

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Mecanismos celulares ativados por agonistas adrenérgicos em
aorta de ratos hipertensos renais com disfunção endotelial**

Ana Carolina Campos Cotrim Bocalon

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Mecanismos celulares ativados por agonistas adrenérgicos em aorta de ratos hipertensos renais com disfunção endotelial

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado(a): Ana Carolina Campos Cotrim Bocalon

Orientador(a): Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Bocalon, A. C.

Mecanismos celulares ativados por agonistas adrenérgicos em aorta de ratos hipertensos renais com disfunção endotelial. Ribeirão Preto, 2014.

84 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bendhack, L. M.

1. Vasoconstrição.
2. Agonistas adrenérgicos.
3. Noradrenalina.
4. Adrenalina.
5. Hipertensão renovascular.
6. NO-Sintase

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Carolina Campos Cotrim Bocalon

Mecanismos celulares ativados por agonistas adrenérgicos em aorta de ratos hipertensos renais com disfunção endotelial.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a meus pais, meu irmão e ao meu esposo, pilares de sustentação de minha vida.

Agradecimento

A Deus e Nossa Senhora pela força, proteção, amparo e luz, essenciais para que eu pudesse chegar até aqui.

Á minha família; meus pais, Ricardo e Leandra Maria, pela dedicação, apoio, segurança, pela sincera amizade e por todo o cuidado e amor incondicional que me passam todos os dias mesmo a distância sem medir esforços para isso; ao meu irmão, Ricardo Filho, pelo carinho, amizade e lealdade; ao meu esposo, Rafael, pela paciência, compreensão, companheirismo, apoio, respeito e amor de todos os instantes. Meu eterno amor e gratidão a vocês.

Aos meus avós, Maria Aparecida e Hortêncio; Geny e Geraldo (in memorium) pelas suas orações.

Á Profa. Dra. Patrícia Ibler Bernardo Ceron, pela amizade e por ter sido a primeira pessoa a acreditar e me incentivar a vir fazer o mestrado, ainda quando eu estava na graduação em Uberaba.

Á minha orientadora, Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack, por ter aberto as portas da vida acadêmica e acreditado em mim, pela oportunidade e imensurável apoio para realização deste trabalho, e também pela amizade e compreensão. Muito obrigada de maneira especial.

Ao pessoal do laboratório, Bruno, Tiago, Fernanda, Laena, Prycila, Vânia, Luciana, Fabíola, Michelle, Tamy, Tais, Luis Antônio, Marcella e Juliana, agradeço por tudo o que me ensinaram, pelo apoio técnico e ajuda nos momentos árdios de trabalho e pela amizade, crucial para superar os obstáculos do dia a dia.

Agradeço em especial ao Dr. Bruno Rodrigues da Silva que desde a minha chegada ao laboratório, quando ainda era doutorando, sempre se dispôs prontamente a me ajudar e auxiliar na construção deste trabalho. Minha imensa gratidão por todo o apoio e amizade, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

As amigas, Marlene, Mayara, Miriam e D. Nina, funcionárias da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da

Universidade de São Paulo, prontas para resolver qualquer problema, muito obrigada pelo apoio e carinho.

Aos amigos, Reinaldo, Antônio Flávio e Ronaldo, funcionários do biotério, por cuidar de todos os animais utilizados neste trabalho e pela compreensão de sempre.

Á todos os colegas da disciplina de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelas discussões acadêmicas e agradável convivência.

Á professora, Dra. Glória Emília Petto de Souza, pela atenção de sempre e amigável convivência.

Á FAPESP (Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo 2012/16392-2) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo auxílio financeiro.

Meu sincero agradecimento a todos.

Muito Obrigada!

Epígrafe

“Transforme as pedras que você tropeça nas pedras de sua escada”

Sócrates

RESUMO

BOCALON A. C. **Mecanismos celulares ativados por agonistas adrenérgicos em aorta de ratos hipertensos renais com disfunção endotelial**. 2014. 84f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O sistema nervoso simpático (SNS) desempenha importante papel sobre o controle da pressão arterial assim como o endotélio, pela liberação de fatores de relaxamento e contração que atuam sobre a modulação do tônus vascular. A hipertensão renovascular (2R-1C) está associada à elevada produção de espécies reativas de oxigênio, hiperatividade do SNS e disfunção endotelial. A hipótese deste trabalho é de que os agonistas adrenérgicos noradrenalina (NOR) e adrenalina (ADR), catecolaminas endógenas, promovam efeito anti-contrátil devido à ativação da eNOS em aorta de ratos 2R-1C. Este estudo teve por objetivo investigar se a ativação de adrenoceptores (AR) com NOR ou ADR leva à maior ativação da eNOS em aortas de ratos 2R-1C do que em 2R e os mecanismos relacionados. Realizamos curvas concentração-efeito para NOR ou ADR, em aortas com ou sem endotélio de ratos 2R e 2R-1C em ausência (controle) ou presença dos antagonistas β -AR (propranolol), α_2 -AR (ioimbina), e inibidor não seletivo da NOS (L-NAME). Por *western blot*, verificamos a fosforilação do resíduo de ativação da enzima eNOS, Serina¹¹⁷⁷ (Ser¹¹⁷⁷), via ativação de α -AR ou β -AR, pela NOR ou ADR em aortas com endotélio, de ratos 2R e 2R-1C e se a via PI_3K/AKT e o H_2O_2 estariam envolvidos nesse processo. Avaliamos a produção de NO pelas células endoteliais isoladas de ratos 2R e 2R-1C, por citometria de fluxo. Realizamos a dosagem de NOR e ADR plasmática e tecidual (adrenais) por meio de HPLC. Nos estudos de reatividade vascular avaliamos a potência (pD_2) e eficácia (E_{max}) dos agonistas em induzir contração. O E_{max} da NOR foi menor na contração de aorta de ratos 2R-1C comparada a 2R, provavelmente devido à maior atividade da eNOS evidenciada pelo efeito do L-NAME em aorta de 2R-1C. A particularidade mais significativa da resposta da NOR é de que em aorta de ratos 2R-1C, a NOR promove a maior fosforilação de Ser¹¹⁷⁷ via α -AR, e esta envolve a participação da via PI_3K/AKT e do H_2O_2 , não havendo alteração dos níveis plasmáticos e tecidual de NOR entre 2R e 2R-1C. O estímulo com ADR, em aorta de 2R-1C, promoveu aumento da atividade da eNOS, certificada pelo efeito do L-NAME, que pode contribuir para o menor E_{max} da ADR em 2R-1C do que em 2R. Entretanto, a ADR promoveu maior fosforilação de Ser¹¹⁷⁷ via β -AR, em aorta de ratos 2R-1C, e esta não envolve participação da via PI_3K/AKT e do H_2O_2 . Os níveis teciduais de ADR foram semelhantes entre 2R e 2R-1C, mas a concentração plasmática de ADR foi menor em 2R-1C do que em 2R. Não houve diferença na produção de NO pelas células endoteliais entre 2R e 2R-1C. Os resultados obtidos sugerem que a ativação de α -AR com NOR envolve participação de H_2O_2 e da via PI_3K/AKT para maior ativação da eNOS em aortas de ratos 2R-1C, mecanismo que pode contribuir para o menor E_{max} da NOR em aorta de 2R-1C. A ADR ao ativar β -AR leva à maior ativação da eNOS, porém sem participação efetiva de H_2O_2 e da via PI_3K/AKT em aortas de ratos 2R-1C.

Palavras chave: vasoconstrição, agonistas adrenérgicos, noradrenalina, adrenalina, hipertensão renovascular, NO-Sintase

ABSTRACT

BOCALON A. C. **Cellular mechanisms activated by adrenergic agonists in the aorta of renal hypertensive rats with endothelial dysfunction.** 2014. 84p. Dissertation (Master). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The sympathetic nervous system (SNS) plays important role on the arterial pressure control as well the vascular endothelium by relaxing and contractile factors release that modulates the vascular tone. The renovascular hypertension (2K-1C) is related to the increased production of oxygen reactive species, SNS hyperactivity and endothelium dysfunction. The hypothesis of this work is that the adrenoceptor (AR) agonists noradrenaline (NOR) and adrenaline (ADR), the endogenous catecholamine promote anti-contractile effect due to eNOS activation in 2K-1C rat aorta. This study aimed to investigate if AR activation by NOR or ADR leads to the increased activation of eNOS in 2K-1C rat aorta, and the mechanisms activated by these agonists. Concentration-effect curves were constructed for NOR or ADR, in intact-endothelium or denuded aortas isolated from 2K-1C and 2K rats in the absence (control) or in the presence of the AR antagonists propranolol (β -AR) or yohimbine (α_2 -AR), or the non-selective NOS inhibitor, L-NAME. By using *western blot*, we have verified the the effects of activation of α -AR ou β -AR and the phosphorylation of NOS activation site Serine1177 (Ser¹¹⁷⁷) by NOR or ADR in intact endothelium aorta from 2K and 2K-1C and also whether the PI₃K/AKT pathway and hydrogen peroxide (H₂O₂) are related to this phosphorylation. We evaluated by flow cytometry the NO production in the isolated endothelial cells from 2K and 2K-1C. Plasma and tissue (adrenal) levels of NOR and ADR were measured by HPLC. In the vascular reactivity studies, we evaluated the potency (pD₂) and efficacy (E_{max}) of the agonists in inducing contraction. The E_{max} induced by NOR was lower in 2K-1C than in 2K rat probably due to the higher activity of eNOS as shown by the effect of L-NAME. The most interesting finding was in 2K-1C aorta that NOR increases the Ser¹¹⁷⁷ phosphorylation via α -AR activation that involves the signaling trough PI₃K/AKT and H₂O₂. There is no differences in NOR at the plasma and tissue levels between 2K-1C and 2K. ADR activates more eNOS in 2K-1C rat aorta as shown by the effect of L-NAME. It could contribute to the lower E_{max} of ADR in 2K-1C than in 2K. However, ADR increased Ser¹¹⁷⁷ phosphorylation via β -AR activation in 2K-1C rat aorta, which does not involve PI₃K/AKT and H₂O₂ pathway. The tissue levels of ADR were not different between 2K-1C and 2K, but the plasma concentration of ADR was lower in 2K-1C than in 2K. There was no difference in the NO production in the endothelial cells from 2K-1C and 2K. Taken together, our results suggest that α -AR activation by NOR involves H₂O₂ and PI₃K/AKT that activates eNOS in 2K-1C rat aorta that could contribute to the lower contractile effect induced by NOR in 2K-1C. β -AR activation by ADR leads to the eNOS activation without activation of H₂O₂ and PI₃K/AKT pathway in 2K-1C rat aorta.

Key Words: vasoconstriction, adrenergic agonists, noradrenaline, adrenaline, renovascular hypertension, NO-Synthase

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Resposta contrátil induzida pela noradrenalina (NOR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), expressa em grama de tensão 19
- Figura 2.** Resposta contrátil, induzida com noradrenalina (NOR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), expressa em porcentagem da contração prévia estimulada por KCl 60 mmol/L 21
- Figura 3.** Efeito máximo estimulado com KCl 60 mmol/L em aortas isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C) com endotélio (E+) (A) ou sem endotélio (E-) (B) 22
- Figura 4.** Efeito da inibição da NO-Sintase com L-NAME sobre a resposta contrátil da noradrenalina (NOR), em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B) 23
- Figura 5.** Efeito do propranolol sobre a resposta contrátil induzida com noradrenalina (NOR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos 24
- Figura 6.** Efeito do propranolol sobre a resposta contrátil induzida com noradrenalina (NOR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos hipertensos renais 25
- Figura 7.** Efeito da ioimbina sobre a resposta contrátil induzida com noradrenalina (NOR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos 26
- Figura 8.** Efeito da ioimbina sobre a resposta contrátil induzida com noradrenalina (NOR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos hipertensos renais 27
- Figura 9.** Efeito do antagonistas de α_2 -AR (RX821002) e de diferentes concentrações de ioimbina sobre a resposta contrátil induzida com fenilefrina (PE) em aortas sem endotélio, isoladas de ratos normotensos 28
- Figura 10.** Efeito da noradrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, em aortas com endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C) 29
- Figura 11.** Efeito do propranolol sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, estimulada por noradrenalina em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B) 30
- Figura 12.** Efeito da noradrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, em aortas com endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C) 31

Figura 13. Efeito da fenoxibenzamina sobre a fosforilação do resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, estimulada por noradrenalina em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B)	32
Figura 14. Efeito do wortmannin ou catalase sobre a fosforilação do resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, estimulada por noradrenalina em aortas com endotélio isoladas de ratos hipertensos renais	33
Figura 15. Concentração de noradrenalina (NOR) em plasma de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C).....	34
Figura 16. Concentração de noradrenalina (NOR) nas adrenais, direita e esquerda, de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B)	35
Figura 17. Concentração de noradrenalina (NOR) nas adrenais, direita (A) e esquerda (B), de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C)	36
Figura 18. Resposta contrátil induzida com adrenalina (ADR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), expressa em grama de tensão	37
Figura 19. Resposta contrátil induzida com adrenalina (ADR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), expressa em porcentagem da contração prévia estimulada por KCl 60 mmol/L	39
Figura 20. Efeito da inibição da NO-Sintase com L-NAME sobre a resposta contrátil da adrenalina (ADR), em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B).....	41
Figura 21. Efeito do propranolol sobre a resposta contrátil induzida com adrenalina (ADR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos.....	42
Figura 22. Efeito do propranolol sobre a resposta contrátil induzida com adrenalina (ADR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos hipertensos renais	43
Figura 23. Efeito da ioimbina sobre a resposta contrátil induzida com adrenalina (ADR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos.....	44
Figura 24. Efeito da ioimbina sobre a resposta contrátil induzida com adrenalina (ADR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos hipertensos renais	45
Figura 25. Efeito da adrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, em aortas com endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C).....	46

