

Ana Paula Couto Davel

**ALTERAÇÕES VASCULARES INDUZIDAS PELO
TRATAMENTO CRÔNICO COM ISOPROTERENOL:
INVESTIGAÇÃO DOS SUBTIPOS DE RECEPTORES
 β -ADRENÉRGICOS ENVOLVIDOS E DA POSSÍVEL GERAÇÃO
DE UM PROCESSO INFLAMATÓRIO LOCAL**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni

São Paulo

2008

RESUMO

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

Este estudo investigou: 1) os subtipos de receptores β -adrenérgicos envolvidos no aumento da contração à fenilefrina induzido pelo tratamento crônico com isoproterenol e, 2) os efeitos da hiperativação dos receptores β -adrenérgicos sobre a expressão gênica e protéica de mediadores pró-inflamatórios na vasculatura e sua associação com a hiperreatividade vascular. Camundongos nocaute para os receptores β_1 - (β_1 KO) ou β_2 -adrenérgicos (β_2 KO) e seus respectivos selvagens foram tratados por 7 dias com isoproterenol (15 mg/kg/dia, sc) ou veículo. Em anéis de aorta de animais β_1 KO, observou-se uma redução significativa das respostas vasodilatadoras ao isoproterenol e à acetilcolina e, uma não modificação da resposta contrátil à fenilefrina. Já as aortas dos β_2 KO também apresentaram redução do relaxamento induzido pelo isoproterenol, mas não foram observadas modificações na vasodilatação à acetilcolina. Porém, nas aortas dos β_2 KO houve aumento da resposta contrátil à fenilefrina, associada à redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO). Na aorta de camundongos não houve participação funcional significativa do receptor β_3 -adrenérgico na reatividade vascular, porém, via técnica de imunohistoquímica, foi possível detectar os três subtipos de receptores β -adrenérgicos, tanto nas células endoteliais como nas musculares lisas. O tratamento por 7 dias com isoproterenol reduziu a vasodilatação induzida agudamente pelo isoproterenol, mas não mudou o padrão de distribuição dos receptores β -adrenérgicos nas aortas isoladas. A hiperativação dos receptores β -adrenérgicos aumentou a contração induzida pela fenilefrina nas aortas de camundongos selvagens via uma menor modulação nitrérgica associada a um maior papel do ânion superóxido. Efeitos similares foram demonstrados na aorta dos β_1 KO, mas, os anéis provenientes dos β_2 KO não apresentaram aumento da contração à fenilefrina após o tratamento com isoproterenol. Em sequência, demonstrou-se que o tratamento com isoproterenol em ratos (0,3 mg/kg/dia, por 7 dias, sc), aumentou a expressão gênica e protéica das interleucinas pró-inflamatórias 1 β e 6 e, induziu maior ativação do fator de transcrição NF- κ B em aorta.

O co-tratamento de ratos com isoproterenol e talidomida (inibidor do NF- κ B) reduziu a hiperreatividade à fenilefrina demonstrada em aorta de ratos tratados com isoproterenol. Em conclusão, os dados demonstram que: os receptores β_1 -, β_2 - e β_3 -adrenérgicos estão presentes em aorta de camundongos, sendo que tanto o subtipo β_1 como o β_2 modulam a vasodilatação ao isoproterenol; o subtipo β_1 é mais importante em mecanismos de vasodilatação, enquanto o β_2 modula negativamente a contração vascular de maneira dependente do endotélio; a hiperativação dos receptores β -adrenérgicos induz alterações de reatividade vascular aumentando a vasoconstrição à fenilefrina via desequilíbrio NO/ânion superóxido e; o receptor β_2 -adrenérgico parece estar envolvido no desencadeamento destes efeitos. Além de alterar a via do NO e gerar estresse oxidativo, os dados também sugerem que a ativação crônica dos receptores β -adrenérgicos aumenta a síntese de fatores pró-inflamatórios e causa maior ativação do NF- κ B no tecido vascular, efeitos que também parecem estar associados ao aumento da reatividade vascular à fenilefrina.

Palavras-chave: Receptores β -adrenérgicos. Isoproterenol. Aorta. Citocinas pró-inflamatórias. Reatividade vascular.

ABSTRACT

DAVEL, A.P.C. **Vascular alterations induced by chronic isoproterenol-treatment: β -adrenoceptor subtypes involved and possible local proinflammatory process generation.** 2008. 152 f. Doctoral Thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

In this study, it was investigated: 1) the β -adrenoceptor subtypes involved in the hyperreactivity to phenylephrine induced by chronic isoproterenol-treatment and, 2) the effects of overactivation of β -adrenoceptors on gene and protein expression of vascular inflammatory mediators and its association with altered vascular reactivity. β_1 - (β_1 KO) or β_2 -adrenoceptor knock-out (β_2 KO) mice and respective wild-types were treated for 7 days with isoproterenol (15 mg/kg/day, sc) or with vehicle. In aortic rings from β_1 KO mice, a significant reduction of isoproterenol- and acetylcholine-induced relaxation was observed, while the vasoconstrictor response to phenylephrine did not change. Aortas from β_2 KO also showed reduced vasodilatation to isoproterenol, however, the acetylcholine-induced relaxation was similar to wild-type. On the other hand, aortic rings from β_2 KO showed increased vasoconstrictor response to phenylephrine, related to an impairment of nitric oxide (NO) availability caused by an increased role for anion superoxide. It was not observed functional participation of β_3 -adrenoceptors on vascular reactivity from murine aortic rings, however, by immunohistochemistry, the three subtypes of β -adrenoceptors were detected in endothelial and smooth muscle cells. Chronic isoproterenol-treatment reduces the vasodilator response to isoproterenol but did not modify the pattern of distribution of β -adrenoceptors in mice aorta. Overactivation of β -adrenoceptors enhanced the vasoconstrictor response to phenylephrine in wild-type aortic rings, associated with impaired nitrergic modulation and higher role for superoxide anion in this vasoconstrictor response. Similar effects for isoproterenol-treatment were observed in aortic rings from β_1 KO, however, aortas from β_2 KO did not develop the alterations on vasoconstrictor response to phenylephrine after 7-day isoproterenol-treatment. In addition, 7-day isoproterenol-treatment in rats (0.3 mg/kg/day, sc) enhanced aortic mRNA and protein expression of interleukin-1 β and -6 and induced higher nuclear activation of nuclear factor NF- κ B. Co-treatment with isoproterenol and thalidomide (a NF- κ B inhibitor), reduced the hyperreactivity to phenylephrine showed in aortas from isoproterenol-treated rats. In conclusion, the data suggest that: β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenoceptors are expressed in mice

aorta, and both β_1 and β_2 subtypes are involved in the isoproterenol-induced vasodilatation; β_1 -adrenoceptor subtype is more important mediating vasodilator mechanisms while the β_2 -adrenoceptor down regulates mice vascular contraction in an endothelium-dependent manner; overactivation of β -adrenoceptors altered vascular reactivity, increasing vasoconstrictor response to phenylephrine by NO/ superoxide anion unbalance, and; β_2 -adrenoceptor seems to be involved in the triggering of these chronic isoproterenol-effects on vascular tissue. Besides the alterations on NO pathway and oxidative stress generation, the results suggest that chronic activation of β -adrenoceptors enhance the synthesis of proinflammatory factors and induces higher NF- κ B activation on vascular tissue, and these effects seem to be related to hiperreactivity to phenylephrine induced by chronic isoproterenol.

