

**GISELE KRUGER COUTO**

***Avaliação Temporal da Função Vascular em Aorta de  
Camundongos com Deleção dos Receptores  $\alpha_{2A}$  - e  $\alpha_{2C}$  -  
Adrenérgicos***

**GISELE KRUGER COUTO**

***Avaliação Temporal da Função Vascular em Aorta de  
Camundongos com Deleção dos Receptores  $\alpha_{2A}$  - e  $\alpha_{2C}$  -  
Adrenérgicos***

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências (Fisiologia).

São Paulo  
2007

**GISELE KRUGER COUTO**

***Avaliação Temporal da Função Vascular em Aorta de  
Camundongos com Deleção dos Receptores***

***$\alpha_{2A}$  - e  $\alpha_{2C}$  - Adrenérgicos***

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências.

Área de concentração:  
Fisiologia

Orientador:  
Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni

São Paulo  
2007

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Tadeu e Edilene, que através do carinho e amor incondicional a mim dedicados, fizeram com que a distância entre nós fosse menos dolorosa. Obrigada pelo incentivo e pelo apoio irrestrito em todos os momentos da minha vida.*

*Aos meus irmãos, Washington e Livia, que são e sempre serão os meus melhores amigos.*

*Aos meus avós, Ostinho e Nize, pelo amor e por sempre me apoiarem na busca pelos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer de maneira especial à minha orientadora, Prof. Dr. Luciana Venturini Rossoni, pela credibilidade, dedicação e incentivo que foram fundamentais para minha formação científica. Ao longo destes anos, o nosso convívio a transformou em uma grande amiga e confidente.

À minha grande amiga e prima Ana Paula Couto Davel, que despertou em mim o interesse pela fisiologia. Sua orientação durante minha iniciação científica na Universidade Federal do Espírito Santo e seu auxílio no mestrado foram de enorme importância.

À Juliana Carmona, pela amizade e pela contribuição na minha dissertação durante seu estágio no laboratório de Fisiologia Vascular.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Vascular, Camilla Wenceslau, Hildebrando, Lívia, Luana, Renata, Kleiber, Anderson, Eliana, Camila Moraes, Raphael, Emilia e Juliana Belletati, que no decorrer do meu mestrado demonstraram seu apoio, compreensão e amizade. Obrigada pelos divertidíssimos almoços no “RU” (bandeirão) e por tornarem meus momentos cansativos em diversão e alegria.

À Prof. Dr. Patrícia Brum, que gentilmente cedeu seu modelo experimental para elaboração deste trabalho e por permitir que alguns experimentos fossem realizados no seu laboratório de pesquisa.

À Marcele, técnica do laboratório da Prof. Dr. Patrícia Brum, pela boa vontade e prestabilidade demonstrados no auxílio de alguns experimentos.

Ao Fernando, Cláudio e Leonardo, funcionários do Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Aos Professores do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo que contribuíram das mais diferentes maneiras (aulas, palestras, conversas nos corredores, ...) para a minha formação científica. Em especial à Prof. Dr. Maria Oliveira de Souza pela amizade e auxílio desde o início do meu mestrado, à Prof. Dr. Zuleica Fortes e ao Prof. Dr. Sérgio Cravo, pela contribuição no meu exame de qualificação.

Aos meus familiares pelo incentivo e apoio, em especial à tia Mariah e ao tio Alan.

A Deus por todas as bênçãos que me concedeu, que muitas pessoas chamam de sorte ou de coincidência, e por ter me proporcionado nesta existência o convívio com pessoas tão valiosas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

Couto GK. *Avaliação temporal da função vascular em aortas de camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos* [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Este estudo avaliou a função vascular em anéis de aorta e no leito vascular mesentérico (LVM) de camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos (camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO) com 3, 5 e 7 meses de idade, os quais apresentam uma hiperatividade simpática com conseqüente desenvolvimento de cardiomiopatia. Os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO apresentaram um aumento da frequência cardíaca em todos os grupos avaliados, e hipertrofia ventricular esquerda aos 5 e 7 meses. Na aorta, o relaxamento dependente (acetilcolina) e independente (nitroprussiato de sódio) do endotélio e da via  $\beta$ -adrenérgica (isoproterenol), assim como a contração (fenilefrina e serotonina) e a mobilização de  $Ca^{2+}$  não foram alterados nos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 3, 5 e 7 meses de idade. Nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 3 meses de vida, o relaxamento mediado pelos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (clonidina) foi reduzido. Tanto a contração (noradrenalina) como o relaxamento (acetilcolina) no LVM dos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 7 meses de idade não foi alterado. Assim, sugere-se que os vasos arteriais parecem ser menos sensíveis do que o coração aos efeitos crônicos da hiperatividade simpática presente nos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos.

**Palavras-chave:** Função vascular; Aorta; Camundongos; Receptores alfa $_{2A}$ -adrenérgicos; Receptores alfa $_{2C}$ -adrenérgicos; Hiperatividade simpática.

## ABSTRACT

Couto GK. *Time-dependent characterization of vascular reactivity in aorta of  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors knockout mice*. [Masters Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

This study assessed the vascular function in aortic rings and in mesenteric vascular bed (MVB) from mice with disruption of  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors ( $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO mice) with 3, 5 and 7 months of age, that present sympathetic hyperactivity associated with a development of time-dependent cardiomyopathy. Heart rate was increased in all  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO mice groups, and left ventricular hypertrophy was observed only in 5 and 7 month-old  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO mice. There are no changes in the relaxation induced by acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside and isoproterenol in aortic rings from all groups. In addition, the contraction induced by phenylephrine and serotonin, and  $Ca^{2+}$  handling did not change. However, in aorta from 3 month-old  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO mice the relaxation induced by clonidine ( $\alpha_2$ -adrenergic agonist) was reduced. In MVB from 7 month-old  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO mice, neither the contraction (noradrenaline) nor relaxation (ACh) was modified. The results suggest that arterial vessel has been more resistant than heart to chronic effects induced by sympathetic hyperactivity observed in mice with disruption of  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors.

**Key-words:** Vascular function; Aorta; Mice; Alpha<sub>2A</sub>-adrenergic receptor; Alpha<sub>2C</sub>-adrenergic receptor; Sympathetic hyperactivity.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. O sistema nervoso simpático e o sistema cardiovascular.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2. Receptores adrenérgicos.....</b>	<b>17</b>
1.2.1. Receptor $\alpha_1$ -adrenérgico em vasos sanguíneos.....	19
1.2.2. Receptor $\alpha_2$ -adrenérgico.....	21
1.2.2.1. Receptor $\alpha_2$ -adrenérgico em vasos sanguíneos.....	22
1.2.2.2. Receptor $\alpha_2$ -adrenérgico na regulação do sistema nervoso simpático....	27
<b>1.3. Atividade simpática e patologias do sistema cardiovascular.....</b>	<b>31</b>
<b>1.4. Deleção dos receptores <math>\alpha_{2A}</math>- e <math>\alpha_{2C}</math>-adrenérgicos em camundongos como um novo modelo de hiperatividade simpática.....</b>	<b>35</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
2.1. Objetivo geral.....	40
2.2. Objetivos específicos.....	40
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1. Obtenção dos animais experimentais.....	42
3.2. Determinação da pressão arterial e frequência cardíaca.....	42
3.3. Avaliação do índice de hipertrofia cardíaca.....	44
3.4. Avaliação da congestão pulmonar e da congestão hepática.....	45
3.5. Reatividade vascular em anéis de aorta de camundongos.....	45

	9
3.5.1. Protocolos experimentais de reatividade vascular na aorta de camundongos.....	46
<b>3.6. Reatividade vascular no leito vascular mesentérico de camundongos.....</b>	<b>48</b>
3.6.1. Protocolos experimentais de reatividade vascular no leito vascular mesentérico de camundongos.....	50
<b>3.7. Análise dos resultados.....</b>	<b>51</b>
3.7.1. Expressão dos dados.....	51
3.7.2. Análise estatística.....	52
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. Medida da pressão arterial e da frequência cardíaca em camundongos WT e <math>\alpha_{2A}/\alpha_{2C}</math>ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.....</b>	<b>54</b>
<b>4.2. Índice de hipertrofia cardíaca em camundongos WT e <math>\alpha_{2A}/\alpha_{2C}</math>ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3. Avaliação da congestão pulmonar e da congestão hepática em camundongos WT e <math>\alpha_{2A}/\alpha_{2C}</math>ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.....</b>	<b>57</b>
<b>4.4. Reatividade vascular em anéis de aorta de camundongos WT e <math>\alpha_{2A}/\alpha_{2C}</math>ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.....</b>	<b>59</b>
4.4.1. Respostas de relaxamento à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em aortas de camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.....	59
4.4.2. Resposta de relaxamento ao isoproterenol em aortas de camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.....	63
4.4.3. Resposta de relaxamento à clonidina em aortas de camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3 meses de idade.....	65

4.4.4. Resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl) em anéis de aorta com e sem endotélio de camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.....	67
4.4.5. Resposta vasoconstritora à fenilefrina e à serotonina em anéis de aorta de camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.....	69
4.4.6. Modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.....	71
4.4.7. Papel de cálcio intracelular e extracelular na resposta vasoconstritora à fenilefrina em aortas de camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.....	74
<b>4.5. Reatividade vascular no leito vascular mesentérico de camundongos WT e <math>\alpha_{2A}/\alpha_{2C}</math>ARKO com 7 meses de idade.....</b>	<b>76</b>
4.5.1. Resposta de relaxamento à acetilcolina no leito vascular mesentérico de camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de idade.....	76
4.5.2. Resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl) no leito vascular mesentérico de camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de idade.....	77
4.5.3. Resposta vasoconstritora à noradrenalina no leito vascular mesentérico de camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ AKO com 7 meses de idade.....	78
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>5.1. Efeitos do aumento do tônus simpático no tecido cardíaco e na pressão arterial e conseqüente indução de edemas pulmonar e hepático...</b>	<b>82</b>

<b>5.2. Os efeitos do aumento do tônus simpático nos vasos sanguíneos.....</b>	<b>89</b>
5.2.1. Relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina e independente de endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio.....	89
5.2.2. Resposta vasodilatadora induzida pelo isoproterenol.....	92
5.2.3. Resposta vasodilatadora induzida pela clonidina.....	95
5.2.4. Resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl).....	99
5.2.5. Resposta vasoconstritora à fenilefrina e à serotonina.....	101
5.2.6. Modulação endotelial na resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	103
5.2.7. Papel do cálcio intracelular e extracelular na resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	105
5.2.8. Efeitos da hiperatividade simpática em diferentes vasos sanguíneos.....	108
<b>6. SUMÁRIO E CONCLUSÃO.....</b>	<b>114</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>117</b>

# Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

O eixo estresse oxidativo-mediadores pró-inflamatórios-disfunção endotelial está envolvido no cerne do desenvolvimento de várias doenças que acometem o sistema cardiovascular, como hipertensão, aterosclerose, doenças isquêmicas do coração e insuficiência cardíaca; sendo que estas possuem alta prevalência e são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade mundiais. No Brasil, a taxa de mortalidade devida a doenças do sistema cardiovascular corresponde a 28% da mortalidade geral e vem crescendo em todas as regiões do Brasil, sendo estas responsáveis por 10% das internações em hospitais do SUS (DATASUS do Ministério da Saúde). Tais aspectos, por si só, justificam o empenho em se estudar os mecanismos relacionados à gênese das doenças que acometem o sistema cardiovascular.

A hipertensão essencial, a hipertrofia cardíaca, o infarto agudo do miocárdio e a insuficiência cardíaca, possuem grande relevância epidemiológica em qualquer programa de saúde mundial e, entre as várias alterações funcionais que caracterizam essas patologias, o aumento da atividade nervosa simpática está presente na grande maioria das vezes (Korner et al., 1973; Bristow, 1984; McAlpine, Cobbe, 1988; Zucker et al., 1995; Esler, Kaye, 2000). Além disso, sabe-se que o sistema nervoso simpático é capaz de modular as funções cardiovasculares.

No coração, a atividade simpática altera o débito cardíaco por alterar a frequência cardíaca e o volume sistólico. E, nos vasos sanguíneos, o sistema nervoso simpático é capaz de modular a resistência periférica total e o retorno venoso através da regulação do tônus vascular, efeito esse mediado pela ação de catecolaminas endógenas nos diferentes tipos de receptores adrenérgicos

encontrados no endotélio e no músculo liso de diferentes leitos vasculares (Levy, 2004).

Sendo assim, devido à importante influência do sistema nervoso simpático no controle do funcionamento vascular, é pertinente a hipótese de que alterações na atividade simpática e/ou as alterações nos receptores adrenérgicos possam contribuir para a gênese e/ou manutenção de estados patológicos do sistema cardiovascular.

### *1.1. O sistema nervoso simpático e o sistema cardiovascular*

Ao fim do século XIX e início do XX Gaskell e Langley foram responsáveis pela realização de estudos clássicos que marcaram a base do conhecimento sobre a anatomia, fisiologia e farmacologia do sistema neurovegetativo. Este sistema é responsável principalmente por regular funções viscerais por todo o organismo humano tendo participação vital na manutenção da homeostasia corporal. Atualmente, também se postula a participação do sistema neurovegetativo na expressão de comportamentos e na influência do controle voluntário em sua atividade (Decety et al., 1993; Timo-laria, 1999).

O sistema neurovegetativo é organizado em dois componentes: sistema nervoso simpático ou toracolombar e o sistema nervoso parassimpático ou craniosacral. A denominação simpático ou parassimpático foi dada devido às observações de que a estimulação de nervos destes dois sistemas produziam efeitos antagônicos sobre os órgãos efetores. Entretanto, esta divisão funcional já não é mais aceita, tornando-se apenas válida a classificação de caráter anatômico. Uma vez que, a maioria dos neurônios efetores pré-ganglionares do sistema

simpático originam-se do primeiro segmento torácico ao segundo ou terceiro segmento lombar da coluna vertebral, enquanto que as fibras pré-ganglionares parassimpáticas têm seus corpos celulares localizados principalmente no mesencéfalo, no bulbo e em segmentos sacrais da medula espinhal (Mosqueda-Garcia, 1996).

Os axônios dos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso autonômico periférico partem de diferentes origens do sistema nervoso central e se direcionam para os gânglios simpáticos ou parassimpáticos onde fazem sinapse com neurônios chamados de neurônios ganglionares. Estes, por sua vez, inervam os diferentes tecidos e órgãos efetores, modulando especificamente o funcionamento de cada um deles. No que tange ao sistema cardiovascular, sabe-se que há influência direta do sistema simpático e parassimpático para o coração e predominantemente simpática para os vasos sangüíneos (Burnstock, 1975; Randall, 1976).

Os curtos axônios mielinizados dos neurônios pré-ganglionares simpáticos cardíacos saem pela raiz ventral dos quatro primeiros segmentos torácicos da medula através de ramos comunicantes brancos, e seguem em direção aos gânglios simpáticos cervicais (superior, médio e inferior) e torácicos superiores das cadeias paravertebrais bilaterais, onde fazem sinapse com neurônios ganglionares, cujos axônios são amielinizados (Timo-laria, 1999; de Hurtado, 2004). Os axônios destes neurônios, por sua vez, inervam os nodos sinoatrial e atrioventricular, o músculo atrial, o septo interatrial, o feixe de His, a rede de Purkinje, o septo interventricular e o músculo ventricular. A estimulação simpática cardíaca induz efeitos cronotrópicos (frequência cardíaca), dromotrópicos (velocidade de condução), inotrópicos (força de contração) e lusitópicos (velocidade de relaxamento) positivos (Timo-laria, 1999; de Hurtado, 2004).



Os vasos sangüíneos são inervados principalmente pelo sistema nervoso simpático (Burnstock, 1975) e as fibras nervosas que os inervam têm origem diversificada na medula espinhal, dependendo da localização. Ao alcançarem os vasos sangüíneos, as fibras nervosas ganglionares simpáticas se ramificam extensivamente formando plexos. As terminações axônicas fazem sinapse com células da adventícia, ou penetram na camada média podendo então influenciar diretamente a atividade das células musculares lisas e do endotélio dos vasos (Nelson, Rennels, 1970; Nelson, Molinoff, 1976). A anatomia e fisiologia das fibras nervosas simpáticas vasomotoras são estudadas há bastante tempo e sabe-se que estas fibras nervosas têm papel na geração e manutenção do tônus vascular, sendo assim, consideradas fibras vasoconstritoras (Warren et al., 1942; Folkow et al., 1971).

A inervação simpática nos vasos sangüíneos ocorre de maneira diferencial dependendo do tipo de vaso e da sua localização. Artérias elásticas como a aorta, têm inervação escassa, enquanto que artérias de pequeno calibre (<300  $\mu\text{m}$ ) são ricas em terminações nervosas simpáticas (Nilsson, 1985; Nilsson et al., 1986; Stassen et al., 1998). A abundante inervação das arteríolas pelo sistema nervoso simpático torna este sistema a principal via eferente neural responsável, diretamente, pelo controle da resistência periférica total e, conseqüentemente, da pressão arterial e da pós-carga cardíaca.

Além da ação das fibras eferentes nos efeitos da estimulação simpática, destaca-se a participação da medula adrenal. Esta se assemelha anatômica e embriologicamente a um gânglio simpático, e possui células denominadas cromafins, que quando estimuladas por neurônios pré-ganglionares simpáticos liberam neurotransmissores na corrente sangüínea, principalmente adrenalina, que

contribuem de maneira essencial para o perfil de resposta da estimulação simpática, e também ampliam o campo de ação deste sistema, que passa a atuar em vísceras e em leitos vasculares mesmo sem inervação simpática direta (Timo-laria, 1999; Migliorini, Kettelhut, 1999).

Assim, os efeitos da estimulação nervosa autonômica são mediados pela ação de neurotransmissores sintetizados nos terminais axônicos dos neurônios ganglionares e na medula adrenal e, posteriormente, liberados para o meio extracelular ou diretamente na circulação, no caso da medula adrenal, podendo então exercer seus efeitos em diferentes sistemas do organismo. Os principais neurotransmissores responsáveis por mediar os efeitos da atividade nervosa simpática sobre o sistema cardiovascular são as catecolaminas: noradrenalina e adrenalina. A noradrenalina é liberada pelos terminais nervosos ganglionares noradrenérgicos e tanto a noradrenalina quanto a adrenalina são secretados pela medula adrenal. Ambas as catecolaminas atuam através da ligação aos receptores adrenérgicos promovendo importantes alterações nas funções cardiovasculares.

### *1.2. Receptores adrenérgicos*

Em 1948, Ahlquist observou, em uma série de órgãos, dois padrões de resposta farmacológica a vários agonistas simpatomiméticos e propôs a divisão dos receptores adrenérgicos em dois tipos:  $\alpha$  e  $\beta$ . Sendo assim, Ahlquist foi o primeiro a estabelecer a classificação farmacológica dos receptores adrenérgicos.

Posteriormente, em relação ao receptor  $\alpha$ -adrenérgico, foi descoberta e caracterizada por Starke e colaboradores (1974, 1975) a existência e a localização tecidual diferenciada de subclasses de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, os quais

demonstraram que o receptor  $\alpha$ -adrenérgico pré- e pós-sinápticos diferem com respeito à relativa potência a alguns agonistas. Em 1974, Langer sugeriu que os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos mediando resposta em órgãos efetores, ou seja, em localização pós-sináptica, seriam o receptor  $\alpha_1$ , enquanto aqueles mediando a redução da liberação de neurotransmissor durante a estimulação nervosa, em localização pré-sináptica, seriam o subtipo  $\alpha_2$ . Alguns anos mais tarde, foi encontrado um receptor  $\alpha$ -adrenérgico, similar ao receptor adrenérgico pré-sináptico  $\alpha_2$ , em localização pós-sináptica (Berthelsen, Pettinger, 1977). Assim, a nomenclatura dos receptores adrenérgicos,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , passou a depender exclusivamente da potência desses receptores a certos agonistas e antagonistas e não mais na sua localização tecidual (Berthelsen, Pettinger, 1977). Nos anos 80, com desenvolvimento de fármacos mais seletivos e do uso de clones moleculares foi demonstrado que existem mais subtipos de receptores que os previamente descritos. Atualmente, nove diferentes subtipos de receptores adrenérgicos foram clonados e farmacologicamente testados:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  (para revisão: Guimarães, Moura, 2001).

As células musculares lisas vasculares possuem tanto receptores adrenérgicos  $\alpha$  como  $\beta$ , assim, a resposta da célula a certos agonistas que estimulam ambos os tipos de receptores adrenérgicos, como a noradrenalina, irá depender da relativa importância de cada população de receptores adrenérgicos. Entretanto, na maioria dos tecidos vasculares os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos medeiam o efeito predominante. Sendo assim, a seguir serão descritas as funções dos receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , bem como os respectivos subtipos, nos vasos sanguíneos.

### 1.2.1. Receptor $\alpha_1$ -adrenérgico em vasos sanguíneos

Embora todos os subtipos de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) estejam presentes nas células de músculo liso vascular, na maioria dos mamíferos, a contração destas células é predominantemente mediada pela ativação dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Neste sentido, na aorta e nas artérias femoral, mesentérica, jejunal, renal e esplênica de cães a resposta contrátil é principalmente mediada pelo receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico (Polônia et al., 1985; Shi et al., 1989); assim como em artérias de outros mamíferos, por exemplo, em aorta de ratos (Digges, Summers, 1983; Macia et al., 1984), em aorta (Russel, Watts, 2000) e artérias mesentéricas de resistência de camundongos (Pérez-Rivera et al., 2007), em artéria pulmonar de coelhos (MacLean et al., 1993) e em algumas artérias de humanos, como as artérias de resistência do músculo esquelético (Jarajapu et al., 2001) e artérias mesentéricas (Törnebrandt et al., 1985).

Em células de músculo liso vascular, os três subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos clonados até o momento ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  e  $\alpha_{1D}$ ) são acoplados à proteína  $G_q$ , que se dissocia nas subunidades  $G_{q\alpha}$ -GTP e  $G_{q\beta\gamma}$  após estimulação dos receptores. Ambas as subunidades causam a ativação da fosfolipase C (PLC) na membrana plasmática. A PLC ativada catalisa a clivagem do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) da membrana plasmática, em diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ), que atuam como segundos mensageiros intracelulares (Wu et al., 1992; Schwinn, 1993). O  $IP_3$  formado é liberado no meio intracelular e estimula a abertura de canais para  $Ca^{2+}$  no retículo sarcoplasmático, canais sensíveis a  $IP_3$ , permitindo a saída do  $Ca^{2+}$  estocado. O DAG por sua vez, em conjunto com o  $Ca^{2+}$ , ativa a proteína quinase C (PKC), que fosforila inúmeras proteínas, desencadeando vários sinais, dentre eles o

aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem do tipo L. Através dos mecanismos descritos acima e por aumentar a probabilidade de abertura dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática operados por receptor, a estimulação  $\alpha_1$  adrenérgica culmina com o aumento das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma da célula muscular lisa, o qual é o íon essencial para a contração desta célula (García-Sáinz et al., 2000).

No músculo liso vascular, o  $\text{Ca}^{2+}$  se liga à proteína citoplasmática calmodulina, formando o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina que é capaz de ativar a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK). A MLCK fosforila a cadeia leve da miosina, o que permite a maior interação da miosina com a actina, causando a contração da célula muscular lisa. O complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina também ativa a quinase da calmodulina II, que dentre outras funções, é capaz de fosforilar a cadeia leve da miosina, mas em menor proporção que a MLCK. O sítio da actina que interage com a miosina é regulado, no músculo liso vascular, pelo caldesmon, e o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina é capaz de se ligar ao caldesmon e liberar a actina para interagir com a miosina. Assim, o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular é o principal processo que inicia a contração dos miócitos vasculares e o seu controle é importante para o funcionamento da célula muscular lisa (Rembold, Murphy, 1986; Somlyo AP, Somlyo AV, 1994; Horowitz et al., 1996). O  $\text{Ca}^{2+}$  liberado dos estoques por canais sensíveis a  $\text{IP}_3$  também é capaz de ativar canais não seletivos para cátions operados por estoques (SOC), e a interação entre estes dois mecanismos permite oscilações na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (ondas de cálcio), que também são necessárias para a manutenção da contração (Lee et al., 2001; 2002). Assim, as catecolaminas liberadas após a estimulação simpática, principalmente via

receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos presentes na célula de músculo liso vascular, promovem uma vasoconstrição e aumento do tônus vascular.

Atualmente acredita-se que as células musculares lisas vasculares expressam uma mistura dos subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Miller et al., 1996) e a resposta mediada por agonistas destes receptores ocorre provavelmente devido a ativação de mais de um subtipo de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico (Van der Graaf et al., 1996; Zhong, Minneman, 1999).

Logo, sabendo que o receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico é o principal receptor responsável pela vasoconstrição após uma descarga simpática, torna-se de fundamental importância estudar a resposta contrátil induzida por este receptor em diversas condições patológicas em que há um aumento da atividade simpática.

### *1.2.2. Receptor $\alpha_2$ -adrenérgico*

Atualmente os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos são classificados como  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2C}$  (Bylund et al., 1994; Guimarães, Moura, 2001) baseados em estudos moleculares, bioquímicos e farmacológicos. Um quarto subtipo de receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico foi clonado em ratos. Este receptor apresentou uma alta similaridade na seqüência molecular com o clone do subtipo  $\alpha_{2A}$  em humanos, no entanto, demonstrou diferença na afinidade farmacológica, sendo assim, este receptor foi classificado como um novo subtipo de receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico, o  $\alpha_{2D}$  (Lanier et al., 1991). Porém, atualmente acredita-se que os subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_{2D}$  e  $\alpha_{2A}$  sejam variações entre diferentes espécies do mesmo receptor, ou seja, o subtipo  $\alpha_{2A}$  está presente em humanos enquanto o subtipo  $\alpha_{2D}$  está presente em ratos (Docherty 1998; Calzada, de Artiñano, 2001; Guimarães, Moura 2001).

Os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos foram inicialmente caracterizados como receptores pré-sinápticos, sendo responsáveis pela inibição da liberação de noradrenalina (Starke et al., 1974, 1975; Langer 1974). Posteriormente, também foi demonstrada a presença destes receptores em localização pós-sináptica desempenhando diversas funções em vários órgãos (Berthelsen, Pettinger, 1977), incluindo os vasos sanguíneos, onde estão presentes tanto nas células endoteliais como em células de músculo liso vascular.

#### *1.2.2.1. Receptor $\alpha_2$ -adrenérgico em vasos sanguíneos*

No sistema vascular, os receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  coexistem e, embora o receptor  $\alpha_1$  seja o receptor adrenérgico predominante responsável pela vasoconstrição, o receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico também pode induzir contração das células de músculo liso vascular (Digges, Summers, 1983; Macia et al., 1984; Polônia et al., 1985; Törnebrandt et al., 1985; Shi et al., 1989; MacLean et al., 1993; Russel, Watts, 2000; Jarajapu et al., 2001). No entanto, ainda não está claro qual, ou quais, subtipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos estão envolvidos nesta vasoconstrição.

Diversos trabalhos demonstram o importante papel funcional do subtipo  $\alpha_{2A}$  na vasoconstrição induzida por agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos em diferentes territórios vasculares como a veia femoral (Paiva et al., 1999) e as vênulas e arteríolas do músculo cremaster de ratos (Leech, Faber, 1996), bem como a veia safena de cães (MacLennan et al., 1997).

Adicionalmente, Duka e colaboradores (2000) utilizando camundongos nocautes para os subtipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2C}$ ) e seus

respectivos WT, observaram que após o bloqueio dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos com prazosin, a administração de noradrenalina intravenosa promovia um aumento da pressão nos animais WT e nocautes para os subtipos  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2C}$ ; entretanto, os camundongos nocautes para o subtipo  $\alpha_{2A}$  não apresentaram esta resposta pressora. Logo, estes resultados sugerem que o subtipo  $\alpha_{2A}$  é o principal subtipo de receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico responsável por promover a vasoconstrição em camundongos, e conseqüentemente, induzir a resposta pressora à noradrenalina, após o bloqueio dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.

