposta induzida pelo CNP (figura 4 B). Esses resultados sugerem que em condições de normalidade, a resposta induzida pelo CNP, em relação à mobilização de cálcio, é parcialmente dependente de O_2^- , possuindo um mecanismo adicional para a elevação intracelular da concentração de cálcio. Entretanto, a elevação da $[Ca^{2+}]_c$ induzida pelo CNP em células endoteliais de aorta de ratos hipertensos é totalmente dependente de O_2^- , portanto demonstrando uma perda de mecanismos auxiliares para se ter a sinalização intracelular desencadeada pelo CNP.

Vários estudos demonstram ações vasodilatadoras do CNP em diferentes leitos vasculares isolados, como em aorta de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (Wei et al. 1994; Drewett et al. 1995; Brunner e Wölkart, 2001; Villar et al. 2007), aorta de camundongos tipo selvagem e *knockout* para eNOS (Madhani et al 2003), microvasculatura coronariana de ratos (Brunner e Wölkart, 2001) e de porcos (Liang et al. 2010), artérias mesentéricas de resistência de ratos (Chauhan et al. 2003; Villar et al. 2007), arteríolas de preparações de néfrons justamedulares perfundidos de ratos (Amin, Carretero, Ito, 1996),

artérias renal e safena e veias renal, safena e femoral isoladas de cães (Wei et al. 1993), artérias radial e mamária interna e veia safena humanas de indivíduos sadios ou que sofreram cirurgia de “ponte de safena” (Kelsall et al. 2005; Nguyen et al. 2009). Porém, ainda não existe um consenso em relação a esta vasodilatação induzida pelo CNP se processar de maneira dependente ou independente do endotélio, envolvendo ou não a participação de metabólitos de NOS (Costa et al. 2007).

Neste contexto, considerando que a expressão protéica e os níveis de RNAm de receptores para peptídeos natriuréticos encontram-se alterados em modelos de hipertensão (Lee et al. 2002), procurou-se investigar o efeito vasodilatador induzido pelo CNP em aorta de ratos normotensos e hipertensos 2R-1C. Estudos funcionais demonstraram que o relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta com endotélio de ratos hipertensos mostrou-se semelhante àquele ocorrido em anéis de aorta de ratos normotensos (figura 5). É sugerido que, embora exista redução do conteúdo de NO e estresse oxidativo endotelial característico no animal hipertenso, estes parâmetros parecem não prejudicar o relaxamento induzido pelo CNP.

Entretanto, ao analisarmos a vasodilatação via CNP em preparações desprovidas de camada endotelial, percebe-se um aumento do efeito máximo induzido pelo CNP em anéis de aorta de ratos hipertensos, além de maior inclinação da curva concentração-efeito cumulativa para o CNP na condição de remoção endotelial em ambos os grupos de ratos (figuras 5 e 6). Estes resultados corroboram com dados apresentados na literatura, nos quais o relaxamento induzido pelo CNP em artéria safena e em veias renal, safena e femoral de cães, é maior naquelas preparações desprovidas de endotélio comparadas à presença deste mesmo (Wei et al. 1993). Portanto, o CNP parece atuar em receptores localizados no músculo liso vascular de aorta de ratos para promover a vasodilatação. Contudo, em presença de camada endotelial existe uma modulação importante para o desenvolvimento da resposta relaxante. A condição de hipertensão promove um efeito relaxante induzido pelo CNP exacerbado em preparações desprovidas de endotélio. Assim, surpreendentemente e contrariamente à nossa hipótese, a presença da hipertensão

renovascular 2R-1C altera, mas não prejudica, a resposta vasodilatadora induzida pelo CNP.

De acordo com os resultados obtidos para o relaxamento induzido pelo CNP em preparações desprovidas de endotélio, que mostraram-se maiores (efeito máximo e número de Hill) comparados àqueles com camada endotelial intacta, procurou-se investigar a participação de metabólitos das enzimas NOS na resposta induzida pelo CNP. Desta forma, ao analisarmos as respostas obtidas em presença de inibidor não-seletivo das isoformas de NOS (L-NAME) apenas observa-se um aumento do número de Hill da curva concentração-efeito cumulativa para o CNP em anéis de aorta com endotélio de 2R, comparado ao seu controle. Este aumento observado no número de Hill em anéis de aorta com endotélio em presença de L-NAME se torna semelhante àquele observado em preparações nas quais promoveu-se a remoção endotelial (figuras 8 e 9). Isto sugere que a remoção endotelial ou a inibição não-seletiva de isoformas de NOS em preparações com camada endotelial intacta parece promover alterações semelhantes na sinalização desencadeada pelo CNP. Resultados semelhantes foram encontrados por Madhani e colaboradores (2003) em artéria aorta de camundongos selvagem ao realizar curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP em presença de L-NAME ou ainda em artérias aorta e mesentéricas de resistência de camundongos *knockout* para eNOS. Brunner e Wölkart (2001) também demonstraram que o relaxamento induzido por CNP em aorta de ratos mostra-se insensível à presença de inibidor não-seletivo de NOS L-NNA.

Contudo, o evento descrito anteriormente parece não ocorrer em preparações isoladas de animais hipertensos 2R-1C. Apenas quando comparada a inibição não-seletiva com L-NAME em anéis de aorta desprovidos de endotélio com aqueles com camada endotelial intacta ocorre uma redução da potência do agonista, sugerindo uma participação endotelial importante na modulação da resposta relaxante induzida pelo CNP em animais hipertensos.

Em relação aos resultados obtidos a partir da inibição não-seletiva de isoformas de NOS, tornou-se interessante avaliar a participação do principal produto formado pelas NOS,

a espécie radicalar NO^0 , através do uso do sequestrador de NO^0 Hidroxicobalamina. De maneira semelhante àquela observada em preparações com endotélio de aorta de ratos normotensos, a presença de Hidroxicobalamina promoveu um aumento do número de Hill da curva concentração-efeito cumulativa para o CNP. Entretanto, a potência ou o efeito máximo do agonista não foram alterados (figuras 10 e 11). Novamente, sugere-se uma participação do NO como um modulador da resposta relaxante induzida pelo CNP em anéis de aorta de ratos normotensos. Embora Costa et al. (2007) demonstrem grande participação de metabólitos de NOS em homogenatos de aorta de ratos através da dosagem de atividade de NOS (metabólitos NO_x) após estimulação com CNP, nossos resultados apenas demonstram uma modulação induzida pelo NO nos efeitos desencadeados pelo CNP.

Em anéis de aorta de ratos hipertensos, os resultados se mostram diferentes daqueles obtidos em normotensos. Assim, em presença de Hidroxicobalamina ocorreu uma diminuição da potência do CNP tanto em relação ao controle, quanto em relação à presença de Hidroxicobalamina em 2R, além de um aumento do número de Hill quando comparado ao controle hipertenso (figuras 10 e 11). Embora nossos resultados anteriores com remoção endotelial e com inibição não-seletiva de NOS não apontassem evidências conclusivas para a participação de NO na resposta vasodilatadora induzida pelo CNP, a presença de sequestrador de NO^0 indica a participação deste mediador. Recentemente, Rautureau e colaboradores (2010) quantificaram a produção de metabólitos de NO (NO_x - nitrato e nitrito) por eletroquimioluminescência em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) em cultura, demonstrando um aumento de NO_x e GMPc após estimulação com CNP por 24 horas. Desta forma, podemos sugerir que tanto a remoção endotelial quanto a inibição não-seletiva de isoformas de NOS podem culminar em respostas compensadas pela via de relaxamento induzida pelo CNP devido a atuação de diversos fatores que tendem ao equilíbrio da resposta.

Um dos principais alvos celulares envolvidos nas respostas relaxantes desencadeadas pelo NO é a modulação positiva da atividade enzimática de guanilil-ciclase solúvel (GCs), presente na porção citoplasmática das células. Como descrito anteriormente,

o CNP é capaz de interagir e ativar seu receptor NPR-B presente na membrana citoplasmática das células, levando à formação de GMPc (Potter; Abbey-Hosch, Dickey, 2006). Desta forma, ambas as enzimas guanilil-ciclases promovem a formação do mesmo segundo mensageiro e poderiam, então, apresentar algum mecanismo de regulação de suas atividades. Frutos et al. (2003) demonstraram que em cultura de células mesangiais humanas (HMC) após exposição ao CNP ocorreu redução da expressão protéica da subunidade β de GCs e da atividade catalítica da enzima. Madhani e colaboradores (2003) demonstraram que a presença de inibidor seletivo de GCs (ODQ) promoveu uma potencialização do CNP em aorta de camundongos do tipo selvagem. Ambos os autores sugerem que os efeitos demonstrados são devido à contra-regulação entre as enzimas GCp e GCs, alterando a sensibilidade dos receptores NPR-B mais do que um fenômeno diretamente relacionado ao NO.

Neste contexto, ao avaliarmos o efeito vasodilatador induzido pelo CNP em presença de ODQ em anéis de aorta de ratos normotensos 2R, observou-se uma atenuação da potência do agonista apenas em preparações com camada endotelial intacta, sugerindo uma participação de produtos de GCs no relaxamento induzido pelo CNP (figuras 12 e 13). Entretanto, ao analisarmos as repostas obtidas em anéis de aorta de ratos hipertensos 2R-1C, observou-se que apenas nas preparações desprovidas de endotélio ocorreu uma redução do efeito máximo promovido pelo CNP, acompanhado de redução do valor de inclinação da curva concentração-efeito do agonista, tornando-se semelhantes ao controle quando em presença de ODQ. Portanto, podemos sugerir que, ao contrário do observado por Frutos et al. (2003) e Madhani et al. (2003), em aorta de ratos 2R, em presença de camada endotelial intacta, ocorre participação positiva de metabólitos de GCs sobre o efeito vasodilatador induzido pelo CNP. Os metabólitos da GCs também participam dos efeitos induzidos pelo CNP que se mostravam exacerbados em aorta de ratos 2R-1C, desprovidos de endotélio.

Após o aumento da atividade catalítica de GCs induzido pela interação de NO no sítio hêmico da enzima, com conseqüente formação do segundo mensageiro GMPc, uma

das principais moléculas alvo ativadas é a proteína quinase dependente de GMPc, designada atualmente como GK (Münzel et al. 2005). Assim também ocorre ativação de GK após interação de peptídeos natriuréticos com os subtipos de receptores GCp, NPR-A/B, com a formação de GMPc (Potter 2011).

A família de GKs em células de mamíferos compreende as isoformas GKI α e GKI β , além de GKII, todas codificadas por genes distintos. Ambas as isoformas de GKI, mas não de GKII, são expressas em células vasculares. Em células musculares lisas de aorta de ratos, a ativação de GKI α aumenta a probabilidade de abertura de canais para K⁺ ativados por Ca²⁺ (K_{Ca}), levando à hiperpolarização das células do músculo liso e inibição do influxo de cálcio induzido por agonista. Além disso, a GKI β é responsável pela fosforilação do substrato de quinase-G associado ao receptor de IP₃ (IRAG), inibindo a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático induzido por agonista, e assim, a contração do músculo liso (Münzel et al. 2005). Por fim, a fosforilação e ativação de enzima fosfodiesterase 5 (PDE5) pela GKI representa o principal mecanismo de redução da sinalização desencadeada pelo GMPc.

