

**NÚBIA DE SOUZA LOBATO**

**A OBESIDADE DIMINUI A RESPOSTA  
DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA  
A AGONISTAS CANABINÓIDES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes

São Paulo  
2010

## RESUMO

Lobato NS. A obesidade diminui a resposta de artérias mesentéricas de resistência a agonistas canabinóides [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

O sistema endocanabinóide possui papel importante na regulação central e periférica da ingestão alimentar e da homeostase energética, além de apresentar pronunciados efeitos cardiovasculares. Na obesidade, estudos têm relatado que ocorre aumento de ativação deste sistema em tecidos que controlam o metabolismo energético. Entretanto, os efeitos da obesidade sobre as ações vasculares mediadas por agonistas canabinóides não foram ainda investigados. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar as implicações da obesidade para a resposta mediada pelo agonista canabinóide anandamida em artérias mesentéricas de resistência. Utilizamos ratos obesos Zucker (OZR) e seus respectivos controles da linhagem Zucker (LZR) com 6-7 semanas de idade. A obesidade foi avaliada pelo peso corporal e pelo acúmulo de gordura visceral. A glicemia foi determinada em ratos submetidos à privação alimentar de 4 horas. A pressão arterial foi determinada por método indireto (pletismografia de cauda). A reatividade de artérias mesentéricas de resistência foi avaliada utilizando um miógrafo para estudo de tensão isométrica. Foram realizadas curvas concentração-efeito à anandamida, aos agonistas de receptores canabinóides CB1 (ACEA) e CB2 (JWH-015) e ao agonista de receptores vanilóides capsaicina em vasos com e sem endotélio. OZR apresentaram redução do relaxamento dependente de endotélio à acetilcolina e aumento da contração à fenilefrina. A incubação com anandamida corrigiu estas alterações. A anandamida, os agonistas CB1 e CB2, assim como a capsaicina, promoveram vasodilatação, que foi menor em artérias mesentéricas com endotélio de OZR quando comparados aos LZR. A expressão protéica dos receptores CB1 e CB2 foi menor em artérias mesentéricas de OZR. A localização desses receptores (por imunofluorescência) indicou redução na expressão de ambos tanto no endotélio quanto no músculo liso vascular de OZR. A incubação de artérias mesentéricas com o bloqueador de receptores vanilóides ou com o antagonista de receptores do peptídeo relacionado

ao gene da calcitonina (CGRP) diminuiu a resposta à anandamida nos dois grupos experimentais, porém, essa redução foi mais pronunciada em LZRs. A incubação com L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase), apamina e caribidotoxina (bloqueadores de canais de K<sup>+</sup>), indometacina (inibidor da ciclooxigenase) ou AM404 (inibidor do transporte de canabinóides) reduziu a vasodilatação à anandamida apenas em LZRs. A resposta à anandamida em OZRs foi corrigida pelos agentes: URB597 (inibidor da degradação de anandamida), forskolin (ativador da via do cAMP), AICAR (ativador da AMPK) ou Pd 98059 (inibidor da ERK1/2). A incubação com anandamida aumentou a fosforilação da AMPK, da ACC e da eNOS em LZRs, mas reduziu em OZRs. A expressão da forma fosforilada da ERK1/2 foi maior em vasos de OZRs. A incubação com anandamida aumentou a fosforilação da ERK1/2 em LZRs e a potencializou em OZRs. Em conclusão, demonstramos que a obesidade diminui o relaxamento a agonistas canabinóides. Os mecanismos envolvidos nesta alteração incluem: redução da expressão dos receptores canabinóides CB1 e CB2; prejuízo das vias de sinalização mediadas pela ativação de receptores vanilóides; redução da captação e aumento da degradação de anandamida; redução da ativação da AMPK e da eNOS e aumento da ativação da ERK1/2.

**Palavras-Chave:** Obesidade. Sistema endocanabinóide. Anandamida. Artérias mesentéricas de resistência.

## **ABSTRACT**

Lobato NS. Obesity decreases the response of resistance mesenteric arteries to cannabinoid agonists [Ph.D. thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

The endocannabinoid system has an important role in the regulation of central and peripheral food intake and energy homeostasis. This system has also pronounced cardiovascular effects. A number of studies have shown that obesity is associated with increased activity of the endocannabinoid system in tissues that control the energy homeostasis. However, the effects of obesity on the vascular actions promoted by cannabinoid agonists have not been elucidated. Therefore, the aim of the present study was to investigate the implications of obesity for the vascular relaxation mediated by anandamide, a cannabinoid agonist, in resistance mesenteric arteries. Young obese Zucker rats (OZR) and their lean counterparts (LZR) were studied at 6- to 7-week-old. Obesity was evaluated by increase in body weight and visceral fat accumulation. Glycemia was determined in rats submitted to food deprivation (4 hours). Blood pressure was assessed by an indirect tail cuff method. The vascular reactivity was evaluated in a small vessel myograph for isometric tension recording. Concentration-response curves to the cannabinoid agonist anandamide, to CB1 (ACEA) and CB2 (JWH-015) agonists as well as to the vanilloid agonist capsaicin were performed in endothelium-intact and endothelium-denuded vessels. OZR displayed decreased endothelium-dependent relaxation to acetylcholine and increased contraction to phenylephrine. Incubation with anandamide corrected these alterations. The vasorelaxation induced by anandamide as well as by CB1, CB2 and TRPV-1 agonists was impaired in mesenteric arteries with intact endothelium from OZR. The protein expression of CB1 and CB2 receptors was decreased in mesenteric arteries from OZR. The localization of these receptors (immunofluorescence) indicated reduced expression of CB1 and CB2 receptors in both endothelium and vascular smooth muscle. Incubation of mesenteric arteries with either the vanilloid receptor blocker or the antagonist of the calcitonin gene related peptide (CGRP) receptor decreased anandamide responses in both

groups; however, the reduction was higher in LZRs. Incubation with L-NAME (a nitric oxide synthase inhibitor), apamin and charybdotoxin ( $K^+$  channel blockers), indomethacin (cyclooxygenase inhibitor) or AM404 (cannabinoid transport inhibitor) reduced the relaxation induced by anandamide only in LZRs. The decreased response to anandamide in OZRs was corrected by the agents: URB597 (inhibitor of anandamide degradation), forskolin (cAMP pathway activator), AICAR (AMPK activator) or Pd 98059 (ERK1/2 inhibitor). Incubation of mesenteric arteries with anandamide evoked AMPK, acetyl CoA carboxylase and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in LZRs, whereas it decreased the phosphorylation of these proteins in OZRs. Basal ERK1/2 phosphorylation was increased in vessels from OZRs. Incubation with anandamide increased ERK1/2 phosphorylation in LZRs, and this effect was potentiated in OZRs. In conclusion, this study demonstrated that obesity decreases the relaxation to cannabinoid agonists. The mechanisms involved in this alteration include: reduction of CB1 and CB2 cannabinoid receptors expression; impairment of signaling pathways mediated by vanilloid receptors activation; reduction of uptake and increase of anandamide degradation; reduction of AMPK and eNOS activation and increase in ERK1/2 activation.

**Key Words:** Obesity. Endocannabinoid system. Anandamide. Resistance mesenteric arteries.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Sistema Endocanabinóide

O sistema endocanabinóide é um sistema endógeno que possui papel importante na regulação central e periférica da ingestão alimentar e da homeostase energética <sup>1</sup>. A descoberta desse sistema iniciou-se a partir de estudos investigando os efeitos do uso da planta *Cannabis sativa*. A mistura das folhas e flores desta planta é denominada marijuana ou maconha. Considerada como uma droga de uso recreacional na maior parte do mundo, a *Cannabis* exerce ainda uma série de outros efeitos incluindo analgesia, ação antiinflamatória, imunossupressão, efeito anticonvulsivante, alívio da pressão intra-ocular no glaucoma, efeito antiemético e orexígeno <sup>2</sup>.

Por muitos séculos as bases biológicas e moleculares do uso das preparações da planta *Cannabis sativa* permaneceram não explicadas. Em 1965, o composto [delta]-9-tetrahydrocannabinol (THC) foi isolado e identificado como sendo o principal metabólito secundário desta planta <sup>3</sup>. A identificação do THC ajudou a explicar a maior parte das ações farmacológicas da planta <sup>1-2</sup>.