Key words: β -Adrenoceptors. Isoproterenol. Aorta. Inflammatory cytokines; Vascular reactivity.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O aumento da atividade nervosa simpática e o conseqüente aumento dos níveis circulantes e teciduais de catecolaminas estão envolvidos com a gênese e a manutenção de estados patológicos que acometem o sistema cardiovascular, incluindo a hipertensão essencial, a hipertrofia cardíaca e sua progressão para a insuficiência cardíaca (ESLER e KAYE, 2000). Nestas situações, a estimulação crônica dos receptores β -adrenérgicos é responsável pela piora da função cardíaca (BRISTOW, 2000). Entretanto, ainda não estão elucidados os efeitos da estimulação a longo prazo de receptores β -adrenérgicos na vasculatura.

A estimulação aguda dos receptores β -adrenérgicos em vasos sanguíneos causa relaxamento. Os receptores β -adrenérgicos são receptores acoplados à proteína G, e o mecanismo de transdução predominante é dependente do acoplamento destes receptores à proteína Gs. Uma vez ativada pela ligação do agonista ao receptor β -adrenérgico, a proteína $G_s\alpha$ induz ativação da adenilato ciclase, aumentando a conversão de trifosfato de adenosina (ATP) em 3',5' monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). O AMPC, ativa a proteína kinase dependente de AMPC (PKA), ao se ligar em sua subunidade regulatória, causando dissociação e ativação da subunidade catalítica da PKA. A PKA é uma serina/ treonina kinase que tem várias proteínas-alvo nas células e conseqüentemente, inúmeras respostas celulares (TANAKA et al., 2005; FERRO, 2006). No músculo liso vascular, a ativação desta cascata induz: hiperpolarização, principalmente por ativação de canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância (BK_{Ca}); redução da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio; aumento da captação de cálcio para o retículo sarcoplasmático e; diminuição do influxo de cálcio pelo sarcolema nas células musculares lisas (Figura 1) (REMBOLD e CHEN, 1998; WERSTIUK e LEE, 2000; TANAKA et al., 2005).

Cronicamente, a administração diária de doses subcutâneas de isoproterenol, um agonista dos receptores β -adrenérgicos não-seletivo, é capaz de causar redução da vasodilatação induzida agudamente pela estimulação de receptores β -adrenérgicos (HAYES et al., 1986), efeito este relacionado à dessensibilização e regulação para baixo (*down-regulation*) destes receptores, que ocorrem durante estimulação prolongada. É interessante notar que esta reduzida capacidade vasodilatadora induzida pela ativação aguda dos receptores β -adrenérgicos também é observada em artérias de ratos com

insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio (GABALLA et al., 2001), em modelos de hipertensão arterial (ASANO et al., 1988; CALLERA et al., 2004) e animais diabéticos (NAKAZAWA et al., 2008).

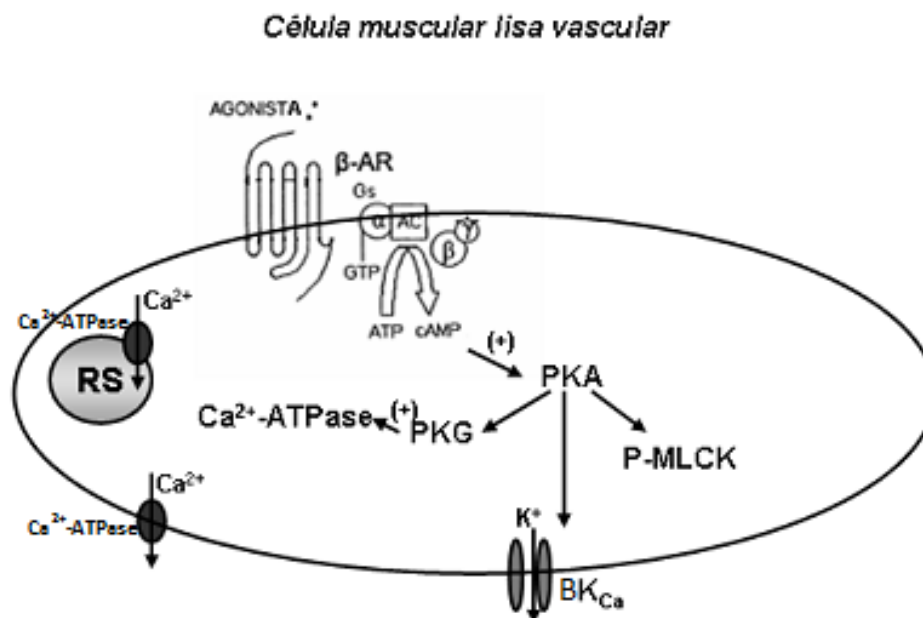


Figura 1 - Mecanismos dependentes de AMPc envolvidos no relaxamento vascular induzido por agonistas de receptores β -adrenérgicos. β -AR: receptor β -adrenérgico; AC: adenilato ciclase; PKA: proteína quinase A; PKG: proteína quinase G; MLCK: kinase da cadeia leve da miosina; BK_{Ca} : canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância; RS: retículo sarcoplasmático.

Além do mais, Davel et al. (2006) demonstraram, pela primeira vez, que o tratamento crônico com isoproterenol aumenta a resposta contrátil ao agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina em aorta de ratos. Estes dados são corroborados por outros autores que demonstraram um aumento do efeito pressórico da fenilefrina, “*in vivo*”, em ratos e camundongos tratados em longo prazo com isoproterenol (TRINDADE et al., 1992; GAVA et al., 2004), e, recentemente, por dados da literatura, que também observaram aumento da vasoconstrição induzida por fenilefrina em aorta de ratos tratados cronicamente com isoproterenol (FUKUDA et al., 2008; LUO et al., 2008; XU et al., 2008). Assim, um incremento da contratilidade em resposta às catecolaminas circulantes poderia contribuir para um grau inapropriado de vasoconstrição, indicando um papel fisiopatológico para a estimulação crônica dos receptores β -adrenérgicos vasculares.

A hiperreatividade à fenilefrina observada nas aortas dos ratos tratados com isoproterenol foi associada a uma alterada modulação endotelial, mais especificamente, devido a um incremento na produção de uma espécie reativa derivada do oxigênio (ERDO), o ânion superóxido, nesta artéria. Ao mesmo tempo, este tratamento também induziu um aumento na produção do fator vasodilatador óxido nítrico (NO), via aumento da atividade e expressão protéica das isoformas neuronal e endotelial da sintase de óxido nítrico (nNOS e eNOS), que tende a contrabalancear o aumento da resposta contrátil da fenilefrina, mas tem sua biodisponibilidade diminuída ao ser degradado pelo ânion superóxido (DAVEL et al., 2006). Corroborando estes resultados, Krenek et al. (2006) observaram um aumento da expressão da eNOS em aorta de ratos tratados por 7 dias com isoproterenol, e Xu et al. (2008) demonstraram que em anéis de aorta de ratos tratados por 10 dias com isoproterenol há redução da biodisponibilidade do NO, concomitante com o aumento da expressão gênica das subunidades p22phox e p47phox da enzima NADPH oxidase, fonte importante de geração de ânion superóxido no tecido vascular em enfermidades cardiovasculares como a hipertensão arterial (PARAVICINI e TOUYZ, 2006).