Desta maneira, considerando a possibilidade de ativação de receptores NPR-B pelo CNP, além da participação da via NO-GCs-GMPc-GK, procurou-se avaliar a contribuição de GK na mediação do relaxamento induzido pelo peptídeo. Tanto em animais normotensos quanto em hipertensos, a presença de inibidor de GK promoveu atenuação da potência do CNP em preparações em ausência ou presença de camada endotelial (figuras 24 e 25 e tabela 2). Entretanto, apenas nas preparações desprovidas de endotélio observou-se uma redução do efeito máximo do agonista. Contudo, cabe ressaltar que o efeito máximo evidenciado em preparações desprovidas de endotélio de animais hipertensos que estava exacerbado tornou-se semelhante àquele do controle normotenso. Além disso, correlacionando com os dados anteriormente descritos em presença de inibidor seletivo de GCs (ODQ), pelo menos em relação à normalização do efeito máximo em preparações sem endotélio vascular de hipertensos, parece existir uma ligação entre a ativação de GCs e GK

sendo responsáveis pelo efeito exacerbado observado em hipertensos, porém independente de NO.

Poucos trabalhos na literatura demonstram a efetiva participação de GK sobre os efeitos vasculares induzido pelo CNP, sendo a maioria apenas projeções de como seria a via de sinalização desencadeada. Além disso, a maioria dos resultados descritos é observada em cultura de células, nas quais podem existir diferentes padrões de expressão protéica e atividade enzimática decorridas de passagens celulares (Browner et al. 2004). Desta forma, estes resultados são pioneiros em demonstrar a participação efetiva de GK sobre a modulação do relaxamento vascular induzido pelo CNP em aorta de ratos normotensos e hipertensos renais.

Os níveis de cálcio intracelular são mantidos pelo equilíbrio dos mecanismos de regulação por influxo e efluxo deste cátion, sendo que a alteração em qualquer um desses mecanismos pode resultar em alteração da reatividade vascular a agonistas contráteis. Neste sentido, a SERCA é descrita estar envolvida no relaxamento induzido pelo NO (Adachi et al. 2002), através da recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático. Entretanto, em modelos animais de hipertensão arterial e hipercolesterolemia, a atividade da SERCA é descrita estar prejudicada, sendo responsável pela hiperreatividade vascular a agonistas vasocontráteis (Bohr e Webb, 1984; Adachi et al. 2002). Entretanto, no modelo de hipertensão 2R-1C, a atividade de recaptação de cálcio do citosol para o retículo sarcoplasmático exercida pela SERCA não se encontrada prejudicada (Callera e Bendhack, 1999). Desta forma, procurou-se avaliar se o efeito vasodilatador induzido pelo CNP tinha a contribuição da SERCA. Assim, observou-se que em aorta E- de ratos 2R e 2R-1C ocorreu atenuação da potência, e apenas do efeito máximo do CNP em 2R-1C, quando em presença de inibidor seletivo de SERCA, Tapsigargina. Assim, sugere-se que a resposta vasodilatadora induzida pelo CNP em aorta de ratos 2R e 2R-1C leva a ativação da recaptação de cálcio do citosol pela SERCA.

O receptor para peptídeos natriuréticos com atividade de guanilil-ciclase, NPR-B, é amplamente descrito como principal mediador da resposta relaxante desencadeada pelo

CNP em vasos de grande calibre (Madhani et al. 2003;). Além disso, as células do músculo liso vascular de artérias e veias parecem apresentar uma expressão protéica de NPR-B maior que a evidenciada em células endoteliais (Nguyen et al. 2009). Assim, para avaliar a participação dos receptores NPR-B sobre a resposta induzida pelo CNP, utilizou-se o antagonista não-seletivo NPR-A/NPR-B Anantin, descrito como antagonista competitivo capaz de diminuir a ligação e formação de GMPc desencadeada pelo ANP em células do córtex adrenal bovino (Weber et al. 1991).

De acordo com os resultados observados em presença de antagonista NPR-A/B, pode-se sugerir que os efeitos induzidos pelo CNP parecem envolver não apenas um único subtipo de receptor, seja presente no endotélio e/ou nas células musculares lisas vasculares, mas ter a participação de ambos os receptores passíveis de ativação pelo CNP, NPR-B e NPR-C, já que pouco do efeito relaxante induzido pelo agonista foi modificado em presença do antagonista Anantin (figuras 22 e 23). Além disso, frente o perfil de seletividade de antagonismo atribuído ao composto, ou seja, a não-seletividade entre NPR-A e NPR-B, não existem estudos mostrando a proporção de interação do antagonista com um ou outro subtipo de receptor GCp. Portanto, a ausência de respostas mais evidentes pode ser justificada pela não-seletividade do antagonista. Entretanto, cabe ressaltar que as ações desencadeadas pelo CNP apenas compreendem a interação do peptídeo com o receptor NPR-B ou NPR-C, não estando relacionadas com a interação com o subtipo de receptor NPR-A.

Contudo, ao analisarmos o perfil de antagonismo apresentado pelo Anantin, pode-se sugerir um antagonismo superável, que ocorre tanto em preparações de animais normotensos e hipertensos quanto em ausência ou presença de camada endotelial. Ainda assim, como anteriormente correlacionado uma ligação entre as atividades de GCs e GK para a manutenção do efeito relaxante exacerbado visto em preparações desprovidas de endotélio de animais hipertensos, este efeito parece não ser afetado pela presença do antagonista, sugerindo que a via de ativação envolvida na resposta relaxante frente à

hipertensão parece não envolver NPR-B ou ser equilibrada pela ativação de outra via de sinalização.

É amplamente conhecido que umas das ações descritas para a GKI é aumentar a probabilidade de abertura dos canais K_{Ca} , levando à hiperpolarização de membrana das células do músculo liso vascular e inibição do influxo de cálcio induzido por agonista, favorecendo o relaxamento vascular (Münzel et al. 2005). Estas ações parecem envolver a formação de GMPC, porém também é descrito na literatura que o NO pode ativar, por via independente de GK, canais para K^+ da membrana do músculo liso vascular, culminando nas mesmas ações de hiperpolarização de membrana e relaxamento vascular (Bolotina et al. 1994).

Além disso, trabalhos sugerem que as ações vasodilatadores do CNP envolvam a ativação de canais para K^+ (Chauhan et al. 2003; Villar et al. 2007; Simon et al. 2009). Desta maneira, procurou-se investigar se o efeito vasodilatador induzido pelo CNP poderia envolver a ativação de canais para K^+ . Utilizando-se de pré-contracção induzida por alta concentração extracelular de K^+ , observou-se que os parâmetros de potência e eficácia do agonista foram atenuados em ambos os grupos, normotenso e hipertenso, em preparações em ausência ou presença de camada endotelial (figuras 26 e 27 e tabela 3). Cabe ressaltar que esta contracção induzida por alta concentração extracelular de K^+ promoveu uma resposta de amplitude semelhante àquela desenvolvida pela fenilefrina, não sendo este o motivo de atenuação de resposta observada.

Além disso, observou-se uma potencialização da resposta do agonista quando em contracção desencadeada por alta concentração extracelular de K^+ em preparações desprovidas de endotélio de animais normotensos em comparação às preparações nas mesmas condições de contracção de animais normotensos, porém em presença de endotélio, o que não ocorreu em preparações de animais hipertenso, sugerindo uma perda da modulação endotelial nesta resposta. Por fim, sugere-se que os efeitos desencadeados pelo CNP parecem envolver a ativação de canais para K^+ presentes no músculo liso e no endotélio vascular.

De acordo com os resultados anteriormente descritos, que evidenciam a participação efetiva de canais para K^+ no efeito vasodilatador induzido pelo CNP, procurou-se elucidar os subtipos destes canais que estariam envolvidos nesta resposta. Assim, ao avaliarmos as curvas concentração-efeito cumulativas para o peptídeo em presença de inibidor seletivo de canais BK_{Ca} , Paxiline, observou-se apenas atenuação da potência do CNP em preparações E+ de 2R e de 2R-1C, ambos comparados ao controle normotenso. De maneira semelhante, Simon e colaboradores (2009) demonstraram a participação de canais BK_{Ca} na hiperpolarização induzida pelo CNP em células endoteliais microvasculares pulmonares em cultura, sendo dependente da ativação da via $GMPC - GK$ e elevação da concentração citosólica de cálcio. Em artérias coronárias de ratos, Brunner e Wölkart (2001) mostraram a participação efetiva de canais BK_{Ca} na redução da pressão de perfusão induzida pelo CNP via NPR-B. Existe um consenso que os canais BK_{Ca} são passíveis de ativação por GK, via fosforilação direta de proteínas do canal pela GK ou por ativação de fosfatase 2A, via GK, levando à desfosforilação de resíduos específicos no canal, culminando em sua ativação (Tanaka; Koike e Toro, 2004).

É descrito que no modelo de hipertensão 2R-1C, o músculo liso vascular de aorta torácica de ratos apresenta um prejuízo na atividade de canais BK_{Ca} , sendo este um dos mecanismos responsáveis pelo relaxamento reduzido à Acetilcolina (Callera et al. 2004). Embora o relaxamento induzido pelo CNP não tenha se mostrado prejudicado em aorta E+ de ratos 2R-1C em relação a 2R, a inibição dos canais BK_{Ca} apresentou-se de mesma amplitude entre os grupos, o que permite sugerir um prejuízo da sinalização através de BK_{Ca} ao CNP em aorta E+ de 2R-1C. Desta forma, podemos sugerir que o relaxamento induzido pelo CNP em aorta E+ de ratos 2R e 2R-1C requer a ativação de canais BK_{Ca} .

Diversos estudos apontam para a efetiva participação de canais SK_{Ca} no relaxamento dependente do endotélio (Coleman; Tare e Parkington, 2004). De maneira semelhante, o relaxamento dependente do endotélio em aorta de ratos 2R-1C foi descrito envolver a ativação de SK_{Ca} (Callera et al. 2004). Desta forma, avaliando o relaxamento induzido pelo CNP em aorta E+, percebeu-se apenas atenuação da potência do CNP em presença de

inibidor seletivo de SK_{Ca} , em ambos os grupos comparados ao 2R, sendo de mesma amplitude. A atividade de canais K_{Ca} é modulada pelo potencial de membrana e pela concentração de cálcio intracelular, ambas condições que se encontram alteradas em 2R-1C: o potencial de membrana de células do músculo liso vascular de aorta de ratos 2R-1C encontra-se menos eletronegativo em relação a 2R, e a concentração de cálcio intracelular basal e o influxo de cálcio em cultura de células do músculo liso vascular de aorta de 2R-1C também estão elevados quando comparados ao 2R (Callera et al. 2000; Callera et al. 2001). Desta forma, é possível que a atividade destes canais K_{Ca} (BK_{Ca} e SK_{Ca}) possam estar prejudicadas em 2R-1C. Portanto, podemos sugerir que a vasodilatação induzida pelo CNP em aorta de ratos 2R e 2R-1C requer a ativação de canais SK_{Ca} .