Como outras drogas, o THC exerce seus efeitos ligando-se a receptores localizados na superfície de neurônios e de outras células. Esses sítios de ligação do componente ativo da maconha foram identificados no cérebro em 1988 <sup>4</sup>. Essa descoberta abriu caminho para a identificação e clonagem dos receptores específicos para o composto THC (CB1 e CB2), que foram clonados em 1990 e 1993, respectivamente <sup>5-6</sup>. Este achado foi logo seguido pela descoberta de que esses receptores são alvos de moléculas regulatórias de ocorrência natural no organismo, denominadas endocanabinóides. Em 1992, o primeiro composto endocanabinóide foi identificado, o composto denominado anandamida (araquidonoil etanolamida), principal ligante endógeno do sistema endocanabinóide <sup>7</sup>. Este achado foi logo seguido pela identificação das propriedades canabimiméticas de um metabólito endógeno já conhecido, o composto 2-araquidonoilglicerol (2-AG) <sup>8</sup>. Embora diversos outros compostos similares aos endocanabinóides tenham sido identificados nos últimos dez anos, a anandamida e o 2-AG permanecem como os

compostos canabinóides cuja atividade farmacológica tem sido mais intensamente investigada, sendo assim considerados como os principais ligantes endógenos do sistema endocanabinóide.

Os estudos avaliando as vias biossintéticas e catabólicas para a anandamida e o 2-AG começaram imediatamente após a descoberta destes compostos. O composto N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NArPE) foi identificado como sendo o precursor biossintético da anandamida, e os diacilgliceróis (DAGs) com o ácido araquidônico (AA) na posição 2, como sendo os mais prováveis compostos a partir dos quais o 2-AG é gerado. O NArPE é produzido a partir da transferência do AA de fosfolípídios para o átomo de nitrogênio do composto fosfatidiletanolamina. O precursor DAG para o composto 2-AG é produzido pela hidrólise, catalisada pela fosfolipase-C, do fosfatidilinositol ou da hidrólise do ácido fosfatídico. Tanto a anandamida quanto o 2-AG são inativados principalmente por hidrólise enzimática pelas enzimas hidrolase de amida de ácido graxo (FAAH) <sup>9</sup> e lipase de monoacilglicerol (MAGL), respectivamente <sup>10-11</sup>.

Processos específicos através dos quais os endocanabinóides são captados pelas células após a ativação de receptores, ou liberados das células logo após a biossíntese intracelular, também já foram descritos. Estes processos funcionam na direção do gradiente de concentração dos endocanabinóides através da membrana plasmática <sup>12</sup>, porém, não foram ainda identificados do ponto de vista molecular. As enzimas envolvidas na degradação de canabinóides (FAAH e MAGL) e o receptor CB1 parecem não estarem envolvidos nestes processos de captação dos compostos canabinóides pela célula.

Além de ativar receptores CB1 e CB2, está bem estabelecido que os compostos canabinóides, principalmente a anandamida, ativam o receptor de potencial transitório de vanilóide tipo-1 (TRPV-1), um canal catiônico não seletivo que pertence à família de receptores de potencial transitório, que é ativado pelo calor, pelo baixo pH e pela capsaicina, componente ativo da pimenta <sup>13</sup>.

Os estudos realizados imediatamente após a caracterização molecular dos receptores CB1 e CB2 estabeleceram a distribuição dos mesmos em diversos tecidos, com alta abundância do receptor CB1 no cérebro e dos receptores CB2 em células imunes. Entretanto, sabe-se atualmente que ambos os receptores, principalmente o CB1, encontra-se muito mais amplamente distribuído do que originalmente se acreditava. No sistema nervoso central, o receptor CB1 está

localizado na região anterior cerebral, no gânglio basal, cerebelo, hipocampo, hipotálamo e córtex cerebral<sup>14-16</sup>, e periféricamente no sistema nervoso<sup>17-18</sup>, no trato gastrointestinal<sup>19</sup>, no tecido adiposo<sup>20</sup>, no fígado<sup>21</sup>, no músculo esquelético<sup>22-23</sup> e no pâncreas<sup>24</sup>. O receptor CB2 é expresso primariamente nas células imunes<sup>17</sup>, mas também pode ser encontrado no baço, no timo, no pâncreas, nos adipócitos e, em menor grau, no sistema nervoso central<sup>6, 17</sup>. A ampla expressão dos receptores CB1 e CB2 explica a lista cada vez maior de funções atribuídas ao sistema endocanabinóide.

Pouco é conhecido sobre os mecanismos envolvidos na síntese e nas ações dos compostos endocanabinóides em tecidos periféricos<sup>25</sup>. Como ligantes de receptores acoplados à proteína G, inicialmente foi descrito que seus efeitos biológicos em células neuronais são exercidos pela ativação de proteínas G heterodiméricas do tipo Gi/o. Como consequência desse acoplamento ocorreria inibição da adenilil ciclase e diminuição de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) nestes tecidos. Além disso, receptores CB1 e CB2 regulam a fosforilação e ativação de diversos membros da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), incluindo as quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), a p38MAPK e a quinase do terminal c-jun (JNK). O receptor CB1 pode ainda se acoplar a canais de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) operados por voltagem do tipo N, P ou Q, inativando-os, ou a canais retificadores de potássio (K<sup>+</sup>), ativando-os. O receptor CB1 pode também induzir aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular pela ativação da fosfolipase C do tipo beta, um processo que depende da ativação de proteína G.

Assim, as diversas atividades biológicas moduladas pelos receptores canabinóides são garantidas por vias de sinalização bem complexas. As MAPKs medeiam, por exemplo, a regulação da sobrevivência ou morte celular e o metabolismo glicêmico pelos canabinóides. Já os canais iônicos estão envolvidos na regulação da liberação de neurotransmissores pelos canabinóides. Um segundo nível de complexidade da sinalização celular mediada pelos canabinóides surge da capacidade de uma única proteína G, através de suas subunidades  $\alpha$  ou  $\beta$  e  $\gamma$ , direcionar a atividade de efetores intracelulares não relacionados. Isso quer dizer que a ativação do receptor CB1, por exemplo, pode simultaneamente levar à inibição da adenilil ciclase pela subunidade G $\alpha$  e à ativação de diferentes membros da cascata das MAPKs pelas subunidades G $\beta\gamma$ <sup>26</sup>.



## 1.2 Ações Cardiovasculares dos Canabinóides

Os compostos canabinóides apresentam pronunciados efeitos cardiovasculares, os quais têm sido intensamente estudados. Estes efeitos são complexos e parecem ser alterados em diferentes condições patológicas. A anandamida apresenta ações pleiotrópicas sobre o sistema cardiovascular *in vivo*. Em ratos anestesiados, este agonista causa uma breve resposta pressora seguida de resposta depressora mais prolongada <sup>27</sup>. Em camundongos anestesiados a anandamida e o THC promovem bradicardia e hipotensão <sup>28</sup>. Estes efeitos são menos pronunciados ou ausentes nos animais quando os mesmos não se encontram anestesiados, mas são potencializados na hipertensão <sup>29</sup>. Os mecanismos envolvidos neste último efeito envolvem a diminuição da atividade simpática pela inibição da liberação de noradrenalina a partir de terminais nervosos simpáticos após a ativação de receptores CB1 pré-sinápticos, bem como efeito direto sobre a vasculatura e o miocárdio <sup>28</sup>. Em humanos, tanto o cigarro de maconha quanto a administração intravenosa de THC, resultaram em vasodilatação periférica e taquicardia, que evoluíram para a queda da resistência periférica e, conseqüentemente, da pressão arterial <sup>30</sup>.

As ações vasculares dos compostos canabinóides variam dependendo da espécie e do território vascular estudado <sup>13, 31-34</sup>. A anandamida pode promover relaxamento vascular tanto por atuar nas células endoteliais quanto por agir diretamente no músculo liso vascular. Diversos mecanismos podem estar envolvidos nestas ações (Figura 1).