No entanto, além do  $\alpha_{2A}$ , outros subtipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos podem estar presentes na célula de músculo liso vascular auxiliando a resposta vasoconstritora mediada por esta via. Neste sentido, na artéria carótida externa de cães, os agonistas  $\alpha_2$  induzem uma vasoconstrição através de ambos os subtipos  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$  (Willems et al., 2001), e, na veia safena de humanos sugere-se que a contração via  $\alpha_2$  seja mediada pelo subtipo  $\alpha_{2C}$  (Gavin et al., 1997; Rizzo et al., 2001).

Além dos subtipos de receptores adrenérgico  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ , estudos utilizando camundongos nocautes para o subtipo de receptor  $\alpha_{2B}$ -adrenérgico demonstraram que este subtipo é o principal responsável pela fase hipertensiva após administração de agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico, sugerindo um possível papel dos receptores  $\alpha_{2B}$ -adrenérgicos também mediando a vasoconstrição (Link et al., 1996; Paris et al., 2003).

Em conclusão, atualmente acredita-se que a estimulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos nos vasos sangüíneos pode induzir contração, no entanto, o principal subtipo envolvido nesta resposta contrátil ainda não é consenso.



O exato mecanismo pelo qual estes receptores medeiam a contração vascular ainda não está totalmente esclarecido. Classicamente todos os subtipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos estão acoplados à via proteína  $G_i$ / adenilato ciclase/ AMPc (Cotecchia et al., 1990; Wise et al., 1997; Limbird et al., 1998). Porém, esta via intracelular é complexa e ainda está em debate se esta via poderia ser a responsável pela vasoconstrição observada em alguns leitos após ativação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos pós-sinápticos. Neste sentido, Parkinson e Hughes (1995) observaram que em vasos de resistência subcutâneos de humanos a contração induzida por agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos levava a um influxo de cálcio, provavelmente através de canais para cálcio voltagem dependente, e este mecanismo estava relacionado com a ativação da proteína  $G_i$ . No entanto, o fidedigno mecanismo de ação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos na musculatura lisa vascular ainda não está totalmente esclarecido.

Os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, além de estarem presentes nas células de músculo liso vascular, são encontrados nas células endoteliais. As células endoteliais possuem um importante papel na função do sistema vascular. Estas células são capazes de controlar o tônus da célula de músculo liso vascular através da liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio como o óxido nítrico (NO) (Furchgott, Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1987); a prostaciclina ( $PGI_2$ ) (Moncada et al., 1977); e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Taylor, Weston, 1988; Félétou, Vanhoutte, 1988), e através da liberação de fatores contráteis derivados do endotélio como a angiotensina II (Kifor, Dzau, 1987); o ânion superóxido (Furchgott, 1983; Rubanyi, Vanhoutte, 1986); a entotelina-1 (ET-1) (Yanagisawa et al., 1988); e os produtos do metabolismo do ácido araquidônico

como o tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) e as prostaglandinas  $H_2$  e  $PGF_{2\alpha}$  (Frolich, Forstermann, 1989; Vanhoutte, 1993).

Em artérias e veias isoladas pré-contraídas com prostaglandina  $F_{2\alpha}$  e incubadas com antagonistas  $\alpha_1$ - e  $\beta$ -adrenérgicos, os agonistas dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos promoveram um relaxamento dependente do endotélio. Este relaxamento foi bloqueado por antagonistas seletivos dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos e pela remoção do endotélio (Miller, Vanhoutte, 1985). Além disso, outros trabalhos descritos na literatura também demonstram a funcionalidade dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos nas células endoteliais mediando a liberação de fatores de relaxamento (Matsuda et al., 1985; Flavahan et al., 1989; MacLean et al., 1993; Bockman et al., 1996; Bryan et al., 1996; Zschauer et al., 1997; Nishina et al., 1999; Atalik et al., 2000; Figueroa et al., 2001; Shafaroudi et al., 2005).

A maioria dos autores sugere que a ativação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos nas células endoteliais induza a estimulação da sintase de óxido nítrico (NOS) e, conseqüentemente, a liberação de NO, um potente vasodilatador, uma vez que este relaxamento era reduzido ou abolido por inibidores da síntese do óxido nítrico (Bockman et al., 1996; Bryan et al., 1996; Nishina et al., 1999; Figueroa et al., 2001; Shafaroudi et al., 2005; Molin, Bendhack, 2005). Além do NO, a estimulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos presentes nas células endoteliais pode levar à liberação de prostanóides vasodilatadores derivados da ciclooxigenase (Zschauer et al., 1997) e de EDHF (Thorin et al., 1998; Véquaud, Thotin, 2001) os quais auxiliam a resposta vasodilatadora via receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico. No entanto, o mecanismo pelo qual a ativação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos presentes nas células endoteliais induz a liberação de destes fatores de relaxamento ainda não está claro. Até o momento sabe-se que os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos estão acoplados a proteína  $G_i$  (Liao,

Homey, 1993; Véquaud, Thorin, 2001) e, nas células endoteliais, acredita-se que tanto a subunidade  $G_{\alpha_i}$  quanto a subunidade  $G_{\beta\gamma}$  estejam envolvidos na liberação de fatores de relaxamento (Véquaud, Thorin, 2001).

De acordo com os resultados descritos acima, acredita-se que a estimulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos nas células endoteliais leva a uma vasodilatação, entretanto pouco se sabe sobre qual o subtipo de receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico é responsável por esta ação. Estudos realizados no leito vascular mesentérico e na artéria mesentérica superior de ratos demonstraram o importante papel do subtipo  $\alpha_{2A}$  na vasodilatação induzida pela liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio (Bockman et al., 1996; Figueroa et al., 2001). Posteriormente pesquisas utilizando camundongos nocautes para o subtipo de receptor  $\alpha_{2A}$ -adrenérgico confirmam a importante função deste subtipo mediando o relaxamento dependente do endotélio na aorta (Safaroudi et al., 2005).

Por fim, atualmente acredita-se que a resposta dos vasos sanguíneos à estimulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos depende do balanço entre vasoconstrição induzida pela ação direta do agonista no receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico na célula de músculo liso vascular e a liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio induzida pela estimulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos nas células endoteliais.

### *1.2.2.2. Receptor $\alpha_2$ -adrenérgico na regulação do sistema nervoso simpático*

Adicionalmente a função vascular, os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, tanto em localização pós-sináptica quanto em localização pré-sináptica, possuem um papel de destaque na regulação do sistema nervoso simpático.

No sistema nervoso central, os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos estão presentes no bulbo rostro-ventro-lateral em localização pós-sináptica e, quando estimulados, promovem uma diminuição do tônus simpático o qual, por consequência, induz bradicardia e hipotensão (Kobinger, Pichler 1976; Timmermans et al., 1981; van Zwieten et al., 1982; Ruffolo et al., 1993). Posteriormente, com o avanço das pesquisas utilizando camundongos geneticamente modificados pôde-se demonstrar que o efeito simpato-inibitório central dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos é mediado pelo subtipo  $\alpha_{2A}$  (MacMillan et al., 1996; Altman et al., 1999; Makaritsis et al., 1999). Assim, acredita-se que, no bulbo rostro-ventro-lateral, os receptores  $\alpha_{2A}$ -adrenérgicos são pós-sinápticos e regulam o tônus simpático e, quando estimulados promovem uma queda da descarga simpática.

Os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos não só modulam a atividade simpática centralmente, assim como estes receptores também estão localizados nos terminais pré-sinápticos nervosos e regulam a liberação do neurotransmissor, no caso a noradrenalina (Langer et al., 1985; Illes, Norenberg 1987; Ruffolo et al., 1993). Sendo assim, os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, quando ativados, além de inibirem o tônus simpático no bulbo rostro-ventro-lateral via o receptor  $\alpha_{2A}$ , inibem a liberação da noradrenalina pelo terminal nervoso simpático em que se encontram e por isso são comumente denominados “auto-receptores” (Westfall T, Westfall D, 2006) .

O mecanismo pelo qual a estimulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos promovem uma inibição da liberação de noradrenalina ocorre através da proteína  $G_i$  e, neste caso, a sinalização intracelular ocorre tanto através da subunidade  $G_{\alpha_i}$  quanto através da subunidade  $G_{\beta\gamma}$ . A ativação da subunidade  $G_{\alpha_i}$  pelos receptores  $\alpha_2$  leva à inibição da atividade da adenilato ciclase com conseqüente redução dos níveis intracelulares de AMPc (Cotecchia et al., 1990; Wise et al., 1997; Hein, 2006), e a ativação da subunidade  $G_{\beta\gamma}$  inibem os canais para  $Ca^{2+}$  voltagem dependentes e ativam canais para  $K^+$  no terminal nervoso simpático (Cotecchia et al., 1990; Surprenant et al., 1992; Hein, 2006). Os receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  também podem estar acoplados a outras vias intracelulares as quais promovem aceleração da atividade do trocador  $Na^+/H^+$  (Limbird, 1988; Cotecchia et al., 1990). Assim, estes receptores quando ativados diminuem a concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular e promovem hiperpolarização do terminal nervoso simpático. Sabendo que o íon  $Ca^{2+}$  é importante para que ocorra a exocitose das vesículas contendo neurotransmissores, uma redução na concentração deste íon reduz a exocitose das vesículas, e conseqüentemente, reduz a liberação de neurotransmissores nos terminais nervosos pré-sinápticos.

Experimentos em órgãos e vasos sanguíneos isolados demonstraram que o subtipo de receptor adrenérgico  $\alpha_{2A}$  é o subtipo de receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico mais importante na regulação pré-sináptica da liberação de noradrenalina nos terminais nervosos simpáticos (Molderings, Gothert, 1995; Smith et al., 1995; Paiva et al., 1997; Trendelenburg et al., 1997). Entretanto, alguns estudos sugerem que em certos tecidos o subtipo  $\alpha_{2C}$  e possivelmente o  $\alpha_{2B}$  também podem contribuir para o controle pré-sináptico da liberação de noradrenérgica nos terminais nervosos

simpáticos (Rump et al., 1995; Docherty, 1998; Ho et al., 1998; Guimarães, Moura, 2001).

Estudos utilizando camundongos nocautes para os subtipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos confirmam a tese de que o subtipo  $\alpha_{2A}$  é o principal subtipo responsável pela auto-inibição pré-sináptica, apesar de outros subtipos também estarem envolvidos. Hein e colaboradores (1999) avaliaram o papel dos três subtipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos na inibição pré-sináptica da liberação de noradrenalina utilizando camundongos nocautes para os subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ , assim como camundongos duplos nocautes para os subtipos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ . Neste trabalho, a inibição da liberação de noradrenalina induzida pelo UK-14304, um agonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, foi avaliada no tecido atrial cardíaco e no córtex cerebral dos animais nocautes e seus respectivos controles (*wild-type*, WT). Os autores observaram que tanto no átrio como no córtex cerebral, o animal WT apresentou uma inibição da liberação de noradrenalina na dependência da concentração do agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico, e o mesmo padrão de resposta foi observado nos animais nocautes para os receptores  $\alpha_{2B}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos. Entretanto, tanto no átrio como no córtex cerebral dos camundongos nocautes para o receptor adrenérgico  $\alpha_{2A}$ , o efeito inibitório da liberação de noradrenalina foi reduzido quando comparado aos demais grupos acima citados, o que indicava que o subtipo  $\alpha_{2A}$  é o principal subtipo responsável pela liberação de noradrenalina. Contudo, nos camundongos duplos nocautes para os subtipos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  a resposta inibitória da liberação de noradrenalina induzida pelo agonista  $\alpha_2$  foi completamente abolida, acreditando-se que o subtipo  $\alpha_{2C}$ , assim como o subtipo  $\alpha_{2A}$ , também esteja envolvido na regulação da liberação de noradrenalina.

Um achado inédito e importante do trabalho de Hein e colaboradores (1999) é o de que os camundongos duplos nocautes para os subtipos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  apresentaram um aumento da concentração de noradrenalina no plasma quando comparado com o WT, assim como com os outros nocautes estudados (Hein et al., 1999). Dessa forma, há fortes indícios funcionais demonstrando que o grau de ativação dos receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ - pré-sinápticos regulam a liberação de noradrenalina. Corroborando os resultados descritos por Hein e colaboradores (1999), outros trabalhos na literatura utilizando camundongos nocautes para os subtipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos também descrevem o importante papel dos subtipos  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$  como receptores pré-sinápticos inibitórios (Altman et al., 1999; Trendelenburg et al., 2001; Brede et al., 2003).

A liberação de neurotransmissores simpáticos também ocorre na medula adrenal. A medula adrenal secreta principalmente adrenalina e, em menor proporção, noradrenalina pelas células cromafins. Entretanto, enquanto a secreção de catecolaminas pelos terminais nervosos simpáticos é mediada principalmente pelo subtipo de receptor adrenérgico  $\alpha_{2A}$  e, em menor grau, pelo subtipo  $\alpha_{2C}$ , na medula adrenal a secreção de catecolaminas é regulada predominantemente pelo subtipo de receptor adrenérgico  $\alpha_{2C}$  (Brede et al., 2003; Moura et al., 2006) e, em menor proporção, pelos subtipos  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2B}$ -adrenérgicos (Moura et al., 2006).

Apesar de ambos os subtipos de receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos atuarem como auto-receptores inibindo a liberação de catecolaminas, existem diferenças funcionais entre eles. Acredita-se que a noradrenalina possui maior afinidade pelo subtipo de receptor adrenérgico  $\alpha_{2C}$  do que pelo subtipo  $\alpha_{2A}$  (Link et al., 1992; Hein et al., 1999). Além disso, Hein e colaboradores (1999) demonstraram que o subtipo de receptor adrenérgico  $\alpha_{2C}$  inibe a liberação de noradrenalina em baixas

freqüências de atividade do sistema nervoso simpático, ou seja, medeia a inibição pré-sináptica em baixas concentrações de noradrenalina, porém o subtipo  $\alpha_{2A}$  é requerido para o controle da liberação de neurotransmissor sobre altas freqüências do tônus simpático e, conseqüentemente, medeia a inibição pré-sináptica em altas concentrações de noradrenalina. Sendo assim, atualmente acredita-se que estes dois subtipos de receptores adrenérgicos,  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ , são os subtipos mais importantes para a regulação da liberação de noradrenalina nos terminais nervosos simpáticos; enquanto que no bulbo rostro-ventro-lateral, o subtipo  $\alpha_{2A}$  é o principal subtipo responsável por induzir uma diminuição do tônus simpático.

De maneira geral pode-se concluir que os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos são importantes reguladores do sistema cardiovascular, pois, estes receptores estão presentes tanto no músculo liso vascular quanto na célula endotelial controlando o tônus vascular. Além disso, os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos atuam modulando o tônus simpático e a liberação de catecolaminas, e como o sistema nervoso simpático está constantemente modulando o sistema cardiovascular, uma alteração nos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos pode levar a sérios danos tanto no coração quanto no sistema vascular.

### *1.3. Atividade simpática e patologias do sistema cardiovascular*

As funções cardiovasculares são fortemente mediadas pela modulação central do tráfico eferente simpático. A exposição aguda do coração ao aumento da atividade do sistema nervoso simpático em resposta a uma variedade de estímulos, como a redução da volemia, parece ser benéfica pois, no coração, o aumento da



atividade simpática aumenta a frequência cardíaca, a contratilidade e a velocidade de relaxamento do miocárdio, aumentando o volume diastólico final e o débito cardíaco. Além disso, a atividade simpática aumenta a resistência vascular periférica, aumentando a pressão arterial e mantendo a perfusão tecidual; nas veias promove venoconstrição induzindo um aumento do retorno venoso e; ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona com o objetivo de aumentar a volemia. Todas estas modificações, em um curto período de tempo, ajustam o sistema circulatório a esta nova situação, contribuindo para a manutenção do débito cardíaco e fluxo sanguíneo (Boulpaep, 2003).

No entanto, exposições crônicas do tecido cardíaco aos níveis elevados de catecolaminas liberadas pelos terminais nervosos simpáticos e pela glândula adrenal, levam a danos no tecido miocárdico, como observado na hipertensão essencial, na hipertrofia cardíaca e na insuficiência cardíaca, que é o quadro clínico final destas doenças se não tratadas precocemente (Bristow, 2000; Brook, Julius, 2000; Esler, Kaye 2000). Estes danos resultarão em uma elevação contínua do tônus simpático com progressiva deterioração da função cardíaca, o que gera uma retro-alimentação positiva, a qual levará a uma piora do quadro patológico (Bristow, 1984; Packer, 1992; Colucci, 1998; Bond, 2001).

Além do mais, sabe-se que o aumento crônico da atividade simpática aumenta os níveis circulantes e teciduais de catecolaminas, que modificarão a resposta de contração e relaxamento do músculo liso vascular. Estas modificações no tônus vascular estarão envolvidas com respostas vasculares anormais e com o desenvolvimento de disfunções endoteliais presentes na hipertensão arterial, no infarto do miocárdio, na hipertrofia cardíaca e sua progressão para insuficiência cardíaca (Esler, Kate, 2000). De uma forma geral, essas respostas vasculares

anormais levam a uma vasoconstrição potencializada e conseqüente aumento da resistência vascular periférica, o que contribuirá para a manutenção e a progressão destas patologias.

Dentre as várias alterações funcionais vasculares que podem contribuir para o aumento da resistência vascular periférica na insuficiência cardíaca severa, pode-se citar a disfunção endotelial, a qual está presente tanto em pacientes com insuficiência cardíaca (Kubo et al., 1991; Drexler et al., 1992; Katz et al., 1992, 1993; Bank et al., 1994) quanto em modelos animais de insuficiência cardíaca (Kaiser et al., 1989; Teerlink et al., 1993; Bauersachs et al., 1999). Assim, tanto a redução da liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio (óxido nítrico, NO; prostaciclina, PGI<sub>2</sub>; fator hiperpolarizante derivado do endotélio, EDHF) e/ou aumento da liberação de fatores contráteis derivados do endotélio (endotelina; tromboxano, TXA<sub>2</sub>; espécies reativas do oxigênio, angiotensina II) podem contribuir para o aumento da resistência vascular periférica (Vanhoutte, 1996). Além disso, na insuficiência cardíaca, há um aumento da produção de ânion superóxido, o qual, além de promover diretamente vasoconstrição, pode degradar o NO reduzindo a ação de um potente vasodilatador e, desse modo, contribuindo para a vasoconstrição observada na insuficiência cardíaca (Belch et al., 1991; Bauersachs et al., 1999; Miller et al., 2000; Landmesser et al., 2002). Adicionalmente, o TNF-alfa e outras citocinas pró-inflamatórias encontram-se elevadas no plasma de pacientes com insuficiência cardíaca (Aukrust et al., 1998; Deswal et al., 2001). Estas citocinas, por sua vez, podem atuar no endotélio diminuindo a expressão da sintase endotelial de óxido nítrico (eNOS) (Yoshizumi et al., 1993).

Outra doença cardiovascular que também apresenta um aumento da atividade simpática é a hipertensão essencial. Estudos em modelos experimentais

de hipertensão e em pacientes hipertensos têm sugerido que o aumento da atividade simpática pode ter importância na patogênese da hipertensão arterial, principalmente a de origem genética ou essencial. Nestes trabalhos, foi demonstrado um aumento dos níveis de catecolaminas circulantes na hipertensão essencial em animais experimentais e em humanos (Goldstein, 1983; Westfall, Meldrum, 1985). Classicamente, a hipertensão essencial é caracterizada por um aumento da resistência periférica total (Folkow, 1982) e, assim, dentre os fatores que podem estar contribuindo para o aumento da resistência vascular periférica e para a gênese e manutenção do quadro hipertensivo pode-se citar o aumento da atividade simpática.

Assim, sabendo-se que a atividade do sistema nervoso simpático está aumentada em diversos estados patológicos, é de importância fundamental estudar os efeitos gerados pelo aumento da descarga simpática no sistema cardiovascular. Porém, vale ressaltar que todas estas alterações vasculares, descritas até o momento, sempre foram avaliadas em vasos de animais submetidos a modelos de insuficiência cardíaca ou hipertensão arterial, ou seja, modelos experimentais com gênese multifatorial, o que torna muito complexo o entendimento da gênese da disfunção envolvida nos ajustes vasculares após um aumento crônico da estimulação primária do sistema nervoso simpático. Neste sentido, Hein e colaboradores (1999) descreveram na literatura um modelo genético de hiperatividade simpática: camundongos nocautes para os receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos (camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO).

#### *1.4. Deleção dos receptores $\alpha_{2A}$ - e $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos em camundongos como um novo modelo de hiperatividade simpática*

Hein e colaboradores (1999) descreveram um modelo genético de hiperatividade simpática. Esse modelo constitui-se na deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos em camundongos (camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO) (Hein et al., 1999). A deleção desses receptores leva a uma disfunção autonômica, uma vez que estes receptores regulam a atividade simpática através de diferentes mecanismos. Como já descrito anteriormente, no bulbo rostro-ventro-lateral, os receptores  $\alpha_{2A}$ -adrenérgicos são pós-sinápticos e regulam o tônus simpático. Quando ativados, estes receptores desencadeiam bradicardia e hipotensão (MacMillan et al., 1996; Tavares et al., 1996; Altman et al., 1999; Makaritsis et al., 1999). Em neurônios simpáticos periféricos ambos os receptores estão localizados no terminal pré-sináptico e regulam a liberação do neurotransmissor, no caso a noradrenalina (Altman et al., 1999; Hein et al., 1999; Trendelenburg et al., 2001; Brede et al., 2003). Sendo assim, estes subtipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, quando ativados, inibem a liberação da noradrenalina pelo terminal nervoso simpático em que se encontram.

Os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO apresentam níveis elevados de noradrenalina plasmática o que sugere que estes animais têm uma elevação crônica da atividade simpática (Hein et al., 1999). Este aumento do tônus simpático está presente nestes animais pois, na ausência destes subtipos, não ocorre a inibição pré-sináptica da liberação de noradrenalina, por exemplo, no coração e nos vasos sanguíneos. Além disso, observa-se um aumento da descarga simpática decorrente da ausência do subtipo  $\alpha_{2A}$  no bulbo rostro-ventro-lateral.

Brum e colaboradores (2002) demonstraram que estes animais, desde o primeiro mês de vida, apresentaram um aumento significativo da frequência cardíaca acompanhado, por sua vez, de um aumento da pressão arterial somente após o quarto mês de vida, mantendo-se a mesma elevada até o sexto mês. Além disso, enquanto os animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 1 mês de vida não apresentavam alteração na capacidade de realizar exercício um teste de esforço e no consumo máximo de oxigênio, os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 4 meses de vida apresentava uma redução na capacidade de realizar exercício e um decréscimo no consumo máximo de oxigênio quando comparado ao respectivo WT (Brum et al., 2002). Adicionalmente, aos 4 meses de idade os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO tinham um decréscimo da função cardíaca caracterizado por um decréscimo na contratilidade e na velocidade de relaxamento cardíaca em comparação ao animal WT (Brum et al., 2002). Não foram observadas diferenças significantes no peso cardíaco dos animais duplos nocautes aos 4 meses de idade quando comparado ao WT, porém, a microscopia eletrônica revelou evidência direta de lesão nos miócitos cardíacos e hipertrofia dos miócitos remanescentes nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO (Brum et al., 2002).

Assim como observado aos 4 meses de idade, aos 6 meses de idade os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO apresentaram uma capacidade de realizar exercício reduzida e decréscimo no consumo máximo de oxigênio quando comparado ao respectivo WT (Brum et al., 2002). Além disso, enquanto os animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 1 mês de vida não apresentaram alteração na fração de encurtamento e do diâmetro sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo, os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 6 meses de idade apresentaram uma redução da fração de encurtamento e um aumento do diâmetro sistólico e diastólico final do ventrículo

esquerdo em relação ao respectivo WT, parâmetros esses avaliados através da realização de ecocardiogramas (Brum et al., 2002).

Recentemente o grupo de Brum demonstrou que, aos 5 e 7 meses de idade, os animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO apresentaram um aumento da frequência cardíaca e um aumento do tônus simpático basal (Rolim et al., 2007), assim como previamente demonstrado para os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 4 meses de idade. Além disso, também foi observada uma redução da fração de encurtamento no coração dos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 5 e 7 meses de idade, o que indica que estes animais, assim como observado aos 6 meses de idade, apresentam um prejuízo da função sistólica (Rolim et al., 2007). Além da função contrátil, a estrutura dos miócitos cardíacos nos animais duplos nocautes aos 5 e 7 meses de idade estava alterada. Estes animais apresentaram um aumento do diâmetro de secção transversa dos miócitos cardíacos e, apesar dos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 4 meses de idade não apresentarem fibrose ventricular (Brum et al., 2002), aos 5 e 7 meses de idade os animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO apresentaram um aumento da fibrose ventricular quando comparado aos respectivos controles (Rolim et al., 2007).

Logo, os resultados descritos pelo grupo de Brum (Brum et al., 2002; Rolim et al., 2007) e por Hein e colaboradores (1999) evidenciam que estes animais apresentam uma elevação da atividade do sistema nervoso simpático a qual pode conduzir diretamente a mudanças patológicas no coração na dependência do tempo de exposição do coração às catecolaminas.

Portanto, os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO constituem-se no primeiro modelo experimental descrito na literatura que desenvolve cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática *per se*. Dessa maneira, este modelo também é um potencial

modelo experimental para estudar os ajustes vasculares durante a hiperestimulação simpática a longo prazo.

Assim, no presente projeto de pesquisa pretende-se estudar se a hiperatividade do sistema nervoso simpático em camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO além de promover uma cardiomiopatia, induz modificações de ordem temporal sobre a função vascular. Além do mais, buscou-se avaliar quais os mecanismos envolvidos nestas modificações. Para tal, foram utilizados camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO em três estágios de vida: aos 3, 5 e 7 meses de idade.

Com os resultados obtidos neste estudo pretende-se esclarecer as alterações vasculares envolvidas na hiperestimulação adrenérgica com a finalidade de futuramente podermos buscar novas e precisas intervenções sobre o sistema vascular de pacientes que apresentam um aumento da atividade nervosa simpática decorrente de algumas patologias como a insuficiência cardíaca. O que poderá levar a um retardo nos quadros de insuficiência do sistema cardiovascular, e melhorar assim a qualidade de vida dos pacientes, o que conseqüentemente reduz o número de internações e óbitos por estas enfermidades.

# Objetivos



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. *Objetivo geral*

Estudar as alterações temporais da função vascular em aortas de camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de vida, bem como estudar a função vascular no leito vascular mesentérico de camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de vida.

### 2.2. *Objetivos específicos*

2.2.1. Estudar em anéis de aorta de camundongos controle e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de vida, se a hiperestimulação crônica do sistema nervoso simpático presente nestes animais:

2.2.1.1. altera as vias de contração e de relaxamento;

2.2.1.2. modifica a função endotelial e;

2.2.1.3. altera as vias de mobilização de cálcio.

2.2.2. Estudar no leito vascular mesentérico de camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de vida, se a hiperestimulação crônica do sistema nervoso simpático presente nestes animais:

2.2.2.1. altera as vias de contração e de relaxamento.

# **Material e Métodos**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção dos animais experimentais

Neste estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57BL6/J, selvagens (wild-type, WT) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos ( $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO), com 3, 5 e 7 meses de vida, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Os animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO foram obtidos a partir da linhagem C57BL6/J desenvolvidos na *Stanford University*, e mantidos no biotério da Faculdade de Medicina da USP e na Escola de Educação Física e Esportes da USP. Após o desmame, os animais foram alocados no biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Estes animais foram mantidos em gaiolas sob condições controle de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à ração e água até que atingissem a idade necessária para a realização dos experimentos.

Os presentes protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (Protocolo registrado sob n<sup>o</sup> 079 nas fls. 19 do livro 2).

#### 3.2. Determinação da pressão arterial e frequência cardíaca

Com a finalidade de avaliar os níveis pressóricos nos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade, os valores de pressão arterial sistólica foram determinados, na semana anterior ao sacrifício destes animais. A pressão arterial sistólica foi determinada, de maneira indireta, através do método de pletismografia de cauda. Para tal, os animais foram mantidos em uma contenção e

submetidos a um prévio aquecimento da cauda com uma lâmpada para provocar vasodilatação da artéria caudal. Em seguida, um manguito de borracha foi colocado na porção proximal da cauda e insuflado até 200-250 mmHg, na seqüência o mesmo foi desinsuflado gradualmente. Na cauda destes animais também foi fixado um transdutor de pulso de pressão (Kent Scientific Corporation, Conecticute, Estados Unidos da América) para detecção dos sinais da onda pressórica os quais foram enviados para um amplificador (General Purpose Amplifier Stoelting CD, Illinois, Estados Unidos da América) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (DI-720 séries Windaq, Data Q Instruments, Ohio, Estados Unidos da América). A pressão caudal corresponde à pressão do manguito em que o pulso pressórico desaparece ou reaparece, ou seja, ao maior valor de pressão intra-arterial que se contrapõe à pressão do manguito conseguindo desobstruir parcialmente a artéria, permitindo a passagem de sangue e o aparecimento do pulso pressórico. O valor de pressão representa a somatória de seis medidas de pressão em cada animal.