- Figura 26.** Efeito do propranolol sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, estimulada por adrenalina em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B)... 47
- Figura 27.** Efeito da adrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, em aortas com endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C)..... 48
- Figura 28.** Efeito da fenoxibenzamina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, estimulada por adrenalina em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B) 49
- Figura 29.** Efeito da adrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, em aortas com endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C)..... 50
- Figura. 30.** Efeito do wortmannin ou catalase sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, estimulada por adrenalina em aortas com endotélio isoladas de ratos hipertensos renais 51
- Figura 31.** Concentração de adrenalina (ADR) em plasma de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C) 51
- Figura 32.** Concentração de adrenalina (ADR) nas adrenais, direita e esquerda, de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B) 52
- Figura 33.** Concentração de adrenalina (ADR) nas adrenais, direita (A) e esquerda (B), de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C) 53
- Figura 34.** Delta Intensidade de fluorescência (IF) em % emitida pela sonda sensível ao NO (DAF-2DA) em células endoteliais de aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C) estimuladas por noradrenalina (A) e adrenalina (B) 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de Emax (em gramas de tensão) e pD ₂ obtidos da resposta contrátil estimulada com noradrenalina (NOR) em aortas de ratos na ausência ou presença de inibidor de NO-Sintase ou de antagonistas adrenérgicos.....	20
Tabela 2. Valores de Emax (%) e pD ₂ obtidos com noradrenalina (NOR) em aorta de ratos 2R e 2R-1C	21
Tabela 3. Valores da concentração de noradrenalina plasmática e tecidual (adrenais) em animais 2R e 2R-1C	34
Tabela 4. Valores de Emax (em gramas de tensão) e pD ₂ obtidos da resposta contrátil estimulada com adrenalina em aorta de ratos na ausência ou presença de inibidor de NO-Sintase ou de antagonistas adrenérgicos	38
Tabela 5. Valores de Emax e pD ₂ obtidos com adrenalina, expressa como percentual da contração prévia estimulada por KCl 60 mmol/L, estimulada com adrenalina em aorta de ratos.....	40
Tabela 6. Valores da concentração plasmática e tecidual (adrenais) de adrenalina em animais 2R e 2R-1C	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-AR	alfa-adrenoceptor
α_1-ARs	alfa 1-adrenoceptor
α_2-ARs	alfa 2-adrenoceptor
β-AR	beta-adrenoceptor
β_1-AR	beta 1-adrenoceptor
β_2-AR	beta 2-adrenoceptor
β_3-AR	beta 3-adrenoceptor
[NO]_c	concentração citosólica de óxido nitro
[Ca⁺²]_c	concentração citosólica de cálcio
2R	rato normotenso
2R-1C	rato hipertenso
7TMRs	receptores de 7 domínios transmembrana
ACh	acetilcolina
ADR	adrenalina
AKT	proteína quinase B
AMPc	adenosina monofosfatada cíclica
Ang II	angiotensina II
ANOVA	análise de variância
AR	adrenoceptores
AT1	subtipo I do receptor para angiotensina
BH₄	tetrahidrobiopterina
BSA	soro de albumina sérica bovina
Ca⁺²	íon cálcio
CaCl₂	cloreto de cálcio

CAM	calmodulina
CMLV	células do músculo liso vascular
CO₂	monóxido de carbono
DAF-2DA	sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína
DAF-2T	sonda fluorescente 4,5-triazol diaminofluoresceína
DC	débito cardíaco
DAG	diacilglicerol
E+	aorta com endotélio
E-	aorta sem endotélio
EC₅₀	concentração que produz 50% do efeito máximo
EDCF	fator de contração derivado do endotélio
EDHF	fator hipolarizante derivado do endotélio
EDRF	fator de relaxamento derivado do endotélio
EPM	erro padrão da média
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
E_{max}	efeito máximo
eNOS	NO-Sintase endotelial
EPM	erro padrão da média
FAD	flavina adenosina dinucleotídeo
FMN	flavina adenosina mononucleotídeo
f-eNOS	NO-Sintase fosforilada
GMPc	guanosina monofosfatada cíclica
GPCRs	receptores acoplados a proteína G
GRKs	quinases de receptores acoplados a proteína G
H₂O₂	peróxido de hidrogênio

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IF	intensidade de fluorescência
IM	intramuscular
iNOS	NO-Sintase induzível
IP₃	inositoltrisfosfato
K⁺	íon potássio
KCl	cloreto de potássio
KH₂PO₄	fosfato de potássio monobásico
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil Ester
MgCl₂	cloreto de magnésio
MgSO₄	sulfato de magnésio
MLV	músculo liso vascular
N₂O₃	trióxido de dinitrogênio
NaCl	cloreto de sódio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaHCO₃	bicarbonato de sódio
NaH₂PO₄	bicarbonato de potássio
NO	óxido nítrico
NOR	noradrenalina
NOS	óxido nítrico sintase
nNOS	NO-Sintase neuronal
NPS	nitroprussiato de sódio
O₂⁻	ânion superóxido
O₂	oxigênio
ONOO⁻	peroxinitrito

PA	pressão arterial
PAS	pressão arterial sistólica
pD₂	co-logaritmo da concentração de uma droga que produz a metade do E _{max}
PE	fenilefrina
PGI₂	prostaciclina
pH	potencial hidrogeniônico
PI3K	fosfatidilinositol-3-OH quinase
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PMSF 1	fluoreto de fenilmetilsulfonil
RVP	resistência vascular periférica
Ser	resíduo do aminoácido serina
Ser¹¹⁷⁷	resíduo do aminoácido serina na posição 1177
SHR	rato espontaneamente hipertenso
SNS	sistema nervoso simpático
SOD	enzima peróxido dismutase
SRAA	sistema renina angiotensina aldosterona
Thr	resíduo do aminoácido treonina
Thr⁴⁹⁵	resíduo do aminoácido treonina na posição 495
L-VDDC	canal para Ca ²⁺ dependente de voltagem Tipo L

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3 MÉTODOS	11
3.1 Implantação da hipertensão renovascular pelo modelo experimental 2R-1C.....	11
3.2 Montagem de preparações isoladas para estudo por reatividade vascular.....	11
3.3 Estudos de reatividade vascular em aortas, com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C	12
3.3.1 Papel do endotélio sobre a resposta contrátil induzida por noradrenalina ou adrenalina, expressa em gramas de tensão ou como percentual da contração prévia induzida por KCl 60 mmol/L.....	12
3.3.2 Efeito de antagonistas de adrenoceptores sobre a resposta contrátil induzida por noradrenalina ou adrenalina	12
3.3.3 Efeito do inibidor não seletivo da NO-Sintase sobre a resposta contrátil induzida por noradrenalina ou adrenalina	12
3.3.4 Efeito de diferentes concentrações dos antagonistas α_2 -AR (ioimbina e RX 821002), sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina (PE).....	13
3.4 <i>Western Blot</i> para expressão proteica da eNOS fosforilada no resíduo de Ser ¹¹⁷⁷	13
3.5 Dosagem de catelocaminas	14
3.6 Estudos por citometria de fluxo	15
3.6.1 Isolamento das células endoteliais para estudo por citometria de fluxo	15
3.6.2 Medida por citometria de fluxo, da produção de NO em células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C após estímulo com NOR ou ADR.....	16
3.7 Análise Estatística	17
3.8 Drogas.....	17

4 RESULTADOS.....	19
4.1 Resposta contrátil induzida por noradrenalina (NOR) em aortas com endotélio ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C	19
4.2 Resposta contrátil induzida por noradrenalina e expressa como percentual da contração induzida por KCl 60 mmol/L, em aortas com endotélio ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	20
4.3 Resposta contrátil máxima induzida com KCl 60 mmol/L, em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C	22
4.4 Efeito da inibição da NO-Sintase sobre a contração induzida com noradrenalina em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C	23
4.5 Efeito do propranolol sobre a resposta contrátil induzida pela noradrenalina em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	24
4.6 Efeito da ioimbina sobre a resposta contrátil induzida pela noradrenalina em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	26
4.7 Resposta contrátil obtida pela ativação de receptores α_1 -adrenérgicos com noradrenalina em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	28
4.8 Efeito dos antagonistas de receptores α_2 -adrenérgicos (RX 821002 e ioimbina) sobre a resposta contrátil induzida com fenilefrina (PE) em aortas sem endotélio, isoladas de ratos 2R	28
4.9 Efeito da noradrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ da eNOS, em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C	29
4.10 Efeito do antagonista de receptores β -adrenérgicos sobre a fosforilação do resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ da eNOS, estimulada com noradrenalina em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	29
4.11 Efeito da noradrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ da eNOS em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C	31
4.12 Efeito do antagonista não seletivo de receptores α -adrenérgicos sobre a fosforilação do resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ da eNOS em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C	31
4.13 Participação da via PI ₃ K/AKT ou peróxido de hidrogênio na fosforilação do resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ da eNOS estimulada com noradrenalina em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R-1C	33
4.14 Medida de noradrenalina plasmática em ratos 2R e 2R-1C.....	34
4.15 Medida de noradrenalina tecidual de ratos 2R e 2R-1C.....	35
4.16 Resposta contrátil estimulada com adrenalina em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	37
4.17 Resposta contrátil induzida com adrenalina em relação à resposta contrátil estimulada com KCl, em aortas com endotélio ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C	39
4.18 Efeito da inibição da enzima NO-Sintase sobre a contração vascular induzida com adrenalina em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C...41	41

4.19 Efeito do propranolol sobre a resposta contrátil induzida pela adrenalina em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	42
4.20 Efeito da ioimbina sobre a resposta contrátil induzida pela adrenalina em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	44
4.21 Efeito da ativação de receptores α_1 -adrenérgicos sobre a resposta contrátil induzida pela adrenalina em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C	46
4.22 Efeito da adrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ , da eNOS em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C	46
4.23 Efeito do antagonista de receptores β -adrenérgicos ativados pela adrenalina na fosforilação do resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ da eNOS em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	47
4.24 Efeito da adrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ da eNOS em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C	48
4.25 Participação de receptores α -adrenérgicos ativados pela adrenalina na fosforilação do resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ da eNOS em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C	48
4.26 Efeito da ADR sobre a expressão do resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ fosforilado da eNOS em aortas com endotélio de ratos 2R e 2R-1C	50
4.27 Participação da via PI ₃ K/AKT ou peróxido de hidrogênio na fosforilação do resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ da eNOS induzida pela adrenalina em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R-1C.....	50
4.28 Medida de adrenalina plasmática de ratos 2R e 2R-1C	51
4.29 Medida de adrenalina tecidual de ratos 2R e 2R-1C.....	52
4.30 Produção de NO em células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C, estimuladas com noradrenalina ou adrenalina	54
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÃO	71
7 REFERÊNCIAS.....	73

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso simpático é um dos principais sistemas envolvidos na regulação da pressão arterial (Guyenet, 2006; Vanhoutte et al., 1981). Fibras pós-ganglionares eferentes simpáticas liberam noradrenalina (NOR) nos vasos sanguíneos, inclusive arteríolas, o que aumenta a resistência vascular periférica e pressão arterial. Fibras pré-ganglionares simpáticas inervam diretamente a medula da supra-renal e o estímulo simpático de diferentes populações de células cromafins supra-renais resulta na liberação direta na circulação sanguínea das catecolaminas, adrenalina (ADR) e NOR, agonistas adrenérgicos endógenos (Morrison e Cao, 2000). A medula supra-renal é embriológica e anatomicamente similar aos gânglios simpáticos, funciona como uma glândula neuro-endócrina e a ADR é a catecolamina liberada em maior proporção.

A família dos adrenoceptores ou receptores adrenérgicos modula os efeitos das catecolaminas endógenas e são divididos em três subfamílias: α_1 , α_2 e β de acordo com suas propriedades farmacológicas, homologia estrutural e acoplamento à proteína G (Zhong e Minneman, 1999). Os adrenoceptores pertencem à classe da rodopsina, a maior classe de receptores acoplados à proteína G (GPCRs), também conhecidos como receptores de 7 domínios transmembrana (7TMRs) (Fredriksson et al., 2003). Os GPCRs são preferencialmente denominados, por muitos autores, de 7TMRs devido à sua capacidade de promover sinalização independente de proteína G, pelo recrutamento da β -arrestina (Shukla et al., 2011). As β -arrestinas foram identificadas no processo de dessensibilização de receptores, que ocorre em duas etapas sequenciais. A primeira etapa requer a fosforilação de resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr) do receptor pelas quinases de receptores acoplados a proteína G (GRKs). De forma geral, a fosforilação aumenta a afinidade da β -arrestina pelo receptor ativo e em seguida ocorre a ligação das β -arrestina ao receptor o que impede fisicamente a ligação do receptor à proteína G. Esta é a segunda etapa da dessensibilização (Heitzler et al., 2012; Zheng et al., 2010; Barki-Harrington e Rockman, 2008).