Diversos trabalhos na literatura descrevem prejuízo nas respostas vasodilatadoras desencadeadas por ativação de K_{ATP} (Ohya et al. 1996; Takaba et al. 1996) em modelos animais de hipertensão. Assim, procurou-se avaliar a participação de canais K_{ATP} no relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos 2R e 2R-1C. Entretanto, em presença de Glibenclamida não se observou diferenças significativas no relaxamento induzido pelo CNP em ambos os grupos. Resultados semelhantes foram obtidos em aorta de ratos 2R e 2R-1C avaliando-se o relaxamento dependente do endotélio induzido por Acetilcolina (Callera et al. 2004). Assim, sugere-se que a via de sinalização desencadeada pelo CNP em aorta de ratos 2R e 2R-1C não envolve a participação de K_{ATP} .

Por fim, para avaliar a contribuição dos canais K_V no relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos 2R e 2R-1C, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativa para o peptídeo, em presença de 4-aminopiridina (4-AP). Desta forma, apenas em aorta E+ de ratos 2R-1C observou-se atenuação da potência do CNP quando em presença de 4-AP e aumento do número de Hill, ambas repostas em relação ao controle normotenso. De maneira semelhante, Callera e colaboradores (2004) observaram que o relaxamento induzido por Acetilcolina em aorta de ratos 2R e 2R-1C requer a ativação de canais K_V . Entretanto, maior atividade vasoconstritora foi observada em 2R-1C, sugerindo maior atividade funcional de canais K_V em aortas de ratos 2R-1C. Neste contexto, os autores

sugeriram um mecanismo compensatório a fim de normalizar o potencial de membrana menos eletronegativo e a maior concentração e influxo de cálcio no músculo liso vascular de aorta de ratos 2R-1C. Tanaka e colaboradores (2006) mostraram que o relaxamento induzido por ANP requer a ativação de canais $K_V2.1$ em anéis de aorta de ratos. Desta forma, podemos sugerir que as respostas evidenciadas em presença de 4-AP e estimuladas por CNP envolvem canais K_V , que parecem estar mais ativados em aortas de 2R-1C, mas não em 2R.

É amplamente descrito na literatura que diversos modelos animais de hipertensão, assim como em humanos, apresentam estresse oxidativo vascular, envolvendo principalmente a formação de O_2^- (Münzel et al. 2005; Paravicini e Touyz, 2008). Entretanto, diversas são as fontes enzimáticas de espécies reativas intracelulares, sendo as mais importantes durante o processo de hipertensão o sistema xantina-xantina oxidase, ciclooxigenase, lipoxigenase, mono-oxidase P_{450} , NOS desacoplada, complexo enzimático NAD(P)H-oxidase e auto-oxidações mitocondriais (Griendling et al. 2000a; Paravicini e Touyz, 2008).

Em condições biológicas normais, a dismutação do O_2^- pela enzima superóxido-dismutase (SOD) ocorre em velocidade suficiente para que a concentração de NO e sua biodisponibilidade seja mantida. Entretanto, considerando que a velocidade de reação entre NO e O_2^- , formando peroxinitrito ($ONOO^-$) é muito mais rápida que àquela de dismutação de O_2^- pela SOD, qualquer alteração nas concentrações de espécies reativas pode gerar grandes consequências para a disponibilidade de NO.

Desta forma, considerando que no modelo de hipertensão 2R-1C existe intensa produção de EROs vascular (Heitzer et al. 1999), procurou-se avaliar a contribuição deste estresse oxidativo sobre os efeitos vasculares desencadeados pelo CNP. Considerando os resultados obtidos por análise de citometria de fluxo em células endoteliais isoladas ratos 2R e 2R-1C, nas quais existe estresse oxidativo caracterizado pela presença de diferentes EROs endoteliais entre os grupos, quando em análise funcional, utilizando-se um agente sequestrador de O_2^- (Tiron), a resposta vasodilatadora induzida pelo CNP não foi afetada.

Isto sugere que apesar de existir estresse oxidativo nas células endoteliais de 2R e 2R-1C, seja como O_2^- ou H_2O_2 , estes exercem pequena participação sobre o efeito funcional desencadeado pelo CNP.

Tendo em vista os efeitos observados com o agente sequestrador de O_2^- , sobretudo nos experimentos em células endoteliais isoladas procurou-se identificar a possível fonte de espécies reativas que estaria envolvida nas respostas induzidas pelo CNP. Desta forma, ao analisarmos as curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP em presença de inibidor seletivo de enzima NAD(P)H-oxidase (Apocinina), observou-se que apenas o efeito máximo induzido pelo CNP em preparações desprovidas de endotélio em 2R-1C foi atenuado (figuras 16 e 17). Cabe ressaltar que este efeito máximo encontrava-se exacerbado, e assim como ocorrido em presença de inibidores seletivos de GCs e GK, separadamente, esta resposta foi normalizada quando a atividade da enzima NAD(P)H-oxidase foi inibida, sugerindo uma possível interação entre essas vias envolvidas no relaxamento vascular.

É conhecido que não apenas o NO é capaz de aumentar a atividade catalítica de GCs para produzir GMPc, mas também outros compostos ativadores diretos, assim como algumas espécies reativas de oxigênio podem interferir com sua atividade enzimática. Dikalov e colaboradores (2008) descrevem que em células do músculo liso vascular de aorta de ratos a formação de O_2^- por NAD(P)H-oxidase é menor que a formação de H_2O_2 , e que a subunidade Nox1 seria a responsável pela produção de O_2^- tanto em condições basais como após estimulação com angiotensina II (AngII), enquanto que a subunidade Nox4 estaria relacionada com a produção de basal H_2O_2 . Não existe um consenso se esta produção de H_2O_2 dependente de NAD(P)H-oxidase ocorreria de maneira direta ou devido à formação de O_2^- e subsequente dismutação por SOD, porém crescentes evidências tem demonstrado que o aumento da expressão protéica de subunidade p22^{phox} aumenta a produção de H_2O_2 sem alterar a geração de O_2^- (Khatri et al. 2004). Portanto, a partir da análise do conjunto de dados funcionais obtidos em aorta de ratos 2R e 2R-1C expostos à inibidores seletivos de GCs e NAD(P)H oxidase, sugere-se que exista a ativação GCs por EROs produzidas pelo complexo enzimático NAD(P)H oxidase, e que a principal espécie reativa envolvida seja o

H_2O_2 , já que o agente sequestrador de O_2^- produziu pouco efeito sobre o relaxamento induzido pelo CNP. Além disso, esta parece ser a via desencadeada para se ter o efeito máximo exacerbado em 2R-1C E-.

A existência de um componente endotelial, independente de NO ou prostaciclina, capaz de promover o relaxamento do músculo liso vascular tem sido amplamente descrito em alguns leitos vasculares, suas ações envolvendo liberação de cálcio em células endoteliais, ativação de canais K_{Ca} , culminando na hiperpolarização, através de junções *gap*, das células do músculo liso vascular adjacente (Harris et al. 2000; Griffith; Chaytor, Edwards, 2004b). Estas são as características do relaxamento vascular induzido pelo EDHF, que ainda permanece com sua identidade química desconhecida.

Considerando que as junções *gap* são pontos de comunicação intercelular importantes para a amplificação e propagação de respostas, e que estas podem ser afetadas, seja em sua formação ou pela condução de sinais, pelo estresse oxidativo, tornou-se interessante avaliar a participação destas junções sobre a resposta relaxante induzida pelo CNP. Desta forma, ao analisarmos o efeito vasodilatador desencadeado pelo CNP em presença de inibidor de junções *gap* em anéis de aorta em presença de endotélio de animais normotensos, observamos que ocorreu redução da potência do agonista, o que não houve em hipertenso (figuras 20 e 21). Cabe ressaltar que embora nossos dados não demonstrem uma participação efetiva do estresse oxidativo, sobretudo do O_2^- , nas respostas induzidas pelo CNP, é importante lembrar que as células do músculo liso vascular de aorta de ratos hipertensos 2R-1C apresentam um elevado nível de O_2^- e que o relaxamento dependente e independente do endotélio se mostram prejudicados (Rodrigues et al. 2008; Rodrigues et al. 2010). Portanto, as modificações ocorridas devido ao estresse oxidativo presente no tecido vascular de 2R-1C ainda permanecem, podendo promover alteração nas respostas induzidas por diversos agonistas, ao recrutarem vias de sinalização específicas que possam ter sofrido tais modificações oxidativas. Portanto, sugere-se que o estresse oxidativo presente em aorta de ratos hipertensos 2R-1C possa ter alterado a formação e/ou

condução de sinais através de junções *gap* mioendoteliais, sendo este o motivo de ausência de efeito quando analisado o relaxamento induzido pelo CNP em anéis de aorta de 2R-1C.

Com tais resultados, não podemos concluir a participação efetiva do EDHF no relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos normotensos, porém considerando que através de tais junções *gap*, além da hiperpolarização desencadeada pelo EDHF, atravessam moléculas com peso molecular inferior a 1 kDa, estando entre elas íon Ca^{2+} , IP_3 e AMPc (Griffith; Chaytor, Edwards, 2004b), apenas podemos sugerir que tais moléculas possam estar envolvidas na resposta vasodilatadora desencadeada pelo CNP.

Enzimas ciclooxigenases (COX) estão presentes em células vasculares e seu metabólito prostaciclina (PGI_2) é o principal produto derivado de COX responsável por efeitos vasodilatadores. Uma vez formada, a PGI_2 interage com o receptor IP, levando à estimulação de adenilil-ciclase e consequente formação de AMPc, culminando em vasodilatação. Além disso, parece haver uma modulação de atividade de COX de forma dependente de cálcio e de EROs (Tang, Vanhoutte, 2009). Desta forma, considerando as ações induzidas pelo CNP em células endoteliais, promovendo o aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} , avaliou-se a participação de prostanóides sobre a modulação da resposta relaxante induzida pelo peptídeo. Assim, quando em presença de inibidor não-seletivo de isoformas de COX (Indometacina), observou-se atenuação da potência do CNP apenas nas preparações com camada endotelial intacta de 2R (figuras 18 e 19). Isto nos permite sugerir que as ações induzidas pelo CNP parecem envolver a ativação de COX endotelial para a formação de prostanóides vasodilatadores, possivelmente PGI_2 , e que este efeito parece estar comprometido no endotélio de aorta de animais hipertensos, assim como se mostra ausente pela remoção endotelial. Além disso, considerando que o CNP é capaz de aumentar a concentração citoplasmática de Ca^{2+} em células endoteliais de aorta de ratos, e o cálcio é um modulador da atividade de COX, assim como o H_2O_2 é um ativador de fosfolipase A_2 , pode existir uma ligação direta entre essas proteínas no sentido de promover a vasodilatação estimulada pelo CNP.