No mesmo sentido dos achados em aorta de ratos tratados com isoproterenol, há trabalhos que correlacionam disfunção endotelial a um incremento da geração de ERDOs no tecido vascular em animais com insuficiência cardíaca, apesar de um concomitante aumento da expressão protéica da eNOS (BOULOUMIÉ et al., 1997; BAUERSACHS et al., 1999). Uma redução da biodisponibilidade do NO conseqüente a um prejuízo na sua síntese ou via aumento de degradação pelo ânion superóxido é um dos principais mecanismos associado à disfunção endotelial em várias doenças cardiovasculares (BAUERSACHS et al., 1999; D'USCIO et al., 2001; BROSNAN et al., 2002). Assim, os efeitos induzidos pela hiperativação dos receptores β -adrenérgicos na vasculatura se assemelham aos encontrados em modelos experimentais mais complexos que mimetizam patologias cardiovasculares de grande incidência mundial, como é o caso da hipertensão arterial e da insuficiência cardíaca subseqüente ao infarto do miocárdio, indicando uma via fisiopatológica comum entre estes modelos experimentais.

Atualmente, alguns trabalhos têm postulado que, em conjunto com as alterações na geração de ERDOs e de NO, um aumento na produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios podem estar associados ao desenvolvimento de alterações

vasculares na aterosclerose (ROSS, 1999; OUBIÑA et al., 2003), hipertensão (SANZ-ROSA et al., 2005) e insuficiência cardíaca (ADAMOPOULOS et al., 2002).

As interleucinas-1 β (IL-1 β) e -6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são citocinas pró-inflamatórias e são postuladas como marcadores inflamatórios vasculares (BLAKE e RIDKER, 2001). Estas citocinas atuam principalmente via ativação do fator de transcrição nuclear (NF)- κ B, que uma vez ativo em células vasculares, estimula a transcrição de vários genes-alvo envolvidos no processo inflamatório e que podem modular a função vascular, incluindo as enzimas ciclooxigenase-2 e a isoforma induzível da NOS (iNOS), moléculas de adesão como selectina-E e molécula de adesão de células vasculares (VCAM)-1 e citocinas como IL-1 β e IL-6 (DE MARTIN et al., 2000).

No coração, a estimulação crônica de receptores β -adrenérgicos ativa a síntese gênica e protéica de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em miocárdio de ratos, como demonstrado por Murray et al. (2000). Corroborando estes resultados, Chandresakar et al. (2004) demonstraram que o tratamento crônico com isoproterenol induz ativação do NF- κ B, em miocárdio de camundongos. Entretanto, apesar dos dados em coração, ainda não se sabe se a ativação crônica dos receptores β -adrenérgicos com isoproterenol é capaz de modular a síntese vascular de citocinas pró-inflamatórias e do NF- κ B. Assim, como previamente demonstrado por Davel et al. (2006) que a ativação β -adrenérgica crônica em ratos é capaz de aumentar a geração de ânion superóxido e induzir um aumento da contração à fenilefrina em anéis de aorta, seria interessante verificar se concomitantemente também ocorre a estimulação da síntese de fatores pró-inflamatórios locais, que poderiam contribuir para a disfunção vascular neste modelo.

A despeito dos efeitos induzidos pela ativação crônica dos receptores β -adrenérgicos no sistema cardiovascular, ainda permanece controverso, principalmente em vasos sanguíneos, qual(is) o(s) subtipo(s) de receptor(es) β -adrenérgico(s) envolvido(s) no desencadeamento destes efeitos. Sugere-se que a maioria das alterações cardíacas induzidas pelo tratamento em longo prazo com isoproterenol, em ratos, incluindo hipertrofia ventricular, síntese de colágeno e disfunção sistólica, parecem dever-se em grande parte à sinalização celular via receptores β_1 -adrenérgicos (MORISCO et al., 2001; KITAGAWA et al., 2004). Estes estudos sugerem a participação seletiva dos subtipos de receptores β -adrenérgicos através da utilização farmacológica de β -bloqueadores. Porém, sabe-se que alguns destes fármacos podem apresentar efeitos benéficos mediados por: propriedades antioxidantes, via vasodilatação

dependente da liberação de NO e/ ou via bloqueio do influxo de cálcio, ou ainda por ser um agonista parcial dos receptores β_2 - e/ou β_3 -adrenérgicos (LU et al., 1989; SZAJERSKI et al., 2006; PRIVIERO et al., 2006). Sendo assim, é importante a avaliação da participação seletiva dos subtipos de receptores β -adrenérgicos através da utilização de outras ferramentas experimentais, como o uso de camundongos com deleção ou super-expressão dos diferentes subtipos de receptores β -adrenérgicos. Patterson et al. (2004) demonstraram que camundongos com deleção dos receptores β_1 -adrenérgicos são resistentes à indução de hipertrofia cardíaca pelo tratamento crônico com isoproterenol, indo ao encontro dos trabalhos sugerindo a participação dos receptores β_1 -adrenérgicos mediando efeitos hipertróficos do isoproterenol. Entretanto, em vasos sanguíneos ainda não se sabe quais os subtipos de receptores β -adrenérgicos estariam envolvidos nos efeitos vasculares da estimulação crônica destes receptores.

Classicamente, Lands et al. (1967) subdividiram os receptores β -adrenérgicos em 2 subtipos e classificaram o subtipo vasodilatador como β_2 -adrenérgico. Porém, desde então, subseqüentes estudos vêm demonstrando um papel importante tanto para o subtipo β_1 como para o subtipo β_3 mediando relaxamento de vasos sanguíneos, variando de acordo com a espécie animal e/ou tipo de leito vascular avaliados (GUIMARÃES e MOURA, 2001). Em aorta de ratos, por exemplo, em somatória com o papel dos receptores β_2 -adrenérgicos, sugere-se que os subtipos β_1 -, β_3 - e o β -atípico (estado de baixa afinidade do β_1), também estejam presentes e desencadeiem efeitos vasodilatadores quando estimulados agudamente (BRAWLEY et al., 2000a; RAUTUREAU et al., 2002). Já em camundongos, Chruscinski et al. (2001), demonstraram que o subtipo β_1 parece ser o principal subtipo de receptor β -adrenérgico envolvido na vasodilatação mediada por agonistas β -adrenérgicos na maioria dos vasos sanguíneos desta espécie animal.

Os três subtipos, β_1 -, β_2 -, e β_3 , de receptores β -adrenérgicos, são acoplados a proteína Gs e causam relaxamento vascular quando ativados, via ativação da cascata adenilato ciclase/ AMPc/ PKA no músculo liso vascular (FERRO, 2006). Além disso, os receptores β_1 -, β_2 -, e β_3 -adrenérgicos também podem induzir seus efeitos vasodilatadores parcialmente via estimulação da síntese e liberação de NO nas células endoteliais (BRAWLEY et al., 2000b; RAUTUREAU et al., 2002; FERRO et al., 2004).

Assim, é possível que durante uma ativação crônica, estas vias possam ser moduladas de forma distinta, de acordo, por exemplo, com a expressão tecidual de cada

subtipo do receptor β -adrenérgico e com a sensibilidade de cada subtipo à fosforilação por kinases que sinalizam a dessensibilização e internalização do receptor. Ao encontro desta hipótese, na insuficiência cardíaca observa-se uma redução da expressão do subtipo β_1 , uma ausência de modificação dos níveis do β_2 , e uma regulação positiva do subtipo β_3 -adrenérgico no coração (BRODDE, 1991; MONIOTTE et al., 2001). Já em camundongos duplo nocaute para os receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos, há um aumento da resposta hipotensora ao agonista seletivo dos receptores β_3 -adrenérgicos CL-316243, o que pode ser explicado por uma regulação positiva deste subtipo no leito vascular (ROHRER et al., 1999).

Em conjunto, estes dados indicam que a estimulação prolongada de um subtipo de receptor β -adrenérgico, pode levar a uma resposta compensatória de outros subtipos. Estes efeitos podem desencadear diferentes cascatas de sinalização intracelular, e estes mecanismos podem estar envolvidos no desenvolvimento de disfunções vasculares durante a estimulação crônica dos receptores β -adrenérgicos.