Através do cálculo entre o número de pulsos pressóricos detectados durante 1 minuto, também foi possível determinar neste sistema a frequência cardíaca destes animais.

Vale ressaltar que, antes da medida definitiva da pressão arterial e frequência cardíaca os animais foram adaptados ao sistema de medida da pressão por três vezes, uma vez por dia durante três dias anteriores à medida definitiva. Esta adaptação é de fundamental importância para minimizar o estresse pelo qual o animal é submetido.

Assim, foi possível determinar os efeitos da hiperatividade simpática nas alterações hemodinâmicas nos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO.

No fim deste protocolo, após 3, 5 ou 7 meses de vida os animais foram pesados e mortos por deslocamento cervical, um método rápido. Em seguida, foi realizada a coleta dos órgãos (coração, pulmão e fígado) para posteriores análises. Além disso, a aorta torácica foi removida e isolada em uma solução nutritora para a realização dos experimentos de reatividade vascular. Adicionalmente, alguns animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO foram anestesiados, após 7 meses de vida, e o leito vascular mesentérico foi cateterizado, removido e perfundido com uma solução nutritora para avaliação da reatividade vascular.

### *3.3. Avaliação do índice de hipertrofia cardíaca*

Foi avaliada a hipertrofia cardíaca nos animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade com o objetivo de avaliar os efeitos da hiperatividade simpática no coração. Para tal, foram calculados os índices de hipertrofia dos ventrículos direito e esquerdo os quais foram inferidos a partir da razão entre os pesos dos ventrículos direito (VD) ou esquerdo (VE) sobre o peso corporal.

Para tal, após a retirada do coração da cavidade torácica, o mesmo foi lavado em uma solução contendo cloreto de cádmio (100 mM) para que esse cessasse os batimentos cardíacos na fase de diástole do ciclo cardíaco. Em seguida, os átrios foram separados dos ventrículos; e o ventrículo direito (VD) foi separado do ventrículo esquerdo (VE) e do septo interventricular. Os ventrículos foram pesados na balança analítica (BEL Equipamentos Analíticos Ltda, São Paulo, Brasil) para calcular o índice de hipertrofia cardíaca (peso do ventrículo/peso corporal). Cabe ressaltar que, o valor do peso do septo interventricular foi adicionado aos valores do VE.

### *3.4. Avaliação da congestão pulmonar e da congestão hepática*

Uma das características clínicas que marca a insuficiência cardíaca congestiva é a retenção de líquidos no pulmão e no fígado (Givertz et al., 2005). Assim, neste projeto, a presença de congestão pulmonar e hepática foi inferida pela razão entre peso úmido e peso seco destes órgãos. Este índice também foi avaliado pela razão entre peso úmido e peso corporal.

Após a morte dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade, o pulmão e o fígado foram coletados, lavados em salina e pesados na balança analítica (BEL Equipamentos Analíticos Ltda, São Paulo, Brasil), este valor corresponde ao peso úmido do órgão e, em seguida, colocados em uma estufa a 50°C por 24 horas (modelo EL 1,0, Marte, São Paulo, Brasil). Seguida as 24 horas, estes órgãos foram novamente pesados para obtenção do peso seco. De posse destes valores foi possível calcular as razões peso úmido/ peso corporal e peso úmido/ peso seco do pulmão e do fígado as quais representam um índice de congestão pulmonar e hepática, respectivamente.

### *3.5. Reatividade vascular em anéis de aorta de camundongos*

As aortas dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade foram divididas em segmentos cilíndricos (3-4 mm), livres dos tecidos conectivo e adiposo. Em algumas aortas, a camada endotelial foi removida mecanicamente através do uso de fios metálicos. Para obtenção do registro de tensão isométrica, cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 mL de solução de Krebs-Henseleit, cuja composição (em mM) é: NaCl 115; KCl 4,6; CaCl<sub>2</sub> 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2;

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25; Glicose 11,1; Na<sub>2</sub>EDTA 0,01. Esta solução foi aquecida a 37°C e continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois arames metálicos foram passados através do lúmen dos segmentos. Um fio metálico foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica (Letica TRI 210, Barcelona, Espanha). A tensão isométrica foi registrada através de um transdutor de força, conectado a um sistema de aquisição de dados (Soft & Solutions, São Paulo, Brasil) e este, a um computador (Pentium IV). Os anéis de aorta torácica dos camundongos foram submetidos a uma tensão de repouso de 500 mg, reajustadas quando necessário, durante o período de estabilização de 1 hora.

### *3.5.1. Protocolos experimentais de reatividade vascular na aorta de camundongos*

- ✓ Avaliação da resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl)

Após 1 hora de estabilização, foi administrado KCl 125 mM em todos os anéis de aorta estudados e então aguardados aproximadamente 40 minutos até que fosse atingido uma estabilização da resposta contrátil. A resposta máxima induzida pelo KCl foi considerada 100% da resposta contrátil do anel vascular.

- ✓ Avaliação da resposta de relaxamento à acetilcolina, ao nitroprussiato de sódio, ao isoproterenol e à clonidina

Depois da avaliação da resposta contrátil ao KCl 125 mM, os anéis foram lavados com solução de Krebs-Heinseleit durante 3 vezes e em seguida uma estabilização de 30 minutos foi aguardada. Após essa, os anéis de aorta com

endotélio foram pré-contraídos com uma concentração submáxima de fenilefrina (aproximadamente 50% da resposta máxima de contração ao KCl 125 mM). Após a obtenção de um platô, foram realizadas curvas concentração-resposta, cumulativas, ao agonista muscarínico acetilcolina ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M), para avaliar o relaxamento dependente do endotélio; ou ao nitroprussiato de sódio ( $10^{-12}$  a  $3 \times 10^{-6}$  M), para avaliar o relaxamento independente do endotélio; ou ainda ao isoproterenol ( $10^{-12}$  a  $3 \times 10^{-6}$  M), para avaliar o relaxamento induzido pela ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgica. Estas respostas de relaxamento foram observadas nas aortas dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade. Além do mais, nos animais com 3 meses de idade também foi avaliado o relaxamento mediado pela clonidina ( $10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-5}$  M) nos anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, para avaliar o relaxamento induzido pela ativação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos.

✓ Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina e à serotonina

Em outro grupo de anéis de aorta com endotélio, 30 minutos após a avaliação da contração induzida pelo KCl 125mM, foram realizadas curvas concentração-resposta ao agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  M) ou à serotonina ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$ M), de maneira cumulativa. Este protocolo tem como objetivo avaliar dois agentes contráteis que induzem seus mecanismos usando as mesmas vias de sinalização intracelular, porém utilizando distintos receptores de membrana.

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta contrátil à fenilefrina, curvas concentração-resposta a este agonista também foi realizada em alguns anéis de aorta sem endotélio. Nestes casos, a ausência do endotélio foi confirmada a partir de uma resposta vasodilatadora à acetilcolina ( $10^{-5}$  M) inferior a 10 %.



✓ Análise do papel do cálcio intracelular e extracelular na resposta vasoconstritora à fenilefrina

A resposta contrátil à fenilefrina do músculo liso vascular mediada pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares foi avaliada através da contração induzida por este agonista em solução livre de cálcio. Já a resposta contrátil mediada pelo influxo de cálcio nas células musculares lisas das aortas, foi avaliada através da administração de  $\text{CaCl}_2$  em preparações previamente incubadas com solução livre de cálcio e na presença do agonista fenilefrina.

Nestes experimentos, 30 minutos após a avaliação da contração induzida pelo KCl (125 mM), as aortas foram incubadas durante 5 minutos com uma solução de Krebs-Henseleit livre de cálcio e contendo EGTA (1 mM), em seguida, foi adicionada fenilefrina ( $10^{-6}$  M) no banho. A adição de fenilefrina induz uma contração transiente e de pequena magnitude e, após retorno à tensão basal,  $\text{CaCl}_2$  (2,5 mM) foi adicionado no banho. O  $\text{CaCl}_2$  omitido na solução sem cálcio foi substituído por igual concentração de NaCl, para manter a osmolaridade.

### *3.6. Reatividade vascular no leito vascular mesentérico de camundongos*

Os camundongos foram anestesiados com injeção intra-peritoneal de tiopetal (40 mg/Kg) e heparinizados (500 UI, *i.p.*). Após a anestesia, a artéria mesentérica superior foi canulada usando um cateter (PE-50 afinado; preenchido com solução salina) com um auxílio de uma lupa (modelo SMZ 645, Nikon, New York, Estados Unidos da América). Após a canulação e fixação da cânula, o leito mesentérico foi isolado do corpo do animal, colocado em um banho de órgão (Soft & Solutions, São Paulo, Brasil) e perfundido com uma solução de Krebs-Henseleit (NaCl 115; KCl 4,6;

CaCl<sub>2</sub> 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25; Glicose 11,1; Na<sub>2</sub>EDTA 0,01; em mM) aquecida a 37°C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica e mantendo o pH estável em 7,4. O leito vascular mesentérico foi perfundido em um fluxo constante de 2 mL/min por meio de uma bomba peristáltica (modelo BP-200, Milan Equipamentos Científicos Ltda, Paraná, Brasil). A pressão de perfusão média do leito arterial mesentérico foi medida através de um transdutor de pressão (Deltran DPT-100, Utah Medical Products, Utah, Estados Unidos da América), conectado a um pré-amplificador (AECAD-0804, Solução Integrada, São Paulo, Brasil), situado entre a bomba peristáltica e a cânula arterial. Este pré-amplificador, por sua vez, foi conectado a um sistema de aquisição de dados digital (DI-194RS Windaq, Data Q Instruments, Ohio, Estados Unidos da América), o que possibilitou a obtenção de registros continuamente.

Imediatamente após a canulação e perfusão do leito mesentérico, as alças intestinais foram separadas do leito vascular mesentérico evitando-se o estiramento excessivo para não causar danos nas células endoteliais.

Como o fluxo foi mantido constante durante toda a preparação, mudanças na pressão de perfusão média representam mudança na resistência vascular.

Após a canulação, a preparação foi mantida por um período de estabilização de 1 hora e em seguida foram iniciados os protocolos experimentais.

### *3.6.1. Protocolos experimentais de reatividade vascular no leito vascular mesentérico de camundongos*

#### ✓ Avaliação da resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl)

Após 1 hora de estabilização, uma solução KCl 125 mM foi perfundida no leito vascular mesentérico até atingir uma estabilização da resposta contrátil, aproximadamente 7 minutos. Após a obtenção do platô, o leito vascular mesentérico era perfundido com solução de Krebs-Henseleit até que os valores de pressão retornassem aos valores basais (aproximadamente 30 mmHg) e então a preparação foi estabilizada por mais 30 minutos. Este protocolo experimental era realizado por mais 2 vezes até que a resposta máxima contrátil ao KCl 125 mM estabilizasse. Este protocolo foi realizado para aumentar a sensibilidade contrátil do leito vascular mesentérico. Vale ressaltar que na ausência desta sensibilização à resposta contrátil à noradrenalina era de pequena magnitude.

A maior resposta máxima induzida pelo KCl foi considerada 100% da resposta contrátil do leito vascular mesentérico.

#### ✓ Avaliação da resposta vasoconstritora à noradrenalina

Trinta minutos após a avaliação das contrações induzidas pelo KCl 125 mM e retorno aos valores basais de pressão de perfusão média, o leito vascular mesentérico foi perfundido com soluções crescentes de noradrenalina, de modo a formar uma curva concentração-resposta ( $3 \times 10^{-7}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M).

✓ Avaliação da resposta de relaxamento à acetilcolina

Trinta minutos após a avaliação da curva concentração-resposta à noradrenalina e retorno da pressão de perfusão média aos valores basais, foi avaliada a presença de endotélio através do relaxamento à acetilcolina ( $10^{-3}$  M). Para isso o leito vascular mesentérico foi pré-contraído, através da perfusão com uma solução de noradrenalina ( $3 \times 10^{-5}$  M) e, após a obtenção de um platô, uma solução de acetilcolina ( $10^{-3}$  M) foi perfundida neste leito.

### 3.7. Análise dos resultados

#### 3.7.1. Expressão dos dados

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  EPM.

Na aorta, os resultados das curvas concentração-resposta aos agentes vasodilatadores foram expressos como porcentagem de relaxamento à pré-contracção. Os resultados da contracção induzida pelo KCl 125 mM foram expressos como grama (g) de contracção. Os resultados das curvas concentração-resposta aos agonistas contráteis foram expressos como porcentagem da contracção induzida por 125 mM de KCl para cada anel.

No leito vascular mesentérico, os resultados do relaxamento à acetilcolina foram expressos como porcentagem de relaxamento à pré-contracção com noradrenalina ( $3 \times 10^{-5}$  M). Os resultados de contracção foram expressos como variação da pressão de perfusão média ( $\Delta$ PPM), obtidos pela subtração da respostam contrátil máxima pela pressão basal de perfusão. Os resultados da curva

concentração-resposta à noradrenalina obtidos como  $\Delta$ PPM foram expressos como porcentagem da contração induzida por 125 mM de KCl em cada leito vascular.

As curvas concentração-resposta aos diferentes agonistas tiveram calculados e expressos os valores de  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ), que representa o valor da concentração dos agentes que produziram 50% da resposta máxima, e de resposta máxima (Rmax). Para tal foram realizadas análises de regressão não-linear, obtidas através da análise das curvas concentração-resposta utilizando o programa GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA).

### *3.7.2. Análise estatística*

A análise estatística dos dados foi realizada por teste *t*- Student para dados não-pareados, ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, completamente randomizada, seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni, realizados a partir do programa GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

# Resultados

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Medida da pressão arterial e da frequência cardíaca em camundongos

#### WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade

Em todas as idades estudadas (3, 5 e 7 meses de idade) os valores de pressão arterial dos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO foram semelhantes aos valores aferidos nos respectivos WT (tabela 1). Porém, com 3 meses de idade, a frequência cardíaca encontra-se significativamente elevada nos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO quando comparada com o WT, e esta permaneceu elevada tanto aos 5 quanto aos 7 meses de idade quando comparada aos respectivos WT (tabela 1).

**Tabela 1:** Medida da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) nos animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 3, 5 e 7 meses de idade.

	WT		$\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO	
	PA (mmHg)	FC (bpm)	PA (mmHg)	FC (bpm)
3 meses	114 ± 5 (6)	544 ± 20 (6)	111 ± 7 (6)	631 ± 19* (6)
5 meses	108 ± 3 (6)	543 ± 21 (6)	109 ± 4 (6)	620 ± 26* (6)
7 meses	129 ± 5 (9)	524 ± 14 (9)	133 ± 7 (6)	620 ± 35* (6)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste *t*, \*P<0,05 vs. WT.

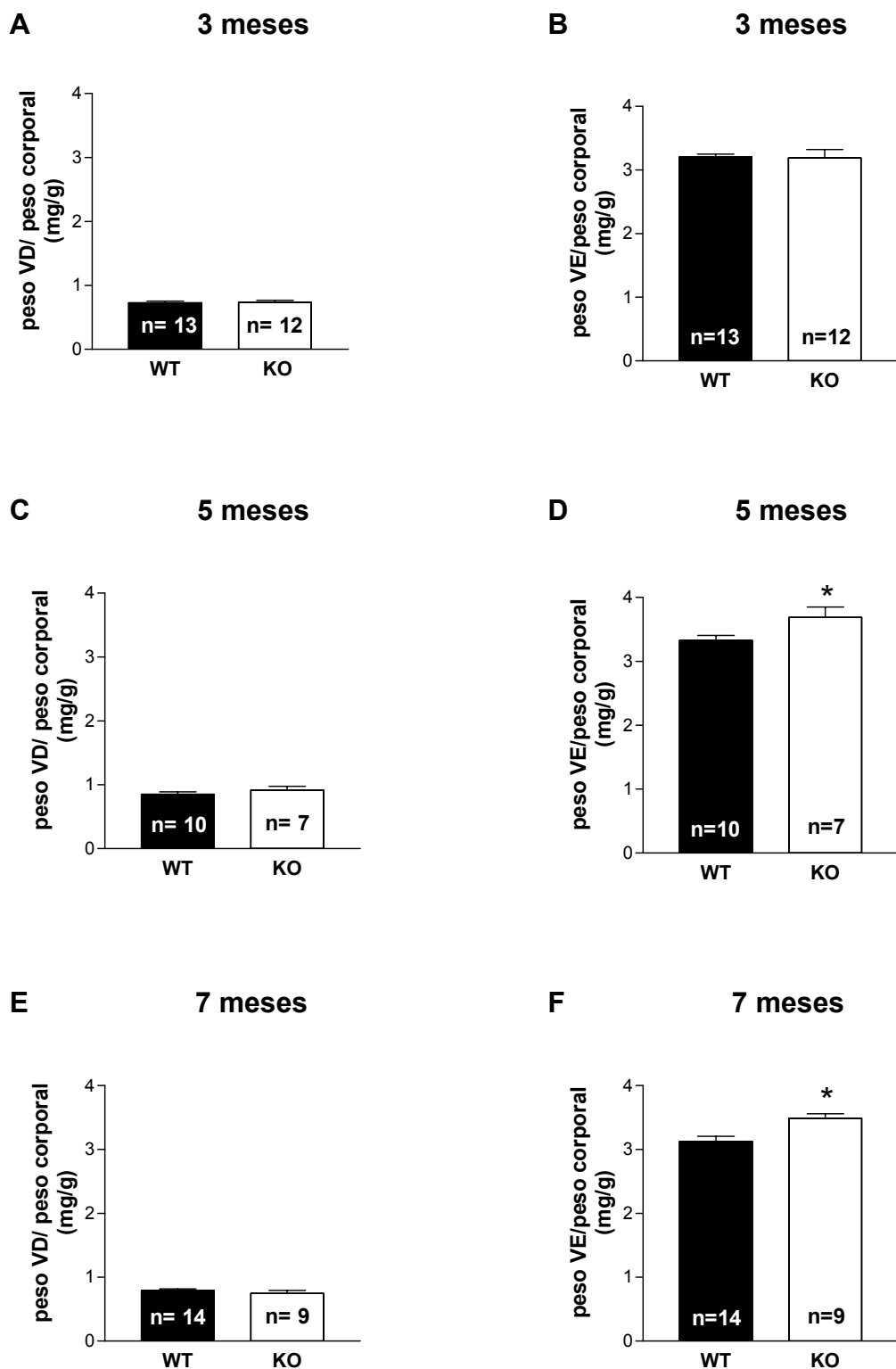
#### 4.2. Índice de hipertrofia cardíaca em camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade

Os pesos do ventrículo direito e do ventrículo esquerdo corrigidos pelo peso corporal (peso do VD/PC e peso do VE/PC, respectivamente) foram utilizados como um indicativo de hipertrofia cardíaca.

Aos 3 meses de idade, os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO apresentaram valores das relações: peso do VD/PC e peso do VE/PC similares aos observados nos WT (figura 1A e 1B, respectivamente). Adicionalmente não foi detectada diferença no peso corporal entre esses 2 grupos (WT:  $27 \pm 0,6$  vs.  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO:  $28 \pm 0,5$  g;  $p > 0,05$ , teste *t*).

Já aos 5 e 7 meses de idade, os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO apresentaram a relação peso do VE/PC significativamente maior do que a observada nos respectivos WT (figura 1D e 1F, respectivamente), e nenhuma diferença na relação peso do VD/PC (figura 1C e 1E, respectivamente). Além disso, não foi observada diferença no peso corporal dos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO quando comparado com o WT, aos 5 (WT:  $29 \pm 0,7$  vs.  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO:  $29 \pm 1,0$  g;  $p > 0,05$ , teste *t*) e 7 meses de idade (WT:  $31 \pm 1,0$  vs.  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO:  $30 \pm 0,9$  g;  $p > 0,05$ , teste *t*).





**Figura 1.** Relação entre o peso do ventrículo direito (VD) e peso corporal (A, C e E) e entre o peso do ventrículo esquerdo (VE) e peso corporal (B, D e F) nos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO (KO) com 3 (A e B), 5 (C e D) e 7 (E e F) meses de idade. *n* corresponde ao número de animais utilizados em cada grupo. Teste *t*. \* $P < 0,05$  vs. WT.

#### 4.3. Avaliação da congestão pulmonar e da congestão hepática em camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade

A relação peso úmido/ peso seco (PU/PS) do pulmão e do fígado e a relação peso úmido/ peso corporal (PU/PC) destes órgãos foram utilizadas para avaliar o índice de congestão pulmonar e hepática.

Como se pode observar na tabela 2, as relações PU/PS e PU/PC do pulmão não foram diferentes entre os animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO nas idades estudadas (3, 5 e 7 meses de idade).

O mesmo padrão de resposta foi observado ao se avaliarem as relações PU/PS e PU/PC do fígado, as quais não apresentaram diferenças entre os animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 3, 5 e 7 meses de idade (tabela 3).

**Tabela 2:** Relação entre o peso úmido e peso seco (PU/PS) do pulmão e entre peso úmido do pulmão e peso corporal (PU/PC) nos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.

Pulmão	WT		$\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO	
	PU/PS	PU/PC (mg/g)	PU/PS	PU/PC (mg/g)
3 meses	4,21 ± 0,12	5,82 ± 0,25 (12)	4,26 ± 0,09	6,06 ± 0,18 (11)
5 meses	4,49 ± 0,07	5,68 ± 0,25 (4)	4,31 ± 0,07	5,41 ± 0,06 (5)
7 meses	4,32 ± 0,09	5,30 ± 0,13 (9)	4,49 ± 0,06	5,68 ± 0,19 (14)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste *t*.

**Tabela 3:** Relação entre o peso úmido e peso seco (PU/PS) do fígado e entre peso úmido do fígado e peso corporal (PU/PC) nos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.

Fígado	WT		$\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO	
	PU/PS	PU/PC (mg/g)	PU/PS	PU/PC (mg/g)
3 meses	3,06 ± 0,09	48,91 ± 1,72 (12)	3,04 ± 0,09	47,68 ± 2,26 (11)
5 meses	2,94 ± 0,02	49,09 ± 0,07 (4)	2,90 ± 0,03	42,47 ± 3,38 (5)
7 meses	3,04 ± 0,08	48,27 ± 1,19 (9)	3,10 ± 0,06	46,40 ± 0,93 (14)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste *t*.

#### 4.4. Reatividade vascular em anéis de aorta de camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade

##### 4.4.1. Respostas de relaxamento à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em aortas de camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade

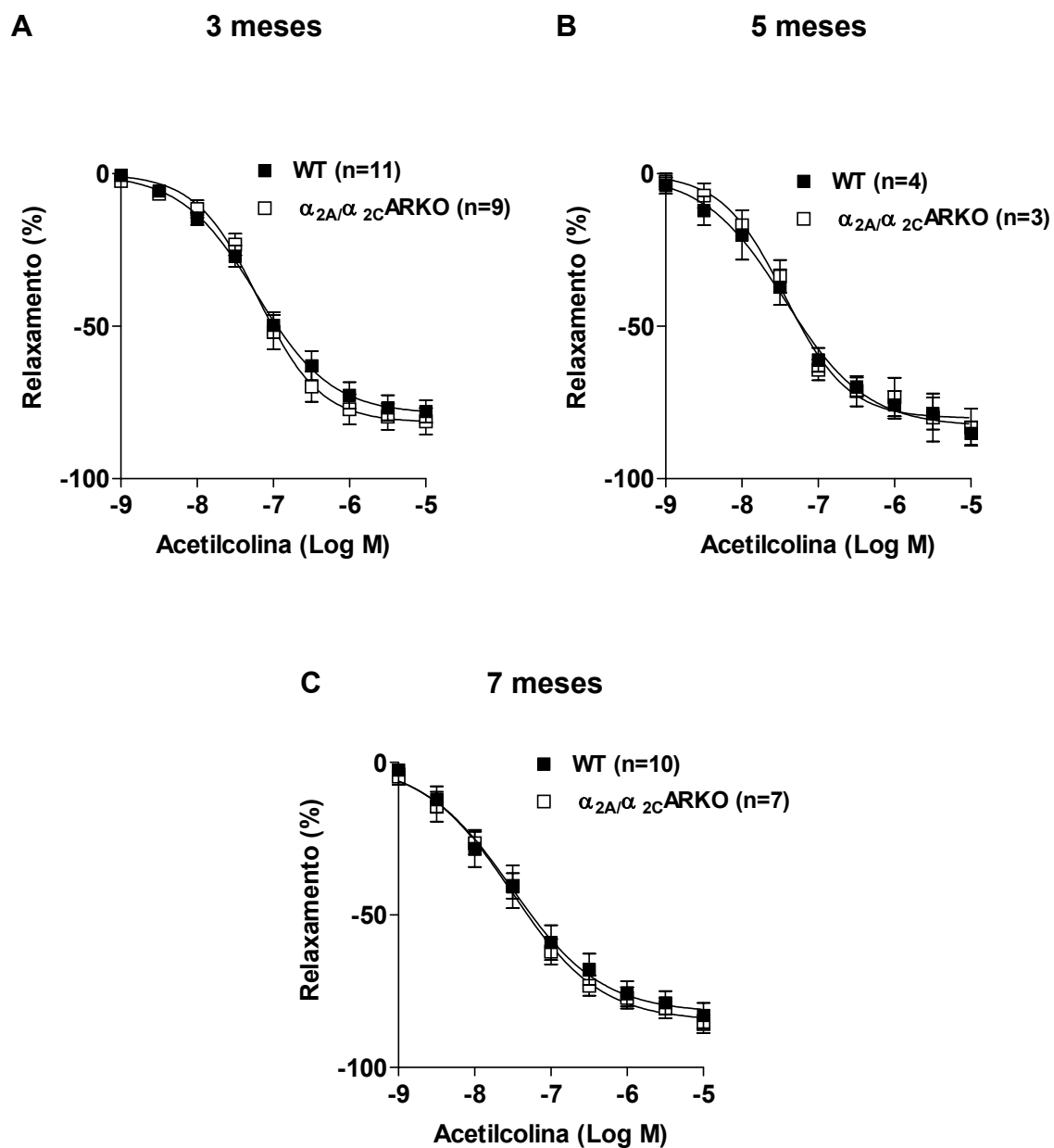
Primeiramente foi avaliado nos anéis de aorta dos camundongos o relaxamento dependente do endotélio através da administração de um agonista muscarínico, a acetilcolina.

Nos anéis de aorta dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, aos 3, 5 e 7 meses de idade, pré-contraídos com fenilefrina (aproximadamente 100 nM), a acetilcolina induziu relaxamento na dependência da concentração utilizada (figura 2). Porém, em todas as idades estudadas, não foram observadas diferenças significativas nem na resposta máxima e nem na sensibilidade à acetilcolina entre as artérias dos animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO (figura 2 e tabela 4).

**Tabela 4:** Valores de sensibilidade ( $pD_2$ ) e resposta máxima ( $R_{max}$ , % de relaxamento) obtidos através de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em aorta torácica de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.

ACh	WT		$\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO	
	$pD_2$	$R_{max}$ (%)	$pD_2$	$R_{max}$ (%)
3 meses	7,20 ± 0,07	-78,9 ± 3,70 (11)	7,17 ± 0,09	-83,7 ± 4,37 (9)
5 meses	7,47 ± 0,10	-85,1 ± 3,87 (4)	7,45 ± 0,11	-83,1 ± 6,12 (3)
7 meses	7,40 ± 0,18	-84,9 ± 4,12 (10)	7,53 ± 0,12	-85,8 ± 2,92 (7)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste *t*.



**Figura 2:** Curva concentração-resposta à acetilcolina em aorta torácica de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  ARKO com 3 (A), 5 (B) e 7 (C) meses de idade pré-contráidas com fenilefrina (aproximadamente 100 nM). Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. O número de animais analisados em cada grupo experimental (n) está entre parênteses. ANOVA (duas vias).