Dale (1905) estudou os efeitos da ADR, o princípio ativo isolado de extratos da glândula supra-renal, que permitiu a descoberta dos adrenoceptores no sistema cardiovascular. Neste estudo, o efeito hipertensor induzido pela injeção de ADR era revertido para hipotensor quando previamente era administrada ergotoxina, que

mais tarde foi identificada como antagonista α -adrenérgico (α -AR) não seletivo. Esta descoberta possibilitou interpretar os experimentos da reversão da ADR apresentados por Dale. Mais tarde, Ahlquist (1948) propôs que as catecolaminas como a ADR e a NOR, regulam processos fisiológicos pela ativação de adrenoceptores específicos localizados na membrana celular, dependendo da dose, do tecido e do agonista. O autor postulou a classificação da potência farmacológica das principais catecolaminas endógenas e a sintética, isoprenalina, em relação aos adrenoceptores (α : Noradrenalina > Adrenalina > Isoprenalina e β : Isoprenalina > Adrenalina > Noradrenalina). Já em 1955, com a descoberta de antagonistas seletivos para receptores β -adrenérgicos (β -ARs), consolidou-se a subdivisão dos receptores em α -ARs e β -ARs, assim como a classificação original sobre a potência farmacológica das principais catecolaminas.

Os α -ARs se subdividem em α_1 -ARs e α_2 -ARs e suas subclasses, que se expressam em diferentes tipos celulares, identificados por técnicas de biologia molecular (Bylund et al., 1994; Insel et al., 1996). Cada uma dessas classes de receptores está associada a vias específicas de sinalização celular e produção de segundos mensageiros (Summers et al., 1993). Os α_1 -ARs acoplados à proteína Gq ativam a enzima fosfolipase C e produzem seus efeitos pelo aumento de concentração citosólica de Ca^{+2} (Berridge, 2009; Putney et al., 1989). No músculo liso vascular (MLV), a ativação de α_1 -ARs com agonistas seletivos como a fenilefrina, induz vasoconstrição (Park e Rasmussen, 1985). Ativação de α_2 -ARs, classicamente inibe a enzima adenilil-ciclase levando também à contração do MLV (Nebigil e Malik, 1992; Limbird, 1988). Os β -ARs são classificados em β_1 , β_2 e β_3 -AR, ativam classicamente a via da proteína Gs e adenilil-ciclase o que promove relaxamento do MLV por mecanismo dependente e independente do endotélio vascular (Ferro, et al., 2004; Callera et al., 2004).

A manutenção do tônus do MLV está relacionada à mobilização de $[Ca^{+2}]_c$ nas células do músculo liso vascular (CMLV), por estímulos específicos como agonistas (endógenos ou exógenos) ou inespecíficos como substâncias que despolarizam ou hiperpolarizam a membrana (estímulos químicos, elétricos ou mecânicos). As substâncias vasoativas produzidas pelo endotélio que exercem seus efeitos nas CMLV são classificadas como fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs – *Endothelium-Derived Relaxing Factors*) ou fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs – *Endothelium-Derived Contractile Factors*).

A contribuição do endotélio para a modulação do tônus vascular só ficou mais clara a partir da descoberta do EDRF por Furchgott e Zawadzki (1980), quando relataram que a acetilcolina causa relaxamento da aorta de coelho com endotélio íntegro. Denominou este fator endotelial como EDRF, que mais tarde foi identificado como óxido nítrico (NO) por Ignarro e cols (1986). O termo EDRF refere-se principalmente ao NO, mas a prostaciclina (PGI₂) e o EDHF (*Endothelium-Derived Hyperpolarization Factor*) também levam ao relaxamento do MLV.

Vale ressaltar que, nos últimos anos foram descobertas várias substâncias derivadas do endotélio com capacidade de hiperpolarizar a membrana de CMLV como o próprio NO (Bolotina et al., 1994), íon potássio (Edwards et al., 1998), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Ellis e Triggle, 2003). O NO tem relevante importância em artérias de condutância, pois é a substância responsável pela manutenção do tônus vascular basal destas artérias (Mitchell et al., 1992).

Foi a partir das descobertas da década de 80, que os pesquisadores buscaram verificar o papel do endotélio vascular sobre as respostas mediadas por agonistas adrenérgicos. Vanhoutte e Miller (1989) sugeriram o envolvimento de α_2 -ARs em resposta de relaxamento às catecolaminas, assim como Zschauer e cols (1997) relataram que a ativação de α_1 -ARs nas células endoteliais por agonista seletivo, é capaz de produzir NO, enquanto a ativação de α_2 -ARs produz prostanóide vasodilatador. A ativação de α_2 -ARs, também está relacionado á ativação da produção de NO (Molin e Bendhack, 2000).

Dados recentes do nosso laboratório mostraram que a ativação de α_1 -ARs com fenilefrina em aorta com endotélio, de ratos hipertensos renais (2R-1C), promove resposta contrátil menor do que em aortas de ratos normotensos (2R). Entretanto, a remoção endotelial ou inibição não seletiva da NOS reverteu a diferença na resposta contrátil entre aortas de 2R-1C e 2R (Silva et al., 2013). Além disso, estudos de Silva e cols (2014) demonstraram que a fenilefrina aumenta a fosforilação do resíduo Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, via PI₃K/AKT, o que é determinante para a maior ativação da enzima, produção de NO e guanosina monofosfatada cíclica (GMPc), em aorta com endotélio de ratos 2R-1C. Contudo, pouco se sabe sobre a importância das catecolaminas, NOR e ADR, para produção de NO em aorta de ratos hipertensos renais.

A biossíntese do NO resulta da oxidação de L-arginina a L-citrulina, reação catalisada pela enzima NO-Sintase (NOS) cuja atividade depende dos cofatores,

nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADPH), flavina adenosina dinucleotídeo (FAD), flavina adenosina mononucleotídeo (FMN) e tetrahydrobiopterina (BH₄) (Thomas et al., 2008; Sessa 2004; Moncada et al., 1991). Existem três isoformas da NOS, uma induzida por estímulo imunológico (iNOS ou NOS2) e duas constitutivas, a NOS endotelial (eNOS ou NOS3) e neuronal (nNOS ou NOS1). A eNOS, oxigenase que produz o NO derivado do endotélio, tem sua ativação bem definida como dependente do complexo Ca²⁺-calmodulina (Feron et al., 1998; Busse et al., 1990). Entretanto, Fleming e cols (1998) demonstraram que a fosforilação da eNOS representa um mecanismo independente de cálcio regulatório para ativação desta enzima. A fosforilação via fosfatidilinositol 3OH quinase/AKT (PI₃K-AKT) do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS aumenta sua atividade e altera sua sensibilidade ao Ca²⁺ (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999). Torna-se evidente que outros estímulos além do *sheer stress*, como fator de crescimento do endotélio vascular e ativação de receptores de tirosina quinase também são capazes de ativar a eNOS. A ativação da AKT de maneira dependente de PI₃K também está associada à ativação de receptores muscarínicos M₁ e M₂ acoplados às proteínas G_q e G_i, respectivamente (Murga et al., 1998).

A ligação do complexo cálcio-calmodulina (CaM) ao seu domínio na eNOS facilita o fluxo de elétrons dependente de NADPH e demais cofatores a partir do domínio redutase para o domínio oxigenase, catalisando a produção de NO. A eNOS apresenta numerosos sítios passíveis de fosforilação, porém nos vasos de ratos, é mais conhecido o mecanismo de fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ no domínio redutase e Thr⁴⁹⁵ situado no do domínio de ligação CaM. Vale ressaltar que as quinases envolvidas no processo de fosforilação variam conforme os estímulos recebidos pela célula e estas quinases apresentam diferente sensibilidade ao Ca²⁺. A fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ da eNOS induz o fluxo de elétrons do domínio redutase para o domínio oxigenase e a consequente produção de NO é aumentada cerca de duas vezes em relação ao basal. Por outro lado, o resíduo de Thr⁴⁹⁵ é um sítio regulatório negativo e quando fosforilado ocorre inibição da atividade da NOS, sendo a proteína quinase C (PKC) a provável quinase constitutiva responsável pela fosforilação deste resíduo (Fleming e Busse, 2003).

O NO é determinante para manutenção do tônus vascular e sua biodisponibilidade é diretamente afetada pelo excesso de radicais livres produzidos na hipertensão arterial. Como espécie radicalar, o NO reage de forma rápida com

outros radicais, como oxigênio (O_2) e ânion superóxido (O_2^-), que sob ação da enzima peróxido dismutase (SOD) produz H_2O_2 (Carter et al. 1994). Ao reagir com o O_2^- , o NO forma peroxinitrito ($ONOO^-$), potente agente oxidante que também reduz a biodisponibilidade de NO (Schiropoulos e Al-mehdi, 1995).

O estresse oxidativo é um estado no qual o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) se sobrepõe à capacidade antioxidante endógena, presente em modelos de hipertensão humana e animal e é um fator determinante para o desenvolvimento da disfunção endotelial (Higashi et al., 2002). A disfunção endotelial, caracterizada pelo menor relaxamento vascular mediado por agonistas que induzem liberação de NO, está presente nos vasos de diferentes modelos de hipertensão como SHR, Doca-Sal (Konishi e Su, 1983; Wu et al., 1996) e em aortas de ratos hipertensos renais (2R-1C) (Callera et al., 2000). A contribuição de EROs para disfunção endotelial no modelo 2R-1C tornou-se clara com os dados de Rodrigues e cols (2008) de nosso laboratório, em que o prejuízo no relaxamento de aortas com endotélio de ratos 2R-1C foi revertido pela incubação das preparações com vitamina C. Recentemente, o termo disfunção endotelial, está associado mais amplamente ao desequilíbrio na produção de EDRFs e EDCFs junto ao aumento na disponibilidade de EROS e redução da capacidade antioxidante (Silva et al., 2012).

No modelo de hipertensão renovascular (2R-1C), descrito por Goldblatt e cols (1934), o estresse oxidativo tem papel crucial na sua patogênese (Nishi et al., 2010; Costa et al., 2009). Este modelo de hipertensão é causado por estenose da artéria renal que promove a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), aumentando a produção do seu principal peptídeo ativo, a angiotensina II (AngII). A ativação de receptores AT_1 nas células do MLV por AngII aumenta a produção de O_2^- , provenientes da ativação da enzima NAD(P)H oxidase (Pagano et al., 1995; Griendling et al., 1994). Compondo o cenário do estresse oxidativo neste modelo, os estudos de Silva e cols (2013) evidenciaram maior produção de H_2O_2 em aortas ratos 2R-1C, com endotélio, de diferentes fontes enzimáticas como NADPH oxidase, Ciclooxygenase, Xantina-oxidase e Superoxido dismutase.

É crescente o número de estudos sugerindo que o SRAA e Sistema Nervoso Simpático não operam independentemente, mas interagem realizando suas funções regulatórias cardiovasculares. Oliveria-Sales e cols (2010) demonstraram que no modelo 2R-1C, a pressão arterial sistólica aumenta significativamente a partir da segunda semana após implantação do clipe e que se estabiliza a partir da quinta

semana. Campese e cols (2005) demonstraram que a atividade simpática é em parte mediada por EROs derivadas do estímulo com AngII, cujos níveis plasmáticos estão aumentados apenas na fase inicial da hipertensão (Oliveira-Sales, 2014; Martinez-Maldonado, 1991; Caravaggi et al., 1976). O estresse oxidativo, tanto central quanto periférico, desempenha importante papel na manutenção de alta atividade simpática e hipertensão arterial neste modelo (Oliveira-Sales et al., 2008; Oliveira-Sales et al., 2009).

Com a hiperatividade simpática e consequente estímulo da medula da supra-renal, ocorre aumento dos níveis plasmáticos de NOR e ADR como é observado em modelos neurogênicos de hipertensão e no modelo DOCA-Sal (Dominiak et al., 1986; Bouvier e Champlain, 1986).

O modelo de hipertensão renovascular 2R-1C está associado ao aumento da atividade simpática via estresse oxidativo e disfunção endotelial. Em conjunto com dados do nosso laboratório que evidenciam hiperativação da via nitrérgica em aorta de ratos 2R-1C estimulada com fenilefrina. É provável que ocorra hiperatividade do eixo neuro-humoral, o que torna mais importante investigar os efeitos da ativação dos adrenocetores endoteliais pelos agonistas adrenérgicos, NOR e ADR, já que estes apesar de não seletivos são os agonistas que conferem respostas mais próximas aos efeitos fisiológicos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a participação da NO-Sintase endotelial na resposta contrátil ativada pelos agonistas adrenérgicos, NOR e ADR, na aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C).