1.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Dentre os fatores envolvidos com a gênese e a manutenção de estados patológicos que acometem o sistema cardiovascular, podemos citar o aumento da atividade nervosa simpática (ESLER e KAYE, 2000).

Santos et al. (2005) demonstraram que pacientes com insuficiência cardíaca apresentam um aumento da atividade simpática, a qual pode ser responsável pelo prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio presente em territórios vasculares periféricos. Assim, torna-se importante o estudo dos mecanismos vasculares associados aos efeitos da hiperatividade simpática. Sabe-se que os níveis elevados de catecolaminas circulantes e teciduais, conseqüentes a uma maior atividade nervosa simpática, entre outros, causam hiperativação dos receptores β -adrenérgicos.

Existem crescentes evidências indicando que a atividade dos receptores β -adrenérgicos modula o tônus vascular, e assim, estes receptores participam do controle do fluxo sanguíneo para os diferentes tecidos. Alguns trabalhos têm demonstrado que em modelos experimentais de hipertensão (ASANO et al., 1988; CALLERA et al., 2004), na insuficiência cardíaca (GABALLA et al., 2001), no diabetes (NAKAZAWA et al., 2008) e no envelhecimento (ARRIBAS et al., 1994; KANG et al., 2007), o relaxamento

dependente da ativação β -adrenérgica está prejudicado, o que pode contribuir para o quadro de disfunção vascular instalado nestes casos.

O eixo estresse oxidativo-inflamação-disfunção endotelial está envolvido no cerne da fisiopatologia de várias doenças que acometem o sistema cardiovascular de alta prevalência e responsáveis por altas taxas de mortalidade mundial, incluindo a insuficiência cardíaca (LOPÉZ FARRÉ e CASADO, 2001), a aterosclerose (RUIZ-ORTEGA et al., 2001) e a hipertensão (SUEMATSU et al., 2002). Entretanto, pouco se sabe sobre uma possível participação de alterações sinalizadas por uma via β -adrenérgica modificada conseqüente à crônica ativação induzida por níveis elevados de catecolaminas.

O modelo da estimulação crônica de receptores β -adrenérgicos com o uso de doses subcutâneas diárias de isoproterenol é constantemente referido na literatura e as alterações cardíacas induzidas por este tratamento, assim como os seus mecanismos celulares, assemelham-se aos encontrados em diversas situações de hiperatividade nervosa simpática. Considerando-se ainda que a utilização de fármacos antagonistas dos receptores β -adrenérgicos possui amplo espectro de uso clínico para o tratamento da hipertensão arterial e da insuficiência cardíaca, e que os mecanismos responsáveis por esta ação terapêutica ainda não estão totalmente esclarecidos, torna-se relevante o estudo dos efeitos vasculares da estimulação crônica dos receptores β -adrenérgicos.

Efeitos cardiovasculares adicionais aos antagonistas β -adrenérgicos de 1ª geração (não-seletivos), são atribuídos aos antagonistas seletivos para os receptores β_1 -adrenérgicos (2ª geração) e aos de 3ª geração, como o nebivolol (IGNARRO, 2008). Este último, tem sua ação benéfica associada a uma importante capacidade de estimular a síntese do fator vasodilatador NO, embora por uma via ainda não esclarecida, onde resultados controversos sugerem um papel para a estimulação dos receptores β_2 -adrenérgicos e/ou dos β_3 -adrenérgicos endoteliais (BROEDERS et al., 2000; DE GROOT et al., 2003). O progresso na tecnologia de manipulação gênica permitiu que fossem desenvolvidos camundongos nocaute para os receptores β_1 -, β_2 -, e para ambos β_1 -/ β_2 -adrenérgicos, o que tem permitido novos avanços sobre o conhecimento do papel de cada subtipo de receptor β -adrenérgico na fisiologia cardiovascular (ROHRER et al., 1996; ROHRER et al., 1998; CHRUSCINSKI et al., 1999). Estes camundongos nocaute não apresentam modificações significativas nos parâmetros cardiovasculares basais *in vivo*, incluindo os valores de pressão arterial e de frequência cardíaca. Entretanto, quando submetidos a diferentes manobras experimentais *in vivo*, como infusão com

isoproterenol ou durante exercício, estes animais apresentam diferentes respostas cardiovasculares, indicando o diferente papel dos subtipos de receptores β -adrenérgicos na homeostasia cardiovascular (ROHRER et al., 1996; ROHRER et al., 1998; CHRUSCINSKI et al., 1999). Assim, estas observações indicam que os subtipos de receptores β -adrenérgicos podem ser modulados de maneira diferenciada, justificando a necessidade de esclarecimento da função de cada um dos subtipos de receptores β -adrenérgicos na homeostasia vascular e as possíveis alterações e suas vias de ação durante ativação crônica dos mesmos.

Assim, presente ao exposto, o **primeiro objetivo** deste estudo foi investigar a contribuição relativa dos subtipos de receptores β -adrenérgicos envolvidos no aumento da resposta contrátil à fenilefrina, induzido pela hiperativação dos receptores β -adrenérgicos, assim como nos mecanismos modulatórios associados a este efeito. Para tal, foram utilizados camundongos nocaute para os receptores β_1 - ou β_2 -adrenérgicos e seus respectivos selvagens, tratados ou não por 7 dias com o agonista não-seletivo dos receptores β -adrenérgicos, isoproterenol. E dentre os objetivos específicos desta primeira parte do estudo, buscou-se avaliar, na aorta destes camundongos, os seguintes parâmetros:

- ✓ Reatividade vascular a agentes vasodilatadores e vasoconstritores;
- ✓ Função endotelial;
- ✓ Participação funcional do ânion superóxido e do NO sobre a resposta contrátil à fenilefrina e;
- ✓ Localização dos subtipos de receptores β_1 -, β_2 - e β_3 -adrenérgicos.

Como **segundo objetivo**, visou-se estudar os efeitos da estimulação crônica dos receptores β -adrenérgicos sobre a expressão de mediadores inflamatórios vasculares e uma possível associação destes fatores pró-inflamatórios com a alterada reatividade vascular à fenilefrina observada após a hiperativação dos receptores β -adrenérgicos. Para tal, foram utilizados ratos tratados ou não por 7 dias com isoproterenol, e na aorta destes animais, especificamente, avaliou-se:

- ✓ A expressão gênica e protéica das citocinas pró-inflamatórias $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 ;
- ✓ Translocação nuclear e ativação do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e;
- ✓ O papel do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ na hiperratividade à fenilefrina induzida pela ativação crônica dos receptores β -adrenérgicos em aorta.

Conclusões

2 CONCLUSÕES

Em conclusão, os dados do presente trabalho sugerem que os receptores β_1 -, β_2 - e β_3 -adrenérgicos estão presentes em aorta de camundongos, sendo que o subtipo β_1 parece ser o mais importante em mecanismos de vasodilatação, enquanto o β_2 modula negativamente a contração vascular, de maneira dependente do endotélio.

Também demonstrou-se neste trabalho que a hiperativação dos receptores β -adrenérgicos com isoproterenol induz alterações de reatividade vascular em aorta de camundongos, aumentando a vasoconstrição à fenilefrina, via desequilíbrio NO/ ânion superóxido. Sugere-se que o receptor β_2 -adrenérgico seja o principal subtipo envolvido na indução do aumento da contração vascular à fenilefrina, associada à redução da biodisponibilidade do NO e aumento dos ânions superóxido, enquanto que o subtipo β_1 -adrenérgico parece impedir o aparecimento de alterações do relaxamento à acetilcolina quando hiperativados. Assim, ambos subtipos de receptores β -adrenérgicos, β_1 e β_2 , parecem mediar efeitos na reatividade vascular quando hiperativados pelo tratamento crônico com isoproterenol.