6. CONCLUSÃO

A partir da análise do conjunto de dados obtidos pelos estudos funcionais e em células isoladas de ratos 2R e 2R-1C, sugere-se que a via de sinalização ativada pelo CNP parece sofrer intensa modulação pelo endotélio vascular e pelo estresse oxidativo. O endotélio vascular modula negativamente o relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos 2R e 2R-1C. Embora haja disfunção endotelial em 2R-1C, esta não é suficiente para alterar a mobilização de cálcio induzida pelo CNP. O relaxamento induzido pelo peptídeo envolve a participação de metabólitos de NOS e de espécie radicalar NO^0 , assim como as enzimas NAD(P)H oxidase, GCs, GK e SERCA parecem estar relacionadas com o efeito vasodilatador induzido pelo CNP mais pronunciado em 2R-1C. Assim também, a sinalização desencadeada pelo CNP leva à ativação de canais para K^+ em ambos os grupos, envolvendo a mediação através de junções *gap* mioendoteliais em 2R, mas não em 2R-1C. Por fim, nas respostas celulares desencadeadas pelo CNP, há o envolvimento da mobilização de cálcio intracelular em células endoteliais isoladas e em anéis de aorta torácica de ratos 2R e 2R-1C.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, T.; MATSUI, R.; XU, S. et al. Antioxidant improves smooth muscle sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase function and lowers tyrosine nitration in hypercholesterolemia and improves nitric oxide-induced relaxation. **Circulation Research**, 90: 1114-21, 2002.

AHLUWALIA, A; HOBBS, A.J. Endothelium-derived C-type natriuretic peptide: more than just a hyperpolarizing factor. **Trends in Pharmacological Sciences**, 26 (3): 164-166, 2005.

AMIN, J.; CARRETERO, O.A., ITO, S. Mechanisms of action of atrial natriuretic factor and C-type natriuretic peptide. **Hypertension**, 27: 684-87, 1996.

ANAND-SRIVASTAVA, M.B. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. **Peptides**, 26: 1044-1059, 2005.

ANEJA, A.; EL-ATAT, F.; McFARLANE, S.I., SOWERS, J.R. Hypertension and obesity. **Recent Progress in Hormone Research**, 59: 169-205, 2004.

BOCCHI, E.A.; GUIMARÃES, G.; TARASOUTSHI, F.; SPINA, G.; MANGINI, S., BACAL F. Cardiomyopathy, adult valve disease and heart failure in South America. **Heart**, 95: 181-89, 2009.

BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 368 (6474): 850-53, 1994.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F.S., da SILVA, R.S., BENDHACK, L.M. Decreased vasodilation induced by a new nitric oxide donor in two kidney, one clip hypertensive rats is due to impaired k channel activation. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 32 (5-6): 478-81, 2005.

BOTTING, R., VANE, J.R. Vasoactive mediators derived from the endothelium. **Arch. Mal. Coeur. Vaiss**, 82 (4): 11-14, 1989.

BOHR, D.F.; WEBB, R.C. Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension. **The American Journal of Medicine**, 77: 3-16, 1984.

BRADLEY, J.R.; THIRU, S., POBER, J.S. Hydrogen peroxide-induced endothelial retraction is accompanied by a loss of the normal spatial organization of endothelial cell adhesion molecules. **Am. J. Pathol.**, 147 (3): 627-41, 1995.

BROWNER, N.C.; DEY, N.B.; BLOCH, K.D. et al. Regulation of cGMP-dependent protein kinase expression by soluble guanylyl cyclase in vascular smooth muscle cells. **The Journal of Biological Chemistry**, 279 (45): 46631-36, 2004.

BRUNNER, F., WÖLKART, G. Relaxant effect of C-type natriuretic peptide involves endothelium and nitric oxide-cGMP system in rat coronary microvasculature. **Cardiovascular Research**, 51: 577-84, 2001.

BRZEZINSKA, A.K.; LOHR, N., CHILIAN, W.M. Electrophysiological effects of O₂⁻ on the plasma membrane in vascular endothelial cells. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 289: H2379–H2386, 2005.

CALLERA, G.E.; BENDHACK, L.M. Contribution of the sarcoplasmic reticulum calcium uptake and L-type calcium channels to altered vascular responsiveness in the aorta of renal hypertensive rats. **General Pharmacology**, 33: 457-66, 1999.

CALLERA, G.E.; VARANDA, W.A.; BENDHACK, L.M. Impaired relaxation to acetylcholine in 2K-1C hypertensive rat aortas involves changes in membrane hyperpolarization instead of an abnormal contribution of endothelial factors. **General Pharmacology**, 34: 379-389, 2000.

CALLERA, G.E.; VARANDA, W.A.; BENDHACK, L.M. Ca²⁺ influx is increased in 2-kidney, 1-clip hypertensive rat aorta. **Hypertension**, 38 (parte 2): 592-96, 2001.

CALLERA, G.E.; YOGI, A.; TOSTES, R.C. et al. Ca²⁺-activated K⁺ channels underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilation in 2K-1C hypertensive rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 309 (3): 1036-2, 2004.

CHAUHAN, S.D.; NILSSON, H.; AHLUWALIA, A. et al. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 100: 1426-31, 2003.

CHITALEY, K e WEBB, R.C. Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of rho-kinase signaling. **Hypertension**, 39 (parte 2): 438-42, 2002.

CHIU, J.J.; WUNG, B.S.; SHYY, J.Y. et al. Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 17 (12): 3570-77, 1997.

CHUN, T.H.; ITOH, H.; SAITO, T. et al. Oxidative stress augments secretion of endothelium-derived relaxing peptides, C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. **Journal of Hypertension**, 18 (5): 575-80, 2000.

COLEMAN, H.A.; TARE, M.; PARKINGTON, H.C. Endothelial potassium channel, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in healthy and disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 31: 641-49, 2004.

COLLIER, J., VALLANCE, P. Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. **Trends Pharmacol. Sci.**, 10 (11): 427-31, 1989.

COSTA, M.A.; ELESGARAY, R.; CANIFFI, C. et al. Role of cardiovascular nitric oxide system in C-type natriuretic peptide effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 359: 180-86, 2007.

CRIMI, E.; IGNARRO, L.J., NAPOLI, C. Microcirculation and oxidative stress. **Free Radical Research**, 41 (12): 1364-75, 2007.

de JULIIS, G.N.; WINGATE, J.K.; KOPPERS, A.J. et al. Definitive evidence for the non-mitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 91 (5): 1968-1975, 2006.

DIEDERICH, D.; YANG, Z.H.; BÜHLER, F.R. et al. Impaired endothelium-dependent relaxations in hypertensive resistance arteries involve cyclooxygenase pathway. **Am. J. Physiol.**, 258 (2 Pt 2): H445-51, 1990.

DREWETT, J.G.; FENDLY, B.M.; GARBERS, D.L. et al. Natriuretic peptide receptor-B (guanylyl cyclase-B) mediates C-type natriuretic peptide relaxation of precontracted rat aorta. **The Journal of Biological Chemistry**, 270 (9): 4668-74, 1995.

FERON, O.; SALDANA, F.; MICHEL, J.B. et al. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. **J. Biol. Chem.**, 273 (6): 3125-28, 1998.

FIGUEROA, X.F., DULING, B.R. Gap junctions in the control of vascular function. **Antioxidants and Redox Signaling**, 11 (2): 251-266, 2009.

FRUTOS, S.; SAURA, M.; RIVERO-VILCHES, F.J. et al. C-type natriuretic peptide decreases soluble guanylate cyclase levels by activating the proteasome pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1643 (1-3): 105-112, 2003.

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

GAO, Y.J. e LEE, R.M. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A(2) production. **British Journal of Pharmacology**, 134 (8): 1639-46, 2001.

GARLAND, C.J., DORA, K.A. Evidence against C-type natriuretic peptide as an arterial 'EDHF'. **British Journal of Pharmacology**, 153 (1): 4-5, 2008.

Goldblatt, H.; Lynch, J.; Hanzal, R.F. et al. Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **J Exp Med**. 59 (3): 347-379, 1934.

GOODENOUGH, D.A.; GOLIGER, J.A.; PAUL, D.L. Connexins, connexons, and intercellular communication. **Annu. Rev. Biochem.**, 65: 475-502, 1996.

GOODWIN, B.L.; SOLOMONSON, L.P.; EICHLER, D.C. Argininosuccinate synthase expression is required to maintain nitric oxide production and cell viability in aortic endothelial cells. **J. Biol. Chem.** 279: 18353-18360, 2004.

GRIENDLING, K.K.; MINIERI, C.A.; OLLERENSHAW, J.D. et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**, 74: 1141-48, 1994.

GRIENDLING, K.K.; SORESCU, D.; LASSÈGUE, B. et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. **Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 20: 2175-2183, 2000a.

GRIENDLING, K.K.; SORESCU, D., USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ. Res.**, 86 (5): 494-501, 2000b.

GRIFFITH, T.M. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? **British Journal of Pharmacology**, 141 (6): 881-903, 2004a.

GRIFFITH, T.M.; CHAYTOR, A.T., EDWARDS, D.H. The obligatory link: role of gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization. **Pharmacological Research**, 49 (6): 551-564, 2004b.

GUAN, S.; FOX, J.; MITCHELL KD, NAVAR, LG. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. **Hypertension**, 20: 763-67, 1992.

HAGIWARA, H.; SAKAGUCHI, H.; ITAKURA, M. et al. Autocrine regulation of rat chondrocyte proliferation by natriuretic peptide C and its receptor, natriuretic peptide receptor-B. **J. Biol. Chem.**, 269: 10729-33, 1994.

HARRIS, D.; MARTIN, P.E.M.; EVANS, W.H. et al. Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor responses and mechanisms of K(+)-relaxation. **European Journal of Pharmacology**, 402: 119-128, 2000.

HEITZER, T.; WENZEL, U.; HINK, U. et al. Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. **Kidney Int.**, 55: 252-260, 1999.

HOOL, L.C.; CORRY, B. Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxid. Redox Signal**, 9 (4): 409-35, 2007.

HOWARD, A.B.; ALEXANDER, R.W.; NEREM, R.M. et al. Cyclic strain induces an oxidative stress in endothelial cells. **Am. J. Physiol.**, 272: C421-27, 1997.

HUSSAIN, M.B.; HOBBS, A.J., MACALLISTER, R.J. Autoregulation of nitric oxide-soluble guanylate cyclase-cyclic GMP signalling in mouse thoracic aorta. **Br. J. Pharmacol.**, 128: 1082-88, 1999.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 84 (24): 9265-9269, 1987.

IGNARRO, L.J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. **Circulation Research**, 65:1-21, 1989.

INOUE, K; NARUSE, K.; YAMAGAMI, S. et al. Four functionally distinct C-type natriuretic peptides found in fish reveal evolutionary history of the natriuretic peptide system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 100 (17): 10079-84, 2003.