Estudos utilizando vasos sanguíneos isolados mostram que tanto os canabinóides endógenos quanto os exógenos promovem vasodilatação. Diversos grupos têm relatado que o efeito vasodilatador da anandamida depende da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) <sup>32, 35</sup>. Em ratos, demonstrou-se que a exposição de cultura de células endoteliais renais à anandamida estimula a liberação de óxido nítrico (NO), enquanto a presença de éster de N-metil-L-arginina (L-NAME), inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), abole essa resposta <sup>36</sup>.

Outro vasodilatador dependente de endotélio, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Figura 1), tem sido sugerido como um dos envolvidos na vasodilatação induzida pela anandamida <sup>32, 37-38</sup>. Um estudo indicou ainda que a anandamida induz hiperpolarização de membrana por meio de outro intermediário

diferente do EDHF, mas ainda desconhecido <sup>39</sup>. Sugere-se que, em artérias mesentéricas de coelho, o componente endotelial do relaxamento vascular promovido pela anandamida se difunde para as células do músculo liso vascular por meio de junções comunicantes <sup>34</sup>. Demonstrou-se ainda *in vitro* que a anandamida promove relaxamento vascular que, em artéria mesentérica e coronária, foi dependente do metabolismo do AA <sup>36</sup>.

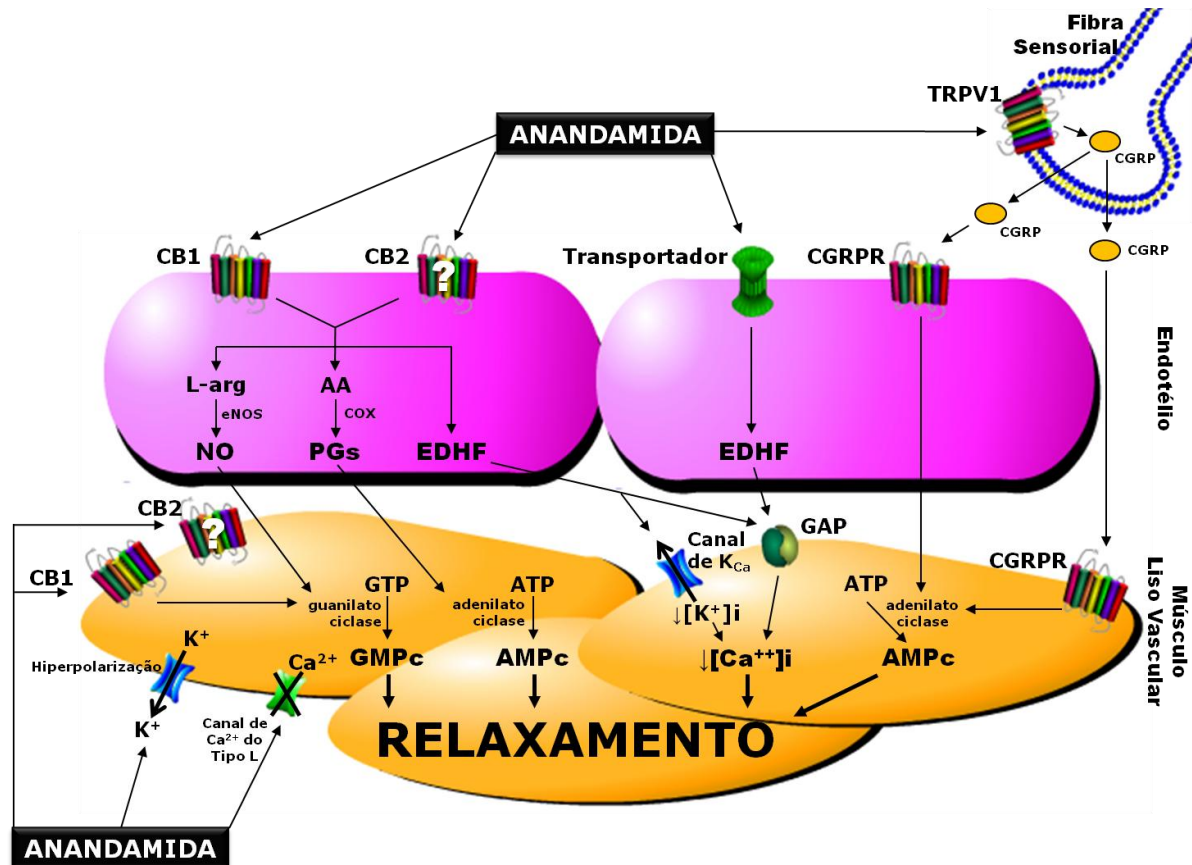
A anandamida pode também exercer alguns de seus efeitos diretamente sobre o músculo liso vascular via receptores CB1, independentemente da presença do endotélio <sup>40</sup>. Dentre os mecanismos envolvidos, inserem-se a inibição da abertura de canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L <sup>40</sup>, a redução dos estoques de  $Ca^{2+}$  intracelulares <sup>39</sup>, bem como a modulação da entrada de  $Ca^{2+}$  através de canais de  $Ca^{2+}$  operados por voltagem <sup>40</sup>.

Outro mecanismo independente do endotélio responsável pelo efeito vasodilatador da anandamida é a liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), um vasodilatador liberado por nervos sensoriais perivasculares, que atua sobre receptores no músculo liso ou no endotélio vascular <sup>13, 41</sup>. Propõe-se que a vasodilatação induzida pelo CGRP seja mediada por dois mecanismos: um deles é a estimulação da enzima adenilil ciclase no músculo liso, com subsequente acúmulo de cAMP <sup>42</sup>. O outro mecanismo é a ativação de canais de  $K^+$  nas células de músculo liso vascular <sup>43</sup>, com consequente vasodilatação.

Propõe-se que os efeitos vasodilatadores dos compostos canabinóides sejam mediados pela ativação de receptores CB1 e de receptores vanilóides <sup>37, 44</sup>. O papel dos receptores CB2 no efeito relaxante promovido pelos endocanabinóides não foi ainda descrito.

A relevância fisiológica dos efeitos cardiovasculares dos endocanabinóides não está totalmente esclarecida. Estudos sugerem que estes compostos apresentam papel mais importante em condições patológicas. Neste sentido, em um modelo animal de choque hemorrágico, Wagner e colaboradores (1997) <sup>45</sup> demonstraram que há liberação de anandamida por macrófagos ativados, a qual pode contribuir para a hipotensão observada. Similarmente, no choque endotóxico, a síntese de 2-AG nas plaquetas e de anandamida nos macrófagos é aumentada <sup>46</sup>. A liberação de anandamida por neurônios centrais sob condições de hipóxia, levando à proteção contra a isquemia já foi também descrita <sup>40</sup>. Estudo recente demonstrou ainda que a anandamida reduz a contratilidade cardíaca na hipertensão. Adicionalmente, a

potencialização desta ação cardíaca bem como da ação vasodilatadora da anandamida após bloqueio de sua hidrólise pela enzima FAHH, pode normalizar a pressão sanguínea nesta condição <sup>29</sup>. Em conjunto, esses dados indicam que o sistema endocanabinoide constitui um mecanismo importante no controle da função cardiovascular em condições patológicas.



**Figura 1** - Esquema ilustrativo dos mecanismos gerais envolvidos no relaxamento à anandamida. CB1 = receptor cannabinoide 1; CB2 = receptor cannabinoide 2; PGs = prostaglandinas; eNOS = óxido nítrico sintase endotelial; L-arg = L-arginina; NO = óxido nítrico; EDHF = fator hiperpolarizante derivado do endotélio; AA = ácido araquidônico; COX = ciclooxigenase; GTP = trifosfato de guanossina; cGMP = monofosfato de guanossina cíclico; ATP = trifosfato de adenosina; cAMP = monofosfato de adenosina cíclico; Ca<sup>2+</sup> = cálcio; K<sup>+</sup> = potássio; CGRPR = receptor do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; GAP = junção comunicante.

### 1.3 Obesidade

A prevalência de obesidade aumentou de modo bastante acelerado a partir do final do século XX, tanto em países industrializados quanto em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil. Dados da Sociedade Brasileira de

Endocrinologia e Metabolismo mostram que 18 milhões de brasileiros são obesos e que cerca de 70 milhões apresentam sobrepeso. Atualmente a obesidade é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo <sup>47</sup>.