Além de alterar a via do NO e gerar estresse oxidativo, os dados também sugerem que a ativação crônica dos receptores β -adrenérgicos aumenta a síntese de citocinas pró-inflamatórias e ativa o NF- κ B no tecido vascular, efeitos que também parecem estar associados ao aumento da reatividade vascular à fenilefrina.

Referências

Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADAMAPOULOS, S.; PARISSIS, J.T.; KREMASTINOS, D.T. Endothelial dysfunction in chronic heart failure: clinical and therapeutic implications. **Eur. J. Intern. Med.**, v. 13, p. 233-239, 2002.

AKIMOTO, Y.; HORINOUCI, T.; SHIBANO, M.; MATSUDHITA, M.; YAMASHITA, Y.; OKAMOTO, T.; YAMAKI, F.; TANAKA, Y.; KOIKE, K. Nitric oxide primarily accounts for endothelium-dependent component of β -adrenoceptor-activated smooth muscle relaxation of mouse aorta in response to isoprenaline. **J. Smooth Muscle Res.**, v. 38, p. 87-99, 2002.

ARRIBAS, S.; MARÍN, J.; PONTE, A.; BALFAGÓN, G.; SALAICES, M. Norepinephrine-induced relaxations in rat aorta mediated by endothelial β -adrenoceptors. Impairment by ageing and hypertension. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 270, p. 520-527, 1994.

ASANO, M.; MASUZAWA, K.; MATSUDA, T. Role of stimulatory GTP-binding protein (Gs) in reduced beta-adrenoceptor coupling in the femoral artery of spontaneously hypertensive rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 95, p. 241-251, 1988.

ASENSIO, C.; JIMENEZ, M.; KUHNE, F.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; MUZZIN, P. The lack of β -adrenoceptors results in enhanced insulin sensitivity in mice exhibiting increased adiposity and glucose intolerance. **Diabetes**, v. 54, p. 3490-3495, 2005.

BALOĞLU, E.; KIZILTEPE, O.; GÜRDAL, H. The role of Gi proteins in reduced vasorelaxation response to β -adrenoceptor agonists in rat aorta during maturation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 564, p. 167-173, 2007.

BAUERSACHS, J.; BOULOUMIE, A.; FRACCAROLLO, D.; HU, K.; BUSSE, R.; ERTL, G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: Role of enhanced vascular superoxide production. **Circulation**, v. 100, p. 292-298, 1999.

BENJAMIN, I.J.; JALIL, J.E.E.; TAN, L.B.; CHO, K.; WEBER, K.T.; CLARCK, W.A. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. **Circ. Res.**, v. 54, p. 373-391, 1989.

***De acordo com:**

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

BLAKE, G.J.; RIDKER, P.M. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. **Circ. Res.**, v. 89, p. 763-771, 2001.

BOULOUMIÉ, A.; BAUERSACHS, J.; LINZ, W.; SCHOLKENS, B.A.; WIEMER, G.; FLEMING, I.; BUSSE, R. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. **Hypertension**, v. 30; p. 934-941, 1997.

BRAWLEY, L.; SHAW, A.M.; MACDONALD, A. β_1 -, β_2 - and atypical β -adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. **Br. J. Pharmacol.**, v. 129, p. 637-644, 2000a.

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

BRIONES, A.M.; DALY, C.J.; JIMENEZ-ALTAYO, F.; MARTINEZ-REVELLES, S.; GONZALEZ, J.M.; MCGRATH, J.C.; VILA, E. Direct demonstration of β_1 - and evidence against β_2 - and β_3 -adrenoceptors, in smooth muscle cells of rat small mesenteric arteries. **Br. J. Pharmacol.**, v. 146, p. 679-691, 2005.

BRISTOW, M.R. β -Adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. **Circulation**, v. 101, p. 558-569, 2000.

BRODDE, O.E. β_1 - and β_2 -adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 203–242, 1991.

BROEDERS, M.A.; DOEVENDANS, P.A.; BEKKERS, B.C.; BRONSAER, R.; VAN GORSEL, E.; HEEMSKERK, J.W.; EGBRINK, M.G.; VAN BREDA, E.; RENEMAN, R.S.; VAN DER ZEE, R. Nebivolol: a third-generation beta-blocker that augments vascular nitric oxide release: endothelial beta(2)-adrenergic receptor-mediated nitric oxide production. **Circulation**, v. 102, p. 677-684, 2000.

BROSNAN, M.J.; HAMILTON, C.A.; GRAHAM, D.; LYGATE, C.A.; JARDINE, E.; DOMINICZAK, A.F. Ibersartan lowers superoxide levels and increase nitric oxide bioavailability in blood vessels from spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 20, p. 281-286, 2002.

BUSATTO, V.C.; CUNHA, V.; CICILINI, M.A.; MILL, J.G. Differential effects of isoproterenol on the activity of angiotensin-converting enzyme in the rat heart and aorta. **Braz. J. Med. Bio. Res.**, v. 32, p. 355 –360, 1999.

CALLERA, G.E.; YEH, E.; TOSTES, R.C.; CAPERUTO, L.C.; CARVALHO, C.R.; BENDHACK, L.M. Changes in the vascular beta-adrenoceptor-activated signalling pathway in 2 Kidney-1 Clip hypertensive rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, p. 1151-1158, 2004.

CANNON, J.G.; EVANS, W.J.; HUGHES, V.A.; MEREDITH, C.N.; DINARELLO, C.A. Physiological mechanisms contributing to increased interleukin-1 secretion. **J. Appl. Physiol.**, v. 61, p. 1869-1874, 1986.

CERAVOLO, G.S.; FERNANDES, L.; MUNHOZ, C.D.; FERNANDES, D.C.; TOSTES, R.C.A.; LAURINDO, F.R.M.; SCAVONE, C.; FORTES, Z.B.; CARVALHO, M.H.C. Angiotensin II chronic infusion induces B1 receptor expression in aorta of rats. **Hypertension**, v. 50, p.756-761, 2007.

CHAN, S.L.; FISCUS, R.R. Vasorelaxant response to isoprenaline, nitric oxide donor, calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in aortic rings of adult C57BL/6J mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 431, p. 229-236, 2001.

CHANDRASEKAR, B.; MARELLI-BERG, F.M.; TONE, M.; BYSANI, S.; PRABHU, S.D.; MURRAY, D.R. β -Adrenergic stimulation induces interleukin-18 expression via β_2 -AR, PI3K, Akt, IKK and NF- κ B. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 319, p. 304-311, 2004.

CHEN, C.C.; MANNING, A.M. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: a dominant role for NF-kappa B. **Agents Actions Suppl.**, v. 47, p.135-141, 1995.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, p. 532–537, 1993.

CHRISTMAN, J.W.; LANCASTER, L.H.; BLACKWELL, T.S. Nuclear factor- κ B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. **Int. Care Med.**, v. 24, p. 1131-1138, 1998.

CHRUSCINSKI, A.; BREDE, M.E.; MEINEL, L.; LOHSE, M.J.; KOBILKA, B.K.; HEIN, L. Differential distribution of β -adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking β_1 - or β_2 -adrenergic receptors. **Mol. Pharmacol.**, v. 60, p. 955–962, 2001.