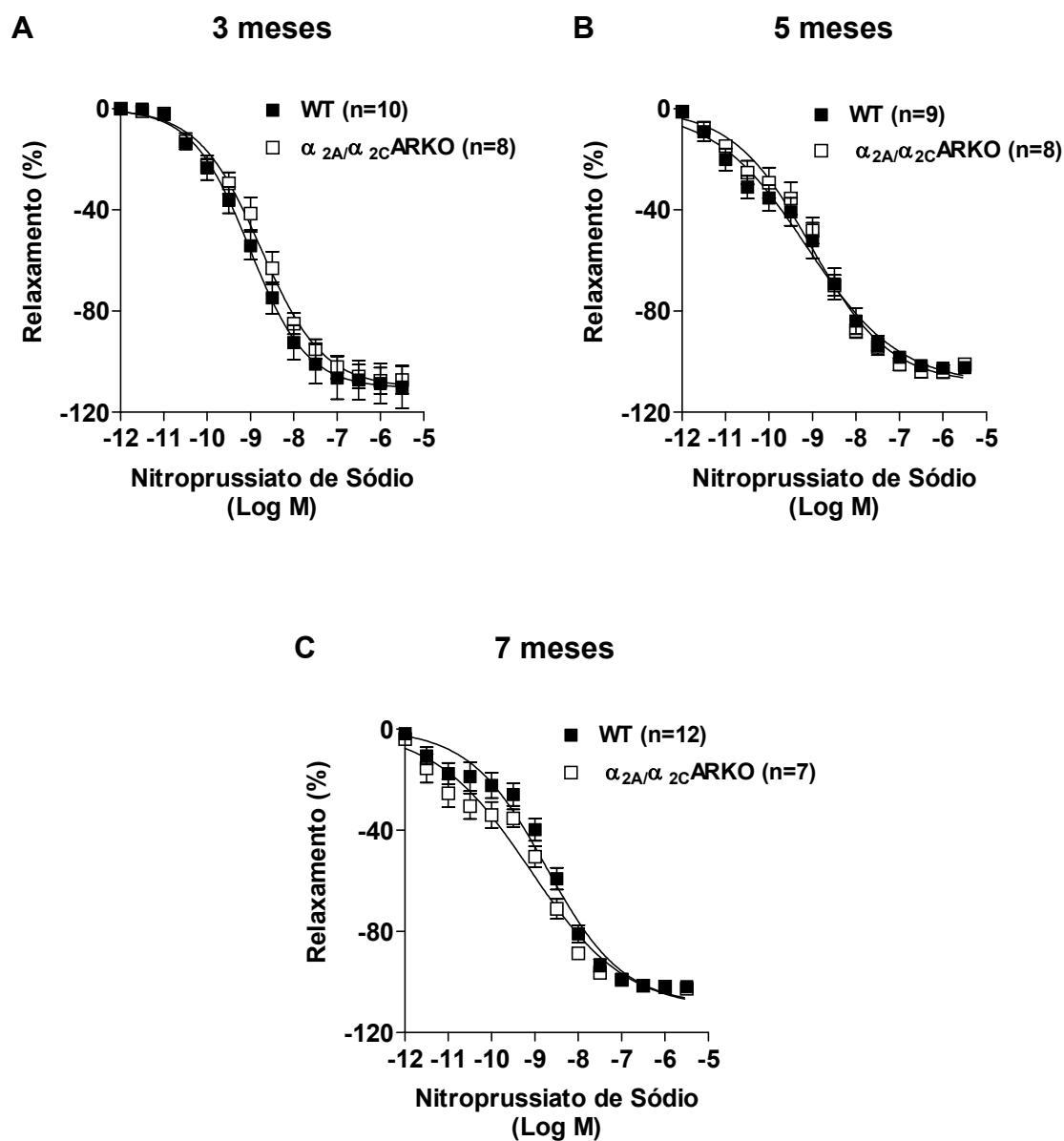
Em seguida foi estudado, nos anéis de aorta dos animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, o relaxamento independente do endotélio para analisar a resposta vasodilatadora da célula de músculo liso vascular. Para isso, foi utilizado o nitroprussiato de sódio (NPS), um doador de NO.

O NPS também promoveu o relaxamento de modo dependente da concentração utilizada nos anéis de aorta dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade, pré-contraídos com fenilefrina (aproximadamente 100 nM) (Figura 3). Similar ao observado no relaxamento à acetilcolina, não foram observadas diferenças significativas nem na resposta máxima e nem na sensibilidade ao NPS entre as artérias dos animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO nas idades estudadas (figura 3 e tabela 5).

**Tabela 5:** Valores de sensibilidade ( $pD_2$ ) e resposta máxima ( $R_{max}$ , % de relaxamento) obtidos através de curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS) em aorta torácica de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.

NPS	WT		$\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO	
	$pD_2$	$R_{max}$ (%)	$pD_2$	$R_{max}$ (%)
3 meses	9,05 ± 0,12	-111 ± 8,16 (10)	8,79 ± 0,14	-109 ± 5,32 (8)
5 meses	9,14 ± 0,27	-104 ± 0,84 (9)	9,08 ± 0,15	-105 ± 2,35 (8)
7 meses	8,81 ± 0,14	-103 ± 1,25 (12)	9,20 ± 0,20	-103 ± 1,47 (7)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste *t*.



**Figura 3:** Curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio em aorta torácica de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3 (A), 5 (B) e 7 (C) meses de idade pré-contraídas com fenilefrina (aproximadamente 100 nM). Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. O número de animais analisados em cada grupo experimental (n) está entre parênteses. ANOVA (duas vias).

#### 4.4.2. Resposta de relaxamento ao isoproterenol em aortas de camundongos

WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade

Para avaliar a resposta de relaxamento induzida pela estimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO e WT, foi realizada uma curva concentração-resposta ao isoproterenol, um agonista não seletivo dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

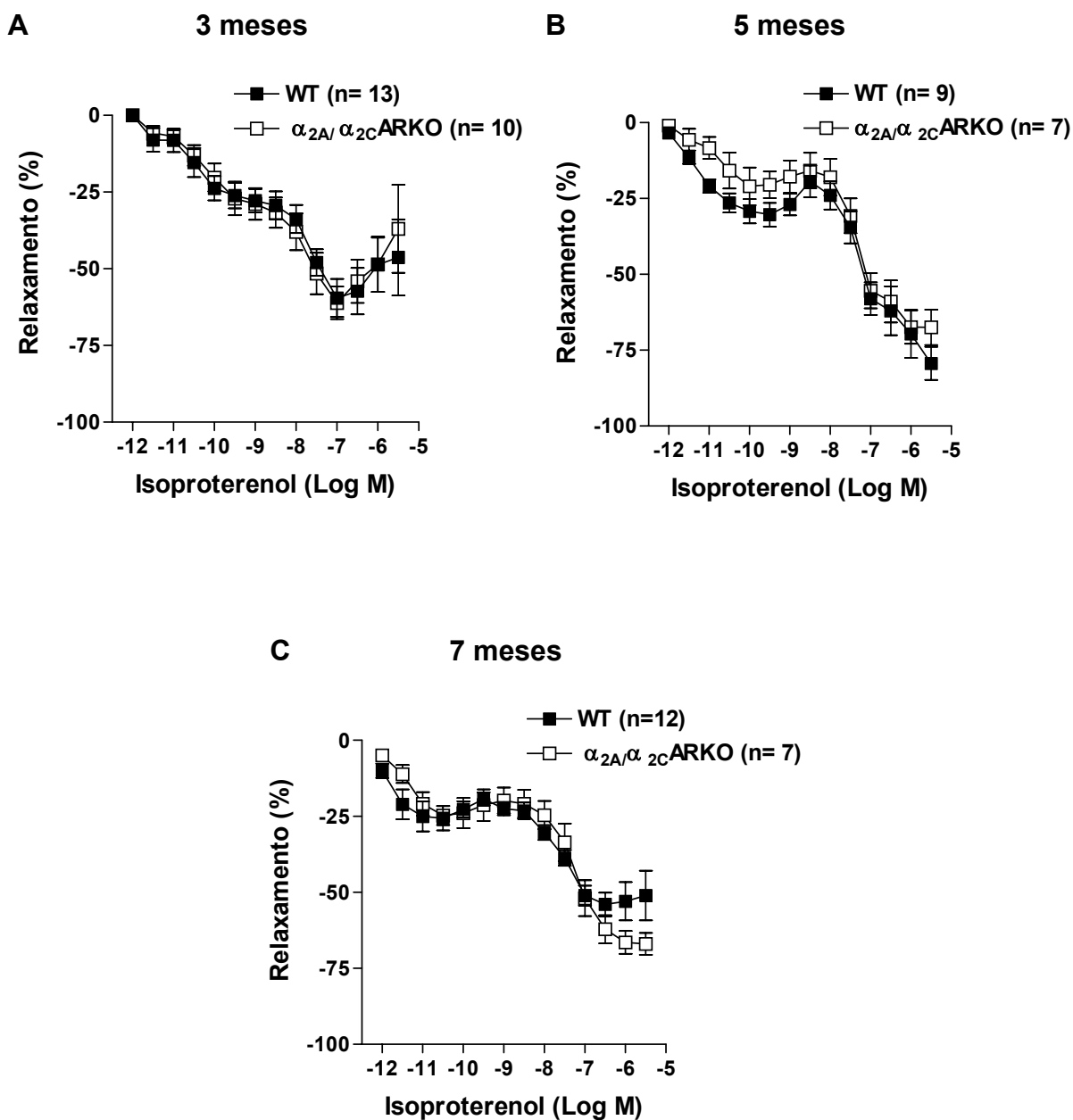
A figura 4A representa o relaxamento dependente da concentração promovido pelo isoproterenol em aortas de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3 meses de idade. Como pode ser observado, não há diferença significativa nas respostas vasculares a diferentes concentrações de isoproterenol entre as aortas dos animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO nesta idade (figura 4A e tabela 6). O mesmo padrão de resposta foi observado nos anéis de aorta dos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 5 e 7 meses de idade (figura 4B e 4C, respectivamente e tabela 6).

**Tabela 6:** Valores de resposta máxima ( $R_{max}$ , % de relaxamento) obtido através de curvas concentração-resposta ao isoproterenol (ISO) em aorta torácica de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade.

ISO	WT	$\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO
	$R_{max}$ (%)	$R_{max}$ (%)
3 meses	$-70,8 \pm 6,17$ (13)	$-67,52 \pm 4,93$ (10)
5 meses	$-79,8 \pm 5,45$ (9)	$-71,36 \pm 4,55$ (7)
7 meses	$-57,0 \pm 8,16$ (12)	$-71,31 \pm 3,32$ (7)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste *t*.



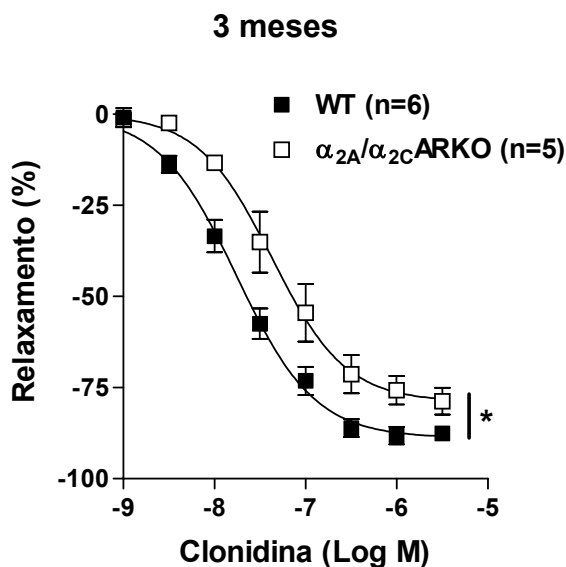


**Figura 4:** Curva concentração-resposta ao isoproterenol em aorta torácica de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3 (A), 5 (B) e 7 (C) meses de idade pré-contraídas com fenilefrina (aproximadamente 100 nM). Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses (n). ANOVA (duas vias).

#### 4.4.3. Respostas de relaxamento à clonidina em aortas de camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3 meses de idade

O relaxamento mediado pela clonidina, um agonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, foi avaliado nas aortas dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO e WT aos 3 meses de idade como uma manobra para se confirmar a deleção dos subtipos de receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos, uma vez que já está bem descrito na literatura que a estimulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos nas células endoteliais promove a liberação de fatores de relaxamento (Matsuda et al., 1985; Miller, Vanhoutte, 1985; Flavanhan et al., 1989; MacLean et al., 1993; Bryan et al., 1996; Bockman et al., 1996; Zschauer et al., 1997; Nishina et al., 1999; Atalik et al., 2000; Figueroa et al., 2001; Molin, Bendack, 2005; Shafaroudi et al., 2005).

Nos anéis de aorta dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, pré-contraídas com fenilefrina (aproximadamente 100 nM), a clonidina induziu um relaxamento na dependência da concentração utilizada (figura 5 e tabela 7). Porém, tanto a resposta máxima quanto a sensibilidade à clonidina encontram-se reduzidas nos animais com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos (figura 5 e tabela 7).



**Figura 5:** Curva concentração-resposta à clonidina em aorta torácica de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3 meses de idade pré-contraídas com fenilefrina (aproximadamente 100 nM). Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses (n). ANOVA (duas vias): \*  $P < 0,05$  vs. WT.

**Tabela 7:** Valores de sensibilidade ( $pD_2$ ) e resposta máxima ( $R_{max}$ , % de relaxamento) obtidos através de curvas concentração-resposta à clonidina em aorta torácica de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3 meses de idade.

Clonidina	WT		$\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO	
	$pD_2$	$R_{max}$ (%)	$pD_2$	$R_{max}$ (%)
3 meses	$7,74 \pm 0,10$	$-89,7 \pm 1,88$ (6)	$7,31 \pm 0,14$ *	$-78,7 \pm 3,66$ * (5)

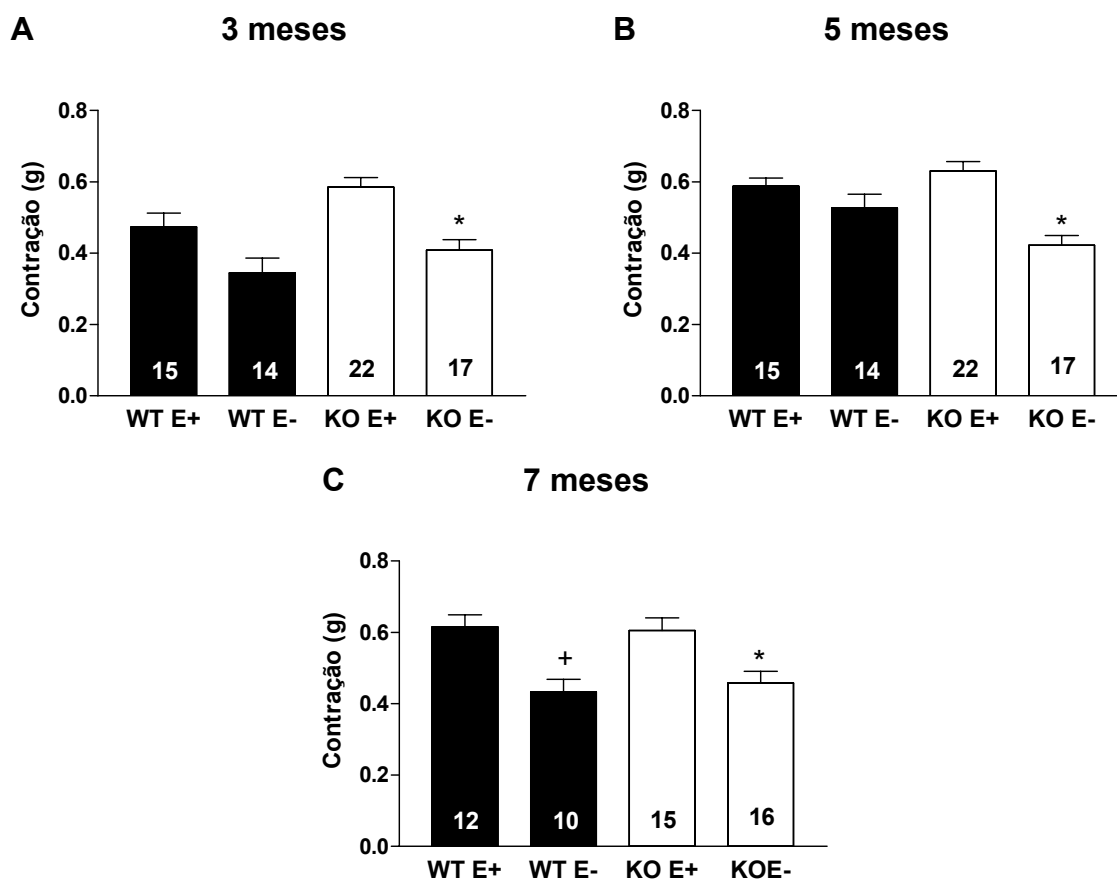
O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste  $t$ , \* $P < 0,05$  vs. WT.

*4.4.4. Resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl) em anéis de aortas com e sem endotélio de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade*

Para testar a viabilidade muscular e a resposta contrátil máxima do anel, foi adicionado no banho 125 mM de KCl, durante 40 minutos.

Como demonstrado na figura 6, a incubação, durante 40 minutos, com 125 mM de KCl nos anéis de aorta dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade, promoveu contração. A resposta de contração induzida pelo KCl nas aortas com endotélio dos animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, em todas as idades estudadas, foi de similar magnitude (figura 6).

Aos 3 e 5 meses de idade, nos anéis de aorta sem endotélio dos camundongos WT, a contração ao KCl não foi estatisticamente diferente ao observado nos anéis com endotélio destes mesmos animais (figura 6A e 6B, respectivamente). Entretanto, aos 7 meses de idade, a contração ao KCl na aorta sem endotélio dos animais WT foi significativamente reduzida quando comparada aos anéis com endotélio desta mesma cepa (figura 6C). Da mesma maneira, as aortas sem endotélio dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, em todas as idades estudadas, apresentaram uma diminuição significativa da contração ao KCl quando comparada aos respectivos anéis com endotélio dos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO (figura 6). Porém, nenhuma diferença estatística foi observada quando comparou-se os anéis sem endotélio entre os grupos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, em todas as três idades avaliadas (figura 6).



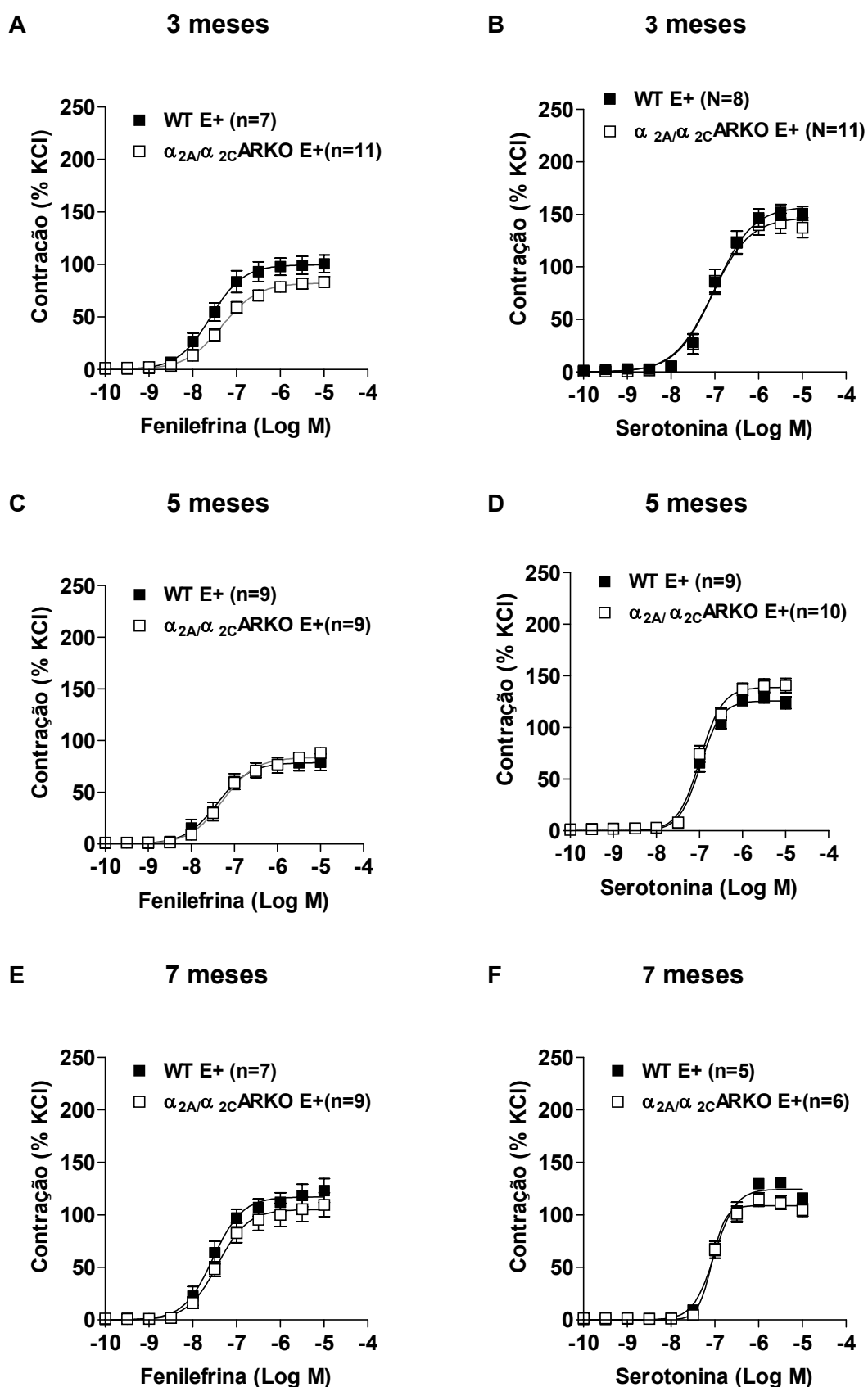
**Figura 6:** Contração máxima (g) induzida por 125 mM de KCl em aortas de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO (KO) com 3 (A), 5 (B) e 7 (C) meses de idade com (E+) e sem (E-) endotélio. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os números dentro das barras correspondem ao número de animais analisados em cada grupo experimental. ANOVA (uma via): \*  $P < 0,05$  vs.  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO E+ ; +  $P < 0,05$  vs. WT E+.

#### 4.4.5. Respostas vasoconstritoras à fenilefrina e à serotonina em anéis de aorta de camundongos WT e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade

Neste projeto de pesquisa, foi avaliada a resposta vasoconstritora a dois agentes contráteis, fenilefrina, um agonista seletivo dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, e serotonina, agonista dos receptores 5-HT. Estes dois agonistas, apesar de atuarem em distintos receptores, induzem contração usando as mesmas vias de sinalização intracelular, deste modo uma alteração nos receptores ou nos mecanismos intracelulares de contração poderiam ser identificados.

Tanto a fenilefrina quanto a serotonina aumentaram, de maneira dependente da concentração, o tônus basal dos anéis de aorta com endotélio nos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO em todas as idades estudadas (figura 7). Não foram observadas diferenças significativas nem na resposta máxima nem na sensibilidade à fenilefrina entre as artérias dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO e WT aos 3, 5 e 7 meses de idade (figura 7A, 7C, e 7E e tabela 8).

Em concordância com estes resultados, em todas as idades estudadas, também não foram observados alterações destes parâmetros na curva concentração-resposta à serotonina nos anéis de aorta dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO quando comparado com os anéis de aorta dos respectivos WT (figura 7B, 7D e 7F e tabela 9).



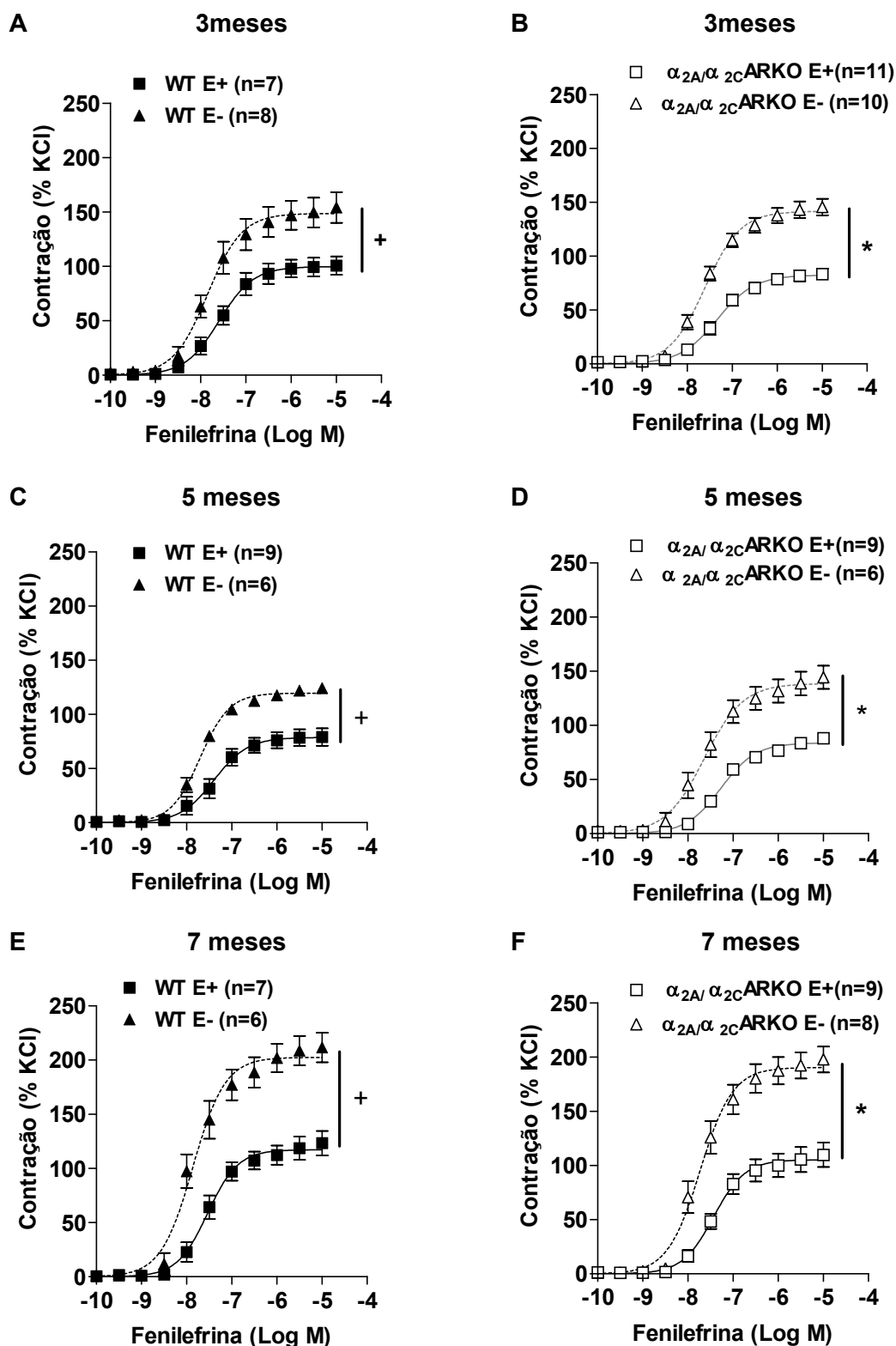
**Figura 7:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina (A, C e E) e à serotonina (B, D e F) em aortas de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  ARKO com 3 (A e B), 5 (C e D) e 7 (E e F) meses de idade em anéis com endotélio intacto (E+). Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) são expressos como porcentagem da máxima contração induzida por 125 mM de cloreto de potássio (KCl). Entre parênteses *n* corresponde ao número de animais analisados em cada grupo experimental. ANOVA (duas vias).

*4.4.6. Modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em aortas de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade*

Para avaliar a modulação endotelial, foi efetuada a retirada do endotélio das aortas isoladas, manobra que elevou somente a resposta máxima à fenilefrina nas aortas dos camundongos WT com 3 meses de idade (figura 8A e tabela 8) e tanto a sensibilidade como a resposta máxima à fenilefrina nas aortas dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3 meses de idade (figura 8B e tabela 8). Na ausência de endotélio, não houve diferenças estatísticas nem na sensibilidade e nem na resposta máxima à fenilefrina entre as aortas dos grupos estudados aos 3 meses de idade (tabela 8).