JAIMES, E.A.; SWEENEY, C. e RAJJ, L. Effects of the reactive oxygen species hydrogen peroxide and hypochlorite on endothelial nitric oxide production. **Hypertension**, 38: 877-83, 2001.

JOHN, S.W; KREGG, J.H.; OLIVER, P.M. et al. Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. **Science**, 267 (5198): 679-81, 1995.

KALINOWSKI, L; MALINSKI, T. Endothelial NADH/NADPH-dependent enzymatic sources of superoxide production: relationship to endothelial dysfunction. **Acta Biochimica Polonica**, 51 (2): 459-469, 2004.

KANAGY, N.L.; CHARPIE, J.R.; DANANBERG, J. et al. Decreased sensitivity to vasoconstrictors in aortic rings after acute exposure to nitric oxide. **Am. J. Physiol.**, 271: H253-60, 1996.

KHATRI, J.J.; JOHNSON, C.; MAGID, R. et al. Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma. **Circulation**, 109: 520-525, 2004.

KAYE, D.M., KELLY, R.A. Expression and regulation of the sodium-calcium exchanger in cardiac microvascular endothelial cells. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 26: 651-55, 1999.

KEDDIS, M.T; GAROVIC, V.D.; BAILEY, K.R. et al. Ischaemic nephropathy secondary to atherosclerotic renal artery stenosis: clinical and histopathological correlates. **Nephrol Dial Transplant**, 25: 3615-22, 2010.

KEENAN, N.L.; ROSENDORF, K.A. Prevalence of hypertension and controlled hypertension - United States, 2005-2008. **Centers for Disease Control and Prevention MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report**, 60: (Suplemento – Prevalence of Hypertension and Cotrolled Hypertension – United States, 2005-2008) 94-98, 2011.

de KEULENAER, G.W.; CHAPPELL, D.C.; ISHIZAKA, N. et al. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. **Circulation Research**, 82: 1094-1101, 1998.

KELSALL, C.J.; CHESTER, A.H.; AMRANI, M. et al. C-type natriuretic peptide relaxes human coronary artery bypass grafts precontracted by endothelin-1. **Ann. Thorac. Surg.**, 80: 1347-52, 2005.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K. et al. Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA. **Neuroreport**. 9 (15): 3345-3348, 1998.

KOMORI, K.; TSUJIMURA, A.; TAKAO, T. et al. Nitric oxide synthesis leads to vascular endothelial growth factor synthesis via the NO/cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) pathway in human corpus cavernosal smooth muscle cells. **J Sex Med**. 5: 1623-1635, 2008.

KONE, B.C. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. **Cardiovasc. Res.**, 51(3): 429-41, 2001.

KURACHI, Y.; ISHII, M. Cell signal control of the G protein-gated potassium channel and its subcellular localization. **Journal of Physiology**, 554 (2): 285-94, 2003.

LAU, K.L.; KONG, S.K.; KO, W.H. et al. cGMP stimulates endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in vascular endothelial cells. **Life Sciences**, 73 (16): 2019-28, 2003.

LEE, J.; KIM, S.; JUNG, M. et al. Altered expression of vascular natriuretic peptide receptors in experimental hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 29 (4): 299-303, 2002.

LEE, D.L.; WEBB, R.C e JIN, L. Hypertension and RhoA/Rho-kinase signaling in the vasculature: highlights from the recent literature. **Hypertension**, 44 (6): 796-99, 2004.

LELIÈVRE, V.; PINEAU, N.; HU, Z. et al. Proliferative actions of natriuretic peptides on neuroblastoma cells. Involvement of guanylyl cyclase and non-guanylyl cyclase pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, 276 (47): 43668-76, 2001.

LI, J.M., SHAH, M. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, 277 (22): 19952-60, 2002.

LIANG, C.F.; AU, A.L.S.; LEUNG, S.W.S. et al. Endothelium-derived nitric oxide inhibits the relaxation of the porcine coronary artery to natriuretic peptides by desensitizing big conductance calcium-activated potassium channels of vascular smooth muscle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 334 (1): 223-31, 2010.

LUCAS, K.A.; PITARI, G.M.; KAZEROUNIAN, S. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological Reviews**, 52 (3): 375-413, 2000.

LUNARDI, C.N.; da SILVA, R.S., BENDHACK, L.M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 42 (1): 87-93, 2009.

MADHANI, M.; SCOTLAND, R.S.; MacALLISTER, R.J. et. al. Vascular natriuretic peptide receptor-linked particulate guanylate cyclases are modulated by nitric oxide-cyclic GMP signaling. **British Journal of Pharmacology**, 139: 1289-96, 2003.

MANTELLI, L.; AMERINI, S., LEDDA, F. Roles of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in vasorelaxant effect of acetylcholine as influenced by aging and hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 25 (4): 595-602, 1995.

MARTINEZ-MALDONADO, M. Pathophysiology of renovascular hypertension. **Hypertension**, 17 (5): 707-19, 1991.

MATSUKAWA, N.; GRZESIK, W.J.; TAKAHASHI, N. et al. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 96: 7403-08, 1999.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, 43 (2): 109-142, 1991.

MÜNDEL, T.; DAIBER, A.; ULRICH, V. et al. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. **Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 25 (8): 1551-57, 2005.

NAKATSUBO, N. et al. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. **FEBS Letters**. 427 (2): 263-266, 1998.

NGUYEN, H.G.; KORACH, A.; COLLURA, C. et al. Differential effects of natriuretic peptides on arterial and venous coronary artery bypass conduits. **Ann. Thorac. Surg.**, 87 (3): 748-56, 2009.

OKAMURA, T.; MIYAZAKI, M.; INAGAMI, T. et al. Vascular renin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats. **Hypertension**, 8 (7): 560-65, 1986.

SENDÃO-OLIVEIRA, A.P.; BENDHACK, L.M. Relaxation induced by acetylcholine involves endothelium-derived hyperpolarizing factor in 2-kidney 1-clip hypertensive rat carotid arteries. **Pharmacology**, 72 (4): 231-39, 2004.

OHYA, Y.; SETOGUCHI, M.; FUJII, K. et al. Impaired action of levcromakalim on ATP-sensitive K channels in mesenteric artery cells from spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, 27: 1234-39, 1996.

OLIVIERA, A.P.; 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. **Pharmacol.**, 50 (5-6): 153-59, 2009.

PAOLOCCI, N.; EKELUND, U.F.; ISODA, T. et al. cGMP-independent inotropic effects of nitric oxide and peroxyxynitrite donors: potential role for nitrosylation. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, 279 (4): H1982-88, 2000.

PARAVICINI, T.M., TOUYZ, R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, 31: S170-80, 2008.

POTTER, L.R. e HUNTER, T. Activation of protein kinase C stimulates the dephosphorylation of natriuretic peptide receptor-B at a single serine residue: a possible mechanism of heterologous desensitization. **The Journal of Biological Chemistry**, 275 (40): 31099-106, 2000.

POTTER, L.R. Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. **Front. Biosci.**, 10:1205-20, 2005.

POTTER, L.R.; ABBEY-HOSCH, S., DICKEY, D.M. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. **Endocrine Reviews**, 27 (1): 47-72, 2006.

POTTER, L.R. Regulation and therapeutic targeting of peptide-activated receptor guanylyl cyclases. **Pharmacology and Therapeutics**, 130 (1): 71-82, 2011.

RAUTUREAU, Y.; GOWERS, I.; WHEELER-JONES, C.P. et al. C-type natriuretic peptide regulation of guanosine-3',5'-cyclic monophosphate production in human endothelial cells. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, 30: 185 – 192, 2010.

RIVERO-VILCHES, F.; de FRUTOS, S.; RODRIGUEZ-PUYOL, M. et al. Guanylate cyclases: physiological processes mediated by cyclic GMP. **Nefrologia**, 21: 233-39, 2001.

RIVERO-VILCHES, F.; de FRUTOS, S.; RODRIGUEZ-PUYOL, M. et al. Differential relaxing responses to particulate or soluble guanylyl cyclase activation on endothelial cells: a mechanism dependent on PKG-I alpha activation by NO/cGMP. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, 285: C891-98, 2003.

RODRIGUES, G.J.; RESTINI, C.B.; LUNARDI, C.N. et al. Caveolae dysfunction contributes to impaired relaxation induced by nitric oxide donor in aorta from renal hypertensive rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 323 (3): 831-37, 2007.

RODRIGUES, G.J.; LUNARDI, C.N.; LIMA, R.G. et al. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**. 18(3): 176-183, 2008.

RODRIGUES, G.J.; RESTINI, C.B.A.; LUNARDI, C.N. et al. Decreased number of caveolae in endothelial cells impairs the relaxation induced by acetylcholine in hypertensive rat aortas. **Cardiovascular Pharmacology**, 627: 251-57, 2010.

RUMMERY, N.M., HILL, C.E. Vascular gap junctions and implications for hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 31 (10): 659-67, 2004.

SAHA, S.; LI, Y.; LAPPAS, G. et al. Activation of natriuretic peptide receptor-C attenuates the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: implication of G α protein. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 44 (2): 336-44, 2008.

SALIEZ, J.; BOUZIN, C.; RATH, G. et al. Role of caveolar compartmentation in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation: Ca²⁺ signals and gap junction function are regulated by caveolin in endothelial cells. **Circulation**, 117 (8): 1065-74, 2008.

SCHOEFFTER, P., MILLER, R.C. Role of sodium-calcium exchange and effects of calcium entry blockers on endothelial-mediated responses in rat isolated aorta. **Mol. Pharmacol.**, 30, 53-57, 1986.

SCHUBERT, A.L.; SCHUBERT, W.; SPRAY, D.C. et al. Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. **Biochemistry**, 41 (18): 5754-64, 2002.

SEVERS, N.J.; ROTHERY, S.; DUPONT, E. et al. Immunocytochemical analysis of connexin expression in the healthy and diseased cardiovascular system. **Microsc. Res. Tech.**, 52 (3): 301-22, 2001.

SIMON, A.; HARRINGTON, E.O.; LIU, G.X. et al. Mechanism of C-type natriuretic peptide-induced endothelial cell hyperpolarization. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, 296: L248-L256, 2009.

SUDOH, T.; MINAMINO, N.; KANGAWA, K. et al. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 168 (2): 863-70, 1990.

STAN, R.V. Structure and function of endothelial caveolae. **Microsc. Res. Tech.**, 57 (5): 350-64, 2002.

STINGO, A.J.; CLAVELL, A.L.; HEUBLEIN, D.M. et al. Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma. **Am J Physiol.**, 263: H1318-H1321, 1992.

SUGA, S.; NAKAO, K.; ITOH, H. et al. Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". **J. Clin Invest.**, 90: 1145-49, 1992.

SUGA, S.; ITOH, H.; KOMATSU, Y. et al. Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells--evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. **Endocrinology**, 133: 3038-41, 1993.