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Para avaliar a resposta vascular induzida por NOR ou ADR em aortas de ratos hipertensos (2R-1C) e normotensos (2R):

- Realizamos curvas concentração-efeito em aortas com ou sem endotélio
- Analisamos a melhor maneira de representação dos resultados: em grama absoluta de contração ou como % da contração induzida por KCl
- Avaliamos a participação do endotélio na resposta induzida pelos agonistas
- Avaliamos a participação da enzima NO-Sintase, em aorta com endotélio, pelo efeito do inibidor não seletivo (L-NAME)
- Avaliamos a participação de α_2 -AR e β -AR, pelos efeitos dos antagonistas ioimbina e propranolol, respectivamente
- Realizamos controle para verificar a seletividade de ioimbina por α_2 -AR

2.2.2 Para estudar os mecanismos moleculares envolvendo a ativação da NO-Sintase endotelial por NOR ou ADR em aortas de ratos hipertensos (2R-1C) e normotensos (2R):

- Avaliamos a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ de ativação da eNOS e sua relação com a ativação seletiva de α -AR ou β -AR, com o uso de fenoxibenzamina e propranolol
- Avaliamos a participação da via PI₃K/AKT e do H₂O₂, em aorta de ratos 2R-1C

2.2.3 Para avaliar a contribuição das catecolaminas circulantes na modulação da resposta adrenérgica ratos hipertensos (2R-1C) e normotensos (2R):

- Avaliamos a concentração de NOR e ADR no plasma e nas adrenais direita e esquerda

Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Implantação da hipertensão renovascular pelo modelo experimental 2R-1C

Os protocolos experimentais foram realizados nos grupos de ratos normotensos sham-operados (2R) e hipertensos renais (2 Rins - 1 Clipe, 2R-1C). Foram utilizados ratos Wistar, com peso entre 180 e 200 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto–USP. Os animais foram mantidos no biotério à temperatura constante de 22°C, em ciclo claro/escuro de 12h, com ração e água à vontade. Para induzir a hipertensão, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg Kg⁻¹) e submetidos à laparotomia mediana. O pedículo da artéria renal esquerda foi exposto, onde foi implantado um clipe de prata com abertura de 0,2 mm (2R-1C). Após a cirurgia, os animais foram tratados com dose única de antibiótico Terramicina LA (0,1 mL/100g), via IM. O grupo de ratos, submetido ao mesmo estresse cirúrgico, porém sem a implantação do clipe, caracterizou o controle normotenso (2R). Nesse estudo os ratos foram considerados hipertensos quando a pressão arterial caudal sistólica foi maior ou igual a 180 mmHg. Os experimentos foram realizados entre as sexta e oitava semanas após a cirurgia.

3.2 Montagem de preparações isoladas para estudo por reatividade vascular

Para registro da tensão isométrica foram utilizadas preparações de aorta torácica isoladas de ratos 2R-1C ou 2R (350-500 g). Os ratos foram anestesiados via inalatória com isoflurano 500 µL e sacrificados por decapitação. A aorta foi isolada, dissecada de tecidos conjuntivos e gorduras e foi cortada em anéis de 4 mm de comprimento. O endotélio vascular foi removido mecanicamente (E-) ou não (E+), dependendo do protocolo a ser realizado. A efetividade da manutenção do endotélio foi verificada pelo relaxamento à acetilcolina (1 µmol/L) em anéis de aorta contraídos com fenilefrina (0,1 µmol/L) para testar a viabilidade da preparação. Os anéis de aorta foram montados entre dois ganchos de metal inseridos no lúmen da artéria para produzir tensão. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor de registro de força. O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs modificado com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 14,9; glicose 5,5, em pH 7,4, sob aeração constante com

mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), a 37°C. As preparações permaneceram por 60 min sob tensão basal constante (1,5 g) para estabilização. A tensão isométrica foi registrada através de transdutor acoplado a um polígrafo.

3.3 Estudos de reatividade vascular em aortas, com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

3.3.1 Papel do endotélio sobre a resposta contrátil induzida por noradrenalina ou adrenalina, expressa em gramas de tensão ou como percentual da contração prévia induzida por KCl 60 mmol/L

Após testar a viabilidade das preparações e confirmar a presença ou ausência de endotélio, realizamos contração com solução de Krebs modificada para KCl 60 mmol/L, tendo o cuidado de corrigir a concentração de NaCl para não alterar a osmolaridade da solução de Krebs. A contração máxima obtida com KCl 60 mmol/L foi registrada em gramas de contração e utilizada como fator de normalização da resposta. O valor máximo da contração foi registrado e as preparações foram lavadas por 20 min. Em seguida, realizamos curvas concentração-efeito para NOR ou ADR nas concentrações de 0,1 nmol/L a 100 µmol/L. As preparações foram estimuladas até atingir o efeito máximo (Emax).

3.3.2 Efeito de antagonistas de adrenoceptores sobre a resposta contrátil induzida por noradrenalina ou adrenalina

Curvas concentração-efeito para NOR ou ADR (0,1 nmol/L a 100 µmol/L) foram realizadas após incubação por 30 min e em presença de antagonista seletivo α₂-adrenérgico, ioimbina (10 µmol/L) ou antagonista não-seletivo β-adrenérgico, propranolol (10 µmol/L), ou associação de ambos antagonistas nas concentrações em que foram utilizados isoladamente

3.3.3 Efeito do inibidor não seletivo da NO-Sintase sobre a resposta contrátil induzida por noradrenalina ou adrenalina

Após incubação por 30 min e na presença do inibidor não seletivo da NOS, L-NAME, 100 µmol/L, realizamos curvas concentração-efeito para NOR e ADR (0,1 nmol/L a 100 µmol/L).

3.3.4 Efeito de diferentes concentrações dos antagonistas α_2 -AR (ioimbina e RX 821002), sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina (PE)

Curvas concentração-efeito para PE (0,1 nmol/L a 100 μ mol/L) foram realizadas na ausência (controle) ou após incubação por 30 min com diferentes concentrações (em μ mol/L) de ioimbina (10,0; 1,0; 0,1; 0,01) ou Rx 821002 (0,1).

3.4 Western Blot para expressão proteica da eNOS fosforilada no resíduo de Ser¹¹⁷⁷

Para avaliar a fosforilação do resíduo de ativação, Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, aortas de ratos 2R e 2R-1C com endotélio, foram montadas em banho para órgãos isolados. Após estabilização por 60 min sob tensão de 1,5 g, as aortas foram estimuladas com PE e após atingir o platô da resposta contrátil a integridade endotelial foi verificada com ACh. Nos 20 min seguintes, a solução de Krebs foi trocada várias vezes para remover os agonistas PE e ACh. Em seguida, as preparações foram incubadas por 30 min ou não (controle), com propranolol 10 μ mol/L ou fenoxibenzamina 10 μ mol/L. A seguir, as preparações controle e incubadas com propranolol foram estimuladas com EC₁₀₀ (10 μ mol/L) da NOR ou ADR. As preparações incubadas com fenoxibenzamina tiveram a solução de Krebs trocada por 2 vezes, após os 30 min de incubação e antes do estímulo com o agonista NOR ou ADR. Em outro grupo de aortas de ratos 2R-1C com endotélio (E+), após verificar a viabilidade e presença de endotélio, as aortas foram incubadas ou não com o inibidor da via PI₃K/AKT (wortmannin 200 nmol/L) ou com o catalisador de peróxido de hidrogênio, Catalase de fígado bovino (300 U/mL).

Após estímulo, com NOR ou ADR, uma vez atingido o platô da resposta contrátil, os anéis foram removidos do banho e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80 °C. Cada amostra foi macerada em 120 μ L de tampão RIPA suplementado com inibidores de protease e de fosfatase (mmol/L) (Tris-HCl 65,2; NaCl 154; NP-40 1%; Deoxicolato de Sódio 0,25%; EDTA 0,8; PMSF 1; Ortovanadato de Sódio 10; Fluoreto de Sódio 100; Pirofosfato de Sódio 10 e inibidor de protease) para evitar proteólise e manter a fosforilação das proteínas. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 10 min a 4°C, para a remoção de debris. A concentração proteica das amostras foi determinada pelo método de *Bradford* (*Bio Rad Protein Assay*). As alíquotas do lisado contendo 20 μ g de proteína total foram misturadas com tampão de amostra e fervidas por 5

min e aplicadas no gel. A separação de proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% a 4 °C, por 2 h, a 150V.

O padrão de peso molecular utilizado foi o *Benchmark* (Life Technologies). Após a corrida do gel, as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose, que foi bloqueada com leite desnatado 5% em TBS-T (0,13 mol/L NaCl; 20 mmol/L tris; pH 7,6; 0,1% Tween 20) por 1 h. Em seguida, a solução de bloqueio foi retirada e as membranas foram lavadas com TBS-T 4 vezes por 5 min cada e incubadas com anticorpo primário diluído em TBS-T com BSA 3% (albumina de soro bovino) ou leite desnatado 5%. Foram usados anticorpo de coelho para eNOS fosforilada no resíduo de Ser¹¹⁷⁷ e anticorpo de camundongo para eNOS total. As membranas ficaram incubadas *overnight*, a 4 °C. Seguiram-se 4 lavagens de 5 min com TBS-T. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-coelho ou anti-camundongo foram diluídos em BSA 1% ou leite desnatado 5% e aplicados a membrana por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, mais 6 lavagens de 5 min cada foram feitas e detectada por quimioluminescência utilizando-se o *kit ECL plus* (GEHealthcare). As proteínas foram quantificadas por densitometria, pelo *software Image J*. A expressão da eNOS fosforilada (p-eNOS) foi normalizada pela eNOS total.

3.5 Dosagem de catelocaminas

Ratos, 350-500g, hipertensos renais (2R-1C, n=10) e normotensos (2R, n=10), foram submetidos à técnica de *handling* (Fluttert e Oitzl, 2000) adaptada as necessidades experimentais para coleta do plasma e adrenais para verificar a concentração de NOR e ADR plasmática e tecidual. Desta forma, na semana anterior à coleta, somente eu como experimentador responsável manipulei os 20 animais incluídos no estudo. No antepenúltimo dia anterior à coleta, cada animal foi acariciado por 2 min no sentido cabeça-cauda. A partir do penúltimo dia além do manuseio por 2 min, o recipiente onde os animais foram anestesiados foi exposto a estes para adaptação ao local. Desta forma, no dia da coleta os animais estavam acostumados ao manipulador e ao recipiente para anestesia inalatória, realizada com 500 µL de isoflurano.

Por punção intracardíaca, coletamos e transferimos o sangue para tubo heparinizado. O material biológico foi armazenado em temperatura entre 2 a 8°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 5 min a 3.000 rpm a 4°C, para

obtenção do plasma. O plasma de cada animal foi transferido para tubos secos e congelados a -80°C .

Após a punção intracardíaca, também coletamos as adrenais, esquerda (referente ao rim clipado) e direita (referente ao rim contralateral). Estas foram pesadas e armazenadas a -20°C e em seguida foram transferidas para *freezer* com temperatura a -80°C .

Realizamos a dosagem das catecolaminas no Laboratório de Rim e Hormônios da Dra. Dulce Elena Casarini (UNIFESP-SP), em São Paulo, SP, de acordo com o método descrito por Mazzacoratti e cols (1990). O transporte das amostras para São Paulo foi feito em gelo seco.

3.6 Estudos por citometria de fluxo

3.6.1 Isolamento das células endoteliais para estudo por citometria de fluxo

Segmentos de aorta de ratos 2R e 2R-1C (15 mm) foram dissecados dos tecidos adjacentes, isolados, cortados longitudinalmente e mantidos em solução de Hanks completa, modificada (CaCl_2 1,6 mmol/L; MgCl_2 1,0 mmol/L; NaCl 120,0 mmol/L; KCl 5,0 mmol/L; NaH_2PO_4 0,5 mmol/L; dextrose 10,0 mmol/L; HEPES 10,0 mmol/L; pH 7,4). A remoção das células endoteliais foi feita mecanicamente com o auxílio de uma haste plástica plana (rodinho). A suspensão de células obtida foi centrifugada a 200 $\times g$ por 5 min e concentrada em 500 μL de solução de Hanks contida em tubos de poliestireno para citometria de fluxo. A seguir, as células permaneceram acondicionadas em incubadora de CO_2 a 37°C , até o momento do experimento. O n experimental representa um animal. A análise por citometria de fluxo foi realizada em FACS Canto, BD.

Nos estudos de citometria de fluxo, foram analisados os traçados citofluorográficos (histogramas) gerados pelo programa DIVA (*Software DIVA*) após leitura pelo citômetro. Os histogramas obtidos descrevem fenômenos de dispersão do laser que incide sobre as células, de absorção da luz e de emissão de fluorescência. Os histogramas biparamétricos correlacionam a luz dispersa lateralmente (*Side-scattered light*, SSC), proporcional à complexidade ou granulosidade interna da célula, em função da luz dispersa para frente (*Forwardscattered light*, FSC), proporcional à área da superfície celular.