CHRUSCINSKI, A.J.; ROHRER, D.K.; SCHAUBLE, E.; DESAI, K.H.; BERNSTEIN, D.; KOBILKA, B.K. Targeted disruption of the β_2 -adrenergic receptor gene. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 16694-16700, 1999.

COLLINS, T. Endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. **Lab. Invest.**, v. 68, p. 499–508, 1993.

DAAKA, Y.; LUTTRELL, L.M.; LEFKOWITZ, R.J. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. **Nature**, v. 6, p. 88-91, 1997.

DAVEL, A.P.; KAWAMOTO, E.M.; SCAVONE, C.; VASSALLO, D.V.; ROSSONI, L.V. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 148, p. 629-639, 2006.

DAWES, M.; CHOWIENSCZYK, P.J.; RITTER, J.M. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway on the vasodilation caused by β -adrenergic agonists in human forearm. **Circulation**, v. 95, p. 2293-2297, 1997.

DE GROOT, A.A.; MATHY, M.J.; VAN ZWIETEN, P.A.; PETERS, S.L. Involvement of the beta3 adrenoceptor in nebivolol-induced vasorelaxation in the rat aorta. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 42, p. 232-236, 2003.

DE MARTIN, R.; HOETH, M.; HOFER-WARBINEK, R.; SCHMID, J.A. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, p. E83-E88, 2000. Review.

DELPY, E.; COSTE, H.; GOUVILLE, A.C. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. **Br. J. Pharmacol.**, v. 119, p. 471-478, 1996.

DUDZINSKI, D.M.; IGARASHI, J.; GREIF, D.; MICHEL, T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 46, p. 235-276, 2006. Review.

D'USCIO, L.V.; BAKER, T.A.; MANTILLA, C.B.; SMITH, L.; WEILER, D.; SIECK, G.C.; KATUSIC, Z.S. Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, p. 1017-1022, 2001.

EDVINSSON, L.; OWMAN, C. Pharmacological characterization of adrenergic alpha and beta receptors mediating the vasomotor responses of cerebral arteries in vitro. **Circ. Res.**, v. 35, n. 6, p. 835-849, 1974.

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

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

FERRO, A.; COASH, M.; YAMAMOTO, T.; ROB, J.; JI, Y.; QUEEN, L. Nitric oxide-dependent β_2 -adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. **Br. J. Pharmacol.**, v. 143, p. 397-403, 2004.

FERRO, A.; KAUMANN, A.J.; BROWN, M.J. β_1 - and β_2 -adrenoceptor-mediated relaxation in human internal mammary artery and saphenous vein: unchanged β - and α -adrenoceptor responsiveness after chronic β_1 - adrenoceptor blockade. **Br. J. Pharmacol.**, v. 109, p. 1053-1058, 1993.

FUKUDA, L.E.; DAVEL, A.P.; VERISSIMO-FILHO, S.; LOPES, L.R.; CACHOFEIRO, V.; LAHERA, L; ROSSONI, L.V. Fenofibrate and pioglitazone do not ameliorate the altered vascular reactivity in aorta of isoproterenol-treated rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 2008. In press.

GABALLA, M.A.; ECKHART, A.; KOCH, W.J.; GOLDMAN, S. Vascular β -adrenergic receptor system is dysfunctional after myocardial infarction. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 280, p. H1129-H1135, 2001.

GAVA, A.L.; PEOTTA, V.A.; CABRAL, A. DE M., MEYRELLES, S. DOS S.; VAZQUES, E.C. Decreased baroreflex sensitivity in isoproterenol-treated mice with cardiac hypertrophy. **Auton. Neurosci.**, v. 30, n. 114, p. 47-54, 2004.

GE, T.; HUGHES, H.; JUNQUERO, D.C.; WU, K.K.; VANHOUTTE, P.M.; BOULANGER, C.M. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta. **Circ. Res.**, v. 76, p. 1003-1010, 1995.

GRACE, G.C.; MACDONALD, P.S.; DUSTING, G.J. Cyclic nucleotide interactions involved in endothelium-dependent dilatation in rat aortic rings. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 148, p. 17-24, 1988.

GRAY, D.W.; MARSHALL, I. Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent β -adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 684-690, 1992.

GUIMARAES, S.; MOURA, D. Vascular adrenoceptors: an update. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, p. 319–356, 2001.

HAGSTROM-TUFT, E.; ENOKSSON, S.; MOBERG, E.; BOLINDER, J.; ARNER, P. β -adrenergic regulation of lipolysis and blood flow in human skeletal muscle in vivo. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. E909-E916, 1998.

HAUSDORFF, W.P.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function. **FASEB J.** v. 4, n. 11, p. 2881-2889, 1990.

HAYES, J.S.; WYSS, V.L.; SCHENCK, K.S.; COHEN, M.L. Effects of prolonged isoproterenol infusion on cardiac and vascular responses to adrenoceptor agonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 237, p. 757-763, 1986.

HU, A.; JIAO, X.; GAO, E.; LI, Y.; SHARIFI-AZAD, S.; GRUNWALD, Z.; MA, X.L.; SUN, J.Z. Tonic β -adrenergic drive provokes proinflammatory and proapoptotic changes in aging mouse heart. **Rejuvenation Res.**, v. 11, p. 215-226, 2008.

HUANG, P.L.; HUANG, Z.; MASHIMO, H.; BLOCH, K.D.; MOSKOWITZ, M.A.; BEVAN, J.Á.; FISHMAN, M.C. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature**, v. 377, p. 239-242, 1995.

IGNARRO, L.J. Different pharmacological properties of two enantiomers in a unique β -blocker, nebivolol. **Cardiovasc. Ther.**, v. 26, p. 115-134, 2008.

JAYACHANDRAN, M.; HAYASHI, T.; SUMI, D.; THAKUR, N.K.; KANO, H.; IGNARRO, L.J.; IGUCHI, A. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase through β_2 -adrenergic receptor--the role of a β -blocker with NO-releasing action. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 280, p. 589-594, 2001.

KANG, K.B.; RAJANAYAGAM, M.A.; VAN DER ZYPP, A.; MAJEWSKI, H. A role for cyclooxygenase in aging-related changes of β -adrenoceptor-mediated relaxation in rat aortas. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 375, p. 273-281, 2007.

KEIFER, J.A.; GUTTRIDGE, D.C.; ASHBURNER, B.P.; BALDWIN, A.S. Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of I kappa B kinase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 22382-22387, 2001.

KRENEK, P.; KLIMAS, J.; KROSLAKOVA, M.; GAZOVA, A.; PLANDOROVA, J.; KUCEROVA, D.; FECENKOVA, A.; SVEC, P.; KYSELOVIC, J. Increased expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in the aorta of rats with isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 84, p. 1245-1250, 2006.

KITAGAWA, Y.; YAMASHITA, D.; ITO, H.; TAKAKI, M. Reversible effects of isoproterenol-induced hypertrophy on in situ left ventricular function in rat hearts. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 287, p. H277–H285, 2004.

KOJDA, G.; LAURSEN, J.B.; RAMASAMY, S.; KENT, J.D.; KURZ, S.; BURCHFIELD, J.; SHESELY, E.G.; HARRISON, D.G. Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. **Cardiovasc. Res.**, v. 42, n. 1, p. 206-213, 1999.

KONISHI, M.; SU, C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. **Hypertension**, v. 5, p. 881-886, 1993.

KUDEJ, R.K.; IWASE, M.; UECHI, M.; VATNER, D.E.; OKA, N.; ISHIKAWA, Y.; SHANNON, R.P.; BISHOP, S.P.; VATNER, S.F. Effects of chronic β -adrenergic stimulation in mice. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 29, p. 2735-2746, 1997.