A obesidade, de modo independente, ou em associação com outras doenças, é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, hipertensão, doença coronariana, certos tipos de câncer, complicações respiratórias, dentre outras. O aumento da ingestão de alimentos calóricos e do estilo de vida sedentário com a conseqüente redução do gasto energético em indivíduos geneticamente predispostos são fatores fortemente implicados como causas primárias da epidemia mundial de obesidade <sup>48</sup>. O aumento da prevalência de obesidade não está restrito apenas à população adulta. Em diversas regiões do mundo o sobrepeso e a obesidade infantil têm aumentado substancialmente nos últimos 20 anos. Este quadro tem sido acompanhado pelo aumento concomitante de hipertensão, dislipidemia e diabetes tipo 2, doenças que, anteriormente, eram quase que exclusivamente presentes apenas em adultos <sup>49</sup>.

O peso corporal é determinado por uma interação de fatores genéticos, ambientais e psicossociais que atuam por meio de mediadores fisiológicos que controlam a ingestão e o gasto energético. Embora as diferenças genéticas sejam de importância inquestionável, o desenvolvimento da obesidade é mais bem explicado pelas mudanças comportamentais e ambientais que resultaram dos avanços tecnológicos. Assim, a obesidade pode ser definida como uma condição na qual ocorre acúmulo de gordura corporal em tal extensão que pode afetar adversamente a saúde. O acúmulo de tecido adiposo branco, levando ao sobrepeso (índice de massa corporal 25-30 kg/m<sup>2</sup>) e à obesidade (índice de massa corporal  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>), está relacionado com condições como dislipidemia, resistência à insulina e disfunção vascular, as quais contribuem para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares <sup>50</sup>.

Quando se associa a obesidade como fator de risco para complicações vasculares, é importante considerar não apenas a magnitude da obesidade, mas também, e talvez este constitua o parâmetro mais relevante, a distribuição de gordura corporal. Há diferenças no risco atribuível à obesidade baseado na heterogeneidade de localização do tecido adiposo entre indivíduos obesos. Neste sentido, em adição à gordura corporal total, o acúmulo de gordura intra-abdominal

ou visceral tem sido considerado como fator de risco independente para doenças cardiovasculares. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a adiposidade visceral, avaliada pela razão cintura-quadril <sup>51-52</sup> ou por tomografia computadorizada <sup>53-54</sup>, está relacionada com doenças da artéria coronária, independentemente do índice de massa corporal.

#### **1.4 Disfunção Endotelial na Obesidade**

A obesidade está intimamente relacionada com disfunção endotelial. Demonstrou-se de forma bastante consistente que indivíduos obesos apresentam prejuízo na função arterial caracterizado pela redução da vasodilatação dependente de endotélio <sup>55</sup>. A disfunção endotelial na obesidade constitui um dos mecanismos pelos quais esta condição leva ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares <sup>56</sup>.

O endotélio vascular representa papel importante na manutenção da homeostase cardiovascular. Além de proporcionar uma barreira física entre o lúmen e a parede do vaso, o endotélio regula ativamente o tônus vascular basal e a reatividade vascular em condições fisiológicas, respondendo a forças mecânicas e a mediadores neurohumorais, além de liberar uma variedade de fatores contráteis e relaxantes. Frente a estímulos específicos, as células endoteliais podem liberar EDRFs, como também fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs) <sup>57</sup>. Os EDRFs incluem o NO, a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o EDHF. Os EDCFs compreendem a angiotensina II (Ang II), a endotelina-1 (ET-1), as espécies reativas de oxigênio (EROs) e os prostanóides vasoconstritores <sup>58</sup>. Em condições fisiológicas, o tônus vascular é garantido pelo equilíbrio exercido por estes fatores, especialmente os produtos da ciclooxigenase (COX), em conjunto com o NO e o EDHF. O desequilíbrio na produção e/ou liberação dos fatores envolvidos no relaxamento e na contração vasculares, com aumento de EDCFs e/ou diminuição dos EDRFs, caracteriza a disfunção endotelial <sup>59</sup>.

Os mecanismos que levam ao desenvolvimento da disfunção endotelial na obesidade não estão completamente esclarecidos. A perda da função modulatória do endotélio, com alterações na geração e/ou liberação dos mediadores envolvidos no relaxamento <sup>60</sup>, especialmente o NO, e na contração vascular em resposta a estímulo por agentes vasoconstritores <sup>61</sup>, parece ter participação crítica no desenvolvimento desta alteração.

Estudos demonstram também o papel importante do estresse oxidativo no desenvolvimento da disfunção vascular na obesidade. Um estudo clínico demonstrou que a diminuição da resposta vasodilatadora dependente de endotélio em indivíduos obesos está relacionada, ao menos em parte, ao estresse oxidativo, tendo-se em vista que a co-infusão de vitamina C melhorou, embora não tenha normalizado completamente, a resposta à acetilcolina (ACh), um agente vasodilatador dependente de endotélio <sup>62</sup>. Estudos experimentais também demonstram que a obesidade é acompanhada por diminuição da vasodilatação dependente de NO, que pode ocorrer devido ao aumento da produção de EROs, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), que inativa o NO. Estudo recente em nosso laboratório demonstrou que a obesidade promove aumento da resposta contrátil e redução da resposta vasodilatadora dependente de endotélio no leito arteriolar mesentérico isolado. Essas alterações foram relacionadas com redução da produção de NO, aumento da geração de EROs e redução da razão  $PGI_2/TXA_2$  no leito arteriolar mesentérico <sup>63</sup>.

### **1.5 O Modelo de Obesidade Monogénica Zucker**

Existem atualmente diversos modelos de obesidade disponíveis, os quais têm sido propostos a fim de investigar a patogênese, bem como os aspectos metabólicos e vasculares envolvidos nesta condição. Os estudos em modelos animais têm sido bastante úteis no estabelecimento das causas e conseqüências da obesidade e podem, também, ter participação importante no desenvolvimento de procedimentos mais efetivos para a prevenção e o tratamento desta condição.

Alguns dos modelos experimentais utilizados ajudaram a esclarecer características monogénicas da obesidade <sup>64-65</sup>. Para se elucidar, por exemplo, o mecanismo de ação da leptina e a resistência à insulina conseqüente à alteração na sinalização da leptina, a primeira alteração descrita foi uma mutação no cromossomo 6, que codifica o gene de síntese da leptina, o gene *ob*. A ausência de leptina nos camundongos *ob/ob* faz com que eles sejam hiperfágicos, diabéticos e obesos <sup>66</sup>. Na ocasião, ganhou força a hipótese de que a hipoleptinemia pudesse ser a maior determinante da obesidade. Entretanto, estudos posteriores mostraram que mutações no gene que determina a síntese do receptor de leptina promoviam aparecimento de resistência à insulina, hiperleptinemia e obesidade. São exemplos destes animais os ratos obesos Zucker (OZR<sub>s</sub>, *fa/fa*). Este modelo experimental

auxiliou no desenvolvimento do conceito de resistência à ação hipotalâmica à leptina<sup>67-68</sup>.

O rato Zucker (fa/fa) é um dos mais bem conhecidos e mais amplamente utilizados modelos de obesidade genética. A mutação do gene fa que determina a síntese do receptor de leptina foi descoberta por Zucker e Zucker (1961, 1963)<sup>69-70</sup>, durante os cruzamentos das matrizes conhecidas como Sherman e Merck M (linhagem 13M)<sup>69-70</sup>. Os animais eram homozigotos para o alelo fa, que determinava a síntese de receptores de leptina não funcionais (fa/fa) e se tornavam notavelmente obesos por volta da terceira e da quinta semana de vida. Na décima quarta semana de idade, a composição corporal dos OZR já era correspondente a 40 % de lipídeos e com 40 semanas eles chegavam a pesar duas vezes mais do que seus respectivos controles (*Lean Zucker rats* - LZRs)<sup>71</sup>. A obesidade nestes animais é herdada como uma herança recessiva mendeliana. Os animais afetados são hiperlipêmicos, hipercolesterolêmicos<sup>70, 72</sup> e hiperinsulinêmicos<sup>71</sup>, além de desenvolverem hipertrofia e hiperplasia de adipócitos<sup>73</sup>. Além das alterações em parâmetros metabólicos, demonstrou-se que OZR na fase adulta apresentam pressão arterial maior do que os controles<sup>74</sup>. Os ratos que apresentam genótipos homozigotos dominantes (+/+) ou heterozigotos (fa/+) permanecem magros, normoglicêmicos e normotensos.