A correlação das medidas de SSC e FSC permitem diferenciar os tipos celulares em populações celulares heterogêneas, agrupadas em *gates* (fronteiras gráficas que definem as características de uma população celular). Os histogramas biparamétricos gerados pela análise citofluorográfica foram utilizados para analisar a homogeneidade da população de células endoteliais empregada na leitura. Os histogramas monoparamétricos relacionam o número de eventos celulares adquiridos por leitura em função da intensidade de fluorescência emitida pela sonda fluorescente em análise e foram utilizados para analisar a biodisponibilidade de NO nas amostras empregadas durante a leitura. Sendo assim, a intensidade de fluorescência (IF) é diretamente proporcional à $[NO]_c$. Foi calculada a diferença (Δ) entre a intensidade de fluorescência inicial (IF_i) e final (IF_f), que foi expressa em % em função da $[NO]_c$ basal inicial, calculada pela fórmula abaixo.

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

3.6.2 Medida por citometria de fluxo, da produção de NO em células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C após estímulo com NOR ou ADR

Células endoteliais sem qualquer estímulo foram fracionadas em quatro tubos. O primeiro tubo de cada grupo ou “n” amostral foi submetido à leitura, para averiguar se ocorreu emissão de auto-fluorescência (branco). No segundo tubo incubamos por 10 min somente os estímulos, NOR ou ADR, para certificar que os próprios agonistas não emitem fluorescência própria. No terceiro, incubamos por 20 min somente a sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2/DA – 10 $\mu\text{mol/L}$, excitada com laser azul em 488 nm, com emissão em 530/30, utilizando detector D). A sonda após ter sua porção diacetato clivada por esterases da membrana plasmática reage com o produto de oxidação do NO, o trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), produzindo o composto fluorescente estável DAF-2T. A leitura dessa amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pela DAF-2/DA. E no quarto tubo incubamos com NOR ou ADR, por 10 min, após 10 min de incubação com a sonda fluorescente, totalizando 20 min de incubação com a sonda, a fim de verificar a produção de NO induzida pelos agonistas adrenérgicos.

Foram realizadas aquisições de 2500 a 5000 eventos para cada protocolo realizado. A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando *software* DIVA.

3.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM em preparações de aorta obtidas de diferentes animais. Em estudos de reatividade vascular as determinações da EC₅₀ (concentração que produz 50% da resposta máxima) e de efeito máximo (Emax) foram realizadas utilizando o método de regressão não-linear dos mínimos quadrados (Meddings et al., 1989) pelo o programa *GraphPad Prism* (*graphPad software*, versão 3.00, 2000). Para a análise da potência do agonista foi utilizado o valor de pD₂ (-log EC₅₀), que assume distribuição normal, compatível com manipulações e comparações estatísticas (Kenakin, 1997). A significância estatística dos dados foi avaliada através de teste de variância de uma via (*One-Way*, ANOVA) seguido do pós-teste, Dunnett no caso de múltipla comparação com o controle e para comparar 2 grupos foi utilizado teste *t* Student não-pareado. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.8 Drogas

Acetilcolina, Fenilefrina, Bitartarato de noradrenalina, Bitartarato de adrenalina, L-NAME, Cloridrato de propranolol, Cloridrato de loimbina, Cloridrato de Fenoxibenzamina, Wortmannin, Catalase de fígado bovino, foram obtidas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). As concentrações das drogas utilizadas foram retiradas da literatura. Propranolol (10 $\mu\text{mol/L}$ - Pontes et al., 2012). Ioimbina (10,0; 1,0; 0,1; 0,01 $\mu\text{mol/L}$ - O' Rourke et al., 1997; Quinn et al., 2006; Kató et al., 2008; Kenakin et al., 1997), Rx 821002 (0,1 $\mu\text{mol/L}$ -Zhang et al., 2002). L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$ - Pontes et al., 2012). Fenoxibenzamina (10 $\mu\text{mol/L}$ - O' Rourke et al., 1997). Wortmannin. 200 nmol/L -Bodiga et al., 2010). Catalisador de peróxido de hidrogênio, Catalase de fígado bovino, 300 U/mL -Yogi, et al., 2010).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Resposta contrátil induzida por noradrenalina (NOR) em aortas com endotélio ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

As curvas concentração-efeito cumulativas para NOR demonstram que ocorreu contração concentração-dependente em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio. Como mostram a Fig. 1A e Fig. 1B, o E_{max} foi menor em aortas de ratos 2R-1C do que em 2R. Porém, a potência foi maior em aortas com endotélio isoladas de ratos 2R-1C do que em aortas de ratos 2R. A remoção do endotélio de aortas 2R ou de 2R-1C não alterou o E_{max} e o pD_2 da NOR (Tab. 1).

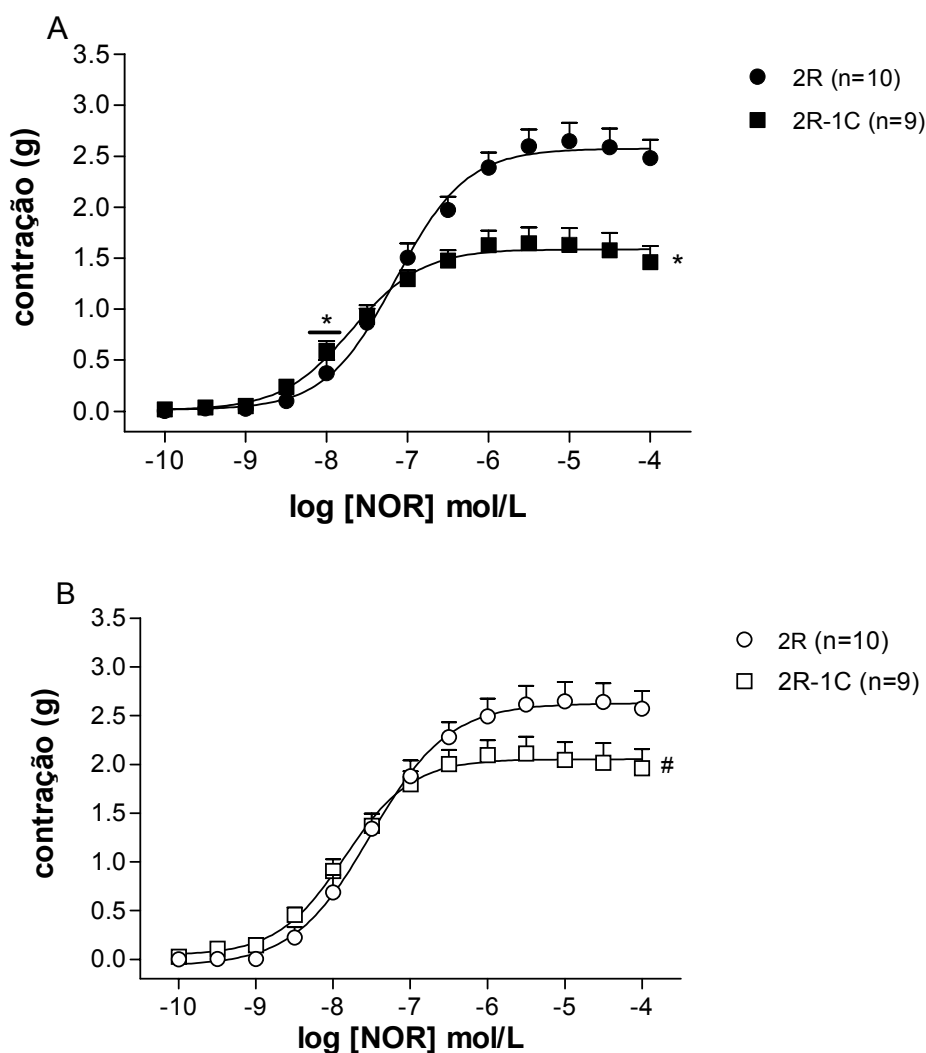


Fig. 1. Resposta contrátil induzida pela noradrenalina (NOR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). Os pontos representam a média \pm EPM, em grama (g) de tensão, de "n" preparações, isoladas de diferentes ratos. (* $p < 0,05$ e # $p < 0,05$) Representam diferenças em relação ao controle 2R.

Tabela 1. Valores de Emax (em gramas de tensão) e pD₂ obtidos da resposta contrátil estimulada com noradrenalina (NOR) em aortas de ratos na ausência ou presença de inibidor de NO-Sintase ou de antagonistas adrenérgicos

	2R				2R-1C			
	E+		E-		E+		E-	
	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂
NOR	2,5 ± 0,2	7,20 ± 0,14	2,6 ± 0,2	7,58 ± 0,15	1,5 ± 0,2*	7,73 ± 0,11*	2,0 ± 0,2 [#]	7,90 ± 0,11
L-NAME	2,6 ± 0,1	7,44 ± 0,11	ND	ND	2,4 ± 0,2 ⁺	8,09 ± 0,11 ⁺	ND	ND
Propranolol	3,0 ± 0,2	6,78 ± 0,05 ^a	3,3 ± 0,1 ^a	7,86 ± 0,22	1,4 ± 0,1	6,99 ± 0,09 ^a	2,3 ± 0,1	7,52 ± 0,24
loimbina	2,2 ± 0,2	5,56 ± 0,21 ^a	3,0 ± 0,1	6,16 ± 0,08 ^a	2,1 ± 0,2	5,45 ± 0,18 ^a	1,8 ± 0,2	6,14 ± 0,25 ^a
Propranolol/ loimbina	3,0 ± 0,2	5,67 ± 0,10 ^a	2,7 ± 0,2	6,25 ± 0,16 ^a	2,0 ± 0,2	6,03 ± 0,09 ^a	1,8 ± 0,2	6,14 ± 0,25 ^a

Os valores representam o efeito contrátil máximo (Emax) ± erro padrão da média (EPM) expresso em grama e pD₂ (-logEC₅₀) obtidos de “n” aortas com endotélio (E+) ou sem (E-) de diferentes ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). * Representa diferença em relação a 2R E+ (p<0,05). [#] Representa diferença em relação a 2R E- (p<0,05). ⁺ p<0,05) Diferença em relação a 2R-1C E+. ^ap<0,05) Diferença em relação ao seu respectivo controle. ND (não determinado).

4.2 Resposta contrátil induzida por noradrenalina e expressa como percentual da contração induzida por KCl 60 mmol/L, em aortas com endotélio ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

O valor de pD₂ foi maior e de Emax foi menor em aortas com endotélio de 2R-1C comparados a 2R (Fig. 2A). Porém, em aortas sem endotélio, os valores de pD₂ e Emax da NOR não foram diferentes entre 2R e 2R-1C (Fig. 2B). Os dados numéricos estão apresentados na Tab. 2.

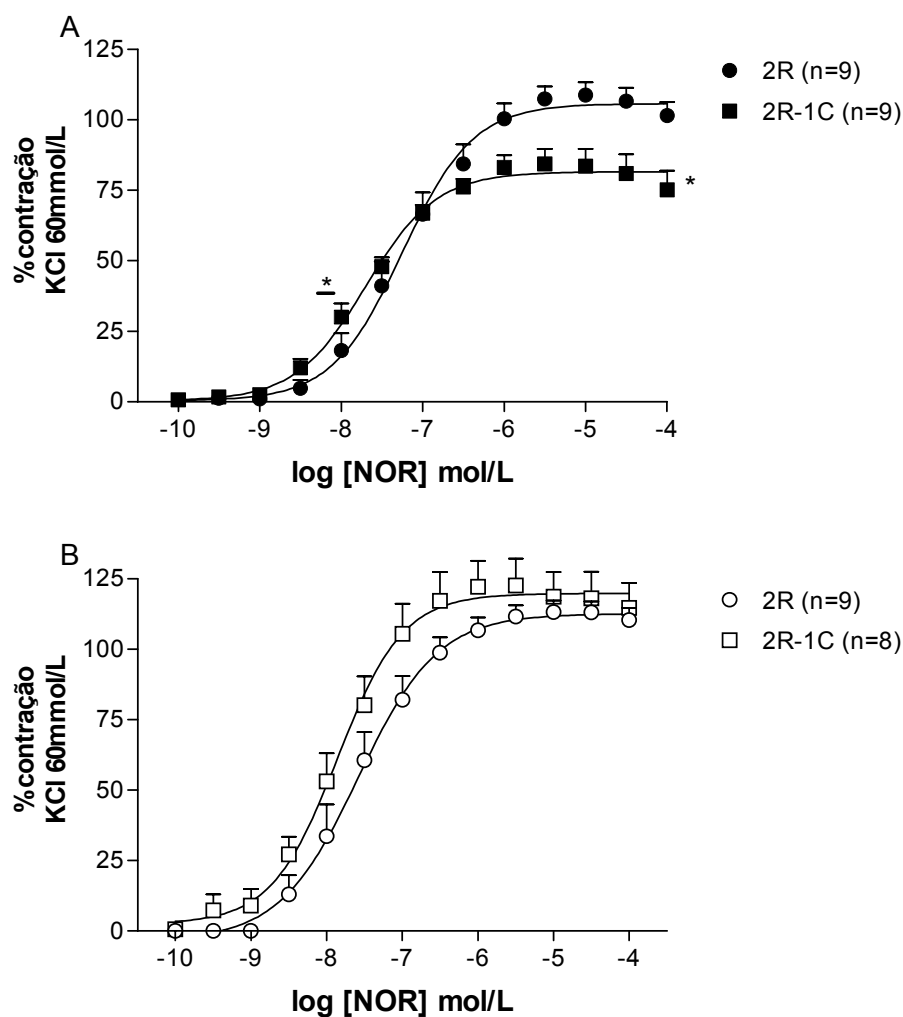


Fig. 2. Resposta contrátil, induzida com noradrenalina (NOR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). Os pontos representam a média \pm EPM, expressos em porcentagem da contração prévia estimulada com KCl 60 mmol/L, de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. * Representa diferença de Emax e pD_2 , em relação ao controle 2R ($p < 0,05$).