LAIGHT, D.W.; KAW, A.V.; MARTIN, J.C.; ANGGARD, E.E. Interaction between superoxide anion and nitric oxide in the regulation of vascular endothelial function. **Br. J. Pharmacol.**, v. 124, p. 238–244, 1998.

LANDMANN, R.M.; MULLER, F.B.; PERINI, C.; WESP, M.; ERNE, P.; BUHLER, F.R. Changes of immunoregulatory cells induced by psychological and physical stress: relationship to plasma catecholamines. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 58, p. 127-135, 1984.

LANDS, A.M.; ARNOLD, A.; McAULIFF, J.P.; LUDUENA, F.P.; BROWN, T.G. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. **Nature**, v. 214, p. 597–598, 1967.

LANGIN, D.; LUCAS, S.; LAFONTAN, M. Millennium fat-cell lipolysis reveals unsuspected novel tracks. **Horm. Metab. Res.**, v. 32, p. 443-452, 2000.

LEBLAIS, V.; DELANNOY, E.; FRESQUET, F.; BÉGUERET, H.; BELLANCE, N.; BANQUET, S.; ALLIÈRES, C.; LEROUX, L.; DESGRANGES, C.; GADEAU, A.; MULLER, B. β -Adrenergic relaxation in pulmonary arteries: preservation of the endothelial nitric oxide-dependent β_2 component in pulmonary hypertension. **Cardiovasc. Res.**, v. 77, p. 202-210, 2008.

LIN, Y.C.; SHUN, C.T.; WU, M.S.; CHEN, C.C. A novel anticancer effect of thalidomide: inhibition of intercellular adhesion molecule-1-mediated cell invasion and metastasis through suppression of nuclear factor-kappaB. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, p. 7165-7173, 2006.

LINDER, A.E.; WEBER, D.S.; WHITESALL, S.E.; D'ALECY, L.G.; WEBB, R.C. Altered vascular reactivity in mice made hypertensive by nitric oxide synthase inhibition. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, n. 46, p. 438-444, 2005.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOPÉZ FARRÉ, A.; CASADO, S. Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction. **Hypertension**, v. 38, p. 1400-1405, 2001.

LU, H.R.; VANDEPLASSCHE, G.; WOUTERS, L.; BORGERS, M. Beta-blockade in the ischemic reperfused working rabbit heart: dissociation of beta-adrenergic blocking and protective effects. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 301, p. 165-181, 1989.

LÜSCHER, T.F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 8, p. 344-348, 1986.

LUO, L.; DAI, D.Z.; DAI, Y. Effect of the endothelin receptor antagonist CPU0213, and its modulation by rifampin, on cardiac and vascular tissue following chronic isoproterenol treatment. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 35, p. 757-765, 2008.

LUTTRELL, L.M.; DAAKA, Y.; LEFKOWITZ, R.J. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 11, n. 2, p. 177-183, 1999.

MAJUMDAR, S.; LAMOTHE, B.; AGGARWAL, B.B. Thalidomide suppresses NF- κ B activation induced by TNF and H₂O₂, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. **J. Immunol.**, v. 168, p. 2644-2651, 2002.

MARCIL, J.; THIBAUT, C.; ANAND-SRIVASTAVA, M.B. Enhanced expression of Gi-protein precedes the development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 29, n. 3, p. 1009-1022, 1997.

MCDONALD, P.H.; CHOW, C.W.; MILLER, W.E.; LAPORTE, S.A.; FIELD, M.E.; LIN, F.T.; DAVIS, R.J.; LEFKOWITZ, R.J. β -arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. **Science**, v. 290, p. 1574-1577, 2000.

MIAN, K.B.; MARTIN, W. Differential sensitivity of basal and acetylcholine-stimulated activity of nitric oxide to destruction by superoxide anion on rat aorta. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, p. 993–1000, 1995.

MONIOTTE, S.; KOBZIK, L.; FERON, O.; TROCHU, J.N.; GAUTHIER, C.; BALLIGAND, J.L. Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. **Circulation**, v. 103, p. 1649-1655, 2001.

MONOPOLI, A.; CONTI, A.; FORLANI, A.; ONGINI, E. β_1 and β_2 adrenoceptors are involved in mediating vasodilation in the human coronary artery. **Pharmacol. Res.**, v. 27, n. 3, p. 273-279, 1993.

MORISCO, C.; ZEBROWSKI, D.C.; VATNER, D.E.; VATNER, S.F.; SADOSHIMA, J. β -adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the β_1 -subtype in the rat heart. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 33, n. 3, p. 561-573, 2001.

MURRAY, D.R.; PRABHU, S.D.; CHANDRASEKAR, B. Chronic β -adrenergic stimulation induces myocardial proinflammatory cytokine expression. **Circulation**, v. 101, p. 2338-2341, 2000.

MURRAY, K.J. Cyclic AMP and mechanisms of vasodilatation. **Pharmacol. Ther.**, v. 47, p. 329-345, 1990.

NAKAZAWA, T.; SATO, A.; MORI, A.; SAITO, M.; SAKAMOTO, K.; NAKAHARA, T.; ISHII, K. β -Adrenoceptor-mediated vasodilation of retinal blood vessels is reduced in streptozotocin-induced diabetic rats. **Vascul. Pharmacol.**, v. 49, p. 77-83, 2008.

OUBIÑA, M.P.; DE LAS HERAS, N.; CEDIEL, E.; SANZ-ROSA, D.; ARAGONCILLO, P.; DIAZ, C.; HERNANDEZ, G.; LAHERA, V.; CACHOFEIRO, V. Synergistic effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibition on inflammatory markers in atherosclerotic rabbits. **Clin. Sci.**, v. 105, p. 655-662, 2003.

PAHL, H.L. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. **Oncogene**, v. 18, p. 6853-6866, 1999.

PAPAPETROPOULOS, A.; MARCZIN, N.; MORA, G.; MILICI, A.; MURAD, F.; CATRAVAS, J.D. Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity, mRNA, and protein levels by cAMP-elevating agents. **Hypertension**, v. 26, p. 696-704, 1995.

PARAVICINI, T.M.; TOUYZ, R.M. Redox signaling in hypertension. **Cardiovasc. Res.**, v. 71, p. 247-258, 2006.

PATTERSON, A.J.; WEIZHONG, Z.; CHOW, A.; AGRAWAL, R.; KOSEK, J.; XIAO, R.P.; KOBILKA, B. Protecting the myocardium: A role for the β_2 -adrenergic receptor in the heart. **Crit. Care Med.**, v. 32, n.4, p. 1041-1048, 2004.

PERKINS, S.N.; EVANS, W.S.; THORNER, M.O.; GIBBS, D.M.; CRONIN, M.J. β -adrenergic binding and secretory responses of the anterior pituitary. **Endocrinology**, v. 117, n. 5, p. 1818:1825, 1985.

PRABHU, S.D.; CHANDRASEKAR, B.; MURRAY, D.R.; FREEMAN, G.L. β -adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide and remodeling. **Circulation**, v. 101, p. 2103-2109, 2000.

PRIVIERO, F.B.; TEIXEIRA, C.E.; TOQUE, H.A.; CLAUDINO, M.A.; WEBB, R.C.; DE NUCCI, G.; ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Vasorelaxing effects of propranolol in rat aorta and mesenteric artery: a role for nitric oxide and calcium entry blockade. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 33, p. 448-455, 2006.