Aos 5 e 7 meses de idade, a remoção do endotélio promoveu um aumento tanto na sensibilidade como na resposta máxima na contração induzida pela fenilefrina em ambos os anéis de aorta dos grupos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO (figura 8C, 8D, 8E e 8F e tabela 8). E, comparando os anéis sem endotélio, a contração à fenilefrina foi de mesma magnitude entre as aortas dos animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO (tabela 8).





**Figura 8.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em aortas de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3 (A e B), 5 (C e D) e 7 (E e F) meses de idade em anéis com (E+) e sem (E-) endotélio. Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) são expressos como porcentagem da máxima contração induzida por 125 mM de cloreto de potássio (KCl). *n* corresponde ao número de animais analisados em cada grupo experimental. ANOVA (duas vias): +  $P < 0,05$  vs. WT E+ ; \*  $P < 0,05$  vs.  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO E+.

**Tabela 8:** Valores de sensibilidade ( $pD_2$ ) e resposta máxima ( $R_{max}$ , % da máxima contração ao KCl) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em aorta torácica de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade, com (E+) e sem endotélio (E-).

Fenilefrina		WT		$\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO	
		$pD_2$	$R_{max}$ (%)	$pD_2$	$R_{max}$ (%)
3 meses	E+	7,59 ± 0,09	101 ± 8,48 (7)	7,34 ± 0,08	83,8 ± 5,01 (11)
	E-	7,83 ± 0,08	154 ± 14,01 + (8)	7,61 ± 0,07 *	146 ± 7,57 * (10)
5 meses	E+	7,40 ± 0,11	80,2 ± 8,14 (9)	7,27 ± 0,07	88,1 ± 4,67 (9)
	E-	7,72 ± 0,06 +	124 ± 3,04 + (6)	7,63 ± 0,10 *	144 ± 10,73 * (6)
7 meses	E+	7,54 ± 0,07	123 ± 11,31 (7)	7,45 ± 0,06	109 ± 11,33 (9)
	E-	7,86 ± 0,13 +	211 ± 13,65 + (6)	7,70 ± 0,08 *	197 ± 11,96 * (8)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste *t*, +  $P < 0,05$  vs. WT E+ e \*  $P < 0,05$  vs.  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO E+.

**Tabela 9:** Valores de sensibilidade ( $pD_2$ ) e resposta máxima ( $R_{max}$ , % da máxima contração ao KCl) obtidos através de curvas concentração-resposta à serotonina em aorta torácica de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade, com endotélio (E+).

Serotonina		WT		$\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO	
		$pD_2$	$R_{max}$ (%)	$pD_2$	$R_{max}$ (%)
3 meses	E+	7,02 ± 0,09	154 ± 7,16 (8)	7,11 ± 0,06	142 ± 9,41 (11)
5 meses	E+	6,97 ± 0,06	130 ± 5,25 (9)	6,97 ± 0,04	142 ± 6,65 (10)
7 meses	E+	6,99 ± 0,06	130 ± 3,46 (5)	7,06 ± 0,03	115 ± 6,34 (6)

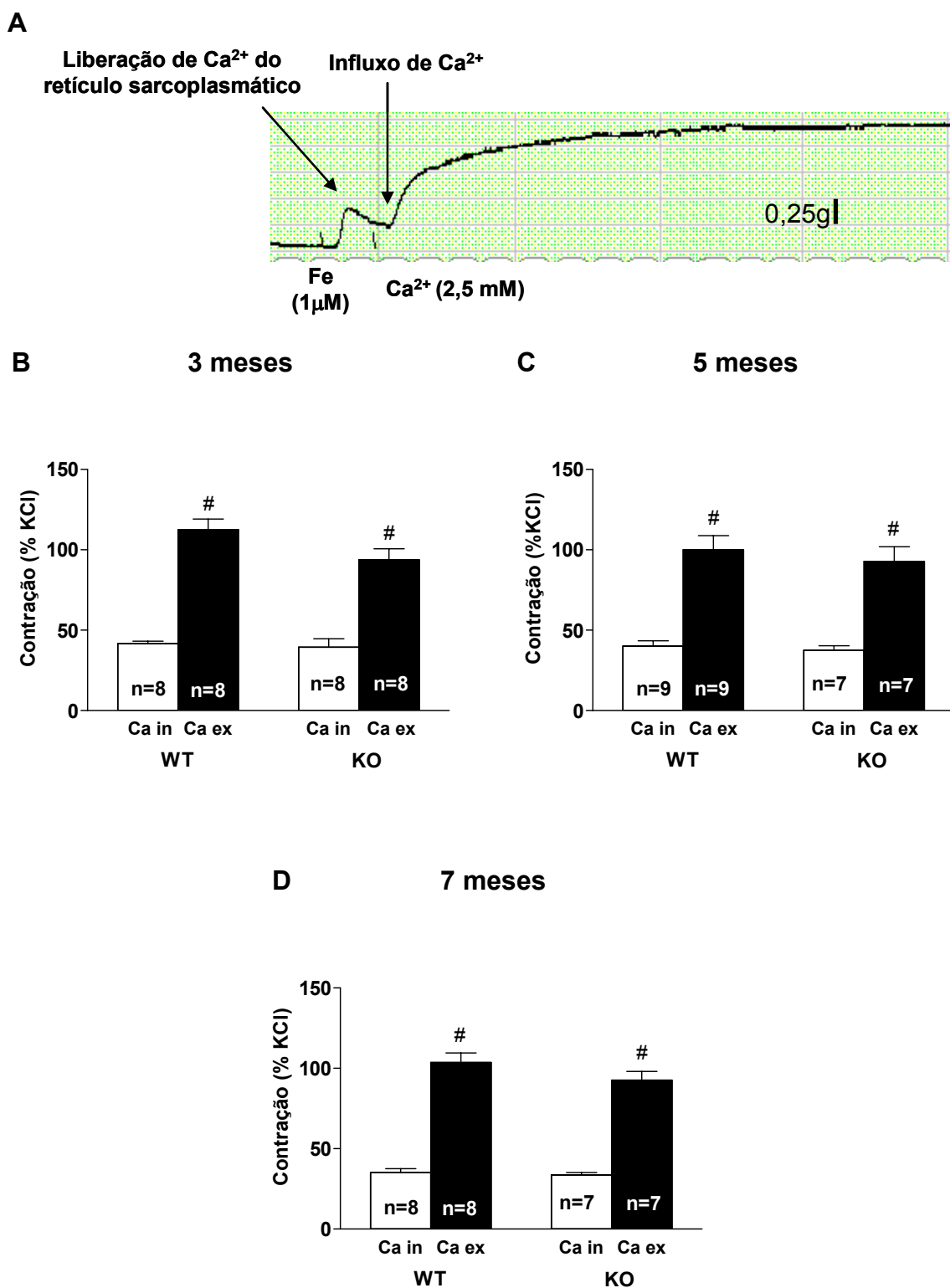
O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste *t*.

*4.4.7. Papel do cálcio intracelular e extracelular na resposta vasoconstritora à fenilefrina em aortas de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade*

No presente trabalho, também foi investigada a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  na resposta contrátil induzida pela fenilefrina nas aortas de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO.

Assim, para avaliar a participação da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático, foi feita a administração de fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) em anéis de aorta incubadas em solução de Krebs-Henseleit livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e com EGTA (1 mM) (figura 9A). Neste meio, a fenilefrina causou uma contração de pequena magnitude e transiente nas aortas de todos os grupos de animais estudados. A magnitude dessa contração foi similar entre os animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO em todas as idades avaliadas (figura 9B, 9C e 9D).

A resposta contrátil do músculo liso vascular aórtico após a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio extracelular foi avaliada em seqüência, através da adição de  $\text{CaCl}_2$  (2,5 mM) ao banho, na presença de fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) (figura 9A). A adição de  $\text{CaCl}_2$  causou uma contração de grande magnitude e sustentada nos anéis de aorta dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, sendo que a magnitude desta resposta foi similar entre WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO em todas as idades estudadas (figura 9B, 9C e 9D).



**Figura 9:** (A) Registro típico do efeito contrátil induzido pela fenilefrina (Fe) 1  $\mu\text{M}$  e  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ; 2,5 mM) em anéis de aorta de camundongos *wild-type* incubados com solução livre de  $\text{Ca}^{2+}$  mais EGTA (1 mM). Representação gráfica da contração induzida pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares (Ca-in, barras brancas) e pelo influxo de cálcio (Ca-ex, barras escuras) em aortas de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO (KO) com 3 (B), 5 (C) e 7 (D) meses de idade. Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) são expressos como porcentagem da máxima contração induzida por 125 mM de cloreto de potássio (KCl).  $n$  corresponde ao número de animais analisados em cada grupo experimental. ANOVA (1via): #  $P < 0,05$  vs. cálcio intracelular.

4.5. *Reatividade vascular no leito vascular mesentérico de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de idade*

Nos leitões vasculares mesentéricos dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, aos 7 meses de idade, não foram observados nenhuma diferença estatisticamente significativa na pressão de perfusão média basal (WT:  $38 \pm 5,05$  vs.  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO:  $35 \pm 1,61$  mmHg;  $p > 0,05$ , teste *t*).

4.5.1. *Resposta de relaxamento à acetilcolina no leito vascular mesentérico de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de idade*

A presença do endotélio no leito vascular mesentérico dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 7 meses de idade foi avaliada através do relaxamento mediado pela perfusão com acetilcolina ( $10^{-3}$  M) no leito vascular pré-contraído com uma solução de noradrenalina ( $3 \times 10^{-5}$  M).

A perfusão com acetilcolina promoveu um relaxamento no leito vascular mesentérico tanto dos camundongos WT quanto dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, e este relaxamento foi de mesma magnitude entre os grupos estudados (tabela 10).

**Tabela 10:** Valores do relaxamento (% de relaxamento) obtidos através da perfusão de acetilcolina (ACh) no leito vascular mesentérico de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de idade.

ACh	WT	$\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO
	Relaxamento (%)	Relaxamento (%)
7 meses	$-36,8 \pm 2,97$ (9)	$-47,4 \pm 4,98$ (7)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste *t*.

4.5.2. Resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl) no leito vascular mesentérico de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de idade

Para testar a viabilidade muscular e a resposta contrátil máxima do leito vascular mesentérico, uma solução de KCl (125 mM) foi perfundida por 3 vezes neste leito com intervalos de 30 minutos. A maior variação da pressão de perfusão média ( $\Delta$ PPM), em relação aos valores basais, induzida pelo KCl 125 mM foi considerada a máxima resposta contrátil do leito vascular mesentérico.

A tabela 11 representa a maior  $\Delta$ PPM obtida no leito vascular mesentérico dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de idade após perfusão com solução de KCl 125 mM, e como pode ser observado, a  $\Delta$ PPM foi de mesma magnitude entre os grupos estudados.

**Tabela 11:** Máxima variação da pressão de perfusão média ( $\Delta$ PPM, mmHg) obtidas através da perfusão com uma solução de KCl (125 mM) no leito vascular mesentérico de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de idade.

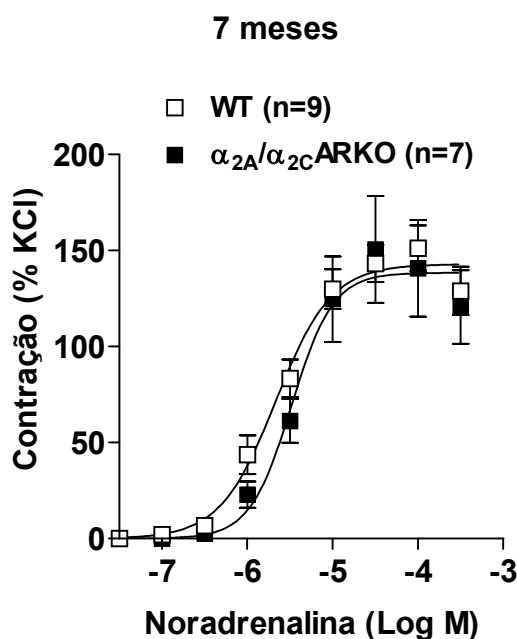
KCl	WT	$\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO
	$\Delta$ PPM (mmHg)	$\Delta$ PPM (mmHg)
7 meses	43,14 $\pm$ 5,69 (9)	37,91 $\pm$ 5,77 (7)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste *t*.

*4.5.3. Resposta vasoconstritora à noradrenalina no leito vascular mesentérico de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de idade*

A resposta contrátil no leito vascular mesentérico dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 7 meses de idade, induzida pelo agonista adrenérgico noradrenalina, foi avaliada através de uma curva concentração-resposta obtida por meio de perfusões com soluções de noradrenalina.

Como pode ser observado na figura 10, a perfusão com soluções crescentes de noradrenalina causou um aumento, dependente da concentração utilizada, da variação da pressão de perfusão média do leito vascular mesentérico, o que reflete em um aumento da contração à noradrenalina tanto nos animais WT quanto nos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de idade. Além disso, não foram observadas diferenças significativas na resposta máxima e na sensibilidade à noradrenalina entre o leito vascular mesentérico dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de idade (figura 10 e tabela 12).



**Figura 10:** Curvas concentração-resposta à noradrenalina no leito vascular mesentérico de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de idade. Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) são expressos como porcentagem da máxima contração induzida por 125 mM de cloreto de potássio (KCl). O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses (n). ANOVA (duas vias).

**Tabela 12:** Valores de sensibilidade ( $pD_2$ ) e resposta máxima ( $R_{max}$ , % da máxima contração ao KCl) obtidos através de curvas concentração-resposta à noradrenalina no leito vascular mesentérico de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses de idade.

Noradrenalina	WT		$\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO	
	$pD_2$	$R_{max}$ (%)	$pD_2$	$R_{max}$ (%)
7 meses	$5,68 \pm 0,09$	$159 \pm 11,7$ (9)	$5,43 \pm 0,18$	$159 \pm 23$ (7)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste *t*.



# Discussão

## 5. DISCUSSÃO

A hiperatividade simpática, caracterizada pelo aumento da quantidade de catecolaminas circulantes e da atividade dos nervos simpáticos periféricos, tem sido relacionada à gênese e à manutenção de diferentes estados patológicos do sistema cardiovascular incluindo a hipertensão essencial, a hipertrofia cardíaca e a sua progressão para a insuficiência cardíaca (Thomas, Marks, 1978; Cohn et al., 1984; Anderson et al., 1999; Schrier, Abraham, 1999; Esler, Kaye, 2000; Graham et al., 2002; Ledoux et al., 2003).

As catecolaminas endógenas (adrenalina e noradrenalina) medeiam a ação do sistema nervoso simpático. Estes efetores do sistema nervoso simpático se ligam aos receptores adrenérgicos, classificados como receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos, os quais estão presentes no coração e vasos sanguíneos. Sendo assim, o sistema nervoso simpático exerce grande influência no sistema cardiovascular (Timo-laria, 1999, de Hurtado, 2004).

Hein e colaboradores (1999) descreveram na literatura um modelo animal de hiperatividade simpática onde os camundongos apresentaram deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos. Sabe-se que estes receptores estão envolvidos na regulação do tônus simpático via auto-inibição pré-sináptica da liberação de catecolaminas periféricamente (Altman et al., 1999; Hein et al., 1999; Trendelenburg et al., 2001; Brede et al., 2003), enquanto o receptor  $\alpha_{2A}$ -adrenérgico também modula a atividade simpática atuando no bulbo rostro-ventro-lateral (MacMillan et al., 1996; Altman et al., 1999; Makaritsis et al., 1999). Sendo assim, na ausência destes receptores, estes animais apresentam um aumento crônico do tônus simpático o qual induz alterações no coração, como as descritas por Brum e colaboradores

(2002) e Rolim e colaboradores (2007). O presente estudo procura estudar se tal aumento mantido do tônus simpático modifica a função dos vasos sanguíneos. Cabe ressaltar que este é o primeiro estudo na literatura que objetiva avaliar a função vascular nesses animais.

### *5.1. Efeitos do aumento do tônus simpático no tecido cardíaco e na pressão arterial e conseqüente indução de edemas pulmonar e hepático*

Nesta parte do estudo foram avaliados alguns parâmetros cardíacos e hemodinâmicos nos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com o objetivo de confirmar a presença de hiperatividade simpática nestes animais.

Hein e colaboradores (1999) descreveram que os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO apresentam níveis de catecolaminas plasmáticas elevados aos 4 meses de idade em comparação aos WT. Brum e colaboradores (2002) observaram que, nestes animais, este aumento das catecolaminas circulantes induz uma taquicardia basal, a qual é característica deste modelo de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática em camundongos. Sendo assim, o aumento da frequência cardíaca presente nestes animais pode ser considerado um parâmetro cardiovascular que confirma a presença de hiperatividade simpática.

No presente projeto, foi observado um aumento da frequência cardíaca nos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO em todas as idades estudadas (3, 5 e 7 meses de idade). Estes resultados vão ao encontro de prévios trabalhos na literatura descritos pelo grupo de Brum, os quais observaram que, desde o primeiro mês de vida, os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO apresentaram um aumento da frequência cardíaca no basal, a qual permanece elevada até o sétimo mês de vida, o que sugere que os

camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO possuem um aumento do tônus simpático já no primeiro mês de idade o qual se mantém elevado até o sétimo mês de vida.

Como já descrito, os mediadores do sistema nervoso simpático, adrenalina e noradrenalina, medeiam as ações no sistema cardiovascular através da sua ligação com os receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos.

Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos são subdivididos em  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ , no entanto, no coração, as catecolaminas medeiam os efeitos cardíacos principalmente através do subtipo de receptor  $\beta_1$ -adrenérgico, o qual é o subtipo predominantemente encontrado neste órgão. Entretanto, estes efeitos cardíacos também podem ser mediados pelos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, uma vez que este subtipo também está expresso no coração. Porém, vale ressaltar que a razão entre  $\beta_1:\beta_2$  no coração é de 70:30 (Wallukat, 2002). Além disso, Devic e colaboradores (2001) também demonstraram a presença funcional do subtipo  $\beta_3$  mediando efeitos cardíacos.

Os receptores  $\beta$  adrenérgicos estão acoplados a proteína G estimulatória ( $G_s$ ), que quando estimulada induz a ativação da enzima adenilato ciclase. Geralmente é a subunidade  $G_{\alpha_s}$  que ativa esta enzima, mas a  $G_{\beta\gamma}$  também pode ativar certas isoformas da adenilato ciclase. A adenilato ciclase catalisa a formação de AMPc, a partir do ATP, e o AMPc atua como o principal segundo mensageiro da estimulação  $\beta$ -adrenérgica (Dixon et al., 1986; Emorine et al., 1989). As ações do AMPc derivam principalmente da sua capacidade em estimular a atividade da proteína quinase A (PKA), a qual promove a fosforilação de diversos alvos. Este mediador intracelular, nos miócitos cardíacos, aumenta a força de contração (efeito inotrópico positivo) e a velocidade de relaxamento (efeito lusitrópico positivo). E, nas células de gênese e condução do potencial de ação, este mediador intracelular

promove um aumento da frequência cardíaca (efeito cronotrópico positivo) e da velocidade de condução (efeito dronotrópico positivo) (de Hurtado, 2004).

Tem sido proposto que os altos níveis de catecolaminas, tanto locais como circulantes, induzem o crescimento dos miócitos cardíacos levando à hipertrofia cardíaca, assim como levam à dessensibilização e *down-regulation* dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos no miocárdio (Colucci et al., 1988; Anderson et al., 1999). Esse fato reduz os efeitos mediados pelos receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos e contribui para a progressão da hipertrofia cardíaca compensada para o quadro de insuficiência cardíaca (Colucci et al., 1988; Anderson et al., 1999).

Brum e colaboradores (2002) não observaram alterações na relação do peso cardíaco pelo peso corporal dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 4 meses de idade. Entretanto, estes mesmos autores observaram, nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 4 meses, anormalidades na ultraestrutura dos cardiomiócitos e alargamento de miócitos remanescente, sem evidências de fibrose no tecido cardíaco. No presente estudo, concordante com os resultados obtidos por Brum e colaboradores (2002), os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 3 meses de idade, não apresentam alterações na razão do peso cardíaco pelo peso corporal em comparação aos WT, o que sugere que a hiperatividade simpática presente nos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 3 meses de idade não foi capaz de induzir hipertrofia cardíaca.

Porém, aos 5 e 7 meses de idade, a hiperatividade simpática nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO induziu um aumento da massa do ventrículo esquerdo, o que indica a presença de hipertrofia cardíaca neste animais. Estes resultados estão de acordo com os resultados recentes obtidos pelo grupo de Brum os quais demonstraram, no coração de camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 5 e 7 meses de idade, um aumento do diâmetro dos cardiomiócitos, além do aumento da fração de

colágeno, indicando o desenvolvimento de fibrose miocárdica (Medeiros et al., 2005; Rolim et al., 2005, 2007).

Esta resposta hipertrófica decorrente de uma hiperestimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos também tem sido descritas em outros modelos experimentais, por exemplo, no modelo de hipertrofia cardíaca onde o rato é submetido a doses subcutâneas diárias de isoproterenol (agonista não-seletivo dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos) (Taylor, Tang, 1984). Além disso, sabe-se que a resposta hipertrófica do miocárdio em resposta à estimulação crônica dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos também tem sido observada em camundongos de diferentes linhagens (Soonpaa, Field, 1994; Kudej et al., 1997; Saadane et al., 1999; Hohimer et al., 2005). Além do mais, a atividade simpática crônica, no coração, pode levar à estimulação do sistema renina-angiotensina sistêmico e/ou local, que também pode estar envolvido na patogenia de modelos que apresentam hiperatividade simpática. E, em adição, a própria auto-oxidação da noradrenalina, quando a mesma se encontra em altas concentrações no plasma e nos tecidos, pode ter efeitos tóxicos direto sobre os cardiomiócitos (Mann et al, 1992; Kaye et al, 1995). Em conjunto, estes fatores podem estar envolvidos no remodelamento cardíaco, com diferentes graus de contribuição, dos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO nas diferentes idades.

Apesar das alterações cardíacas encontradas nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 5 e 7 meses de idade, decorrentes de um aumento da descarga simpática no coração, no presente estudo, não foi encontrada alteração sobre os valores de pressão arterial nessas idades. Adicionalmente, aos 3 meses de idade, os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO também não apresentaram alteração da pressão arterial. Assim, apesar da hiperatividade simpática presente nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade, evidenciada pelo aumento da frequência

cardíaca, e apesar da hipertrofia ventricular esquerda presente nos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 5 e 7 meses de idade, a hiperatividade simpática neste modelo experimental não foi capaz de induzir alteração na pressão arterial em nenhuma das idades estudadas.

Estes resultados de pressão arterial obtidos no presente estudo vão de encontro aos resultados descritos por Brum e colaboradores (2002), uma vez que estes autores observaram que enquanto os animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 1 mês de vida não apresentavam alteração da pressão arterial, aos 4 e 6 meses de idade os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO apresentavam valores de pressão arterial aumentados quando comparados os respectivos controles. No entanto, assim como observado no presente estudo, recentes trabalhos do grupo de Brum demonstraram que os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade não apresentam alteração da pressão arterial (Medeiros et al., 2005; Rolim et al., 2005).

Esta não modificação dos valores de pressão arterial também está presente em outros modelos experimentais de hiperatividade simpática, por exemplo, no modelo de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol (Trindade et al., 1992; Busato et al., 1999; Vassallo et al., 1988, Meyrelles et al., 1994), onde tanto a pressão sistólica quanto a pressão diastólica não foram alterados pelo tratamento com o agonista  $\beta$ -adrenérgico.

Nos quadros de insuficiência cardíaca também pode não haver alteração na pressão arterial, neste sentido, foi observado na clínica médica que 40 a 50% dos pacientes com sinais e sintomas de insuficiência cardíaca possuem pressão arterial sistólica normal (Gheorghide et al., 2005).

No atual projeto também foi demonstrado que os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade não apresentaram indícios nem de edema pulmonar

nem hepático, os quais estão presentes em algumas condições patológicas, como na insuficiência cardíaca congestiva (Givertz et al., 2005; de Luca et al., 2006; Gheorghide et al., 2006). A ausência de edema pulmonar e hepático nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO vai de encontro a uma possível presença de insuficiência cardíaca congestiva nos animais utilizados no presente estudo.

Porém, Brum e colaboradores (2002) demonstraram que, enquanto os animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 1 mês de vida não apresentavam alteração na capacidade de realizar exercício físico e no consumo máximo de oxigênio, os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 4 meses de vida apresentavam uma capacidade de realizar exercício reduzida e um decréscimo no consumo máximo de oxigênio quando comparado ao respectivo WT (Brum et al., 2002). Adicionalmente, aos 4 meses de idade os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO tinham um decréscimo da função cardíaca caracterizado por um decréscimo na contratilidade e na velocidade de relaxamento cardíaca em comparação ao animal WT (Brum et al., 2002).

Assim como observado aos 4 meses de idade, aos 6 meses de idade os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO apresentaram uma capacidade de realizar exercício reduzida e decréscimo no consumo máximo de oxigênio quando comparado ao respectivo WT (Brum et al., 2002). Além disso, enquanto os animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 1 mês de vida não apresentaram alteração na fração de encurtamento e do diâmetro sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo, os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 6 meses de idade apresentaram uma redução da fração de encurtamento e um aumento do diâmetro sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo em relação ao respectivo WT, parâmetros esses avaliados através da realização de ecocardiogramas (Brum et al., 2002).



Recentemente o grupo de Brum demonstrou que aos 3 meses de idade não foram observadas diferenças na fração de encurtamento entre os animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO e WT, porém, aos 5 e 7 meses de idade foi observado uma redução da fração de encurtamento nos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO quando comparado aos respectivos WT, o que indica que estes animais, assim como observado aos 6 meses de idade, apresentam um prejuízo da função sistólica (Medeiros et al., 2005; Rolim et al., 2005, 2007).

Assim, os resultados descritos da literatura (Brum et al., 2002; Medeiros et al., 2005; Rolim et al., 2005, 2007) indicam a manutenção da característica fenotípica de insuficiência cardíaca desse modelo de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática. Porém, os animais utilizados no presente estudo apesar de apresentarem uma hiperestimulação simpática não apresentam indícios de insuficiência cardíaca congestiva.

O sistema nervoso simpático, além de exercer seus efeitos sobre o tecido cardíaco, também exerce influência sobre os vasos sanguíneos, através de receptores adrenérgicos presentes nas células de músculo liso vascular e nas células endoteliais, regulando o fluxo sanguíneo e a resistência periférica total (Guimarães, Moura, 2001). Desse modo, neste projeto de pesquisa foram avaliados os efeitos da hiperatividade simpática na função vascular dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO de maneira dependente do tempo aos 3, 5 e 7 meses de idade.

## 5.2. Os efeitos do aumento do tônus simpático nos vasos sanguíneos

### 5.2.1 Relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina e independente do endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio

Para avaliar o relaxamento dependente do endotélio foi utilizado um agonista muscarínico, a acetilcolina, o qual tem sido amplamente utilizado para avaliação do relaxamento dependente do endotélio desde quando Furchgott e Zawadzki (1980) demonstraram o papel obrigatório do endotélio na vasodilatação induzida por este agonista.

Nos anéis de aorta dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 3, 5 e 7 meses de idade, pré-contraídas com fenilefrina, a acetilcolina induziu um relaxamento na dependência da concentração utilizada. Já foi descrito em aorta de camundongos C57BL6/J, que similarmente ao que ocorre na aorta de ratos, o relaxamento induzido pela acetilcolina parece ocorrer principalmente via indução da síntese e liberação do fator vasodilatador dependente do endotélio, o óxido nítrico (NO), uma vez que a administração do inibidor não específico da sintase de NO (NOS), o L-NAME é capaz de abolir este relaxamento (Zhou et al., 2005). Porém, nos presentes resultados, em todas as idades estudadas, não foram observadas diferenças significativas no relaxamento à acetilcolina entre os animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO. Assim, nesta situação, a hiperatividade simpática encontrada nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO parece não ser capaz de induzir um prejuízo do relaxamento dependente do endotélio nos anéis de aorta.