Tabela 2. Valores de Emax (%) e pD_2 obtidos com noradrenalina (NOR) em aorta de ratos 2R e 2R-1C.

	2R				2R-1C			
	E+		E-		E+		E-	
	Emax	pD_2	Emax	pD_2	Emax	pD_2	Emax	pD_2
NOR	101,5 \pm 4,8	7,25 \pm 0,15	110,4 \pm 4,3	7,58 \pm 0,17	75,2 \pm 6,9*	7,73 \pm 0,11*	114,6 \pm 8,9	7,87 \pm 0,12

Os valores representam o efeito contrátil máximo (Emax) \pm erro padrão da média (EPM) expresso em relação (%) à contração prévia estimulada com KCl, 60 mmol/L e pD_2 obtidos de "n" aortas com endotélio (E+) ou sem (E-) de diferentes ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). (* $p < 0,05$) Representam diferenças em relação a 2R.

4.3 Resposta contrátil máxima induzida com KCl 60 mmol/L, em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

Em aortas com ou sem endotélio (Fig. 3A e Fig. 3B), a média dos valores de contração induzida com KCl foi menor em aortas de 2R-1C (E+: $1,94 \pm 0,09\text{g}$, $n=18$, ($p<0,01$) / E-: $2,01 \pm 0,14\text{g}$, $n=16$, $p<0,05$) do que de aortas de 2R (E+: $2,36 \pm 0,11\text{g}$, $n=19$ / E-: $2,48 \pm 0,15\text{g}$, $n=17$).

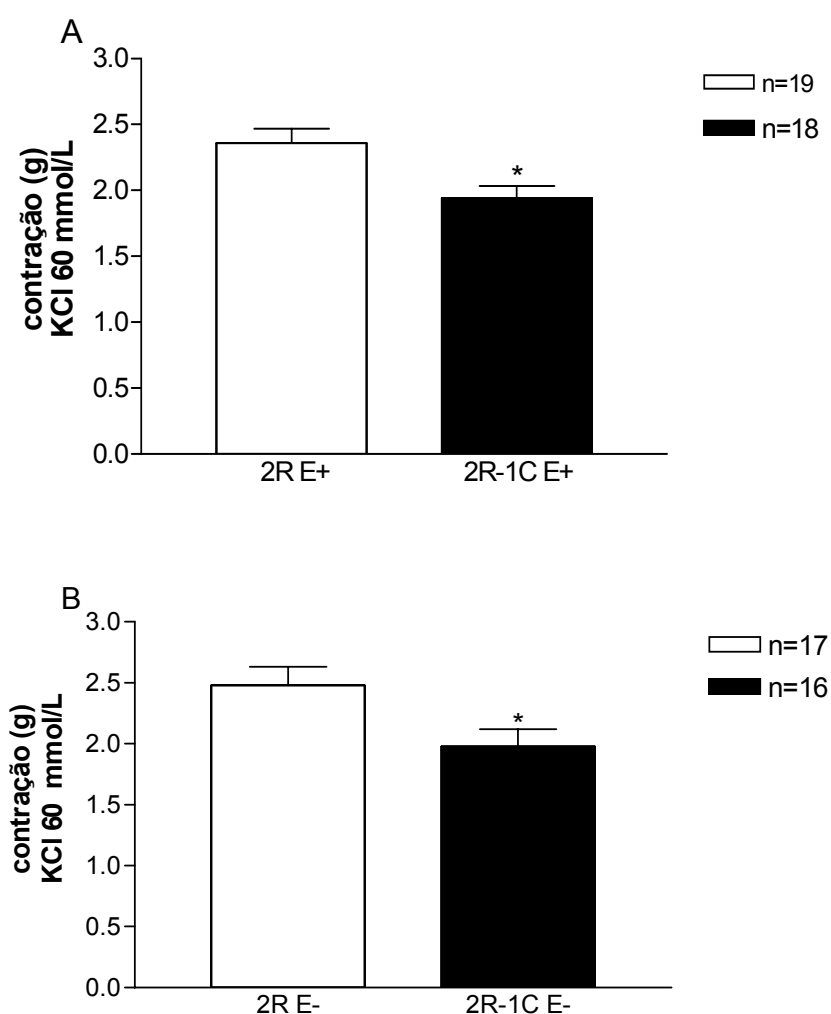


Fig. 3. Efeito máximo estimulado com KCl 60 mmol/L em aortas isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C) com endotélio (E+) (A) ou sem endotélio (E-) (B). As barras representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. (* $p<0.05$) Representa diferença em relação ao controle 2R.

4.4 Efeito da inibição da NO-Sintase sobre a contração induzida com noradrenalina em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

A inibição da NO-Sintase com L-NAME não alterou a resposta contrátil induzida pela NOR em aortas de ratos 2R (Fig. 4A e Tab. 1). Entretanto, em aortas de ratos 2R-1C, houve aumento do E_{max} e pD_2 em relação à resposta controle (ausência de inibidor) (Fig. 4B e Tab. 1).

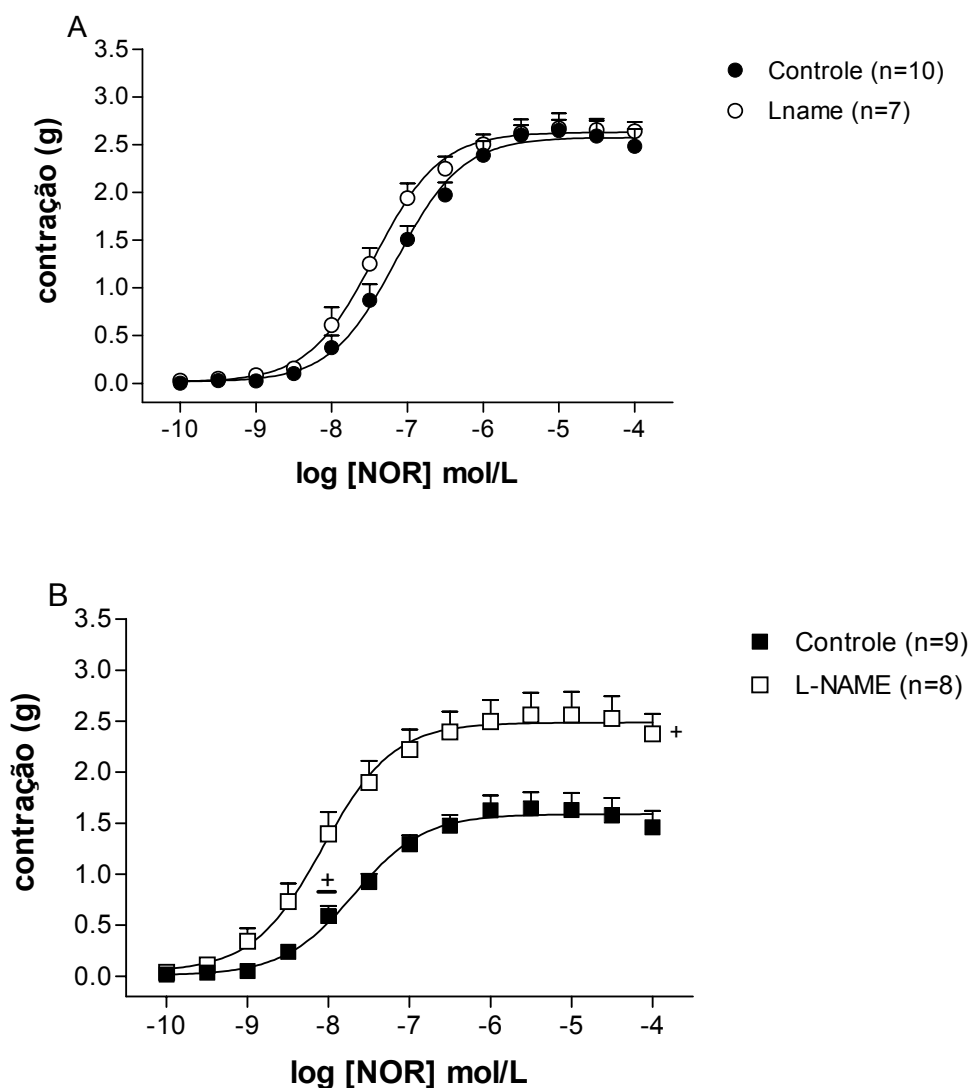


Fig. 4. Efeito da inibição da NO-Sintase com L-NAME sobre a resposta contrátil da noradrenalina (NOR), em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B). As curvas concentração-efeito foram realizadas após incubação com L-NAME ou na ausência do inibidor (controle). Os pontos representam a média \pm EPM, em grama (g) de tensão, de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ($^+$ $p < 0,05$) Indica diferença em relação ao controle 2R-1C.

4.5 Efeito do propranolol sobre a resposta contrátil induzida pela noradrenalina em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

Em aortas de ratos 2R com endotélio houve redução de pD_2 da NOR (Fig. 5A e Tab. 1). Porém, em aortas sem endotélio, o propranolol (antagonista não seletivo β -AR) aumentou o E_{max} da resposta contrátil estimulada com NOR em relação ao controle (Fig. 5B e Tab. 1).

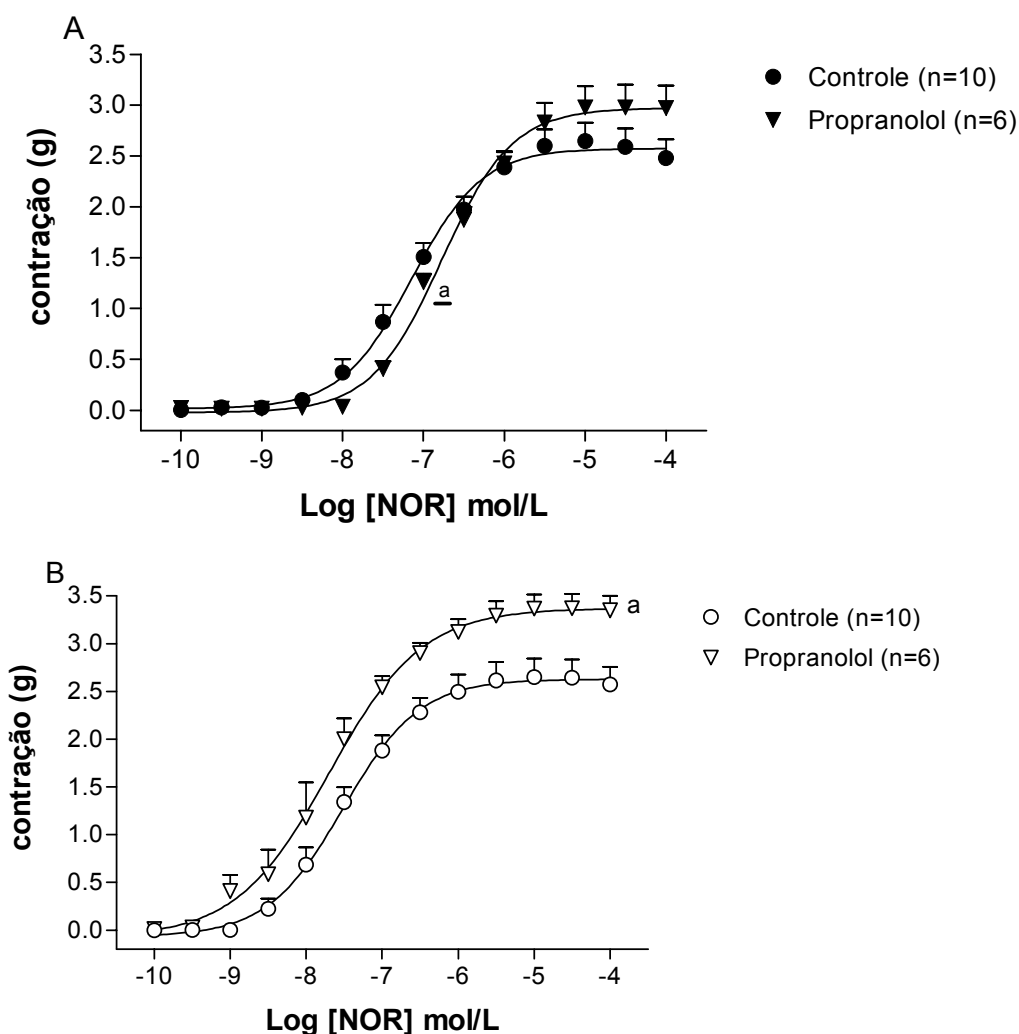


Fig. 5. Efeito do propranolol sobre a resposta contrátil induzida com noradrenalina (NOR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos. As curvas concentração-efeito foram realizadas após incubação com propranolol ou na ausência do antagonista não seletivo β -AR (controle). Os pontos representam a média \pm EPM, em grama (g) de tensão, de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ^a Indica diferença em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$).