A mais valiosa contribuição do OZR tem sido sua utilização como modelo de obesidade humana que se estabelece na fase jovem da vida. Muitos investigadores têm utilizado este modelo para estudar o desenvolvimento, a etiologia, as patologias associadas, os possíveis tratamentos e os mecanismos envolvidos neste tipo de obesidade genética considerada de grau severo.

O OZR é significativamente hiperfágico quando comparado ao LZR, já com 17 dias de vida<sup>75</sup> e esta diferença se torna mais significativa durante períodos de rápido crescimento, por exemplo, nas 16 primeiras semanas de vida<sup>76</sup>. É importante considerar que a hiperfagia não é necessária para a expressão do fenótipo obeso que OZR apresentam. Isto é justificado a partir de observações de que uma das primeiras alterações observadas nos OZR é o aumento da atividade da enzima lipase lipoprotéica no tecido adiposo, a qual está significativamente correlacionada com aumento da captação de triglicerídeos pelo tecido adiposo<sup>77</sup>. A atividade desta enzima já está elevada em OZR aos doze dias de vida, período onde ainda não é possível identificar visualmente estes animais como obesos e a hiperfagia ainda não

é identificada <sup>78</sup>. O aumento da atividade da lipase lipoprotéica precede também outras alterações presentes na obesidade em OZR, tais como o aumento da lipogênese hepática e a hiperinsulinemia <sup>79</sup>.

Ao contrário de seu amplo uso como modelo de obesidade, os OZR não têm sido extensivamente utilizados como modelo de diabetes tipo 2. Isto ocorre muito provavelmente porque esses animais são relativamente normoglicêmicos, desenvolvendo pequenos aumentos na glicemia apenas ocasionalmente <sup>69</sup>. A resistência à insulina e a hiperinsulinemia ocorrem na fase jovem dos ratos Zucker, seguida pela evolução para o prejuízo na capacidade secretória de insulina. A hiperglicemia, quando ocorre, se manifesta por volta da décima segunda semana de idade <sup>74</sup>. Porém, a presença de resistência à insulina já pode ser detectada nos animais com 6-7 semanas <sup>80</sup>, indicando que OZR, na fase jovem, representam um modelo normotenso de obesidade e resistência à insulina.

## **1.6 Ativação do Sistema Endocanabinóide na Obesidade**

Diversos estudos têm relatado consistentemente que ocorre aumento da ativação do sistema endocanabinóide na obesidade. De fato, o aumento dos níveis dos canabinóides endógenos anandamida e 2-AG no plasma de indivíduos obesos foi correlacionado com adiposidade visceral, sugerindo que o aumento da ativação do sistema endocanabinóide contribui para a obesidade e as desordens relacionadas a esta condição <sup>81</sup>. Estas evidências foram acompanhadas pelo desenvolvimento clínico de antagonistas do receptor CB1 para o tratamento da obesidade <sup>82</sup>, dislipidemia <sup>83</sup>, diabetes tipo 2 <sup>84</sup> e aterosclerose <sup>85</sup>. Estudos sugeriram que a alta eficácia dos antagonistas CB1 na redução do peso corporal em animais obesos e também em humanos é devida ao aumento da atividade do sistema endocanabinóide na obesidade <sup>86</sup>. Isso ocorre por um mecanismo independente da inibição da ingestão alimentar, e não ocorre somente no sistema nervoso central <sup>87</sup>, mas também nos tecidos periféricos <sup>21, 24, 81</sup>.

Hormônios como a leptina, que regula a biossíntese de endocanabinóides no hipotálamo, têm sido alvos crescentes de investigação como possíveis envolvidos na perda da regulação do sistema endocanabinóide na obesidade <sup>88</sup>. Demonstrou-se que a leptina controla negativamente os níveis de endocanabinóides no tecido adiposo branco <sup>89</sup>. Adicionalmente, em outros tecidos periféricos, a insulina parece



ter papel importante reduzindo os níveis de endocanabinóides ou aumentando sua degradação em animais que não apresentam obesidade <sup>24</sup>. Portanto, não somente a resistência à leptina, mas também a perda da sensibilidade à insulina pode resultar em elevação dos níveis de endocanabinóides. Esse fenômeno parece preceder o desenvolvimento da obesidade.

Os níveis desregulados de endocanabinóides (assim como o aumento da expressão de receptores CB1) podem afetar as ações biológicas que são exercidas por este sistema em vários órgãos. Por exemplo, estudos experimentais demonstraram que a estimulação de receptores CB1 pelos compostos canabinóides leva à inibição da liberação de neurotransmissores em neurônios centrais induzindo numerosas respostas fisiológicas, tais como ingestão alimentar <sup>88</sup>. O aumento da expressão destes receptores no hipotálamo pode não só promover ingestão alimentar e balanço energético positivo, mas também levar à obesidade e às desordens metabólicas relacionadas a esta condição.

Estudos demonstraram ainda que os compostos canabinóides estimulam a atividade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no hipotálamo, o que poderia explicar seus efeitos orexigênicos. Por outro lado, eles inibem a atividade desta enzima no fígado e tecido adiposo, o que levaria ao acúmulo de gordura nestas regiões, que juntamente com o efeito central, contribuiria para o ganho de peso e o aumento da massa de tecido adiposo branco <sup>90</sup>. A AMPK pertence à família de enzimas que são ativadas em consequência do estresse celular resultante da depleção de trifosfato de adenosina (ATP), agindo assim como reguladora da homeostase energética celular e sistêmica. Os principais efeitos agudos provenientes da ativação da AMPK podem ser resumidos em dois componentes: supressão das vias de utilização de ATP, que incluem a síntese de ácidos graxos, glicogênio, colesterol e proteínas; e ativação de processos de geração de energia (ATP), que incluem aumento da captação de glicose, estímulo da oxidação de ácidos graxos, inibição da produção de glicose, controle da secreção de insulina e aumento da ingestão alimentar <sup>91</sup>.

Especificamente no que tange ao tecido adiposo, onde a ativação do receptor CB1 estimula a adipogênese e a lipogênese <sup>24</sup>, o aumento da atividade canabinóide pode contribuir para o acúmulo de gordura. Considerando o papel importante da gordura visceral na gênese da resistência à insulina, este fenômeno pode facilitar o desenvolvimento de diabetes tipo 2 <sup>88</sup>. Uma vez que a estimulação de receptores

CB1 inibe a expressão e a liberação de adiponectina por adipócitos <sup>24</sup>, este cenário pode ser ainda mais prejudicado na presença de hiperativação do sistema endocanabinóide. Isso ocorre, pois a adiponectina protege a musculatura esquelética contra a resistência à insulina além de inibir a liberação e os efeitos promovidos por citocinas pró-inflamatórias.

No fígado, o aumento da expressão de receptores CB1 e também dos níveis de endocanabinóides facilita a produção excessiva de ácidos graxos e triglicerídeos, os quais, por sua vez, contribuem para a resistência à insulina, para a redução na razão HDL/ VLDL colesterol, e para a esteatose hepática <sup>21</sup>.

O aumento generalizado dos níveis de endocanabinóides também aumenta diretamente os níveis de triacilgliceróis por prejudicar o clearance, mediado pela apolipoproteína E, de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis <sup>92</sup>. No pâncreas, a consequência do aumento da atividade do sistema endocanabinóide inclui aumento da liberação de insulina por este tecido <sup>24</sup>. Esta alteração, combinada com a redução da sensibilidade à insulina, pode levar à hiperglicemia e, eventualmente, à hipertrofia e morte das células  $\beta$ , contribuindo assim para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 <sup>88</sup>.