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

TAKABA, H.; NAGAO, T.; IBAYASHI, S. et al. Altered cerebrovascular response to a potassium channel opener in hypertensive rats. **Hypertension**, 28: 143-46, 1996.

TAKAHASHI, A.; CAMACHO, P.; LECHLEITER, J.D. et al. Measurement of intracellular calcium. **Physiological Reviews**, 79 (4): 1089-1125, 1999.

TAMURA, N.; OGAWA, Y.; CHUSHO, H. et al. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 97 (8): 4239-44, 2000.

TANAKA, Y.; KOIKE, K., TORO, L. MaxiK channel roles in blood vessels relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. **Journal of Smooth Muscle Research**, 40 (4-5): 125-53, 2004.

TANAKA, Y.; TANG, G.; TAKIZAWA, K. et al. KV channels contribute to nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-induced relaxation of a rat conduit artery. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 317 (1): 341-54, 2006.

TANG, E.H.C.; LEUNG, F.P.; HUANG, Y. et al. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. **British Journal of Pharmacology**, 151: 15-23, 2007.

TANG, E.H., VANHOUTTE, P.M. Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. **Pharmacology and Therapeutics**, 122 (2): 140-49, 2009.

THAKALI, K.; DAVENPORT, L.; FINK, G.D. et al. Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. **Hypertension**, 47 (3): 482-87, 2006.

THOMAS, D.D.; RIDNOUR, L.A.; ISENBERG, J.S. et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, 45 (1): 18-31, 2008.

VANE, J.R.; ANGGARD, E.E., BOTTING, R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **New Engl. J. Med.**, 323, 27-36. 1990.

VASHIST, A.; HELLER, E.N.; BROWN, E.J., ALHADDAD, I.A. Renal artery stenosis: a cardiovascular perspective. **American Heart Journal**, 143 (4): 559-64, 2002.

VILLAR, I.C.; Panayiotou, C.M.; Sheraz, A. et al. Definitive role for natriuretic peptide receptor-C in mediating the vasorelaxant activity of C-type natriuretic peptide and endothelium-derived hyperpolarising factor. **Cardiovascular Research**, 74: 515-25, 2007.

WANG, B.; LUO, T.; CHEN, D. et al. Propofol reduces apoptosis and up-regulates endothelial nitric oxide synthase protein expression in hydrogen peroxide-stimulated human umbilical vein endothelial cells. **Anesth Analg**. 105: 1027-1033, 2007.

WEBER, W.; FISCHILI, W.; HOCHULI, E. et al. Anantin - a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (ANF). I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. **The Journal of Antibiotics**, 44 (2): 164-71, 1991.

WEI, C-M.; AARHUS, L.; MILLER, V.M. et al. Action of C-type natriuretic peptide in isolated canine arteries and veins. **Am. J. Physiol.**, 264 (33): H71-H73, 1993.

WEI, C-M.; KIM, C.H.; KHRAIBI, A.A. et al. Atrial natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide in spontaneously hypertensive rats and their vasorelaxing actions in vitro. **Hypertension**, 23 (parte 2): 903-907, 1994.

WIDDER, J.D.; GUZIK, T.J.; MUELLER, C.F. et al. Role of the multidrug resistance protein-1 in hypertension and vascular dysfunction caused by angiotensin II. **Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 27: 762-68, 2007.

WOLF, G. Free radical production and angiotensin. **Current Hypertension Reports**, 2: 167-73, 2000.

ZABEL, U.; KLEINSCHNITZ, C.; OH, P. et al. Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. **Nat. Cell. Biol.**, 4 (4): 307-11, 2002.

ZHAO, H.; KALIVENDI, S.; ZHANG, H. et al. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. **Free Rad Biol Med**. 34: 1359-1368, 2003.

ZOLLE, O.; LAWRIE, A.M., SIMPSON, A.W. Activation of the particulate and not the soluble guanylate cyclase leads to the inhibition of Ca²⁺ extrusion through localized elevation of cGMP. **J. Biol. Chem.**, 275 (34): 25892-99, 2000.

ANEXO

Estudos por Espectrofluorofotometria: DAF-2/FLUO-3 e o CNP

1. Estudos por Espectrofluorofotometria

1.1 Preparo das sondas fluorescentes

Para a realização dos estudos por espectrofluorofotometria, tornou-se necessária a obtenção de sondas fluorescentes sem os radicais que promovem a permeação destes compostos para o interior das células (Takahashi et al. 1999) e que, por sua vez, quando presentes nas moléculas das sondas, diminuem sua auto-fluorescência. Assim, com o objetivo de investigar a interação química existente entre a sonda DAF-2/DA e o CNP, foi necessária a clivagem da fração diacetato (DA), para gerar o composto auto-fluorescente DAF-2. Da mesma maneira, com a sonda FLUO-3AM foi necessária a clivagem da porção acetóxi-metil-éster (AM), para gerar o composto auto-fluorescente FLUO-3.

1.1.1 Obtenção da sonda fluorescente DAF-2 a partir de DAF-2/DA

Para a obtenção da sonda fluorescente DAF-2 a partir do DAF-2/DA, foram utilizadas células endoteliais de aorta torácica ratos Wistar com aproximadamente 35 dias de idade (180 – 200 g), que foram anestesiados com Isoflurano (1 mL/mL – Forane® Abbott) e sacrificados por decapitação. Segmentos de aorta torácica dos ratos (15 mm) foram dissecados dos tecidos adjacentes, isolados, cortados longitudinalmente e mantidos em solução de Hanks completa modificada (CaCl₂ 1,6 mmol/L; MgCl₂ 1,0 mmol/L; NaCl 120,0 mmol/L; KCl 5,0 mmol/L; NaH₂PO₄ 0,5 mmol/L; dextrose 10,0 mmol/L; HEPES 10,0 mmol/L; pH 7,4). A remoção das células endoteliais foi feita mecanicamente com o auxílio de uma haste plástica plana (rodinho). A suspensão de células obtida foi centrifugada a 200 xg por 5 minutos e o líquido sobrenadante foi desprezado. Adicionou-se 1mL de solução de DAF-2/DA (10 µmol/L, previamente diluída em solução de Hanks completa modificada), na qual as células foram ressuspensas e mantidas por 30 minutos, protegidas da luminosidade, em estufa de CO₂ a 5% a temperatura de 37°C. Após esse período, foi adicionado 500 µL de Dimetil-sulfóxido (DMSO 100%) para causar a lise da membrana plasmática das células endoteliais. A suspensão de células permaneceu em contato com o DMSO durante 10

minutos e posteriormente, realizou-se nova centrifugação a 200 xg por 5 minutos. O líquido sobrenadante contendo a sonda fluorescente sem a fração diacetato, ou seja, o DAF-2 foi recolhido e armazenado sob refrigeração (-20°C) e proteção da luminosidade.

1.1.2 Obtenção da sonda fluorescente FLUO-3 a partir de FLUO-3AM

Para a obtenção da sonda fluorescente FLUO-3 a partir do FLUO-3AM, foram utilizadas células endoteliais de aorta torácica ratos Wistar com 35 a 40 dias de idade (180 – 200 g), que foram anestesiados com Isoflurano (1 mL/mL – Forane[®] Abbott) e sacrificados por decapitação. Segmentos de aorta torácica dos ratos (15 mm) foram dissecados dos tecidos adjacentes, isolados, cortados longitudinalmente e mantidos em solução de Hanks completa modificada (CaCl₂ 1,6 mmol/L; MgCl₂ 1,0 mmol/L; NaCl 120,0 mmol/L; KCl 5,0 mmol/L; NaH₂PO₄ 0,5 mmol/L; dextrose 10,0 mmol/L; HEPES 10,0 mmol/L; pH 7,4). A remoção das células endoteliais foi feita mecanicamente com o auxílio de uma haste plástica plana (rodinho). A suspensão de células obtida foi centrifugada a 200 xg por 5 minutos e o líquido sobrenadante foi desprezado. Adicionou-se 1mL de solução de FLUO-3AM (10 µmol/L, previamente diluída em solução de Hanks completa modificada), na qual as células foram ressuspensas e mantidas por 30 minutos, protegidas da luminosidade, em estufa de CO₂ a 5% a temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado 500 µL de Dimetil-sulfóxido (DMSO 100%) para causar a lise da membrana plasmática das células endoteliais. A suspensão de células permaneceu em contato com o DMSO durante 10 minutos e posteriormente, realizou-se nova centrifugação a 200 xg por 5 minutos. O líquido sobrenadante contendo a sonda fluorescente sem a fração acetóxi-metil-éster, ou seja, o FLUO-3, foi recolhido e armazenado sob refrigeração (-20°C) e proteção da luminosidade.

1.2 Protocolos experimentais utilizando o DAF-2

1.2.1 Avaliação da IF emitida pelo DAF-2

Para avaliar a intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda DAF-2, esta foi analisada por Espectrofluorofotômetro (RF-5301PC, Shimadzu Corporation), utilizando-se como comprimento de onda de excitação 488 nm, com lâmpada de xenônio (150 W), em cubeta para fluorescência de quartzo, com volume de 1 mL e caminho óptico de 1 cm. De modo semelhante, a sonda DAF-2/DA teve sua intensidade de fluorescência analisada por espectrofluorofotometria, sendo excitada em 488 nm. De acordo com as características da sonda DAF-2/DA como marcadora indireta para NO intracelular, foram realizadas análises da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DAF-2 em presença de um composto macrocíclico de rutênio doador de NO, Terpy (122 $\mu\text{mol/L}$), ou solução saturada de NO (borbulhamento de NO a 1 mmol/L, 1 minuto/mL de solução). As análises foram realizadas em sala escura a temperatura de 20°C e soluções com pH 7,4. Os dados foram analisados pelo software OriginPro 8 (1991 – 2007), sendo plotados como unidade de intensidade de fluorescência emitida em função do comprimento de onda (nm).

1.2.2 Avaliação da interação entre DAF-2 e CNP

Para avaliar a possibilidade de interação química entre as moléculas da sonda DAF-2 e do CNP, em 500 μL de sonda DAF-2 foi adicionado CNP (1 $\mu\text{mol/L}$) e a intensidade de fluorescência emitida foi medida. O comprimento de onda utilizado na análise foi de 488 nm, utilizando-se cubeta para fluorescência de quartzo, com volume de 1 mL e caminho óptico de 1 cm. A solução de DAF-2 analisada em ausência ou presença de doador de NO, Terpy ou de solução saturada de NO. As análises foram realizadas em sala escura a temperatura de 20°C e as soluções apresentavam pH 7,4. Os dados foram analisados pelo software OriginPro 8 (1991 – 2007), sendo plotados como unidade de intensidade de fluorescência emitida em função do comprimento de onda (nm).