Em aortas de ratos 2R-1C com endotélio, o propranolol reduziu o valor de pD_2 da NOR comparado ao controle (Fig. 6A e Tab. 1) Porém, em aortas de ratos 2R-1C sem endotélio, o propranolol não alterou o E_{max} e pD_2 da NOR (Fig. 6B e Tab. 1).

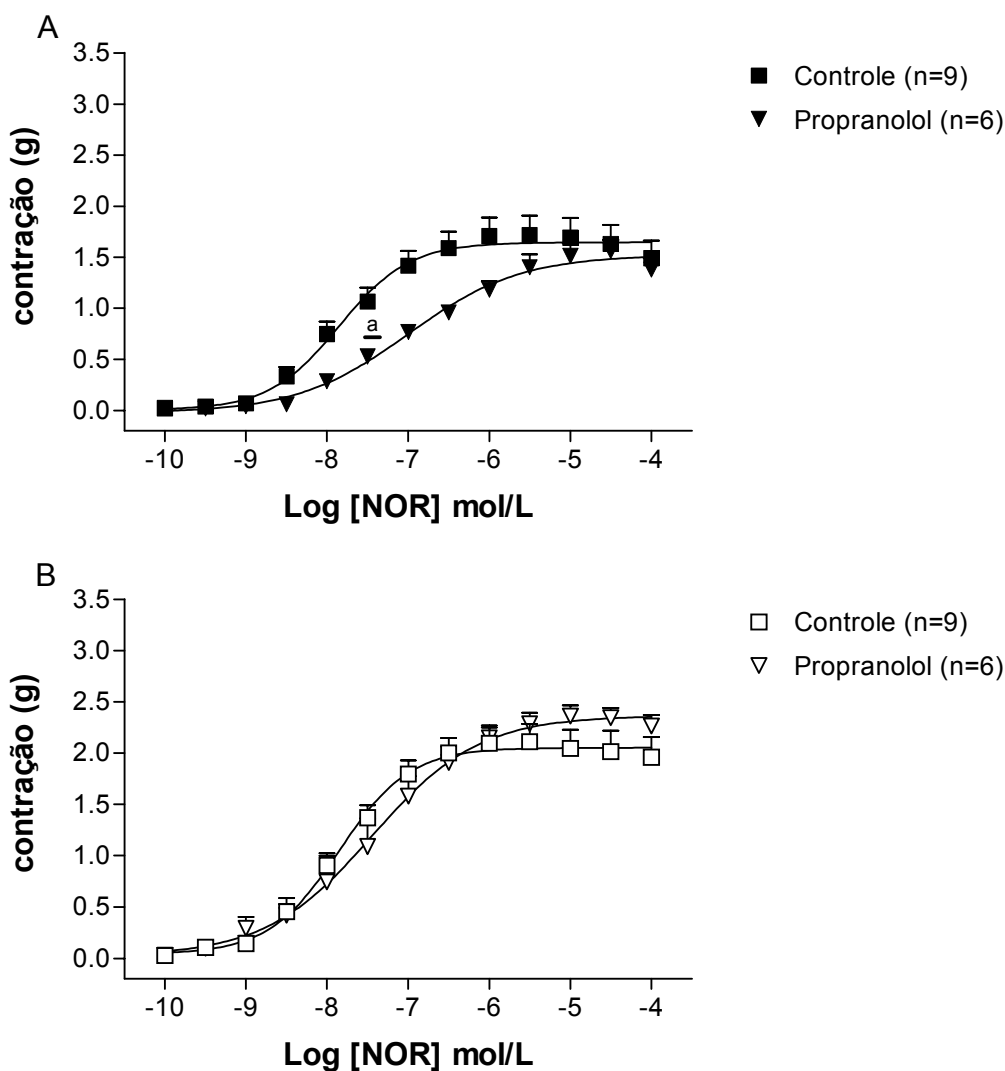


Fig. 6. Efeito do propranolol sobre a resposta contrátil induzida com noradrenalina (NOR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos hipertensos renais. As curvas concentração-efeito foram realizadas após incubação com propranolol ou na ausência do antagonista não seletivo β -AR (controle). Os pontos representam a média \pm EPM, em grama (g) de tensão, de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ^a Indica diferença em relação aos seus controles ($p < 0,05$).

4.6 Efeito da ioimbina sobre a resposta contrátil induzida pela noradrenalina em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

Em aortas de ratos 2R com endotélio (Fig. 7A) ou sem endotélio (Fig. 7B), o antagonista α_2 -AR, ioimbina, reduziu o pD_2 da NOR, em relação aos respectivos controles. Dados numéricos estão apresentados na Tab. 1.

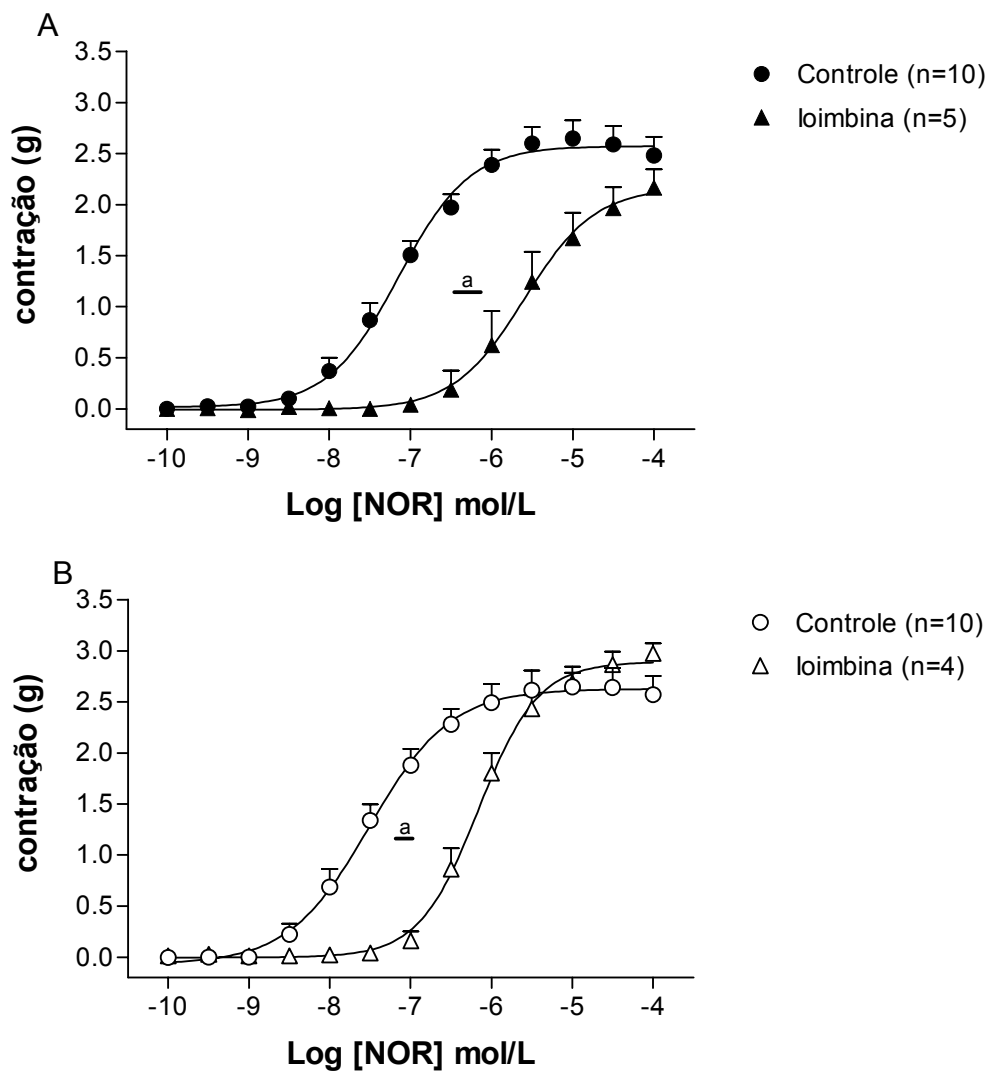


Fig. 7. Efeito da ioimbina sobre a resposta contrátil induzida com noradrenalina (NOR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos. As curvas concentração-efeito foram realizadas após incubação com ioimbina ou na ausência do antagonista seletivo α_2 -AR (controle). Os pontos representam a média \pm EPM, em grama (g) de tensão, de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ^a Indica diferença em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$).

Em aortas de ratos 2R-1C, a ioimbina reduziu os valores de pD_2 da NOR em aortas com ou sem endotélio (Fig. 8A e Fig. 8B). Dados numéricos estão apresentados na Tab. 1.

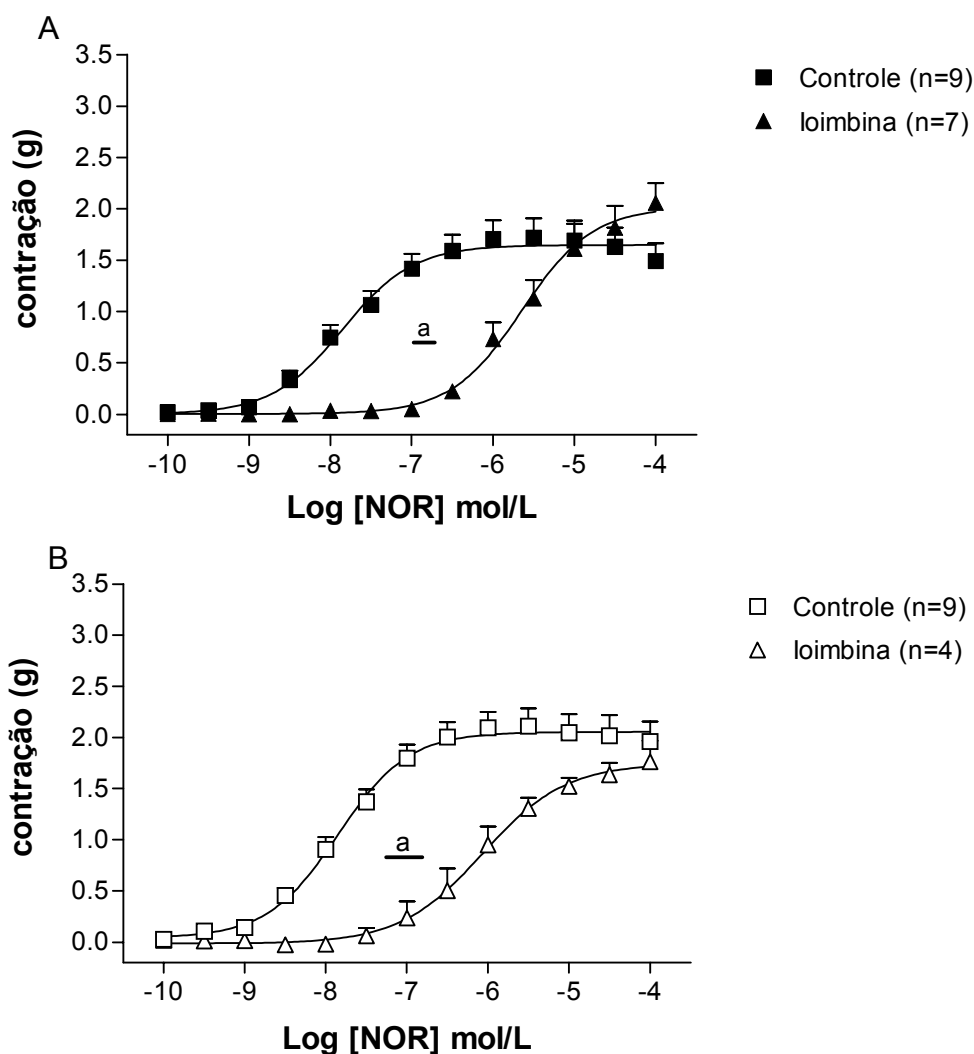


Fig. 8. Efeito da ioimbina sobre a resposta contrátil induzida com noradrenalina (NOR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos hipertensos renais. As curvas concentração-efeito foram realizadas após incubação com ioimbina ou na ausência do antagonista seletivo α_2 -AR (controle). Os pontos representam a média \pm EPM, em grama (g) de tensão, de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ^a Indica diferença em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$).

4.7 Resposta contrátil obtida pela ativação de receptores α_1 -adrenérgicos com noradrenalina em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

Curvas concentração-efeito foram realizadas para NOR na ausência (Controle) ou após a incubação com a associação de propranolol e ioimbina. Houve redução de pD_2 da NOR em aortas com ou sem endotélio, de ratos 2R e 2R-1C incubadas com os antagonistas em relação aos seus respectivos controles. Os dados numéricos são apresentados na Tab. 1.