Diferentes leitos vasculares tanto em humanos como em animais experimentais, com doenças que cursam com aumentada atividade simpática, por

exemplo, insuficiência cardíaca e hipertensão essencial, têm classicamente apresentado uma redução do relaxamento dependente do endotélio o qual está associado ao aumento de resistência vascular periférica, característico da insuficiência cardíaca (Kaiser et al., 1989; Kubo et al., 1991; Katz et al., 1992, 1993; Teerlink et al., 1993; Nakamura et al., 1994; Wang et al., 1994; Cannan et al., 1996; Gaballa, Goldman, 1999; Gschwend et al., 2003). Além disso, dados experimentais sugerem que vasos sanguíneos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e de pacientes com hipertensão essencial apresentam redução do relaxamento dependente do endotélio (Konishi, Su, 1983; Panza et al., 1990; Treasure et al., 1993). No entanto, Teerlink e colaboradores (1993) demonstraram que a disfunção endotelial em modelos de ratos com insuficiência cardíaca induzida por ligadura da artéria coronária é um processo progressivo e dependente do tempo, apresentando um menor papel em estágios iniciais da insuficiência cardíaca. Esses autores estudaram o relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos após 1, 4 e 16 semanas da ligadura da artéria coronária. Com 1 semana após o infarto, os anéis de aorta não demonstraram evidências de disfunção endotelial, entretanto, um progressivo desvio para a direita na curva concentração-resposta à acetilcolina e uma diminuição do relaxamento máximo foi observado após 4 e 16 semanas de infarto quando comparado com os ratos controle. Sendo assim, a disfunção endotelial nem sempre está presente, e parece ocorrer na dependência de diversos fatores como o tipo de leito vascular estudado; a espécie e o gênero do animal; o tipo de enfermidade estudada; o tempo; e conseqüentemente, a severidade da doença.

Neste projeto, além do relaxamento dependente do endotélio, também foi avaliado o relaxamento independente do endotélio utilizando o nitroprussiato de sódio, um doador de óxido nítrico.

Similarmente ao observado no relaxamento à acetilcolina, não foram observadas diferenças significativas no relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio entre os animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO nas idades estudadas. Este resultado demonstra que, possivelmente, os mecanismos celulares do músculo liso vascular envolvidos no relaxamento não estão alterados pela hiperatividade simpática encontrada nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO durante os períodos estudados.

A não modificação da função da célula de músculo liso vascular à ação de nitrovasodilatadores, ou seja, a ausência de modificações nos elementos responsivos ao óxido nítrico na célula de músculo liso vascular, também tem sido demonstrado em outros modelos animais de insuficiência cardíaca, os quais apresentam um aumento da atividade simpática. Assim, a artéria femoral de cães com insuficiência cardíaca induzida por implantação de marcapasso ectópico ventricular (Kaiser et al., 1989) e a aorta de ratos com insuficiência cardíaca induzida pela ligadura da artéria coronária (Teerlink et al., 1993; Gschwend et al., 2003) apesar de apresentarem significativa redução do relaxamento dependente do endotélio, não apresentam alterações significativas no relaxamento à nitroglicerina. Porém, em alguns modelos de hipertensão, onde também há hiperatividade simpática, a resposta de relaxamento aos nitrovasodilatadores pode estar prejudicada ou até mesmo aumentada. Bauersachs e colaboradores (1998) demonstraram que em aorta e artéria coronária de SHR, a resposta ao nitroprussiato de sódio foi de menor magnitude quando comparado ao controle. E, em experimento utilizando

perfusão do leito mesentérico, *in situ*, de SHR sugere-se que a vasodilatação ao nitroprussiato de sódio esteja aumentada (Chang et al., 2002).

Vale ressaltar que a resposta de relaxamento ao nitroprussiato de sódio, assim como a resposta de relaxamento à acetilcolina, depende de diversos fatores, por exemplo, o tipo de enfermidade avaliada; a espécie do animal; o leito vascular; o tempo; e a severidade da doença. Sendo assim, neste projeto, a hiperatividade simpática presente nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade não foi suficiente para promover uma alteração tanto no relaxamento dependente do endotélio como diretamente na célula de músculo liso vascular de anéis de aorta.

#### *5.2.2. Resposta vasodilatadora induzida pelo isoproterenol*

No sistema cardiovascular, os receptores  $\beta$ -adrenérgicos desempenham importantes funções, tanto em nível cardíaco, como visto anteriormente, mas também em nível vascular.

Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos estão localizados nos vasos sanguíneos e, quando estimulados, promovem uma resposta vasodilatadora. Em aorta de ratos, o relaxamento via receptor  $\beta$ -adrenérgico foi descrito sendo totalmente dependente do endotélio (Gray, Marshall, 1992). Porém, outros autores sugerem que este relaxamento é independente do endotélio (Eckly, Lugnier, 1994; Rascado, Bendhack, 2005). E, em contrapartida, a maioria dos trabalhos descritos na literatura até o presente momento tem demonstrado que este relaxamento ocorre tanto na presença do endotélio quanto na ausência do endotélio, onde a resposta vasodilatadora seria devida tanto a uma ação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos nas células de músculo liso vascular quando a uma ação desses receptores nas células

endoteliais (Kamata et al., 1989; Akimoto et al., 2002; Briones et al., 2005; Mallem et al., 2005).

Atualmente acredita-se que nas células de músculo liso vascular a estimulação do receptor  $\beta$ -adrenérgico promoveria uma vasodilatação pela ativação da via adenilato ciclase-AMPC-PKA, a qual promove hiperpolarização e diminui a sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{2+}$  (Rembold, Chen, 1998). E, nas células endoteliais, a ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos induziria uma vasodilatação a qual seria mediada principalmente pela síntese de óxido nítrico (Blankesteyin, Thien, 1993; Dawes et al., 1997; Xu et al., 2000; Akimoto et al., 2002; Ferro et al., 2004) e, em alguns vasos, através da liberação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Dessy et al., 2004).

Sabe-se que a exposição prolongada dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos a níveis elevados de catecolaminas endógenas como a noradrenalina e a adrenalina ou sintéticas como o isoproterenol, induz à sua dessensibilização e *down-regulation* destes receptores, de modo que, em alguns estados patológicos associados à hiperestimulação simpática ou ao mimetismo deste por administração de drogas simpatomiméticas podem apresentar anormalidades no relaxamento vascular induzido pela estimulação da via  $\beta$ -adrenérgica. Essa redução da vasodilatação induzida por sua hiperestimulação, principalmente pelas catecolaminas endógenas, pode levar a um inadequado grau de vasoconstrição periférica e contribuir assim para um aumento da pós-carga cardíaca, e por fim, aumentar a malignidade do estado patológico.

Em vasos sanguíneos de SHR, tem sido demonstrado: redução da vasodilatação induzida pela estimulação  $\beta$ -adrenérgica (Michel et al, 1990), um menor número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Conyers et al., 1995), desacoplamento

da interação receptor  $\beta$ -adrenérgico-proteína  $G_s$ -adenilato ciclase (Conyers et al., 1997) e níveis elevados da quinase do receptor  $\beta$ -adrenérgico ( $\beta$ ARK), a qual fosforila o receptor  $\beta$ -adrenérgico e assim promove dessensibilização do mesmo (Gros et al., 2000).

Gaballa e colaboradores (2001), demonstraram que as aortas isoladas de ratos com insuficiência cardíaca após infarto agudo do miocárdio apresentam redução do relaxamento induzido pelo isoproterenol, acompanhada de reduções na densidade dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos e nos níveis de AMPc e GMPc, ao mesmo tempo em que há aumento da quantidade de  $\beta$ ARK.

Em ratos tratados cronicamente com isoproterenol, um modelo experimental de hiperestimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, observa-se uma redução da resposta vasodilatadora à administração aguda de isoproterenol (Hayes et al., 1986) a qual tem sido atribuída à dessensibilização e/ou *down-regulation* dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos vasculares (Harden et al., 1983; Kimura et al., 1993). Entretanto, Davel e colaboradores (2006) não observaram alteração na resposta vasodilatadora induzida agudamente pela administração de isoproterenol em aorta de ratos tratados por 7 dias com esse agonista  $\beta$ -adrenérgico em menores doses do que a utilizada por Hayes e colaboradores (1986). Esta não modificação do relaxamento ao isoproterenol, nestes ratos, foi justificada como sendo devida a uma relativa resistência a *down-regulation* do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Cohen, Schenck, 1987) e uma possível *up-regulation* do receptor  $\beta_3$ -adrenérgico, a qual pode ocorrer quando os receptores  $\beta_1$ - e  $\beta_2$ -adrenérgicos estão em *down-regulation* (Rohrer et al., 1999; Moniotte et al., 2001). Assim, corroborando os resultados de Davel e colaboradores (2006), apesar da hiperestimulação destes receptores pelo nível elevado de catecolaminas circulantes, as aortas dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7

meses de idade não apresentaram uma alteração na resposta de relaxamento mediada pelos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, indicando que a hiperatividade simpática neste modelo experimental não parece ser capaz de dessensibilizar a via  $\beta$ -adrenérgica vascular.

### *5.2.3. Resposta vasodilatadora induzida pela clonidina*

É claro na literatura que a estimulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos nas células endoteliais promove um relaxamento através da liberação dos fatores de relaxamento derivados do endotélio (Matsuda et al., 1985; Miller, Vanhoutte, 1985; Flavanhan et al., 1989; MacLean et al., 1993; Bryan et al., 1996; Bockman et al., 1996; Zschauer et al., 1997; Nishina et al., 1999; Atalik et al., 2000; Figueroa et al., 2001; Molin, Bendack, 2005; Shafaroudi et al., 2005). Esta função vasodilatadora dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos pode ser essencial para a regulação do fluxo sanguíneo após um aumento da descarga simpática, pois estes fatores de relaxamento liberados após estimulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos pode contrabalancear a excessiva vasoconstrição mediada principalmente pelos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.

Esta moderação da vasoconstrição mediada pelos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos após uma descarga simpática é de fundamental importância principalmente nos leitos vasculares onde uma vasoconstrição excessiva poderia ser prejudicial para o funcionamento de um órgão. Neste sentido, Zou e Cowley (2000) demonstraram que a infusão intravenosa de noradrenalina, em uma concentração subpressórica, não alterou o fluxo sanguíneo da medula renal de ratos, porém foi observado um aumento da liberação de NO, e, na presença de antagonistas dos receptores  $\alpha_2$ -



adrenérgicos observou-se uma redução do fluxo sangüíneo medular e uma redução da liberação de NO. Estes resultados sugerem que, neste leito, a noradrenalina estimula os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos na célula endotelial levando a liberação de NO.

Em aortas com endotélio de camundongos, Shafaroudi e colaboradores (2005) demonstraram que a estimulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos promoveu um relaxamento na dependência da concentração utilizada o qual foi bloqueado por antagonistas dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos e pela remoção do endotélio, o que sugere que, na aorta de camundongos, o relaxamento após estimulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, ocorre devido à estimulação de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos presentes na célula endotelial mediante liberação de fatores de relaxamento. Além disso, neste estudo estes pesquisadores demonstraram que o relaxamento mediado por agonistas dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos era somente mediado pelo subtipo de receptor adrenérgico  $\alpha_{2A}$ , uma vez que em camundongos com deleção para os receptores  $\alpha_{2A}$ -adrenérgicos este relaxamento não era observado. Estes resultados vão ao encontro de trabalhos prévios descritos na literatura, os quais, utilizando técnicas farmacológicas, demonstraram que o relaxamento mediado por agonistas dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, tanto em arteríolas coronarianas de porcos quanto no leito vascular mesentérico e na artéria mesentérica superior de ratos, ocorre por meio do subtipo  $\alpha_{2A}$  (Bockman et al., 1993, 1996; Figueroa et al., 2001). Porém vale ressaltar que existem poucos trabalhos na literatura que buscam avaliar o subtipo de receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico responsável pela vasodilatação dependente do endotélio, já que não existem drogas suficientemente seletivas para os subtipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. Assim, a função fisiológica e o potencial terapêutico destes receptores ainda não foram totalmente elucidados,

e, com os trabalhos publicados até o momento, acredita-se que o subtipo de receptor  $\alpha_{2A}$ -adrenérgico parece estar modulando a resposta de relaxamento dependente do endotélio mediada por agonistas dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos.

Sabendo que os camundongos utilizados no atual projeto de pesquisa apresentam deleção de 2 dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos ( $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ ) e que, dentre os subtipos deletados, o subtipo  $\alpha_{2A}$  parece ser importante para o relaxamento induzido pela estimulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, no presente projeto foi avaliado nas aortas dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO e WT, com 3 meses de idade, o relaxamento mediado pela clonidina, um agonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, como uma manobra para se confirmar a ausência dos subtipos de receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ - adrenérgicos.

No atual projeto de pesquisa, assim como descrito por Shafaroudi e colaboradores (2005), a clonidina, um agonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, promoveu um relaxamento na dependência da concentração utilizada nas aortas dos camundongos WT. Nos anéis de aorta dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO também foi observado um relaxamento dependente da concentração, porém, tanto a sensibilidade quanto a resposta máxima de relaxamento à clonidina encontram-se reduzidas nestas aortas quando comparada aos animais WT. Assim, enquanto Shafaroudi e colaboradores (2005) demonstraram que em aortas de camundongos o relaxamento após estimulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos era mediado somente pelo subtipo  $\alpha_{2A}$ , o presente estudo demonstra que o subtipo  $\alpha_{2B}$  também pode auxiliar no relaxamento mediado pelos agonistas dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. Assim, é possível que em aortas de camundongos o relaxamento dependente do endotélio após estimulação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos também ocorra através do subtipo  $\alpha_{2B}$ , e como este relaxamento não foi similar ao observado nas aortas dos

camundongos WT, outros subtipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, podem estar envolvidos.

Além disso, uma outra possível explicação para o presente achado é a de que nas aortas dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, ocorra uma *up-regulation* do subtipo do receptor  $\alpha_{2B}$ -adrenérgico na ausência dos subtipos de receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos, de modo a compensar a perda dos outros subtipos. E dessa forma, observou-se neste projeto um relaxamento mediado pelo subtipo de receptor  $\alpha_{2B}$ -adrenérgico, o qual não foi observado no modelo de camundongo com deleção do subtipo de receptor  $\alpha_{2A}$ -adrenérgico estudado por Shafaroudi e colaboradores (2005).

Além do mais, a discrepância de resultados encontrada entre o presente estudo e o de Shafaroudi e colaboradores (2005) pode ter ocorrido pois existem diferenças fisiológicas entre os camundongos com deleção do subtipo de receptor  $\alpha_{2A}$ -adrenérgico e os camundongos duplos nocautes para os subtipos  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos. Assim, Hein e colaboradores (1999) avaliaram as conseqüências fisiológicas, tais como a hemodinâmica cardíaca e a razão peso dos ventrículos cardíacos/peso corporal como um índice de hipertrofia cardíaca, entre os camundongos WT, os camundongos com deleção para o subtipo de receptor  $\alpha_{2A}$ -adrenérgico e para camundongos duplos nocautes para os subtipos de receptor  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos. Neste trabalho foi demonstrado que somente os animais duplos nocautes para os subtipos de receptor  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos apresentaram um aumento de noradrenalina plasmática, um aumento da freqüência cardíaca, uma hipertrofia cardíaca e uma redução da contratilidade cardíaca (redução da  $dP/dt+$ ; derivada de pressão sobre a derivada de tempo positiva) quando comparado ao animal WT. Logo, pode-se concluir que somente os camundongos duplos nocautes

para os subtipos de receptor  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos apresentam um aumento da atividade simpática, a qual é capaz de induzir uma cardiomiopatia (Hein et al., 1999). Assim, diante das diferenças descritas entre os dois tipos de animais nocautes, é possível que as artérias dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO apresentem um maior relaxamento mediado pelo subtipo de receptor  $\alpha_{2B}$ -adrenérgico como um mecanismo compensatório a uma maior atividade simpática e a uma disfunção cardíaca, de modo a manter uma adequada perfusão e assim manter a homeostasia e sobrevivência destes animais.

Após avaliação da resposta do relaxamento dependente do endotélio, independente do endotélio, das vias  $\beta$ - e  $\alpha_2$ -adrenérgicas nas aortas de camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, foram avaliadas as respostas contráteis nas aortas destes animais.

#### *5.2.4. Resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl)*

Ao adicionar cloreto de potássio no banho, avalia-se a viabilidade do músculo liso vascular pois, ao aumentar a concentração de  $K^+$  extracelular, reduz-se o efluxo de  $K^+$  da célula muscular lisa pelos canais para  $K^+$  da membrana celular, e assim, o meio intracelular torna-se menos negativo e despolariza-se. A despolarização leva a abertura de canais para  $Ca^{+2}$  sensíveis à voltagem presentes na membrana da célula muscular lisa promovendo o influxo de  $Ca^{+2}$ . Esta contração, sendo independente da ativação de receptores, é um bom mecanismo para se avaliar o aparato contrátil da célula de músculo liso vascular.

Teerlink e colaboradores (1994), descreveram uma diminuição da contração ao KCl em anéis de aorta com e sem endotélio de ratos com insuficiência cardíaca após 1 semana de infarto. Logo, neste modelo experimental de insuficiência cardíaca, o músculo liso vascular apresentou uma função anormal no aparato contrátil. Entretanto, em camundongos, não há trabalhos demonstrando o papel da hiperatividade simpática na contração induzida pelo KCl.

No presente estudo, em todas as idades estudadas, a contração induzida pelo KCl nas aortas com endotélio de camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO foi de mesma magnitude quando comparada com a contração na aorta com endotélio dos animais WT. Assim, este resultado nos permite inferir que o aumento do tônus simpático presente nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO não foi capaz de induzir uma alteração na maquinaria contrátil da célula de músculo liso vascular.

Com a retirada do endotélio, em alguns anéis de aorta, observou-se uma redução da contração ao KCl quando comparada ao seu respectivo anel com endotélio. Este resultado foi observado nos anéis sem endotélio do grupo  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3 e 5 meses, e, WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 7 meses. A remoção do endotélio neste projeto é realizada por fricção mecânica de fios metálicos no lúmen do vaso. Como a aorta de camundongo é um vaso muito pequeno e delicado, é possível que durante a retirada do endotélio nos anéis dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO a camada de músculo liso vascular tenha sido parcialmente afetada, o que provocou esta redução da contração ao KCl.

Sendo assim, para manter a viabilidade muscular dos anéis sem endotélio a serem estudados, foi estabelecido que somente os anéis com contração ao KCl igual ou acima de 300mg seriam utilizados para o estudo de reatividade vascular.

### 5.2.5. Resposta vasoconstritora à fenilefrina e à serotonina

O tônus vascular é uma resultante das capacidades de relaxamento e contração do vaso sanguíneo, de maneira que, além do prejuízo no efeito de agentes vasodilatadores, o aumento da responsividade a agonistas contráteis pode contribuir para o aumento do estado contrátil do músculo liso vascular, e assim participar da gênese e manutenção do aumento da resistência periférica em diferentes estados patológicos como na hipertensão e na insuficiência cardíaca (Teerlink et al., 1993; 1994; Dohi et al., 1996), estados estes que possuem uma elevação do tônus simpático. Sendo assim, neste projeto foi avaliada a contração a dois agonistas contráteis, fenilefrina e serotonina.

A fenilefrina é um agonista do receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, e este tipo de receptor  $\alpha$ -adrenérgico é o principal envolvido na contração vascular após estimulação simpática. Assim, em patologias que apresentam um aumento do tônus simpático podem-se observar alterações na resposta contrátil nos vasos sanguíneos induzida por este agonista. Além de avaliar a contração à fenilefrina, neste projeto também foi avaliada a resposta contrátil da aorta à serotonina, um agonista do receptor 5-HT. Este receptor, quando estimulado, induz contração utilizando a mesma via intracelular do receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, ou seja, aumentando a formação de  $IP_3$  e DAG, porém via distintos receptores de membrana. Assim, uma alteração no número dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos ou na via intracelular mediada por esse receptor poderia ser detectada.

No presente projeto, a resposta contrátil a fenilefrina não foi alterada nos anéis de aorta com endotélio dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 3, 5 e 7 meses de idade. Em concordância com estes resultados a contração à serotonina também não

foi alterada em todas as idades estudadas. Logo, estes resultados sugerem que as respostas contráteis parecem não estar alteradas pela hiperatividade simpática induzida pela deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos em camundongos.

Davel e colaboradores (2006) demonstraram, em anéis de aorta de ratos tratados com isoproterenol (0,3 mg/ kg/ dia) por 1 semana, um aumento da reatividade vascular tanto à fenilefrina como à serotonina quando comparados com animais controle, indicando que a hiperestimulação por 7 dias dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos exacerba a resposta contrátil vascular por um mecanismo comum aos dois agonistas contráteis. Em contraposição, Hayes e colaboradores (1986), demonstraram que a resposta contrátil à noradrenalina e à serotonina em aorta e veia porta de ratos tratados por quatro dias com isoproterenol, na dose de 9,6 mg/ kg/ dia, foi similar a de ratos controle. A diferença na resposta contrátil neste modelo experimental poderia ser atribuída à diferença na dose de isoproterenol utilizada entre nestes estudos, isto é, diferenças no padrão de estimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos e no efeito tóxico das catecolaminas em níveis muito elevados.

A interação entre alteração neuro-humoral encontrada na insuficiência cardíaca e receptores adrenérgicos no miocárdio tem sido extensivamente estudada. Porém, alterações nos receptores adrenérgicos presentes nos leitos vasculares têm sido menos caracterizados e os poucos resultados encontrados até o presente momento são bastante contraditórios.

Pereira e colaboradores (2005) observaram, no leito arterial caudal de ratos com insuficiência cardíaca 4 semanas após o infarto do miocárdio, que a resposta contrátil à fenilefrina estava reduzida quando comparada aos animais controles. Entretanto, uma inalterada reatividade aos agonistas dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos também pode ser encontrada em artérias de ratos com insuficiência cardíaca 3

meses após indução de infarto do miocárdio induzida por infarto do miocárdio, por exemplo, em artérias de resistência femoral e do leito mesentérico e em aorta abdominal (Mulder et al., 1997). E, utilizando este mesmo modelo experimental, também foi observado que esta contração pode estar aumentada. Neste sentido foi demonstrado que 1 semana após o infarto do miocárdio observa-se um aumento da resposta contrátil à noradrenalina na aorta destes animais (Teerlink et al., 1994). Um aumento da resposta contrátil também foi demonstrado em arteríolas de resistência do leito mesentérico de ratos duas (Koida et al., 2006) e seis semanas após o infarto do miocárdio (Miller et al., 2000).

Sabe-se que o aumento da resposta contrátil contribui para o aumento da resistência vascular periférica a qual promove um aumento da pós-carga cardíaca e favorece a progressão do quadro de insuficiência cardíaca. Em contrapartida, a diminuição e/ou a não alteração da resposta vasoconstritora a agonistas contráteis, como encontrado nos animais  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, poderia ser um possível mecanismo compensatório se contrapondo à instalação desse quadro.

#### *5.2.6. Modulação endotelial na resposta vasoconstritora à fenilefrina*

Um desequilíbrio na síntese, liberação e/ou no efeito de fatores endoteliais capazes de relaxar e contrair o músculo liso vascular caracteriza a disfunção endotelial, que pode se manifestar como uma redução na vasodilatação dependente do endotélio e/ou como aumento na resposta a agentes vasoconstritores (de Artiñano, Gonzales, 1999). A disfunção endotelial pode contribuir para o aumento da resistência periférica e assim contribuir para a gênese e manutenção da hipertensão, para o aumento da pós-carga cardíaca e progressão para insuficiência cardíaca, de



maneira que se sugere que a disfunção endotelial pode ser um indicador de morbidade e mortalidade em pacientes com doenças cardiovasculares (Hednet, Sun, 1997).

Apesar do relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina não estar modificado, a modulação exercida pelo endotélio sobre a resposta contrátil a agentes vasoconstritores pode estar alterada. Neste sentido, em anéis de aorta de ratos tratados com isoproterenol (0,3 mg/ Kg/ dia) por 1 semana, apesar do relaxamento à acetilcolina não estar alterado, foi observado um aumento da contração à fenilefrina devido a um prejuízo da modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina, o qual foi associado com um aumento da geração de ânion superóxido promovido pelo desacoplamento da atividade da sintase de óxido nítrico (NOS) (Davel et al., 2006). Este aumento de ânion superóxido inativa parte do NO produzido no basal pela atividade da NOS, contribuindo para o aumento da contração à fenilefrina (Davel et al., 2006).

Adicionalmente, 1 semana após o infarto do miocárdio em ratos, o relaxamento à acetilcolina na aorta ainda está preservado, enquanto uma resposta aumentada à noradrenalina está presente (Teelink et al, 1994). Este aumento da resposta contrátil à noradrenalina ocorreu devido a uma perda da modulação endotelial mediada pelo NO na resposta contrátil (Teelink et al, 1994). Assim, 1 semana após o infarto do miocárdio já se observa uma modificação da modulação endotelial mesmo com um inalterado relaxamento à acetilcolina. Além disso, como o relaxamento à acetilcolina na aorta estava prejudicado 4 semanas após o infarto do miocárdio (Teerlink et al., 1993), é possível que uma disfunção endotelial possa estar presente em diferentes graus de severidade dependendo, por exemplo, da

fase evolutiva na qual o quadro patológico se encontra, e acredita-se que quanto maior o tempo de instalação da doença maior o prejuízo da função endotelial.

No atual projeto de pesquisa, a modulação endotelial sobre a contração induzida pela fenilefrina não foi alterada em nenhuma das idades estudadas. Assim, até o presente momento, acredita-se que apesar da hiperatividade simpática, os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO não apresentaram alteração nas vias de contração e na modulação do endotélio sobre a resposta contrátil, sugerindo que o grau de hiperatividade simpática presente nestes animais não é capaz de alterar significativamente a contração vascular, ou pode ser que neste modelo haja a ativação de mecanismos compensatórios que mantenham o funcionamento adequado vascular.

#### *5.2.7. Papel do cálcio intracelular e extracelular na resposta vasoconstritora à fenilefrina*

As catecolaminas, principalmente a noradrenalina, podem atuar como potentes vasoconstritores via estimulação dos receptores  $\alpha_1$ - e  $\alpha_2$ -adrenérgicos no músculo liso vascular. Assim, em situações em que haja aumento dos níveis de catecolaminas locais e/ou circulantes, como na insuficiência cardíaca, um aumento da vasoconstrição induzida por estas substâncias poderia contribuir para um aumento da resistência periférica e agravamento da doença (Teerlink et al., 1993). A estimulação dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos na célula muscular lisa desencadeia cascatas de reações intracelulares que culminam com aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e da sensibilidade das proteínas contráteis a este íon. Este aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico deriva de duas fontes principais: o meio extracelular, através do influxo de

$\text{Ca}^{2+}$  pelos canais para cálcio operados por receptor e pelos canais para cálcio sensíveis à voltagem da membrana plasmática; e os estoques intracelulares, principalmente o retículo sarcoplasmático, que libera  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais sensíveis à  $\text{IP}_3$ . A relativa contribuição de cada uma destas fontes para a geração de força varia entre os diferentes tipos de artérias (Cauvin et al., 1988). Assim, a manutenção do equilíbrio na mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  é importante para a geração de um tônus vascular adequado, de maneira que alterações nesta regulação podem resultar em aumento da reatividade vascular a agentes contráteis.

No presente trabalho, foi investigada a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  na resposta contrátil induzida pela fenilefrina nas aortas de camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade pois, mesmo sem alteração da resposta contrátil à fenilefrina, a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares e do meio extracelular poderia estar diferentemente modulada pelo aumento da atividade simpática. Neste sentido, Grifoni e Bendhack (2004) demonstraram que as aortas de ratos hipertensos induzidos pela administração crônica de L-NAME apresentaram reatividade vascular à fenilefrina similar a de aortas controle, entretanto observou-se um aumento da liberação de cálcio dos estoques intracelulares, que foi parcialmente compensada pela redução do influxo de cálcio. Além do mais, foi demonstrado pelo grupo de Brum que o tecido cardíaco dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 5 e 7 meses de idade apresentaram uma diminuição da expressão protéica da cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA 2A), a qual está associada a uma menor recaptção de cálcio para o retículo sarcoplasmático no tecido cardíaco e conseqüentemente, leva a uma diminuição da concentração pico de cálcio durante a sístole (Medeiros et al., 2005; Rolim et al., 2005, 2007).