Alterações na atividade do sistema endocanabinóide têm sido descritas em modelos experimentais de obesidade induzida por dieta e também em modelos genéticos <sup>21, 88</sup>. No que tange ao modelo experimental de obesidade utilizado no presente estudo (OZR), alterações na atividade do sistema endocanabinóide também já foram descritas. Nesse modelo experimental, em que a sinalização mediada pela leptina está prejudicada, não foi surpresa a observação dos níveis de endocanabinóides permanentemente elevados no tecido que apresenta maiores níveis de expressão dos receptores para leptina, que é o hipotálamo, onde a leptina inibe a síntese de endocanabinóides <sup>87</sup>. Nestes animais, o tratamento crônico com o antagonista de receptores canabinóides CB1 (o composto rimonabanto) reduziu a falência renal, a disfunção da célula beta <sup>93</sup> e a esteatose hepática <sup>94</sup>. Esses efeitos ocorreram de modo totalmente independente de seus efeitos sobre a ingestão alimentar. De fato, uma observação que merece especial menção é que o aumento do gasto energético é o principal mecanismo envolvido na perda de peso induzida pelo rimonabanto na obesidade. Esse efeito é independente de sua ação anoréxica.

Estudo recente mostrou também que os níveis do agonista canabinóide anandamida encontram-se elevados no pâncreas, no fígado e no duodeno de OZR

<sup>95</sup>. Esses dados, em conjunto, indicam que a hiperatividade persistente do sistema endocanabinóide em tecidos que controlam o balanço energético pode ter, então, papel central não só no desenvolvimento da obesidade como no surgimento dos fatores de risco a ela agregados em OZR. Entretanto, o papel da obesidade sobre as respostas mediadas por agonistas canabinóides no sistema vascular não foram ainda investigados.

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados apresentados neste estudo permitem-nos concluir que:

- ✓ A obesidade diminui o relaxamento de artérias mesentéricas de resistência a agonistas canabinóides;
- ✓ A redução da expressão dos receptores canabinóides CB1 e CB2 em artérias mesentéricas de OZR contribui para a redução do relaxamento à anandamida em OZR;
- ✓ Embora a expressão de receptores vanilóides (TRPV-1) não esteja alterada em OZR, há prejuízo nas vias de sinalização mediadas pela ativação destes receptores, uma vez que a resposta ao agonista deste receptor (capsaicina) está reduzida;
- ✓ Redução da captação e aumento da degradação de anandamida estão presentes em artérias mesentéricas de resistência de OZR e podem ter contribuído para a redução do relaxamento à anandamida;
- ✓ A fosforilação da eNOS, com conseqüente produção de NO pelas células endoteliais, possui papel importante no relaxamento à anandamida em LZR e participa do prejuízo no relaxamento a este agonista em OZR, por ter sua ativação reduzida após estímulo com anandamida;
- ✓ A AMPK é um alvo da anandamida em artérias mesentéricas de resistência de LZR e, assim como a eNOS, medeia o prejuízo no relaxamento a este agonista em OZR, por ter sua ativação reduzida após estímulo com anandamida;
- ✓ A ERK1/2, embora sofra fosforilação frente a estímulo com anandamida, não parece mediar o relaxamento à anandamida em LZR, porém sua ativação aumentada em OZR contribui para a redução do relaxamento à anandamida em OZR.

## REFERÊNCIAS\*

- 1 Osei-Hyiaman D, Harvey-White J, Batkai S, Kunos G. The role of the endocannabinoid system in the control of energy homeostasis. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30 Suppl 1:S33-8.
- 2 Pacher P, Batkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):389-462.
- 3 Mechoulam R, Gaoni Y. A Total Synthesis of DI-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc*. 1965;87:3273-5.
- 4 Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988;34(5):605-13.
- 5 Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990;346(6284):561-4.
- 6 Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365(6441):61-5.
- 7 Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992;258(5090):1946-9.
- 8 Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995;50(1):83-90.
9. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996;384(6604):83-7.

- 10 Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H, Holm C. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem.* 1997;272(43):27218-23.
- 11 Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(16):10819-24.
- 12 Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science.* 1997;277(5329):1094-7.
- 13 Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* 1999;400(6743):452-7.
- 14 Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.* 1991;11(2):563-83.
- 15 Mailleux P, Parmentier M, Vanderhaeghen JJ. Distribution of cannabinoid receptor messenger RNA in the human brain: an in situ hybridization histochemistry with oligonucleotides. *Neurosci Lett.* 1992;143(1-2):200-4.
- 16 Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol.* 1993;327(4):535-50.
- 17 Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68-69:619-31.
- 18 Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther.* 1997;74(2):129-80.
- 19 Coutts AA, Izzo AA. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: an update. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(6):572-9.
- 20 Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest.* 2003;112(3):423-31.

- 21 Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Batkai S, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1298-305.
- 22 Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Int J Obes (Lond).* 2005;29(2):183-7.
- 23 Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev.* 2006;27(1):73-100.
- 24 Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(8):3171-80.
- 25 Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(11):873-84.
- 26 Alexander SP, Kendall DA. The complications of promiscuity: endocannabinoid action and metabolism. *Br J Pharmacol.* 2007;152(5):602-23.
- 27 Varga K, Lake K, Martin BR, Kunos G. Novel antagonist implicates the CB1 cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide. *Eur J Pharmacol.* 1995;278(3):279-83.
- 28 Varga K, Lake KD, Huangfu D, Guyenet PG, Kunos G. Mechanism of the hypotensive action of anandamide in anesthetized rats. *Hypertension.* 1996;28(4):682-6.
- 29 Batkai S, Pacher P, Osei-Hyiaman D, Radaeva S, Liu J, Harvey-White J, et al. Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation.* 2004;110(14):1996-2002.
- 30 Randall MD, Harris D, Kendall DA, Ralevic V. Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol Ther.* 2002;95(2):191-202.
- 31 Plane F, Holland M, Waldron GJ, Garland CJ, Boyle JP. Evidence that anandamide and EDHF act via different mechanisms in rat isolated mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 1997;121(8):1509-11.

- 32 Randall MD, Kendall DA. Anandamide and endothelium-derived hyperpolarizing factor act via a common vasorelaxant mechanism in rat mesentery. *Eur J Pharmacol.* 1998;346(1):51-3.
- 33 Pratt PF, Hillard CJ, Edgmond WS, Campbell WB. N-arachidonylethanolamide relaxation of bovine coronary artery is not mediated by CB1 cannabinoid receptor. *Am J Physiol.* 1998;274(1 Pt 2):H375-81.
- 34 Chaytor AT, Martin PE, Evans WH, Randall MD, Griffith TM. The endothelial component of cannabinoid-induced relaxation in rabbit mesenteric artery depends on gap junctional communication. *J Physiol.* 1999;520(Pt 2):539-50.
- 35 Harris D, McCulloch AI, Kendall DA, Randall MD. Characterization of vasorelaxant responses to anandamide in the rat mesenteric arterial bed. *J Physiol.* 2002;539(Pt 3):893-902.
- 36 Randall MD, Kendall DA, O'Sullivan S. The complexities of the cardiovascular actions of cannabinoids. *Br J Pharmacol.* 2004;142(1):20-6.
- 37 Harris D, Kendall DA, Randall MD. Characterization of cannabinoid receptors coupled to vasorelaxation by endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1999;359(1):48-52.
- 38 Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, et al. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(24):14136-41.
- 39 Zygmunt PM, Hogestatt ED, Waldeck K, Edwards G, Kirkup AJ, Weston AH. Studies on the effects of anandamide in rat hepatic artery. *Br J Pharmacol.* 1997;122(8):1679-86.
- 40 Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca<sup>2+</sup> channel current. *Am J Physiol.* 1999;276(6 Pt 2):H2085-93.
- 41 Mukhopadhyay S, Chapnick BM, Howlett AC. Anandamide-induced vasorelaxation in rabbit aortic rings has two components: G protein dependent and independent. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(6):H2046-54.
- 42 Edwards RM, Stack EJ, Trizna W. Calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase and relaxes intracerebral arterioles. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;257(3):1020-4.