QUEEN, L.R.; JI, Y.; XU, B.; YOUNG, L.; YAO, K.; WYATT, A.W.; ROWLANDS, D.J.; SLOW, R.C.; MANN, G.E.; FERRO, A. Mechanisms underlying β_2 -adrenoceptor-mediated nitric oxide generation by human umbilical vein endothelial cells. **J. Physiol.** v. 15, p. 585-594, 2006.

RABELO, L.A.; CORTES, S.F.; ALVARES-LEITE, J.I.; LEMOS, V.S. Endothelium dysfunction in LDL-receptor knockout mice: A ROLE FOR H₂O₂. **Br. J. Pharmacol.**, v. 138, p. 1215-1220, 2003.

RASCADO, R.R.; BENDHACK, L.M. Activation of α_2 -adrenoceptors is necessary to induce nitric oxide release in isoprenaline-induced relaxation. **Vasc. Pharmacol.**, n. 42, p. 63-68, 2005.

RAUTUREAU, Y.; TOUMANIANTZ, G.; SERPILLON, S.; JOURDON, P.; TROCHU, J.N.; GAUTHIER, C. β_3 -adrenoceptor in rat aorta: molecular and biochemical characterization and signalling pathway. **Br. J. Pharmacol.**, v. 137, p. 153-161, 2002.

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

ROHRER, D.K.; BERNSTEIN, D.; CHRUSCINSKI, A.; DESAI, K.H.; SCHAUBLE, E.; KOBILKA, B.K. The developmental and physiological consequences of disrupting genes encoding β_1 - and β_2 -adrenoceptors. **Adv. Pharmacol.**, v. 42, p. 499-501, 1998.

ROHRER, D.K.; CHRUSCINSKI, A.; SCHAUBLE, E.H.; BERNSTEIN, D.; KOBILKA B.K. Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both β_1 - and β_2 -adrenergic receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 16701-16708, 1999.

ROHRER, D.K.; DESAI, K.H.; JASPER, J.R.; STEVENS, M.E.; REGULA, D.P. JR.; BARSH, G.S.; BERNSTEIN, D.; KOBILKA, B.K. Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 7375-7380, 1996.

RONG Y.; BAUDRY M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. **J. Neurochem.**, v. 67, p. 662-668, 1996.

ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p. 115-126, 1999.

ROSSONI, L.V.; SALAICES, M.; MIGUEL, M.; BRIONES, A.M.; BARKER, L.A.; VASSALLO, D.V.; ALONSO, M.J. Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 283, p. H2110-H2118, 2002.

RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; SUZUKI, Y.; MEZZANO, S.; PLAZA, J.J.; EGIDO, J. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. **Hypertension**, v. 38, p. 1382-1387, 2001.

SAADANE, N.; ALPERT, L.; CHALIFOUR, L.E. Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx-2.5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127, p. 1165-1176, 1999.

SANZ-ROSA, D.; OUBIÑA, M.P.; CEDIEL, E.; DE LAS HERAS, N.; VEGAZO, O.; JIMENEZ, J.; LAHERA, V.; CACHOFEIRO, V. Effect of AT₁ receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 288, p. H111-H115, 2005.

SANTOS, A.C.; ALVES, M.J.N.N.; RONDON, M.U.P.B.; BARRETTO, A.C.P.; MIDDLEKAUFF, H.R.; NEGRÃO, C.E. Sympathetic activation restrains endothelium-mediated muscle vasodilatation in heart failure patients. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 289, p. 593-599, 2005.

SOONPAA, M.H.; FIELD, L.J. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis during hypertrophy in adult mice. **Am. J. Physiol.**, v. 35, p. H1439-H1445, 1994.

SUEMATSU, M.; SUZUKI, H.; DELANO, F.A.; SCHMID-SCHONBEIN, G.W. The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension: oxidative stress, leukocytes/endothelial interaction, apoptosis. **Microcirculation**, v. 9, p. 259-276, 2002.

SZABO, C.; HASKO, G.; ZINGARELLI, B.; NEMETH, Z.H.; SALZMAN, A.L.; KVETAN, V.; PASTORES, S.M.; VIZI, E.S. Isoproterenol regulates tumor necrosis factor, interleukin-10, interleukin-6 and nitric oxide production and protects against the development of vascular hyporeactivity in endotoxaemia. **Immunology**, v. 90, p. 95-100, 1997.

SZAJERSKI, P.; ZIELONKA, J.; SIKORA, A.; ADAMUS, J.; MARCINEK, A.; GEBICKI, J.; KOZLOVSKI, V.I.; DRELICHARZ, L.; CHLOPICKI, S. Radical scavenging and NO-releasing properties of selected beta-adrenoreceptor antagonists. **Free Radic. Res.**, v. 40, p. 741-752, 2006.

TAIRA, C.A.; CARRANZA, A.; MAYER, M.; DI VERNIERO, C.; OPEZZO, J.A.; HÖCHT, C. Therapeutic implication β -adrenergic receptor pharmacodynamic properties. **Curr. Clin. Pharmacol.**, v. 3, p. 174-184, 2008.

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

TAYLOR, P.B.; TANG, Q. Development of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 62, p. 384-389, 1984.

TOUYZ, R.M. Recent advances in intracellular signalling in hypertension. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 12, p. 165-174, 2003.

TRINDADE, J.D.; CABRAL, A. DE M.; VASQUEZ, E.C.; VASSALLO, D.V. Cardiovascular effects on conscious rats of pretreatment with isoproterenol for 3 days. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 25, p. 301-304, 1992.

VÁSQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B.; MARTÁSEK, P.; HOGG, N.; MASTERS, B.S.S.; KAROUI, H.; TORDO, P.; PRITCHARD JR, K.A. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 95, p. 9220–9225, 1998.

VASSALLO, D.V.; VASQUEZ, E.C.; CABRAL, A.M. Contractile performance of papillary muscles of renovascular hypertensive and isoproterenol-pretreated rats. **Pharmacol. Res. Commum.**, v. 20, p. 61 –72, 1988.

VILA, E.; SALAICES, M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 288, p. H1016-H1021, 2005. Review.

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

XIAO, R.P.; AVDONIN, P.; ZHOU, Y.Y.; CHENG, H.; AKHTER, S.A.; ESCHENHAGEN, T.; LEFKOWITZ, R.J.; KOCH, W.J.; LAKATTA, E.G. Coupling of β_2 -adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. **Circ. Res.**, v. 84, n. 1, p. 43-52, 1999.

XU, J.; LI, N.; DAÍ, D.Z.; YU, F.; DAI, Y. The endothelin receptor antagonist CPU0213 is more effective than aminoguanidine to attenuate isoproterenol-induced vascular abnormality by suppressing overexpression of NADPH Oxidase, ET_A , ET_B , and MMP9 in the vasculature. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 52, p. 42-48, 2008.

YANG, Y.T.; MCELLIGOTT, M.A. Multiple actions of β -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. **Biochem. J.**, v. 261, p. 1-10, 1989.

ZHOU, Y.; VARADHARAJ, S.; ZHAO, X.; PARINANDI, N.; FLAVAHAN, N.A.; ZWEIER, J.L. Acetylcholine causes endothelium-dependent contraction of mouse arteries. **Am. J. Physiol.**, v. 289, p. 1027-1032, 2005.

ZHOU, Y.Y.; YANG, D.; ZHU, W.Z.; ZHANG, S.J.; WANG, D.J.; ROHRER, D.K.; DEVIC, E.; KOBILKA, B.K.; LAKATTA, E.G.; CHENG, H.; XIAO, R.P. Spontaneous activation of β_2 - but not β_1 -adrenoceptors expressed in cardiac myocytes from β_1/β_2 double knockout mice. **Mol. Pharmacol.**, v. 58, n. 5, p. 887-894, 2000.