Porém, nas aortas de camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade as vias de mobilização de cálcio, liberação de cálcio do retículo e influxo de cálcio através da membrana extracelular, não foram alteradas pelo aumento do tônus simpático.

Bendhack e colaboradores (1992) demonstraram que em células isoladas de aorta de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) há um aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  induzido pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), assim como da liberação de  $Ca^{2+}$  de estoques intracelulares em resposta a angiotensina II. Estes resultados sugerem que o aumento da mobilização de cálcio dos meios intra e extracelulares, em artérias de animais hipertensos SHR, poderia estar contribuindo para a gênese e manutenção do aumento da reatividade vascular a agentes contráteis e do remodelamento vascular. Corroborando estes dados, o tratamento com bloqueadores dos canais para cálcio parece ser mais efetivo em reduzir a pressão arterial e a reatividade vascular de ratos hipertensos SHR do que de normotensos (Atkinson et al., 1988). O aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  pelos canais para cálcio sensíveis à voltagem parece estar em íntima associação com os níveis de pressão arterial. Neste sentido, Storm e Webb (1993) demonstraram que anéis de aorta de ratos hipertensos e com hipertrofia cardíaca por coarctação da aorta apresentam aumento da resposta contrátil ao Bay K 8644 (agonista dos canais de cálcio sensíveis à voltagem do tipo L) apenas no segmento acima da coarctação.

Porém, ao encontro dos resultados obtidos no presente estudo, em aorta de ratos tratados cronicamente com isoproterenol, a mobilização de  $Ca^{2+}$ , proveniente tanto dos estoques intracelulares quanto do meio extracelular, em resposta a contração induzida pela fenilefrina foi de mesma magnitude quando comparado ao animal controle (Davel, 2003).

Assim, apesar de alterações no influxo e liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  terem importante papel no aumento do tônus vascular e na manutenção da hipertensão em ratos SHR, os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3, 5 e 7 meses de idade, que apresentam níveis controle de pressão arterial, a mobilização dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  na musculatura lisa da aorta não está alterada neste modelo, assim como os animais tratados com isoproterenol.

#### *5.2.8. Efeitos da hiperatividade simpática em diferentes vasos sanguíneos*

A inervação simpática nos vasos sanguíneos ocorre de maneira diferencial dependendo do tipo de vaso e de sua localização. As artérias elásticas, como a aorta, têm inervação escassa, enquanto que artérias de pequeno calibre (<300  $\mu\text{m}$ ) são ricas em terminações nervosas simpáticas (Nilsson, 1985, 1986; Stassen et al., 1998). Assim, após um aumento e/ou diminuição da descarga simpática pode-se observar diferenças na reatividade vascular entre uma artéria de grande e de pequeno calibre.

No atual projeto de pesquisa foi demonstrado que a hiperatividade simpática presente nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, apesar de induzir uma cardiopatia, não modificou a função vascular na aorta. Apesar da aorta ser um vaso fracamente inervado (Nilsson, 1985, 1986; Stassen et al., 1998), as células endoteliais estão em íntimo contato com o plasma sanguíneo e, conseqüentemente, com as catecolaminas circulantes, as quais encontram-se aumentadas no plasma dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO. Dessa forma, um aumento da atividade simpática poderia induzir uma disfunção endotelial na aorta e possivelmente induzir uma alteração na pós-carga cardíaca. Porém, como neste projeto não foi observado

alteração na função vascular da aorta, buscou-se avaliar a função vascular no leito vascular mesentérico dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 7 meses de idade. Vale ressaltar que este leito contém desde artérias de grande calibre até artérias de pequeno calibre as quais são intensamente inervadas pelo sistema nervoso simpático (Nilsson, 1985, 1986; Stassen et al., 1998). A abundante inervação destas artérias pelo sistema nervoso simpático torna este sistema a principal via eferente neural responsável, diretamente, pelo controle da resistência periférica total e, conseqüentemente, da pressão arterial e da pós-carga cardíaca.

Diversos trabalhos na literatura têm demonstrado que as alterações vasculares presentes em algumas patologias ocorre na dependência do tipo de vaso, ou seja, pode estar presente somente em vasos de pequeno calibre, enquanto que os vasos de grande calibre podem estar funcionalmente normais, já que as artérias de resistências respondem diferentemente dos vasos de condutância. Por exemplo, em grandes artérias como a aorta o relaxamento dependente do endotélio é principalmente mediado pelo NO, ao passo que, em pequenas artérias e arteríolas esse relaxamento é majoritariamente mediado pelo EDHF (Shimokawa et al., 1996). Neste sentido, foi demonstrado que, no modelo experimental de ratos com infarto do miocárdio, o relaxamento dependente do endotélio, mediado pela acetilcolina estava inalterado na aorta, um vaso de grande calibre, e reduzido nas artérias mesentéricas de resistência (Thuillez et al., 1995). Além da dependência do tipo de vaso estudado, uma alteração da função vascular também ser leito específica, por exemplo, neste mesmo modelo experimental de ratos com infarto do miocárdio, o relaxamento à acetilcolina encontra-se inalterado na aorta e reduzido na artéria pulmonar (Baggia et al., 1997). Logo, estes resultados demonstram a importância de um estudo comparativo da função endotelial em diferentes tipos de vasos e leitos vasculares.

No atual projeto de pesquisa, a presença do endotélio no leito vascular mesentérico foi confirmada pelo relaxamento à acetilcolina. Como não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados, acredita-se que, assim como observado na aorta, a hiperatividade simpática presente nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO não foi capaz de alterar a função endotelial no leito vascular mesentérico.

Em outros modelos experimentais que apresentam uma hiperatividade simpática, como no modelo de ratos com insuficiência cardíaca induzida após o infarto do miocárdio, os estudos em arteríolas do leito mesentérico isoladas demonstraram que o relaxamento dependente do endotélio encontrava-se inalterado (Baggia et al., 1997; Xu et al., 2007), o que vai ao encontro dos resultados obtidos no presente estudo. Porém, outros trabalhos, utilizando o mesmo modelo experimental, observaram que o relaxamento à acetilcolina em arteríolas do leito mesentérico isoladas pode estar reduzido (Thuillez et al., 1995; Mulder et al., 1995, 1996). Provavelmente, esta discrepância de resultados encontrada neste modelo experimental ocorre na dependência do tempo após o infarto do miocárdio e da severidade da doença.

No entanto, além da resposta vasodilatadora, a resposta contrátil também pode estar alterada na dependência do leito e tipo de vaso estudado. Neste sentido a resposta contrátil às altas concentrações de  $K^+$  extracelular, à noradrenalina e à fenilefrina encontra-se inalterada na aorta de animais com insuficiência cardíaca induzida após o infarto do miocárdio, ao passo que, nas artérias de resistência do leito vascular mesentérico estas repostas contráteis encontram-se reduzidas (Stassen et al., 1997). Estes resultados demonstram a dependência do tipo de vaso para a presença de disfunção contrátil. Este trabalho também demonstrou que

mesmo entre os vasos de menor calibre existem diferenças na função contrátil, a qual irá depender do leito vascular estudado. Assim, estes pesquisadores demonstraram que, enquanto a resposta contrátil às altas concentrações de  $K^+$  extracelular, à serotonina e à arginina-vasopressina estava reduzida nas artérias de resistência do leito mesentérico, estas respostas contráteis estavam aumentadas nas artérias coronárias de resistência (Stassen et al., 1997). Além disso, Okumura e colaboradores (1996) demonstraram que, após o infarto do miocárdio em ratos, a contração à noradrenalina estava aumentada na aorta e na artéria pulmonar dos animais infartados, enquanto que, na artéria mesentérica superior não foi observada alteração nesta resposta contrátil.

Logo, no presente projeto, além do relaxamento à acetilcolina, também foi avaliada, no leito vascular mesentérico dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 7 meses de idade, a resposta contrátil induzida pelo aumento da concentração de  $K^+$  extracelular, de modo a avaliar a viabilidade muscular e a resposta contrátil máxima. E, assim como observado na aorta dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, a resposta contrátil do leito vascular mesentérico às altas concentrações de  $K^+$ , foi de mesma magnitude nos animais WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO, o que sugere que a maquinaria contrátil não foi alterada pelo aumento da atividade simpática neste modelo experimental. Corroborando o presente resultado, uma inalterada função do aparato contrátil também foi encontrada em outros modelos experimentais de hiperatividade simpática, como em arteríolas isoladas do leito mesentérico de ratos após o infarto do miocárdio (Bergdahl et al., 2001; Gschwend et al., 2003).

Adicionalmente, neste projeto também foi avaliada a resposta contrátil à noradrenalina no leito vascular mesentérico dos camundongos WT e  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 7 meses de idade. A noradrenalina é um agonista dos receptores adrenérgico e



pode atuar tanto nos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) quanto nos receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ). No entanto, Pérez-Rivera e colaboradores (2007) demonstraram que, em arteríolas do leito mesentérico isoladas de camundongos, a resposta contrátil à noradrenalina somente era mediada via receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Assim, no atual projeto de pesquisa, a contração mediada pelos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos foi avaliada tanto na aorta quanto no leito arterial mesentérico dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 7 meses de idade e, semelhante ao encontrado na aorta, a resposta contrátil via receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos no leito vascular mesentérico não foi alterada pelo aumento da atividade simpática presente nestes animais.

Em outros modelos que apresentam um aumento da atividade simpática, como no modelo de ratos com insuficiência cardíaca 3 meses após o infarto do miocárdio, foi demonstrado que a resposta contrátil à fenilefrina em arteríolas isoladas do leito mesentérico pode estar inalterada (Mulder et al., 1997), assim como observado no presente projeto, ou pode até mesmo estar aumentada quando avaliada neste modelo experimental duas (Koida et al., 2006) e seis (Miller et al., 2000) semanas após o infarto do miocárdio. Logo, ainda não é consenso a presença de alteração da função vascular contrátil no leito vascular mesentérico deste modelo experimental.

Um aumento da atividade nervosa simpática também está presente no modelo animal de hipertensão DOCA-sal, o qual apresenta um aumento dos níveis de catecolaminas circulantes (Schenk, McNeill, 1992; Moreau et al., 1995). A hiperatividade simpática presente neste modelo experimental parece estar relacionada a um prejuízo da função dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos em localização pré-sináptica, uma vez que, após a injeção intravenosa de yombina, um antagonista

dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, o animal controle apresenta um aumento dos níveis plasmáticos de noradrenalina, ao passo que no animal com hipertensão DOCA-sal não se observa alteração nos níveis de noradrenalina circulantes (Moreau et al., 1995). Adicionalmente, Luo e colaboradores (2004) demonstraram que nos nervos simpáticos associados a arteríolas do leito vascular mesentéricos de ratos com hipertensão DOCA-sal observa-se um prejuízo da função de auto-receptores dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. No entanto, apesar do aumento da atividade simpática presente neste modelo experimental, não foi observado alteração na reatividade vascular à noradrenalina em arteríolas do leito vascular mesentéricos de camundongos com hipertensão DOCA-sal (Perez-Rivera et al., 2007). Este resultado está de acordo com os obtidos no presente estudo onde a hiperatividade simpática presente nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO não foi capaz de induzir alteração na função vascular do leito vascular mesentérico destes animais.

Assim, apesar da hiperatividade simpática presente nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 7 meses de idade induzir uma cardiomiopatia, não foram observadas diferenças na reatividade vascular nem na aorta, um vaso de condutância, e nem no leito vascular mesentérico, um leito de resistência, dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO quando comparado ao respectivo WT.

# Sumário e Conclusão

## 6. SUMÁRIO E CONCLUSÃO

Com os resultados do presente estudo pode-se sumarizar que o aumento do tônus simpático encontrado nos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 3 meses de idade, evidenciado pelo aumento da frequência cardíaca, não foi capaz de induzir uma resposta hipertrófica no coração, assim como, na aorta a hiperatividade simpática também não alterou as vias relaxamento dependente do endotélio e independente do endotélio, bem como o relaxamento da via  $\beta$ -adrenérgica. Além disso, também não modificou as vias de contração e de mobilização de cálcio. No entanto, como estes camundongos não apresentavam dois dos subtipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos ( $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ ) a sensibilidade e a resposta máxima de relaxamento mediado pela clonidina, agonista do receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico, foi significativamente reduzida.

Já os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO com 5 e 7 meses de idade apresentaram um aumento da atividade simpática a qual foi evidenciada pelo aumento da frequência cardíaca. No entanto, apesar desta hiperatividade simpática induzir hipertrofia ventricular esquerda nestes animais, as respostas de relaxamento e de contração, a modulação endotelial e a mobilização de cálcio na aorta encontraram-se inalteradas. Assim como observado na aorta, as vias de contração e o relaxamento dependente do endotélio no leito vascular mesentérico dos camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO aos 7 meses de idade não foram alterados pelo aumento da atividade simpática presente neste modelo experimental.

Logo, estes resultados nos permitem concluir que existe dependência do tempo de exposição às catecolaminas para o desenvolvimento de alterações cardíacas a qual é evidenciada pelo fato de que com 3 meses de idade os camundongos  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ ARKO não apresentam indícios de hipertrofia cardíaca, o que já ocorre aos 5 e 7 meses de idade. Entretanto, com os dados de reatividade vascular pode-se inferir que a função vascular, avaliada tanto em um vaso que recebe uma escassa inervação simpática como a aorta quanto em um leito com intensa inervação simpática como o leito vascular mesentérico, é menos sensível do que o coração aos efeitos da hiperatividade simpática induzida pela deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos, uma vez que, em todas as idades estudadas, não foram observadas alterações vasculares significativas.

Como estes camundongos apresentam uma cardiomiopatia, é possível que uma função vascular preservada possa estar compensando uma possível disfunção cardíaca presente neste modelo experimental de modo a manter a homeostasia do organismo e a sobrevivência destes animais. Também não se pode descartar a hipótese de que, neste modelo experimental, o aumento do tônus simpático até os 7 meses de idade, pode não ser suficiente para estimular mecanismos de sinalização intracelulares nos vasos sanguíneos os quais podem levar a alterações na reatividade vascular e, conseqüentemente, na resistência vascular periférica e na pressão arterial.

# Referências

## REFERÊNCIAS

Ahlquist RF. A study of the adrenotropic receptors. *The American Journal of Physiology*. 1948; 153:586-600.

Akimoto Y, Horinouchi T, Shibano M, Matsushita M, Yamashita Y, Okamoto T, Yamaki F, Tanaka Y, Koike K. Nitric oxide (NO) primarily accounts for endothelium-dependent component of  $\beta$ -adrenoceptor-activated smooth muscle relaxation of mouse aorta in response to isoprenaline. *Journal of Smooth Muscle Research*. 2002; 38(4,5):87-99.

Altman JD, Trendelenburg AU, Macmillan L, Berstein D, Limbird L, Starke K, Kobilka B, Hein L. Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor knockout mice. *Molecular Pharmacology*. 1999; 56:154-61.

Anderson KM, Eckhart AD, Willette RN, Koch WJ. The myocardial  $\beta$ -adrenergic system in spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rats. *Hypertension*. 1999; 33: 402-407.

Atalik EK, Sahin AS, Kilic M, Dogan N. Role of the endothelium on the response to adrenoceptor agonist of rabbit aorta during cooling. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2000; 14(1):25-30.

Atkinson J, Sautel M, Sonnay M, Fluckiger JP, de Rivaz JC, Boillat N, Piton MC, Porchet PA, Armstrong JM, Fouda AK. Greater vasodepressor sensitivity to nicardipine in spontaneously hypertensive rats (SHR) compared to normotensive rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1988; 337:471-476.

Aukrust P, Ueland T, Müller F, Andreassen AK, Nordoy I, Aas H, Kjekshus J, Simonsen S, Froland SS, Gullestad L. Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1998; 97(12): 1136-1143.

Baggia S, Perkins K, Greenberg B. Endothelium-dependent relaxation is not uniformly impaired in chronic heart failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1997; 29(3): 389-396.

Bank AJ, Rector TS, Tschumperlin LK, Kraemer MD, Letourneau JG, Kubo SH. Endothelium-dependent vasodilation of peripheral conduit arteries in patients with heart failure. *Journal of Cardiac Failure*. 1994; 1(1): 35-43.

Bauersachs J, Bouloumie A, Mulsch A, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovascular Research*. 1998; 37(3):772-779.

Bauersachs J, Bouloumié A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increase vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation*. 1999; 100: 292-298.

Belch JJF, Bridges AB, Scott N, Chopra M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *British Heart Journal*. 1991; 65:245-248.

Bendhack LM, Sharma RV, Bhalla RC. Altered signal transduction in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1992; 19(2):142-148.

Bergdahl A, Valdemarsson S, Adner M, Sun XY, Hedner T, Edvinsson L. Enhanced endothelin-1-induced contractions in mesenteric arteries from rats with congestive heart failure: Role of ET<sub>B</sub> receptors. *European Journal of Heart Failure*, 2001; 3: 293-299.

Berthelsen S, Pettinger WA. A functional basis for the classification of  $\alpha$ -adrenoceptors. *Life Science*. 1977; 21:595-606.

Blankesteyn WM, Thien T. Effect of NG-monomethyl-L-arginine on the beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat mesenteric resistance arteries. *Life Science*. 1993; 52(16):PL135-PL139.

Bockman CS, Jefries WB, Abel PW. Binding and functional characterization of alpha-2 adrenergic receptor subtypes on pig vascular endothelium. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1993; 267(3):1126-1133.

Bockman CS, Gonzales-Cabrera I, Abel PW. Alpha-2 adrenoceptor subtype causing nitric oxide-mediated vascular relaxation in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1996; 278(3):1235-1243.

Bond RA. Is paradoxical pharmacology a strategy worth pursuing? *Trends in Pharmacological Sciences*. 2001; 22:273-276.



Boulpaep EL. Integrated control of the cardiovascular system. In: Boron WF, Boulpaep EL, editors. *Medical Physiology*. Pennsylvania: An Imprint of Elsevier Science; 2003. p.574-590.

Brede M, Nagy G, Philipp M, Sorensen JB, Lohse MJ, Hein L. Differential control of adrenal and sympathetic catecholamine release by  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes. *Molecular Endocrinology*. 2003; 17(8):1640-1646.

Briones AM, Daly CJ, Jimenez-Altayo F, Martinez-Revelles S, Gonzales JM, McGrath JC, Vila E. Direct demonstration of  $\beta_1$  and evidence against  $\beta_2$ - and  $\beta_3$ -adrenoceptors, in smooth muscle cells of rat small mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology*. 2005; 146(5):679-691.

Bristow MR. The adrenergic nervous system in heart failure. *The New England Journal of Medicine*. 1984; 311:850-851.

Bristow MR.  $\beta$ -adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation*. 2000; 101:558-569.

Brook RD, Julius S. Autonomic imbalance, hypertension, and cardiovascular risk. *American Journal of Hypertension: Journal of the American Society of Hypertension*. 2000; 13:112S-122S.

Brum PC, Kosek J, Patterson A, Bernstein D, Kobilka B. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. *American Journal of Physiology*. 2002; 283:H1838-H1845.

Bryan RM, Eichler MY, Swafford MW, Johnson TD, Suresh MS, Childres WF. Stimulation of alpha 2 adrenoceptors dilates the rat middle cerebral artery. *Anesthesiology*. 1996; 85(1):82-90.

Burnstock G. Innervation of vascular smooth muscle: histochemistry and electron microscopy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1975; 2 (Suppl):7-20.

Busatto VCW, Cunha V, Cicilini MA, Mill JG. Differential effects of isoproterenol on the activity of angiotensin- converting enzyme in the rat heart and aorta. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1999; 32: 355-360.

Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz JR, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Trendelenburg U. IV International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacological Reviews*. 1994; 46:121-136.

Calzada BC, de Artiñano AA. Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacological Research*. 2001; 44(3):195-205.

Cannan CR, McGoon MD, Holmes DR, Lerman A. Altered coronary endothelial function in a patient with asymptomatic left ventricular dysfunction. *International Journal of Cardiology*. 1996; 53:147-151.

Cauvin C, Weir SW, Buhler FR. Differences in  $Ca^{2+}$  handling along the arterial tree: an update including studies in human mesenteric resistance vessels. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1988; 12 (Suppl 6): S10-S5.

Chang HR, Lee RP, Wu CY, Chen HI. Nitric oxide in mesenteric vascular reactivity: a comparison between rats with normotension and hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 2002; 29(4):275-80.

Cohen MI, Schenck KW. Selective down regulation of vascular beta 1 adrenergic receptors after prolonged isoproterenol infusion. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1987; 10(3):365-368.

Cohn JN, Levine TB, Olivare MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *The New England Journal of Medicine*. 1984; 311(13):819-823.

Colucci W, Denniss AR, Leatherman GF, Quigg RJ, Ludmer PL, Marsh JD, Gauthier DF. Intracoronary infusion of dobutamine to patients with and without severe congestive heart failure: dose-response relationships, correlation with circulating catecholamines, and effect of phosphodiesterase inhibition. *Journal of Clinical Investigation*. 1988; 81:1103-1110.

Colucci WS. The effects of norepinephrine on myocardial biology: implications for the therapy of heart failure. *Clinical Cardiology*. 1998; 21:120-1244.

Conyers RB, Kwan CY, Lee RM. Alterations in beta-adrenoceptors and polyploidy in cultured aortic smooth muscle cells from different age groups of spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats. *Journal of Hypertension*. 1995; 13:507-515.

Conyers RB, Werstiuk ES, Lee RMKW. Expression of functional  $\beta$ -adrenoceptors and polyploidy development in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1997; 75:375-382.

Cothechia S, Kobilka BK, Daniel KW, Nolan RD, Lapetina EY, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW. Multiple second messenger pathways of alpha adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265(1):63-69.

Davel APC. Efeitos do tratamento crônico co isoproterenol sobre a reatividade vascular de aorta de ratos: Possíveis mecanismos modulatórios [dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)]. Vitória (Brasil): Universidade Federal do Espírito Santo; 2003.

Davel APC, Kawamoto EM, Scavone C, Vassallo DV, Rossoni LV. Ghanges in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. *British Journal of Pharmacology*. 2006; 148 (5):629-639.

Dawes M, Chowienzczyk PJ, Ritter JM. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway on vasodilation caused by beta-adrenergic agonists in human forearm. *Circulation*. 1997; 95(9):2293-2297.

De Artiñano AA, Gonzales VL. Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. *Pharmacological Research*. 1999; 49:113-124.

Decety J, Jeannerod M, Durozard D, Baverel G. Central activation of autonomic effectors during mental stimulation of motor action in man. *The Journal of Physiology*. 1993; 461:540-563.

De Hurtado. A ação do sistema neurovegetativo sobre o coração. In:Cingolani HE, Houssay AB. *Fisiologia Humana*. 7th ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A.; 2004. p.378-387.

De Luca L, Abraham WT, Fonarow GC, Gheorghiadu M. Congestion in acute heart failure syndromes: importance of early recognition and treatment. *Reviews in Cardiovascular Medicine*. 2006; 7(2):69-74.

Dessy C, Moniotte S, Ghisdal P, Havaux X, Noirhomme P, Balligand JL. Endothelial  $\beta_3$ -adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through

nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. *Circulation*. 2004; 110:948-954.

Deswal A, Peterson NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mamm DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone Trial (VEST). *Circulation*. 2001; 103:2055-2059.

Devic E, Xiang Y, Gould D, Kobilka B.  $\beta$ -adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 adrenoceptor knockout mice. *Molecular Pharmacology*. 2001; 60(3):577-583.

Digges KG, Summers RJ. Characterization of postsynaptic alpha-adrenoceptors in rat aortic strips and portal veins. *British Journal of Pharmacology*. 1983; 79 (3):655-665.

Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*. 1986; 321:75-79.

Docherty JR. Subtypes of functional alpha1- and alpha2- adrenoceptors. *European Journal of Pharmacology*. 1998; 361: 1-15.

Dohi Y, Kojima M, Sato K. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. *Hypertension*. 1996; 28:732-737.

Drexler H, Hayoz D, Munzel T, Hornig B, Just H, Brunner HR, Zelis R. Endothelial function in chronic congestive heart failure. *The American Journal of Cardiology*. 1992; 69(19): 1596-15601.

Duka I, Gavras I, Johns C, Handy DE, Gavras H. Role of the postsynaptic  $\alpha$ 2 adrenergic receptor subtypes in catecholamine induced vasoconstriction. *General Pharmacology*. 2000; 34:101-106.

Eckly AE, Lugnier C. Role of phosphodiesterases III and IV in the modulation of vascular cyclic AMP content by the NO/ cyclic GMP pathway. *British Journal of Pharmacology*. 1994; 113: 445-450.

Emorine LJ, Marullo S, Briand-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD. Molecular characterization of the human  $\beta$ 3- adrenergic receptor. *Science*. 1989; 245: 1118-1121.

Esler M, Kate D. Sympathetic nervous system activation in essential hypertension, cardiac failure and psychosomatic heart disease. *Journal of Cardiology Pharmacology*. 2000; 35:S1-S7.

Falvahan NA, Shimokawa H, Vanhoutte PM. Pertussis toxin inhibits endothelium-dependent relaxation to certain agonists in porcine coronary arteries. *Journal of Physiology*. 1989; 408:549-560.

Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*. 1988; 93: 515-524.

Ferro A, Coash M, Yamamoto T, Rob J, Ji Y, Queen L. Nitric oxide- dependent through activation of both protein kinase A and Akt. *British Journal of Pharmacology*. 2004; 143:397-403.

Figuroa XF, Poblete MI, Boric MP, Mendizabal VE, Graschinsky EA, Huidobro-Toro JP. Clonidine-induced nitric oxide-dependent vasorelaxation mediated by endothelial  $\alpha_2$  adrenoceptor activation. *British Journal of Pharmacology*. 2001; 134:957-968.

Folkow B, Sonnenschein RR, Wright DL. Loci of neurogenic and metabolic effects on precapillary vessels of skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1971; 81:459-471.

Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiological Reviews*. 1982; 62:347-504.

Frolich JC, Forstermann U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research*. 1989; 19: 211-215.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373-376.

Furchgott RF. Role of endothelium in response to vascular smooth muscle. *Circulation Research*. 1983; 53: 557-572.

Gaballa MA, Goldman S. Overexpression of endothelium nitric oxide synthase reverses the diminished vasorelaxation in the hindlimb vasculature in ischemic heart failure in vivo. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1999; 31(6), 1243-1252.

Gaballa MA, Eckhart A, Kosh WJ, Goldman S. Vascular  $\beta$ -adrenergic receptor is dysfunctional after myocardial infarction. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2001; 280:H1129-H1135.

García-Sáinz JÁ, Vázquez-Prado J, Medina LC.  $\alpha_1$ - Adrenoceptors: function and phosphorylation. *European Journal of Pharmacology*. 2000; 389: 1-12.

Gavin KT, Colgan MP, Moored D, Shanik G, Docherty JR.  $\alpha_{2C}$  -adrenergic mediate contractile responses to noradrenaline in the human saphenous vein. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1997; 355:406-411.

Gheorghiade M, de Luca L, Fonarow GC, Filippatos G, Metra M, Francis GS. Pathophysiologic targets in the early phase of acute heart failure. *The American Journal of Physiology*. 2005; 96(6A):11G-17G.

Gheorghiade M, Shin DD, Thomas TO, Brandimarte F, Fonarow GC, Abraham WT. Congestion is important diagnostic and therapeutic target in heart failure. *Reviews in Cardiovascular Medicine*. 2006; 7(S1):S12-S24.

Givertz MM, Colucci WS, Braunwald E. Clinical Aspects of Heart Failure; Pulmonary Edema, High-Output Failure. In: Braunwald E. *Heart Diseases*. 7th ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005. p.539-568.

Goldstein DS. Plasma catecholamines and essential hypertension. *Hypertension*. 1983; 5:86-99.

Graham LN, Smith PA, Stoker JB, Mackintosh AF, Mary DASG. Time course of sympathetic neural hyperactivity after uncomplicated acute myocardial infarction. *Circulation*. 2002; 106: 793-797.

Gray DW, Marshall L. Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent  $\beta$ -adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *British Journal of Pharmacology*. 1992; 107:684-690.

Grifoni SC, Bendhack LM. Functional study of the  $[Ca^{2+}]_i$  signaling pathway in aortas of L-NAME-hypertensive rats. *Pharmacology*. 2004; 70:160-168.