- 43 Brayden JE, Quayle JM, Standen NB, Nelson MT. Role of potassium channels in the vascular response to endogenous and pharmacological vasodilators. *Blood Vessels*. 1991;28(1-3):147-53.
- 44 Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, et al. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol*. 2000;129(2):227-30.
- 45 Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature*. 1997;390(6659):518-21.
- 46 Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J*. 1998;12(11):1035-44.
- 47 Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27(5):1047-53.
- 48 Hill JO. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr Rev*. 2006;27(7):750-61.
- 49 Strauss RS, Pollack HA. Epidemic increase in childhood overweight, 1986-1998. *JAMA*. 2001;286(22):2845-8.
- 50 Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1983;67(5):968-77.
- 51 Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Wilhelmsen L, Bjorntorp P, Tibblin G. Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984;288(6428):1401-4.
- 52 Rueda-Clausen CF, Silva FA, Lopez-Jaramillo P. Epidemic of overweight and obesity in Latin America and the Caribbean. *Int J Cardiol*. 2008;125(1):111-2.
- 53 Nakamura T, Kobayashi H, Yanagi K, Nakagawa T, Nishida M, Kihara S, et al. Importance of intra-abdominal visceral fat accumulation to coronary atherosclerosis in heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997;21(7):580-6.

- 54 Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 2006;113(6):898-918.
- 55 Stapleton PA, James ME, Goodwill AG, Frisbee JC. Obesity and vascular dysfunction. *Pathophysiology*. 2008;15(2):79-89.
- 56 Fruhbeck G. The adipose tissue as a source of vasoactive factors. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2004;2(3):197-208.
- 57 Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989;3(9):2007-18.
- 58 Feletou M, Vanhoutte PM. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. *J Physiol Pharmacol*. 1999;50(4):525-34.
- 59 Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(3):H985-1002.
- 60 Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996;97(11):2601-10.
- 61 Mather KJ, Mirzamohammadi B, Lteif A, Steinberg HO, Baron AD. Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(12):3517-23.
- 62 Perticone F, Ceravolo R, Candigliota M, Ventura G, Iacopino S, Sinopoli F, et al. Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C. *Diabetes*. 2001;50(1):159-65.
- 63 Lobato NS, Filgueira FP, Akamine EH, Davel AP, Rossoni LV, Tostes RC, et al. Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: Role of NO and prostanoids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010. In press.
- 64 Plum L, Wunderlich FT, Baudler S, Krone W, Bruning JC. Transgenic and knockout mice in diabetes research: novel insights into pathophysiology, limitations, and perspectives. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:152-61.

- 65 Cesareti MLR, Kohlmann JrO. Modelos Experimentais de Resistência à Insulina e Obesidade: Lições Aprendidas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50(2):190-7.
- 66 Marques-LopesI, Martí A, Moreno-Aliaga MJ, Martínez A. Aspectos genéticos da obesidade. *Rev Nutr.* 2004;17(3):327-38.
- 67 Campfield LA, Smith FJ, Burn P. The OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res.* 1996;28(12):619-32.
- 68 Munzberg H, Myers MG, Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci.* 2005;8(5):566-70.
- 69 Zucker LM, Zucker TF. Fatty, a new mutation in the rat. *J Hered.* 1961;52:275-8.
- 70 Zucker TF, Zucker LM. Fat accretion and growth in the rat. *J Nutr.* 1963;80:6-19.
- 71 Zucker LM, Antoniades HN. Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty". *Endocrinology.* 1972;90(5):1320-30.
- 72 Zucker TF, Zucker LM. Hereditary obesity in the rat associated with high serum fat and cholesterol. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962;110:165-71.
- 73 Johnson PR, Zucker LM, Cruce JA, Hirsch J. Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat. *J Lipid Res.* 1971;12(6):706-14.
- 74 Kurtz TW, Morris RC, Pershadsingh HA. The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension.* 1989;13(6 Pt 2):896-901.
- 75 Stern JS, Johnson PR. Spontaneous activity and adipose cellularity in the genetically obese Zucker rat (fafa). *Metabolism.* 1977;26(4):371-80.
- 76 Vasselli JR, Cleary MP, Jen KL, Greenwood MR. Development of food motivated behavior in free feeding and food restricted Zucker fatty (fa/fa) rats. *Physiol Behav.* 1980;25(4):565-73.
- 77 Maggio CA, Greenwood MR. Adipose tissue lipoprotein lipase (LPL) and triglyceride uptake in zucker rats. *Physiol Behav.* 1982;29(6):1147-52.

- 78 Gruen R, Hietanen E, Greenwood MR. Increased adipose tissue lipoprotein lipase activity during the development of the genetically obese rat (fa/fa). *Metabolism*. 1978;27(12 Suppl 2):1955-66.
- 79 Turkenkopf IJ, Olsen JL, Moray L, Greenwood MR, Johnson PR. Hepatic lipogenesis in the preobese Zucker rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1980;164(4):530-3.
- 80 Osmond JM, Mintz JD, Dalton B, Stepp DW. Obesity increases blood pressure, cerebral vascular remodeling, and severity of stroke in the Zucker rat. *Hypertension*. 2009;53(2):381-6.
- 81 Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Janke J, Batkai S, et al. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes*. 2005;54(10):2838-43.
- 82 Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rossner S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*. 2005;365(9468):1389-97.
- 83 Despres JP, Golay A, Sjostrom L. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med*. 2005;353(20):2121-34.
- 84 Scheen AJ, Finer N, Hollander P, Jensen MD, Van Gaal LF. Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet*. 2006;368(9548):1660-72.
- 85 Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K, Rodes-Cabau J, Cannon CP, Deanfield JE, et al. Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. *JAMA*. 2008;299(13):1547-60.
- 86 Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci*. 2005;8(5):585-9.
- 87 Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*. 2001;410(6830):822-5.
- 88 Di Marzo V. The endocannabinoid system in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(8):1356-67.

- 89 Buettner C, Muse ED, Cheng A, Chen L, Scherer T, Poci A, et al. Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nat Med.* 2008;14(6):667-75.
- 90 Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, Mitchell SE, et al. Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2005;280(26):25196-201.
- 91 Schimmack G, Defronzo RA, Musi N. AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab.* 2006;8(6):591-602.
- 92 Ruby MA, Nomura DK, Hudak CS, Mangravite LM, Chiu S, Casida JE, et al. Overactive endocannabinoid signaling impairs apolipoprotein E-mediated clearance of triglyceride-rich lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(38):14561-6.
- 93 Janiak P, Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C, Pierre F, Gouraud L, et al. Blockade of cannabinoid CB1 receptors improves renal function, metabolic profile, and increased survival of obese Zucker rats. *Kidney Int.* 2007;72(11):1345-57.
- 94 Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C, et al. Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology.* 2007;46(1):122-9.
- 95 Izzo AA, Piscitelli F, Capasso R, Aviello G, Romano B, Borrelli F, et al. Peripheral endocannabinoid dysregulation in obesity: relation to intestinal motility and energy processing induced by food deprivation and re-feeding. *Br J Pharmacol.* 2009;158(2):451-61.
- 96 Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.* 1977;41(1):19-26.
- 97 O'Sullivan SE, Kendall DA, Randall MD. Heterogeneity in the mechanisms of vasorelaxation to anandamide in resistance and conduit rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 2004;142(3):435-42.
- 98 Jiang S, Fu Y, Williams J, Wood J, Pandarinathan L, Avraham S, et al. Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells. *PLoS One.* 2007;2(7):e641.