1.3 Protocolos experimentais utilizando o FLUO-3

1.3.1 Avaliação da IF emitida pelo FLUO-3

Para avaliar a intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda FLUO-3, esta foi analisada por Espectrofluorofotômetro (RF-5301PC, Shimadzu Corporation), utilizando-se como comprimento de onda de excitação 488 nm, com lâmpada de xenônio (150 W), em cubeta para fluorescência de quartzo, com volume de 1 mL e caminho óptico de 1 cm. De modo semelhante, a sonda FLUO-3AM teve sua intensidade de fluorescência analisada por espectrofluorofotometria, sendo excitada em 488 nm. De acordo com as características da sonda FLUO-3AM como marcador para cálcio intracelular, foram realizadas análises da intensidade de fluorescência emitida pela sonda FLUO-3 em presença de solução de CaCl_2 (1,6 mmol/L). As análises foram realizadas em sala escura a temperatura de 20°C e soluções com pH 7,4. Os dados foram analisados pelo software OriginPro 8 (1991 – 2007), sendo plotados como unidade de intensidade de fluorescência emitida em função do comprimento de onda (nm).

1.3.2 Avaliação da interação entre FLUO-3 e CNP

Para avaliar a possibilidade de interação química entre as moléculas da sonda FLUO-3 e do CNP, em 500 μL de sonda FLUO-3 foi adicionado CNP (1 $\mu\text{mol/L}$) e a intensidade de fluorescência emitida foi medida. O comprimento de onda utilizado na análise foi de 488 nm, utilizando-se cubeta para fluorescência de quartzo, com volume de 1 mL e caminho óptico de 1 cm. A solução de FLUO-3 foi analisada em ausência ou presença de solução de CaCl_2 (1,6 mmol/L). As análises foram realizadas em sala escura a temperatura de 20°C e as soluções apresentavam pH 7,4. Os dados foram analisados pelo software OriginPro 8 (1991 – 2007), sendo plotados como unidade de intensidade de fluorescência emitida em função do comprimento de onda (nm).

2. Resultados

2.1 Avaliação da IF emitida pela sonda DAF-2

Para a realização dos estudos de interação entre a sonda DAF-2/DA e o CNP, tornou-se necessária a obtenção da sonda DAF-2, a partir da DAF-2/DA, e portanto, uma avaliação de sua fluorescência. Desta forma, as sondas DAF-2/DA e DAF-2 foram separadamente submetidas à excitação em 488 nm e verificada a sua IF emitida. Assim, como pode ser observado na figura 39, a sonda DAF-2/DA não apresentou fluorescência detectável, enquanto que a sonda DAF-2 obteve um alto sinal de fluorescência quando em comparação a DAF-2/DA.

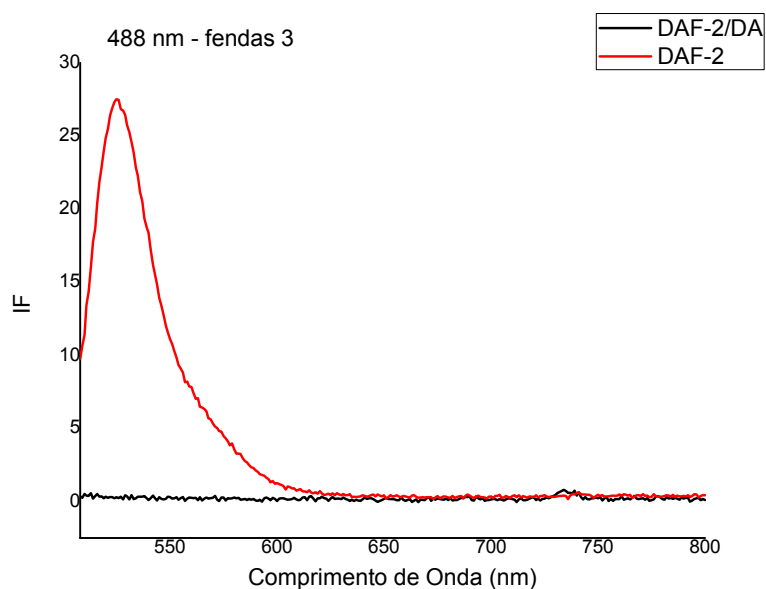


Fig. 39: Traçado fluorimétrico representativo da intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda DAF-2 em comparação com DAF-2/DA. Os experimentos foram realizados em fluorímetro com excitação por laser de xenônio, com fenda de excitação em 488 nm e fenda de emissão em 525 nm, abertura de fendas 3, em sala escura a temperatura de 20°C. Em preto, representa-se a sonda DAF-2/DA e em vermelho a sonda DAF-2.

Com o objetivo de verificar a seletividade da sonda obtida DAF-2, análises fluorimétricas foram realizadas em presença de solução saturada de NO (borbulhamento de NO a 1 mmol/L, 1 minuto/mL de solução) ou composto macrocíclico de rutênio doador de NO Terpy (122 µmol/L). Assim, tanto a sonda DAF-2 em presença de solução de NO, como

em presença de Terpy teve sua fluorescência aumentada quando comparada apenas a IF emitida pela sonda DAF-2 (figura 40).

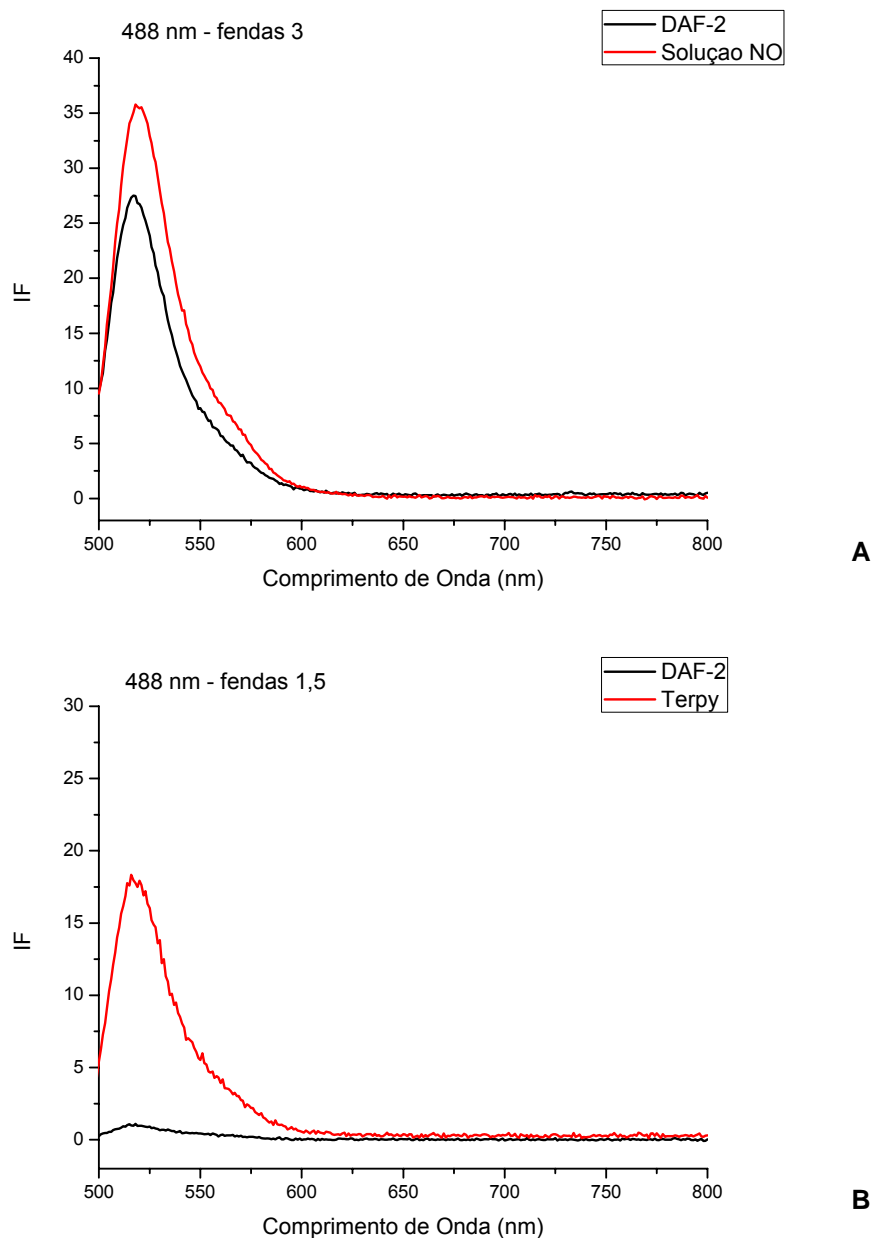


Fig. 40: Traçado fluorimétrico representativo da intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda DAF-2 em presença de solução saturada de NO (borbulhamento de NO a 1 mmol/L, 1 minuto/mL de solução, abertura de fendas 3, **A**) ou composto macrocíclico de rutênio doador de NO Terpy (122 $\mu\text{mol/L}$, abertura de fendas 1,5, **B**). Os experimentos foram realizados em fluorímetro com excitação por laser de xenônio, com fenda de excitação em 488 nm e fenda de emissão em 518 em **A**, e em 517 nm em **B**, em sala escura a temperatura de 20°C. Em preto, representa-se a sonda DAF-2 e em vermelho a presença de solução de NO ou Terpy.

2.2 Avaliação da Interação entre DAF-2 e CNP

Com o objetivo de avaliar a interação existente entre a sonda DAF-2/DA e CNP, análises fluorimétricas foram realizadas na sonda obtida DAF-2 em ausência ou presença de CNP (1 $\mu\text{mol/L}$). Desta forma, como observado na figura 41, em presença de CNP a sonda DAF-2 teve sua IF diminuída.

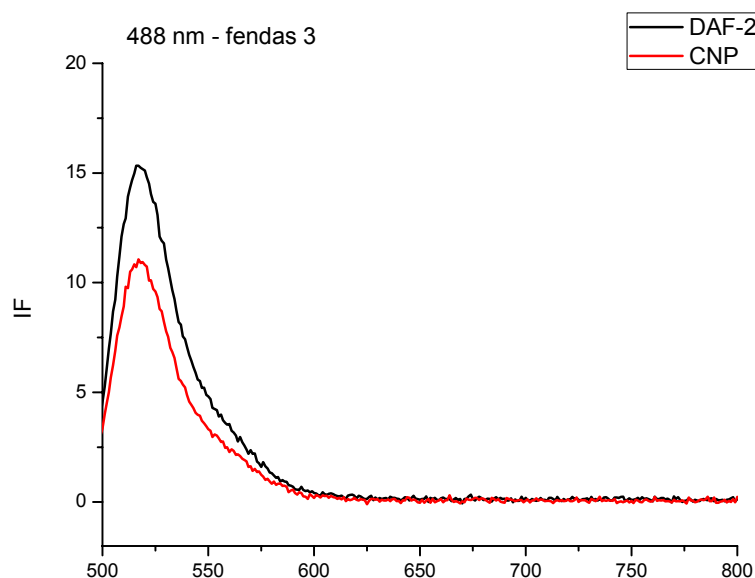


Fig. 41: Traçado fluorimétrico representativo da intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda DAF-2 em presença de CNP (1 $\mu\text{mol/L}$). Os experimentos foram realizados em fluorímetro com excitação por laser de xenônio, com fenda de excitação em 488 nm e fenda de emissão em 519 nm, abertura de fendas 3, em sala escura a temperatura de 20°C. Em preto, representa-se a sonda DAF-2 e em vermelho a presença de CNP.