Gros R, Benovic JL, Tan CM, Feldman RD. G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *Journal of Clinical Investigation*. 2000; 99: 2087-2093.

Gschwend S, Buikema H, Henningrh, Pinto YM, Zeeuw D, Van Gilst WH. Endothelial dysfunction and infarct-size relate to impaired EDHF response in rat experimental chronic heart failure. *The European Journal of Heart Failure*. 2003; 5:147-154.

Guimarães S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacological Reviews*. 2001; 53: 319-356.

Harden TK. Agonist-induced desensitization of the beta-adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. *Pharmacological Reviews*. 1983; 35(1):5-32.

Hayes JS, Wyss VL, Schenck KS, Cohen ML. Effects of prolonged isoproterenol infusion on cardiac and vascular responses to adrenoceptor agonists. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1986; 237: 757-763.

Hednet T, Sun X. Measures of endothelial function as a endpoint in hypertension? *Blood Pressure*. 1997; 2 (Suppl.): 58-66.

Hein L, Altman J, Kobilka B. Sympathetic neurotransmitter release is regulated by two functionally distinct  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes. *Nature*. 1999; 402:181-184.

Hein L. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell and Tissue Research*. 2006; 326:541-551.

Ho SL, Honner V, Docherty JR. Investigation of the subtypes of alpha2-adrenoceptor mediaing prejunctional inhibition in rat atrium and cerebral cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1998; 357(6): 634-639.

Hohimer AR, Davis LE, Hatton DC. Repeated daily injections anda osmotic pump infusion of isoproterenol cause similar increases in cardiac mass but have different effects on blood pressure. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2005; 83(2):191-197.

Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiological Reviews*. 1996; 76:967-1003.

Illes P, Nörenberg W. Eletrophysiological evidence for an  $\alpha_2$ -adrenergic inhibitory control of transmitter release in the rabbit mesenteric artery. *European Journal of Pharmacology*. 1987; 143:151-161.

Jarajapu YP, Coats P, McGrath JC, Macdonald A, Hillier C. Increase alpha(1)- and alpha(2)- adrenoceptor- mediates contractile response of human skeletal muscles resistance arteries in chronic limb ischemia. *Cardiovascular Research*. 2001; 49 (1):218-225.

Kaiser L, Spickard KC, Olivieri NB. Heart failure depresses endothelium-dependent responses in canine femoral artery. *American Journal of Physiology*. 1989; 256:H962-H967.

Kamata K, Mivata N, Kasuya Y. Involvement of endothelial cells in relaxation and contraction responses of the aorta to isoproterenol in naive and streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1989; 249(3):890-894.

Katz AD, Biasucci L, Sabba C, Strom JA, Jondeaur LE, Jemtel TH. Impaired endothelium-mediated vasodilatation in the peripheral vasculature of patients with congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 1992; 19:12-16.

Katz AD, Schwarz M, Yuen J, Lejemtel TH. Impaired acetylcholine-mediated vasodilatation in patients with congestive heart failure: role of endothelium-derived vasodilating and vasoconstricting factors. *Circulation*. 1993; 88:55-61.

Kaye DM, Lefkovits J, Jennings GL, Bergin P, Broughton A, Esler MD. Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *Journal of the American College of Cardiology*. 1995; 26:1257-1263.

Kifor I, Dzau DJ. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensin. *Circulation Research*. 1987; 60: 422-428.

Kimura H, Miyamoto A, Ohshika H. Down-regulation of  $\beta$  adrenoceptors and loss of  $G\alpha_s$  subunit levels in ventricular myocardium of rats treated with isoproterenol. *Life Sciences*. 1993; 53:171-176.

Kobinger W, Pichler L. Centrally induced reduction in sympathetic tone – A postsynaptic  $\alpha$ -adrenoceptor-stimulating action of imidazolines. *European Journal of Pharmacology*. 1976; 40: 311-320.



Koida S, Ueda A, Mori Y, Iwasaka T. Mechanism of increased  $\alpha_1$ -adrenoceptor-mediated contraction in small resistance arteries of rats with heart failure. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2006; 33:47-52.

Konishi M, Su C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension*. 1983; 5: 881-886.

Korner PI, Shaw J, Uther JB, West MJ, Mcritchie RJ, Richards JG. Autonomic and non-autonomic circulatory components in essential hypertension in man. *Circulation*. 1973; 48:107-117.

Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Williams RE, Heifetz SM. Endothelium-dependent vasodilatation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation*. 1991; 84:1589-1596.

Kudej RK, Iwase M, Uechi M, Vatner DE, Oka N, Ishikawa Y, Shannon RP, Bishop SP, Vatner SF. Effects of chronic  $\beta$ -Adrenergic receptor stimulation in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1997; 29:2735-2746.

Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: Role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*. 2002; 106: 3073-3078.

Langer SZ. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochemical Pharmacology*. 1974; 23:1973-1800.

Langer SZ, Duval N, Massingham R. Pharmacologic and therapeutic significance of  $\alpha$ -adrenoceptor subtypes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1985; 6(4):S547-S558.

Lanier SM, Downing S, Duzic E, Homcy CJ. Isolation of rat genomic clones encoding subtypes of alpha 2-adrenergic receptor: identification of a unique receptor subtype. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991; 5:266(16):10470-10478.

Ledoux J, Gee DM, Leblanc N. Increased peripheral resistance in heart failure: new evidence suggests an alteration in vascular smooth muscle function. *British Journal of Pharmacology*. 2003; 139:1245-1248.

Lee CH, Poburko D, Sahota P, Sandhu J, Ruehlmann DO, Van Breemen C. The mechanism of phenylephrine-mediated  $[Ca^{2+}]_i$  oscillation underlying tonic contraction in the rabbit inferior vena cava. *The Journal of Physiology*. 2001; 534: 641-650.

Lee CH, Rahimian R, Szado T, Sandhu J, Poburko D, Behra T, Chan L, Van Breemen C. Sequential opening of  $IP_3$ -sensitive  $Ca^{2+}$  channels and SOC during  $\alpha$ -adrenergic activation of rabbit vena cava. *American Journal of Physiology: Heart and Circulation Physiology*. 2002; 282: H1768-H1777.

Leech CJ, Faber JE. Different alpha adrenoceptor subtypes mediate constriction of arterioles and venules. *The American Journal of Physiology*. 1996; 270(2pt2):H710-H722.

Levy MN. A circulação periférica e seu controle. In: Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Fisiologia*. 5<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2004. p.399-413.

Liao JK, Homey CJ. The release of endothelium-derived relaxing factor via  $\alpha_2$ -adrenergic receptor activation is specifically mediated by  $G_{i\alpha 2}$ . *The Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268(26): 19528-19533.

Limbird LE. Receptor linked to inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms. *FASEB Journal*. 1988; 2(11):2686-2695.

Link R, Daunt D, Barsh G, Chruscinski A, Kobilka B. Cloning of two mouse genes encoding alpha 2-adrenergic receptor subtypes and identification of a single amino acid in the mouse alpha 2-C10 homolog responsible for an interspecies variation in antagonist binding. *Molecular Pharmacology*. 1992; 42(1):16-27.

Link RE, Desai K, Hein L, Stevens ME, Chruscinski A, Bernstein D, Barsh GS, Kobilka BK. Cardiovascular regulation in mice lacking  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes b and c. *Science*. 1996; 273:803-805.

Luo M, Fink GD, Lookingland KJ, Morris JA, Galligan JJ. Impaired function of  $\alpha_2$ -adrenergic autoreceptors on sympathetic nerves associated with mesenteric arteries and veins in DOCA-salt hypertension. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2004; 286:H1558-H1564.

Macia RA, Matthews WD, Lafferty J, de Marinis RM. Assessment of alpha-adrenergic receptor subtypes in isolated rat aortic segments. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1984; 325(4):306-309.

MacLean MR, McCulloch KM, McGrath JC. Influences of the endothelium and hypoxia on alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor-mediated responses in the rabbit isolated pulmonary artery. *British Journal of Pharmacology*. 1993; 108(1):155-161.

MacLennan SJ, Luong LA, Jasper JR, To ZP, Eglen RM. Characterization of  $\alpha_2$ adrenoceptors mediating contraction of dog saphenous vein: identity with the human  $\alpha_{2A}$  subtype. *British Journal of Pharmacology*. 1997; 121:1721-1729.

MacMillan LB, Hein L, Smith MS, Piascik MT, Limbird LE. Central hypotensive effects of  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor subtype. *Science*. 1996; 273:801-803.

Makaritsis KP, Jons C, Gravas I, Altman JD, Handy DE, Bresnahan MR, Gravas H. Sympathoinhibitory function of the  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor subtype. *Hypertension*. 1999; 34:403-407.

Mallem Y, Holopherne D, Reculeau O, LeCoz O, Dessfontis JC, Gogny M.  $\beta$ -adrenoceptor mediated vascular relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*. 2005; 118:61-67.

Mann DL, Kent RL, Parsons B, Cooper G. Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation*. 1992; 85:790-804.

Matsuda H, Kuon E, Holtz J, Busse R. Endothelium-mediated dilatations contribute to the polarity of the arterial wall in vasomotion induced by alpha2-adrenergic agonist. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1985; 7(4):680-688.

McAlpine HM, Cobbe SM. Neuroendocrine changes in acute myocardial infarction. *The American Journal of Medicine*. 1988; 84:61-66.

Medeiros A, Rolim NPL, Rosa KT, Irigoyen MC, Krieger EM, Krieger JE, Negrão CE, Brum PC. O treinamento físico previne a disfunção cardíaca e altera a recaptação de cálcio em um modelo genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática. In: XX Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental; Águas de Lindóia-SP. 2005. Abstracts... p.120.

Meyrelles SS, Cabral AM, Vasquez EC. Impairment of the Bezold-Jarish reflex in conscious rats with myocardial hypertrophy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1994; 27: 1065-1069.

Michel MC, Brodde OE, Insel PA. Peripheral adrenergic receptors in hypertension. *Hypertension*. 1990; 16(2):107-120.

Migliorini RH, Kettelhut IC. As glândulas adrenais. In: Aires MM. *Fisiologia*. 2<sup>nd</sup> ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 1999. p829-841.

Miller AA, Megson IL, Gray G. Inducible nitric oxide synthase-derived superoxide contributes to hyperactivity in small mesenteric arteries from a rat of chronic heart failure. *British Journal of Pharmacology*. 2000; 131(1): 29-36.

Miller JW, Hu ZW, Okazaki M, Fujinaga M, Hoffman BB. Expression of alpha 1 adrenergic receptor subtype mRNA in the rat cardiovascular system with aging. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1996; 87(2):75-89.

Miller VM, Vanhoutte PM. Endothelial alpha2-adrenoceptors in canine pulmonary and systemic blood vessels. *European Journal of Pharmacology*. 1985; 26:118(1-2):123-129.

Molderings GJ, Gothert M. Subtype determination of presynaptic in the rabbit pulmonary artery and human saphenous vein. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1995; 352(5):483-490.

Molim JC, Bendhack LM. Clonidine induces rat aorta relaxation by oxide-dependent and -independent mechanisms. *Vascular Pharmacology*. 2005; 42:1-6.

Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Trombosis Research*. 1977; 11: 323-344.

Moniotte S, Kobik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, Balligand JL. Upregulation of  $\beta$ 3-adrenoreceptor and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation*. 2001; 103:1649-1655.

Moreau P, Drolet G, Yamaguchi N, de Champlain J. Alteration of prejunctional  $\alpha$ <sub>2</sub>-adrenergic autoinhibition in DOCA-salt hypertension. *American Journal of Hypertension : Journal of the American Society of Hypertension*. 1995; 8(3): 287-293.

Mosqueda-Garcia R. Central autonomic regulation. In: Robertson D, Low PA, Polinsky RJ. *Primer on the Autonomic Nervous System*. New York: Academic Press; 1996. p. 3-11.

Moura E, Afonso J, Hein L, Vieira-Coelho MA.  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes involved in the regulation of catecholamine release from the adrenal medulla of mice. *British Journal of Pharmacology*. 2006; 149: 1049-1058.

Mulder P, Compagnon P, Devaux B, Richard V, Henry JP, Elfertak L, Wimart MC, Thibout E, Comoy E, Mace B, Thuillez C. Response of large and small vessels to alpha and beta adrenoceptor stimulation in heart failure: effect of angiotensin converting enzyme inhibition. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 1997; 11(3):221-230.

Mulder P, Devaux B, Fertak LE, Compagnon P, Richard V, Henry JP, Scalbert E, Desché P, Macé B, Thuillez C. Vascular and myocardial protective effects of converting enzyme inhibition in experimental heart failure. *The American Journal of Cardiology*. 1995; 76: 28E-33E.

Mulder P, Elfertak L, Richard V, Compagnon P, Devaux B, Henry JP, Scalbert E, Desché P, Macé B, Thuillez C. Peripheral artery structure and endothelial function in heart failure: effect of ACE inhibition. *The American Journal of Physiology*. 1996; 271: H469-H477.

Nakamura M, Ishikawa M, Funakoshi T, Hashimoto K, Chiba M, Hiramori K. Attenuated endothelium-dependent peripheral vasodilatation and clinical characteristics in patients with chronic heart failure. *American Heart Journal*. 1994; 128:1164-1169.

Nelson DL, Molinoff PB. Distribution and properties of adrenergic storage vesicles in nerve terminals. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1976; 196:346-359.

Nelson E, Rennels M. Innervation of intracranial arteries. *Brain*, 93: 475-490, 1970.

Nilsson H. Adrenergic nervous control of resistance and capacitance vessels. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1985; 124 (Suppl 541):1-34.

Nilsson H, Goldstein M, Nilsson O. Adrenergic innervation and neurogenic response in large and small arteries and veins from the rat. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1986; 126:121-133.

Nishina H, Ozaki T, Hanson Ma, Poston L. Mechanism of noradrenaline induced vasorelaxation in isolated femoral arteries of the neonatal rats. *British Journal of Pharmacology*. 1999; 127:809-812.

Okumura Y, Nasa Y, Sanbe A, Toga W, Takeo S. Effects of long-term treatment with trandolapril on augmented vasoconstriction in rats with chronic heart failure. *Journal of Cardiac Failure*. 1996, 2(4): 301-310.

Packer M. The neuronal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 1992; 20:248-254.

Paiva MQ, Mota A, Moura D, Guimarães S. Prejunctional alpha 2A-autoreceptors in the canine saphenous vein. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1997; 356:368-373.

Paiva MQ, Morato M, Moura D, Guimarães S. A comparative study of postsynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptors of the dog mesenteric and rat femoral veins. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1999; 360:165-170.

Palmer MRJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524-526.

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE. Abnormal endothelium dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *New England Journal of Medicine*. 1990; 323: 22-27.

Paris A, Philipp M, Tonner PH, Steinfath M, Lohse M, Scholz J, Hein L. Activation of  $\alpha_{2B}$ -adrenoceptors mediates the cardiovascular effects of etomidate. *Anesthesiology*. 2003; 99(4): 889-895.

Parkinson NA, Hughes AD. The mechanism of action of alpha 2-adrenoceptor in human isolated subcutaneous resistance arteries. *British Journal of Pharmacology*. 1995; 1115(8):1463-1468.

Pereira RB, Sartorio CL, Vassallo DV, Stefanon I. Differences in tail vascular bed reactivity in rats with and without heart failure following myocardial infarction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005; 312(3): 1321-1325.

Pérez-Rivera AA, Hlavacova A, Rosario-Colon LA, Fink GD, Galligan JJ. Differential contributions of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors to vasoconstriction in mesenteric arteries and vein of normal and hypertensive mice. *Vascular Pharmacology*. 2007; 46(5): 373-382.

Polônia JJ, Paiva MQ, Guimarães S. Pharmacological characterization of postsynaptic alpha-adrenoceptor subtypes in five different dog arteries in-vitro. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1985; 37(3):205-208.

Randall WC. Anatomy of sympathetic innervation, and sympathetic control of the heart. In: WC Randall. *Neural Regulation of the Heart*. New York, 1976.

Rascado RR, Bendhack LM. Activation of alpha2-adrenoceptors is necessary to induced nitric oxide release in isoprenaline-induced relaxation. *Vascular Pharmacology*. 2005; 42(2):63-68.

Rembold CM, Murphy RA. Myoplasmic calcium, myosin phosphorylation, and regulation of the crossbridge cycle in swine arterial smooth muscle. *Circulation Research*. 1986; 58: 803-815.

Rembold CM, Chen X-L. Mechanisms responsible for forskolin-induced relaxation of rat tail artery. *Hypertension*. 1998; 31: 872-877.

Rizzo CA, Ruck LM, Corboz MR, Umland SP, Wan Y, Shah H, Jakway J, Cheng L, McCormick K, Egan RW, Hey JA. Postjunctional  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor contractility in human saphenous vein. *European Journal of Pharmacology*. 2001; 413:263-269.

Rohrer DK, Chruscinski A, Schauble EH, Bernstein D, Kobilka BK. Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta<sub>1</sub>- and beta<sub>2</sub>-adrenergic receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274: 16701-16708.

Rolim NP, Rosa KT, Bartholomeu J, Matos KC, Carvalho CRO, Irigoyen MC, Krieger EM, Krieger JE, Negrão CE, Brum PC. Treinamento físico restaura disfunção cardíaca e recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático em modelo genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática. In: XX Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental; Águas de Lindóia-SP. 2005. Abstracts... p.70.

Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, Krieger JE, Negrão CE, Brum PC. Exercise training improves the net balance of cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  handling protein expression in heart failure. *Physiological Genomics*. 2007; 29:246-252.

Rubany GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *The American Journal of Physiology*. 1986; 250(19): H815-H821.

Ruffolo RR Jr, Nichols AJ, Stadel JM, Hielble JP. Pharmacologic and therapeutic applications of alpha 2-adrenoceptor subtypes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1993; 33:243-279.

Rump LC, Bohmann C, Shaible U, Schollhorn J, Lmberger N. Alpha 2C-adrenoceptor modulated release of noradrenaline in human right atrium. *British Journal of Pharmacology*. 1995; 116(6):2617-2624.

Russel A, Watts S. Vascular reactivity isolated thoracic aorta of the C57BL/6J Mouse. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000; 294(2): 598-604.

Saadane N, Alpert L, Chalifour LE. Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx-2,5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult mice. *British Journal of Pharmacology*. 1999; 127:1165-1176.

Schenk J, McNeill JH. The pathogenesis of DOCA-salt hypertension. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 1992; 27(3): 161-170.

Schrier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. *The New England Journal of Medicine*. 1999; 341(8):577-85.

Schwinn DA. Adrenoceptors as models for G protein-coupled receptors: structure, function and regulation. *British Journal of Anesthesiology*. 1993; 71:77-85.

Shafaroudi MM, Mc Bride M, Deighan C, Wokoma A, MacMillan J, Daly CJ, McGrath. Two "Knockout" mouse models demonstrate that aortic vasodilatation is mediated via  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptors located on the endothelium. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005; 314(2): 804-810.

Shi AG, Kwan CY, Daniel EE. Relation between density (maximum binding) of alpha adrenoceptor binding sites and contractile response in four canine vascular tissues.



The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1989; 250(3):1119-1124.

Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A. The importance of the hyperpolarizing mechanism increase as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric circulation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1996; 28(5): 703-711.

Smith K, Gavin K, Docherty JR. Investigation of the subtype of alpha 2-adrenoceptor mediating prejunctional inhibition of cardioacceleration in the pithed rat heart. *British Journal of Pharmacology*. 1995; 115:316-320.

Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. 1994; 372: 231-236.

Soonpaa MH, Field LJ. Assessment of cardiomyocyte DNA syntesis during hypertrophy in adult mice. *The American Journal of Physiology*. 1994; 266:H1439-H1445.

Starke K, Montel H, Gayk W, Merker R. Comparison of the effect of clonidine on pre- and postsynaptic adrenoceptor in the rabbit pulmonary artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1974; 285:133-150.

Starke K, Endo TE, Taube HD. Relative pre- and postsynaptic potencies of  $\alpha$ -adrenoceptor agonist in the rabbit pulmonary artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1975; 291:55-78.

Stassen FRM, Fazzi GE, Leenders PIA, Smits JFM, de Mey JGR. Coronary arterial hyperreactivity and mesenteric arterial hyporeactivity after myocardial infarction in the rat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1997; 29(6): 780-788.

Stassen FRM, Maas RGHT, Schiffers PMH, Janssen GMT, de Mey JGR. A positive and reversible relationship between adrenergic nerves and alpha-1A adrenoceptors in rat arteries. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1998; 284(1): 399-405.

Storm DS, Webb RC. Contractile responses to Bay K 8644 in rats with coarctation-induced hypertension. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1993; 203: 92-99.

Surprenant A, Horstman DA, Akbarali H, Limbird LE. A point mutation of the alpha 2-adrenoceptor that blocks coupling to potassium but not calcium currents. *Science*. 1992; 14:257(5072):977-980.

Tavares A, Handy DE, Bogdanova NN, Rosene DL, Gravas H. Localization of alpha 2A- and alpha 2B-adrenergic receptor subtypes in brain. *Hypertension*. 1996; 27:449-455.

Taylor PB, Tang Q. Development of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1984; 62:384-389.

Taylor SG, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1988; 9: 272-274.

Teerlink JR, Clozel M, Fischli W, Clozel JP. Temporal evolution of endothelial dysfunction in a rat model of heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 1993; 22:615-620.

Teerlink JR, Gray GA, Clozel M, Clozel JP. Increased vascular responsiveness to norepinephrine in rats with heart failure is endothelium dependent. Dissociation of basal and stimulated nitric oxide release. *Circulation*. 1994; 89(1), 393-401.

Timmermans PB, de Jonge A, Van Meel JCA, Slothorst-Grisdijk FP, Lam E, Van Zweiten PA. Characterization of  $\alpha$ -adrenoceptor populations: qualitative relationships between cardiovascular effects initiated at central and peripheral  $\alpha$ -adrenoceptor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1981; 24:502-507.

Thomas JA, Marks BH. Plasma norepinephrine in congestive heart failure. *The American Journal of Cardiology*. 1978; 41(2):233-243.

Thorin E, Huang PL, Fishman MC, Bevan JA. Nitric oxide inhibits  $\alpha$ 2-adrenoceptor-mediated endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation Research*. 1998; 82: 1323-1329.

Thuillez C, Mulder P, Elfertak L, Blaysat G, Compagnon P, Henry JP, Richard V, Scalbert E, Desche P. Prevention of endothelial dysfunction in small and large arteries in a model of chronic heart failure: Effect of angiotensin converting enzyme inhibition. *The American Journal of Hypertension*. 1995; 8: 7S-12S.

Timo-laria C. Sistemas neurovegetativos. In: Aires MM. Fisiologia. 2nd ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 1999. p289-314.

Törnebrandt K, Nobin A, Owman C. Pharmacological characterization of alpha-adrenergic receptor subtypes mediating contraction in human mesenteric arteries and veins. *Blood Vessels*. 1985; 22(4): 179-195.

Treasure CB, Klein JL, Vita JA, Manoukian SV, Renwick GH, Selwyn AP, Ganz P, Alexander W. Hypertension and left ventricular hypertrophy are associated with impaired endothelium-mediated relaxation in human coronary resistance vessels. *Circulation*. 1993; 87: 86-93.

Trendelenburg AU, Sutej I, Wahl CA, Molderings GJ, Rump LC, Starke K. A re-investigation of questionable subclassifications of presynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptors: rat vena cava, rat atria, human kidney and guinea-pig urethra. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology*. 1997; 356:721-737.

Trendelenburg AU, Klebroff W, Hein L, Starke K. A study of presynaptic alpha<sub>2</sub>-adrenoceptors in alpha<sub>2A/D</sub>-, alpha<sub>2B</sub>- and alpha<sub>2C</sub>-adrenoceptor-deficient mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology*. 2001; 364(2):117-30.

Trindade JD, Cabral AM, Vasquez EC, Vassallo DV. Cardiovascular effects on conscious rats of pretreatment with isoproterenol for 3 days. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*. 1992; 25: 301-304.

Van der Graaf PH, Shankley NP, Black JW. Analysis of the activity of alpha 1-adrenoceptor antagonists in rat aorta. *British Journal of Pharmacology*. 1996; 118(2):299-310.

Vanhoutte PM. Endothelium-dependent responses in congestive heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1996; 28: 2233-2240.

Vanhoutte PM. Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation*. 1993; 87 (suppl V): V9-V17.

Van Zwieten PA, Van Mell JC, de Jonge A, Wilffert B, Timmermans PB. Central and peripheral alpha-adrenoceptor. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1982; 4(1):S19-S24.

Vassallo DV, Vasquez EC, Cabral AM. Contractile performance of papillary muscles of renovascular hypertensive and isoproterenol-pretreated rats. *Pharmacological Research Communication*. 1988; 20: 61-72.

Véquad P, Thorin E. Endothelial G protein  $\beta$ -subunits trigger nitric oxide- but not endothelium-derived hyperpolarizing factor—dependent dilatation in rabbit resistance arteries. *Circulation Research*. 2001; 89: 716-722.

Wallukat G. The beta-adrenergic receptors. *Herz*. 2002; 27:683-690.

Wang I, Seyedi N, Xu XB, Wolin MS, Hintze TH. Defective endothelium-mediated control of coronary circulation in conscious dogs after heart failure. *The American Journal of Physiology*. 1994; 266:H670-H680.

Warren JV, Walter JR, Stead EA. Blood flow in hand and forearm after paravertebral block of sympathetic ganglia. Evidence against sympathetic vasodilation nerves in extremities of man. *The Journal of Clinical Investigation*. 1942; 21: 665-673.

Westfall TC, Meldrum MJ. Alterations in the release of norepinephrine at the vascular neuroeffector junction in hypertension. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1985; 25: 621-641.

Westfall TC, Westfall DP. Fármacos que agem nas sinapses e junções neuroefetoras. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editors. *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11th ed. Rio de Janeiro: Interamericana do Brasil Ltda; 2006. p. 127-163.

Willems EW, Valdivia LF, Saxena PR, Villalón CM. The role of several  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-adrenoceptor subtypes mediating vasoconstriction in the canine external carotid circulation. *British Journal of Pharmacology*. 2001; 132:1292-1298.

Wise A, Watson-Koken MA, Ress S, Lee M, Milligan G. Interaction of  $\alpha$ <sub>2A</sub> adrenoceptor with multiple Gi-family G proteins: Studies with pertussis toxin resistant G-protein mutants. *The Biochemical Journal*. 1997; 321:721-728.

Wu D, Katz A, Lee C, Simon MI. Activation of phospholipase C by  $\alpha$ <sub>1</sub> adrenergic receptors is mediated by the  $\alpha$  subunit of G<sub>q</sub> family. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267:25798-25802.

Xu B, Li J, Gao L, Ferro A. Nitric oxide-dependent vasodilatation of rabbit femoral artery by  $\beta_2$  adrenergic stimulation or cyclic AMP elevation in vivo. *British Journal of Pharmacology*. 2000; 129:969-974.

Xu Y, Henning RH, Lipsic E, Vanbuiten A, Vangilst WH, Buikema H. Acetylcholine stimulated dilatation and stretch induced myogenic constriction in mesenteric artery of rats with chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure*. 2007; 9: 144-151.

Yanagisawa M, Kurihara S, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular cells. *Nature*. 1988; 322: 411-415.

Yoshizumi M, Perella MA, Burnett JC, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates and endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circulation Research*. 1993; 73:205-209.

Zhong H, Minneman KP. Alpha1-adrenoceptor subtype. *European Journal of Pharmacology*. 1999; 375:261-276.

Zhou Y, Varadharaj S, Zhao X, Parinandi N, Flavahan NA, Zweier JL. Acetylcholine causes endothelium-dependent contraction of mouse arteries. *The American Journal of Physiology*. 2005; 289: 1027-1032.

Zou AP, Cowley AW Jr. Alpha(2)-adrenergic receptor-mediated increase in NO production buffers renal medullary vasoconstriction. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2000; 279(3):R769-777.

Zschauer AOA, Sielczak MW, Smith DAS, Wanner A. Norepinefrine-induced contraction of isolated rabbit bronchial artery: Role of  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptor activation. *Journal of Applied Physiology*. 1997; 82(6):1918-1925.

Zucker IH, Wang W, Brandle M, Schultz HD, Patel KP. Neural regulation of sympathetic nerve activity in heart failure. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1995; 37:397-414.