- 99 Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):143-201.
- 100 Scotland RS, Chauhan S, Davis C, De Felipe C, Hunt S, Kabir J, et al. Vanilloid receptor TRPV1, sensory C-fibers, and vascular autoregulation: a novel mechanism involved in myogenic constriction. *Circ Res.* 2004;95(10):1027-34.
- 101 Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997;389(6653):816-24.
- 102 Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, et al. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol.* 1992;107(2):544-52.
- 103 Dray A, Forbes CA, Burgess GM. Ruthenium red blocks the capsaicin-induced increase in intracellular calcium and activation of membrane currents in sensory neurones as well as the activation of peripheral nociceptors in vitro. *Neurosci Lett.* 1990;110(1-2):52-9.
- 104 Rayment SJ, Ralevic V, Barrett DA, Cordell R, Alexander SP. A novel mechanism of vasoregulation: ADP-induced relaxation of the porcine isolated coronary artery is mediated via adenosine release. *FASEB J.* 2007;21(2):577-85.
- 105 Goirand F, Solar M, Athea Y, Viollet B, Mateo P, Fortin D, et al. Activation of AMP kinase alpha1 subunit induces aortic vasorelaxation in mice. *J Physiol.* 2007;581(Pt 3):1163-71.
- 106 Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(17):7686-9.
- 107 Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* 1994;372(6507):686-91.
- 108 Sista AK, O'Connell MK, Hinohara T, Oommen SS, Fenster BE, Glassford AJ, et al. Increased aortic stiffness in the insulin-resistant Zucker fa/fa rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(2):H845-51.

- 109 Bouvet C, Belin de Chantemele E, Guihot AL, Vessieres E, Bocquet A, Dumont O, et al. Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. *Hypertension*. 2007;50(1):248-54.
- 110 Stepp DW, Frisbee JC. Augmented adrenergic vasoconstriction in hypertensive diabetic obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282(3):H816-20.
- 111 Naik JS, Xiang L, Hester RL. Enhanced role for RhoA-associated kinase in adrenergic-mediated vasoconstriction in gracilis arteries from obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290(1):R154-61.
- 112 Lesniewski LA, Donato AJ, Behnke BJ, Woodman CR, Laughlin MH, Ray CA, et al. Decreased NO signaling leads to enhanced vasoconstrictor responsiveness in skeletal muscle arterioles of the ZDF rat prior to overt diabetes and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(4):H1840-50.
- 113 Xiang L, Dearman J, Abram SR, Carter C, Hester RL. Insulin resistance and impaired functional vasodilation in obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(4):H1658-66.
- 114 Wagner JA, Varga K, Jarai Z, Kunos G. Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension*. 1999;33(1 Pt 2):429-34.
- 115 Hillard CJ. Endocannabinoids and vascular function. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;294(1):27-32.
- 116 Kunos G, Jarai Z, Batkai S, Goparaju SK, Ishac EJ, Liu J, et al. Endocannabinoids as cardiovascular modulators. *Chem Phys Lipids*. 2000;108(1-2):159-68.
- 117 Rajesh M, Mukhopadhyay P, Batkai S, Hasko G, Liaudet L, Huffman JW, et al. CB2-receptor stimulation attenuates TNF-alpha-induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(4):H2210-8.
- 118 Rajesh M, Mukhopadhyay P, Hasko G, Huffman JW, Mackie K, Pacher P. CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF-alpha-induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol*. 2008;153(2):347-57.

- 119 McGiff JC, Carroll MA, Escalante B. Arachidonate metabolites and kinins in blood pressure regulation. *Hypertension*. 1991;18(5 Suppl):III150-7.
- 120 Ellis EF, Moore SF, Willoughby KA. Anandamide and delta 9-THC dilation of cerebral arterioles is blocked by indomethacin. *Am J Physiol*. 1995;269(6 Pt 2):H1859-64.
- 121 Grainger J, Boachie-Ansah G. Anandamide-induced relaxation of sheep coronary arteries: the role of the vascular endothelium, arachidonic acid metabolites and potassium channels. *Br J Pharmacol*. 2001;134(5):1003-12.
- 122 Randall MD, Alexander SP, Bennett T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, et al. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;229(1):114-20.
- 123 Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*. 1995;92(11):3337-49.
- 124 Burnham MP, Bychkov R, Feletou M, Richards GR, Vanhoutte PM, Weston AH, et al. Characterization of an apamin-sensitive small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF. *Br J Pharmacol*. 2002;135(5):1133-43.
- 125 Chataigneau T, Feletou M, Thollon C, Villeneuve N, Vilaine JP, Duhault J, et al. Cannabinoid CB1 receptor and endothelium-dependent hyperpolarization in guinea-pig carotid, rat mesenteric and porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol*. 1998;123(5):968-74.
- 126 Fulton D, Quilley J. Evidence against anandamide as the hyperpolarizing factor mediating the nitric oxide-independent coronary vasodilator effect of bradykinin in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;286(3):1146-51.
- 127 Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*. 2006;147 Suppl 1:S193-201.
- 128 Mendizabal VE, Orliac ML, Adler-Graschinsky E. Long-term inhibition of nitric oxide synthase potentiates effects of anandamide in the rat mesenteric bed. *Eur J Pharmacol*. 2001;427(3):251-62.
- 129 Begg M, Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Mo FM, et al. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther*. 2005;106(2):133-45.



- 130 Mendizabal VE, Adler-Graschinsky E. Cannabinoids as therapeutic agents in cardiovascular disease: a tale of passions and illusions. *Br J Pharmacol.* 2007;151(4):427-40.
- 131 Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:749-74.
- 132 Chen Z, Peng IC, Sun W, Su MI, Hsu PH, Fu Y, et al. AMP-activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase Ser633. *Circ Res.* 2009;104(4):496-505.
- 133 Cale JM, Bird IM. Inhibition of MEK/ERK1/2 signalling alters endothelial nitric oxide synthase activity in an agonist-dependent manner. *Biochem J.* 2006;398(2):279-88.
- 134 Anter E, Chen K, Shapira OM, Karas RH, Keaney JF, Jr. p38 mitogen-activated protein kinase activates eNOS in endothelial cells by an estrogen receptor alpha-dependent pathway in response to black tea polyphenols. *Circ Res.* 2005;96(10):1072-8.
- 135 Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(1):18-24.
- 136 Lim CT, Kola B, Korbonits M. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J Mol Endocrinol.* 2010;44(2):87-97.
- 137 Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature.* 2002;415(6869):339-43.
- 138 Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002;8(11):1288-95.
- 139 Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 1999;443(3):285-9.
- 140 Zhang XP, Hintze TH. cAMP signal transduction induces eNOS activation by promoting PKB phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(6):H2376-84.

- 141 Lipina C, Stretton C, Hastings S, Hundal JS, Mackie K, Irving AJ, et al. Regulation of MAP kinase-directed mitogenic and protein kinase B-mediated signaling by cannabinoid receptor type 1 in skeletal muscle cells. *Diabetes*. 2010;59(2):375-85.
- 142 Li DY, Tao L, Liu H, Christopher TA, Lopez BL, Ma XL. Role of ERK1/2 in the anti-apoptotic and cardioprotective effects of nitric oxide after myocardial ischemia and reperfusion. *Apoptosis*. 2006;11(6):923-30.
- 143 Xu Z, Ji X, Boysen PG. Exogenous nitric oxide generates ROS and induces cardioprotection: involvement of PKG, mitochondrial KATP channels, and ERK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(4):H1433-40.
- 144 Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation*. 1999;99(3):392-9.
- 145 Xiao D, Zhang L. ERK MAP kinases regulate smooth muscle contraction in ovine uterine artery: effect of pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282(1):H292-300.
- 146 Matsumoto T, Ishida K, Nakayama N, Kobayashi T, Kamata K. Involvement of NO and MEK/ERK pathway in enhancement of endothelin-1-induced mesenteric artery contraction in later-stage type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(5):H1388-97.
- 147 Ding L, Chapman A, Boyd R, Wang HD. ERK activation contributes to regulation of spontaneous contractile tone via superoxide anion in isolated rat aorta of angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(6):H2997-3005.
- 148 Kim J, Yoon MY, Choi SL, Kang I, Kim SS, Kim YS, et al. Effects of stimulation of AMP-activated protein kinase on insulin-like growth factor 1- and epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem*. 2001;276(22):19102-10.
- 149 Kawasaki H, Takasaki K, Saito A, Goto K. Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature*. 1988;335(6186):164-7.
- 150 Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23(4):183-91.

- 151 Glaser ST, Kaczocha M, Deutsch DG. Anandamide transport: a critical review. *Life Sci.* 2005;77(14):1584-604.
  
- 152 Moore SA, Nomikos GG, Dickason-Chesterfield AK, Schober DA, Schaus JM, Ying BP, et al. Identification of a high-affinity binding site involved in the transport of endocannabinoids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(49):17852-7.