2.3 Avaliação da IF emitida pela sonda FLUO-3

Para a realização dos estudos de interação entre a sonda FLUO-3AM e o CNP, tornou-se necessária a obtenção da sonda FLUO-3, a partir da FLUO-3AM, e portanto, uma avaliação de sua fluorescência. Desta forma, as sondas FLUO-3AM e FLUO-3 foram separadamente submetidas à excitação em 488 nm e verificada a sua IF emitida. Assim, como pode ser observado na figura 42, a sonda FLUO-3AM não apresentou fluorescência detectável, enquanto que a sonda FLUO-3 obteve um alto sinal de fluorescência quando em comparação a FLUO-3AM.

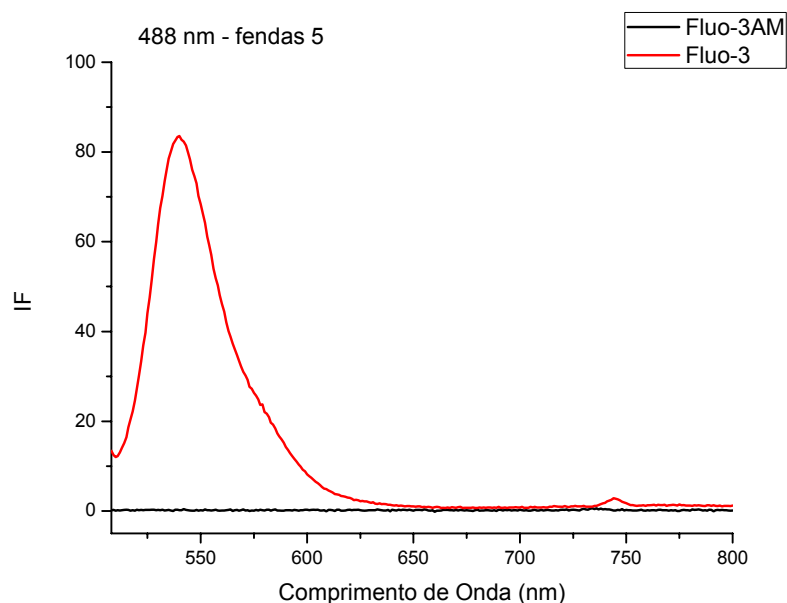


Fig. 42: Traçado fluorimétrico representativo da intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda FLUO-3 em comparação com FLUO-3AM. Os experimentos foram realizados em fluorímetro com excitação por laser de xenônio, com fenda de excitação em 488 nm e fenda de emissão em 541 nm, abertura de fendas 5, em sala escura a temperatura de 20°C. Em preto, representa-se a sonda FLUO-3AM e em vermelho a sonda FLUO-3.

Com o objetivo de verificar a seletividade da sonda obtida FLUO-3, análises fluorimétricas foram realizadas em presença de solução de CaCl_2 (1,6 mmol/L). Como mostrado na figura 43, a presença de solução de CaCl_2 promoveu um pequeno aumento na intensidade de fluorescência da sonda FLUO-3.

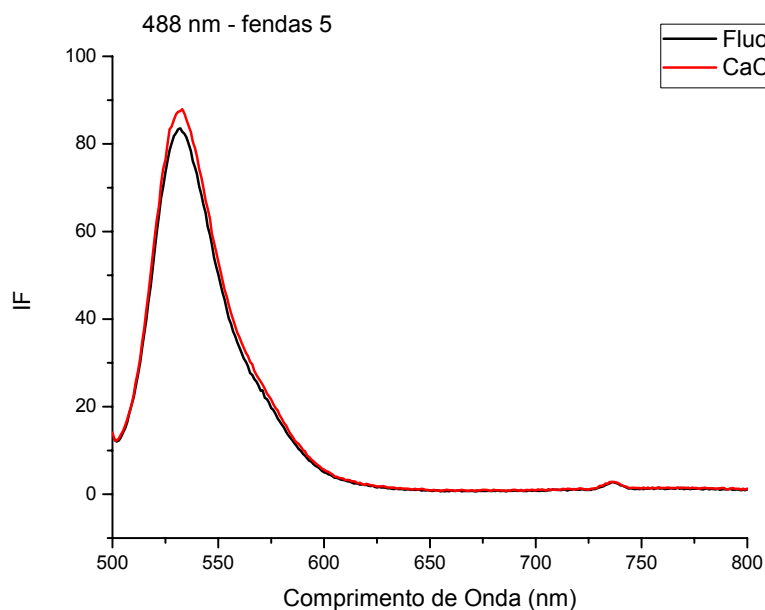


Fig. 43: Traçado fluorimétrico representativo da intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda FLUO-3 em presença de solução saturada CaCl_2 (1,6 mmol/L). Os experimentos foram realizados em fluorímetro com excitação por laser de xenônio, com fenda de excitação em 488 nm e fenda de emissão em 533 nm, com abertura de fendas 5, em sala escura a temperatura de 20°C. Em preto, representa-se a sonda FLUO-3 e em vermelho a presença de solução de CaCl_2 .

Com o objetivo de verificar a ocorrência de interação química existente entre a sonda FLUO-3AM e CNP, análises fluorimétricas foram realizadas na sonda obtida FLUO-3 em ausência ou presença de CNP (1 $\mu\text{mol/L}$). De acordo com o resultado obtido, podemos sugerir que não ocorre qualquer interação química entre a sonda FLUO-3 e o CNP, no sentido de alteração da intensidade de fluorescência da sonda (figura 44).

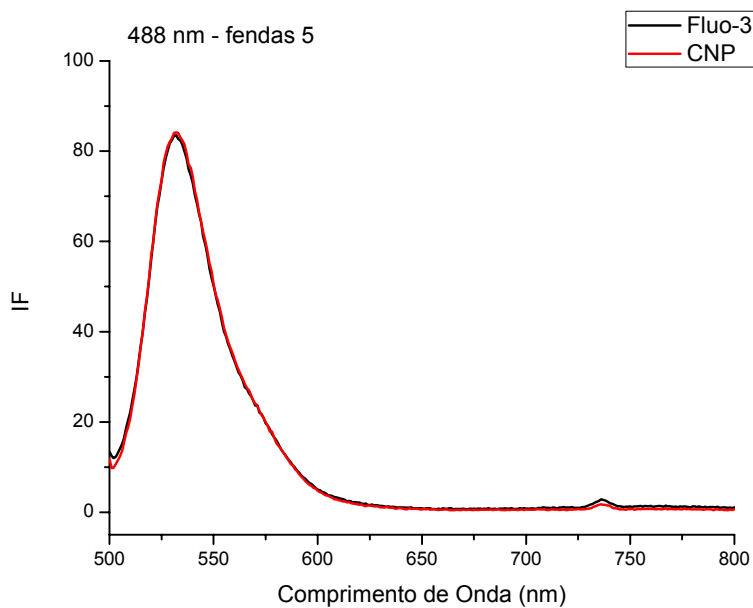


Fig. 44: Traçado fluorimétrico representativo da intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda FLUO-3 em presença de CNP (1 $\mu\text{mol/L}$). Os experimentos foram realizados em fluorímetro com excitação por laser de xenônio, com fenda de excitação em 488 nm e fenda de emissão em 532 nm, abertura de fendas 3, em sala escura a temperatura de 20°C. Em preto, representa-se a sonda FLUO-3 e em vermelho a presença de CNP.

3. Discussão

A medida da concentração de NO produzido por estimulação via CNP torna-se um dado importante para a compreensão das respostas vasculares desencadeadas pelo CNP, já que inúmeros trabalhos evidenciam sua participação nos efeitos induzidos pelo CNP (Rautureau et al. 2010). Para tanto, utilizando-se a técnica de fluorescência, tornou-se necessária a obtenção de sondas fluorescentes sem os radicais que promovem a permeação destes compostos para o interior das células (Takahashi et al. 1999) e que, por sua vez, quando presentes nas moléculas das sondas, diminuem sua auto-fluorescência. Assim, para a avaliação da interação química entre as sondas e o CNP foram realizados experimentos por espectrofluorofotometria, nos quais ocorreu leitura da intensidade de fluorescência emitida apenas de soluções sem a presença de células, excluindo a interferência de qualquer fator biológico.

A caracterização da integridade das sondas fluorescentes após pré-tratamento para a remoção dos radicais diacetato e acetóxi-metil-éster foi evidenciada pela emissão de fluorescência das sondas DAF-2 (figura 39) e FLUO-3 (figura 42) em relação as suas formas radicaladas DAF-2/DA e FLUO-3AM, respectivamente.

Para garantir a seletividade das sondas obtidas, foram realizadas leituras de intensidade de fluorescência emitida após a exposição à solução saturada de NO ou Terpy (figura 40) para o DAF-2 ou solução de CaCl_2 (figura 43) para o FLUO-3. Desta forma, após a exposição da sonda DAF-2 à solução de NO ou Terpy ocorreu um aumento da intensidade de fluorescência emitida. Isso nos permitiu sugerir que a sonda obtida DAF-2 continuou seletiva para a marcação de NO.

Entretanto, após a exposição da sonda FLUO-3 à solução de CaCl_2 ocorreu pequeno aumento na intensidade de fluorescência emitida. Isto pode ter ocorrido devido ao fato de todo o procedimento de preparo da sonda ter sido realizado em presença de cálcio nas soluções nutrientes para as células. Deste modo, após a clivagem de seu radical, o FLUO-3

permaneceu em solução contendo cálcio, sendo passível de interação com esse cátion e a intensidade de fluorescência emitida anteriormente à aplicação de solução de CaCl_2 já representava o resultado da interação da sonda com o cátion.

Contudo, após a exposição da sonda DAF-2 ao CNP ocorreu redução da intensidade de fluorescência emitida, caracterizando uma interação química entre as moléculas (figura 41). O DAF-2/DA em presença de N_2O_3 (produto de oxidação do NO) leva a formação do composto estável DAF-2T que é fluorescente (Nakatsubo et al. 1998). Desta maneira, reduções na formação deste composto fluorescente sugerem processos de perda de fluorescência por formação de novas moléculas com consequente transferência de energia. Desta forma, a medida de conteúdo de NO intracelular através de ensaios de fluorescência com a sonda DAF-2DA, após estimulação com CNP, não são adequados.

Tal interação apenas aconteceu com o CNP em presença da sonda DAF-2, não ocorrendo quando em presença da sonda FLUO-3 (figura 44), sugerindo uma interação química específica entre DAF-2 e CNP. Assim, as análises através de ensaios de fluorescência com a sonda FLUO-3AM, após estimulação com CNP, constituem uma medida representativa dos efeitos desencadeados pelo peptídeo sobre a mobilização de cálcio intracelular.