4.8 Efeito dos antagonistas de receptores α_2 -adrenérgicos (RX 821002 e ioimbina) sobre a resposta contrátil induzida com fenilefrina (PE) em aortas sem endotélio, isoladas de ratos 2R

Em relação à curva concentração-efeito controle da PE (pD_2 : $8,13 \pm 0,10$), apenas a concentração de $0,01 \mu\text{mol/L}$ de ioimbina não reduziu o pD_2 da PE (pD_2 : $8,19 \pm 0,19$). As concentrações de $0,1 \mu\text{mol/L}$ de RX 821002 (pD_2 : $7,43 \pm 0,05$), de ioimbina $0,1 \mu\text{mol/L}$ (pD_2 : $7,58 \pm 0,14$), $1 \mu\text{mol/L}$ (pD_2 : $6,89 \pm 0,12$) e $10 \mu\text{mol/L}$ (pD_2 : $6,01 \pm 0,09$) causaram deslocamento para a direita da curva controle dependente da concentração, o que indica redução de potência do agonista (Fig. 9).

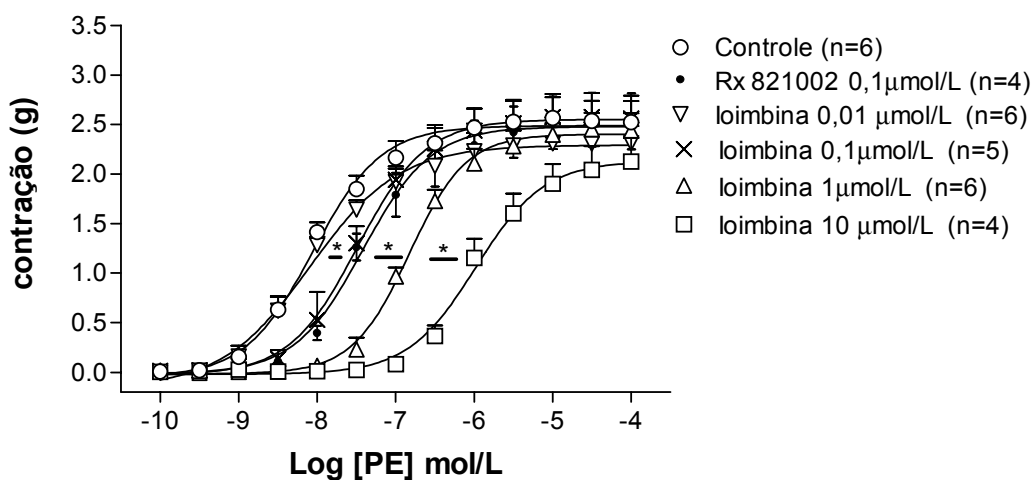


Fig. 9. Efeito do antagonista de α_2 -AR (RX821002) e de diferentes concentrações de ioimbina sobre a resposta contrátil induzida com fenilefrina (PE) em aortas sem endotélio, isoladas de ratos normotensos. As curvas concentração-efeito foram realizadas após incubação com RX 821002 ($0,1 \mu\text{mol/L}$) ou ($0,1$; $0,01$; $1,0$; $10,0 \mu\text{mol/L}$) de ioimbina ou na ausência de qualquer antagonista (controle). Os pontos representam a média \pm EPM, em grama (g) de tensão, de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. (* $p < 0,05$) Representa a diferença de pD_2 em relação ao controle.

4.9 Efeito da noradrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

A expressão da forma fosforilada da eNOS no resíduo de Ser¹¹⁷⁷ foi maior em aortas de ratos 2R-1C ($0,93 \pm 0,08$) do que na aorta de 2R ($0,64 \pm 0,09$) (Fig. 10).

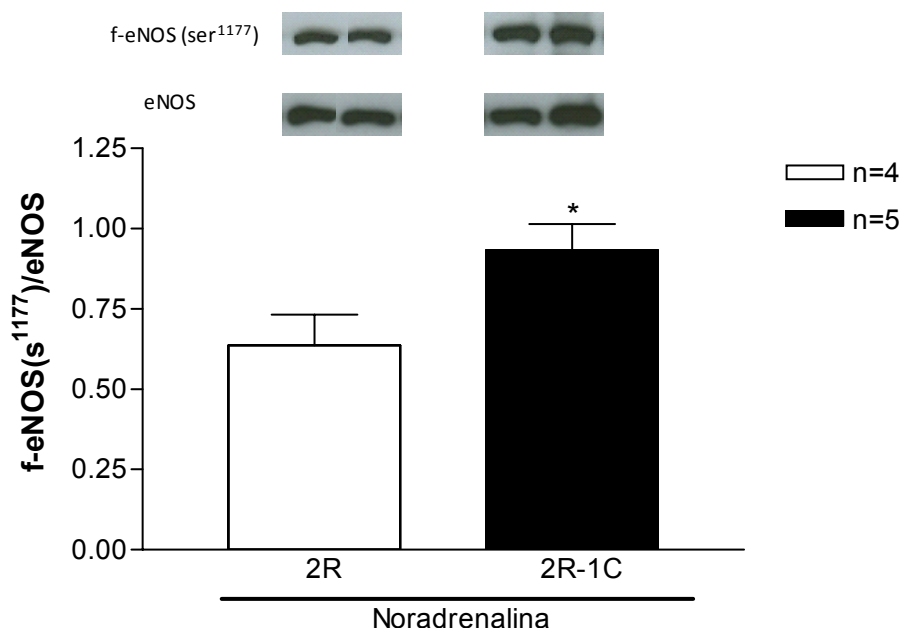


Fig. 10. Efeito da noradrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, em aortas com endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). As barras representam a média ± EPM de “n” preparações isoladas de diferentes ratos. * Representa diferença entre 2R-1C e 2R ($p < 0,05$).

4.10 Efeito do antagonista de receptores β -adrenérgicos sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, estimulada com noradrenalina em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

Não houve diferença na expressão de Ser¹¹⁷⁷ fosforilada (f-eNOS) entre aortas controle 2R, ($0,64 \pm 0,09$) e as aortas 2R incubadas com propranolol ($0,61 \pm 0,04$) e aortas controle 2R-1C ($0,93 \pm 0,08$) e aortas 2R-1C incubadas com propranolol ($0,83 \pm 0,07$), estimuladas com NOR (Fig. 11A, Fig. 11B).

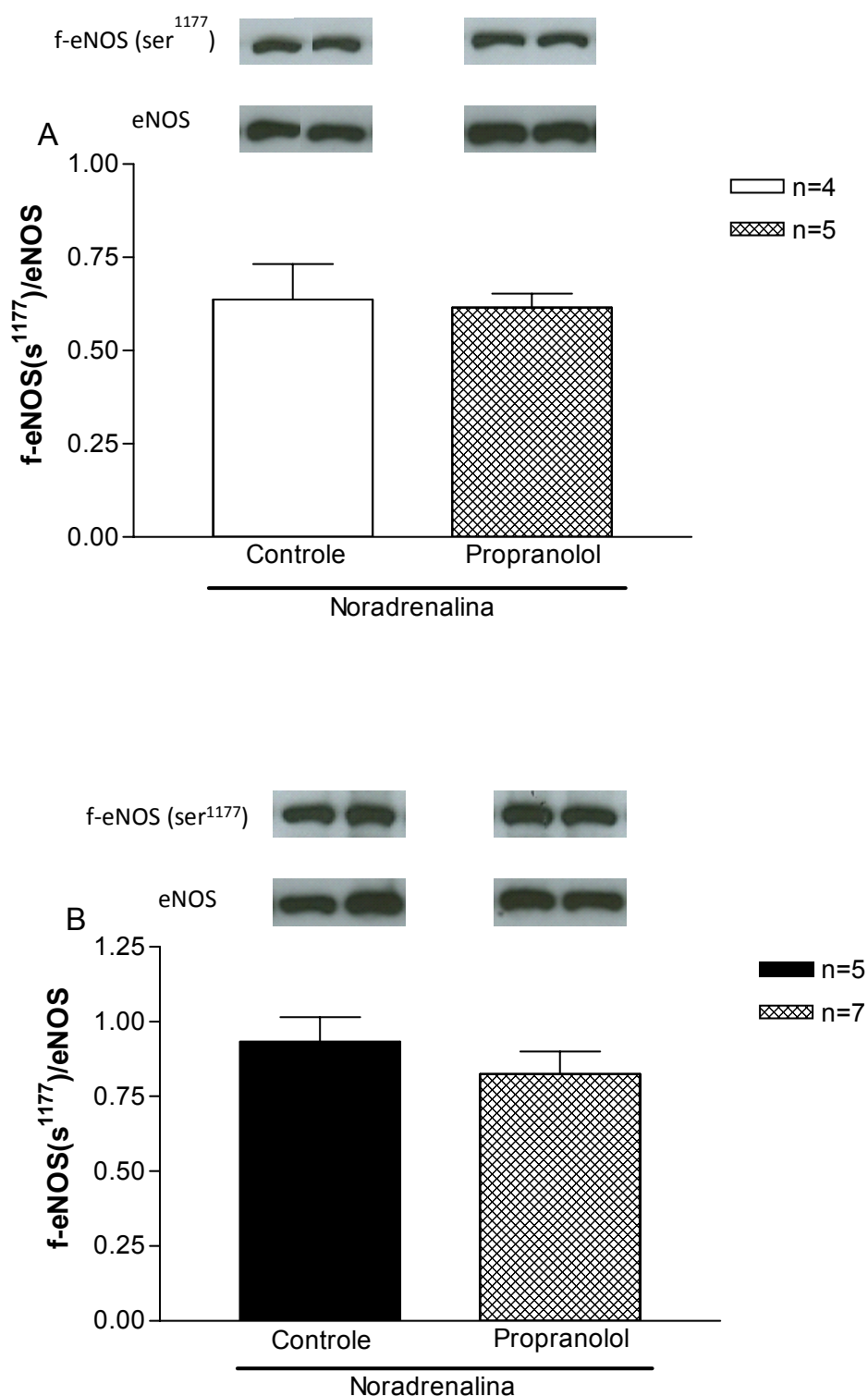


Fig. 11. Efeito do propranolol sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, estimulada por noradrenalina em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B). A expressão de Ser¹¹⁷⁷ foi verificada após incubação com propranolol ou em ausência do antagonista (controle). As barras representam a média \pm EPM de "n" preparações isoladas de diferentes ratos.

4.11 Efeito da noradrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

Houve maior expressão da forma fosforilada no resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS (f-eNOS) em aortas de ratos 2R-1C ($1,12 \pm 0,12$) do que em aortas de ratos 2R ($0,61 \pm 0,07$) (Fig. 12).

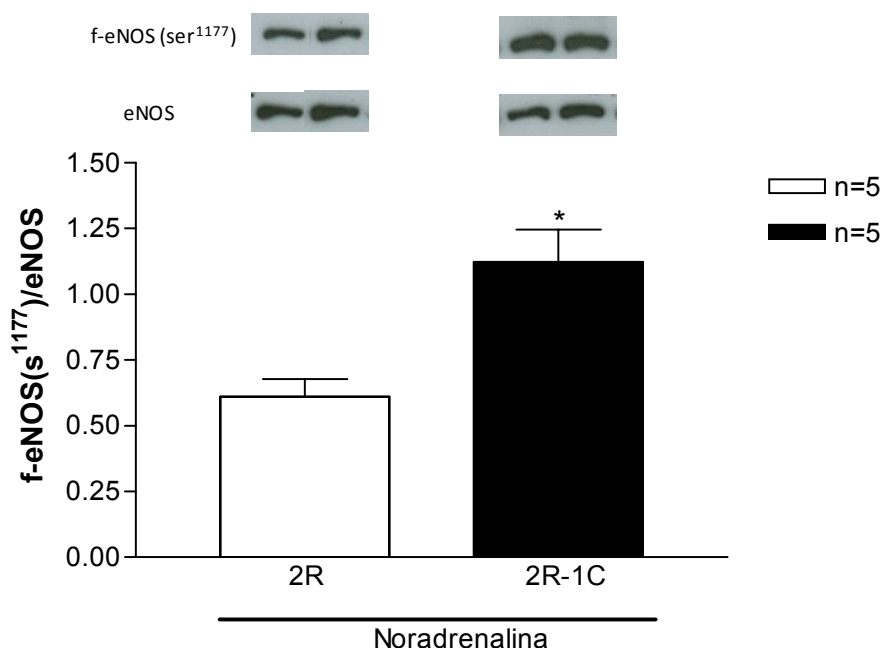


Fig. 12. Efeito da noradrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ (S¹¹⁷⁷) da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, em aortas com endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). As barras representam a média \pm EPM de “n” preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença entre 2R-1C e 2R ($p < 0,05$).

4.12 Efeito do antagonista não seletivo de receptores α -adrenérgicos sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

A incubação de aortas de ratos 2R com a fenoxibenzamina resultou em maior expressão de Ser¹¹⁷⁷ fosforilada da eNOS (f-eNOS, $1,24 \pm 0,16$) do que em aortas de ratos 2R estimuladas com noradrenalina (controle: $0,61 \pm 0,07$) (Fig. 13A). A incubação de aortas de ratos 2R-1C com fenoxibenzamina diminuiu a expressão de Ser¹¹⁷⁷ fosforilada da eNOS (f-eNOS: $0,43 \pm 0,20$) em relação às aortas de ratos 2R-1C estimuladas com noradrenalina (controle: $1,12 \pm 0,12$) (Fig. 13B).

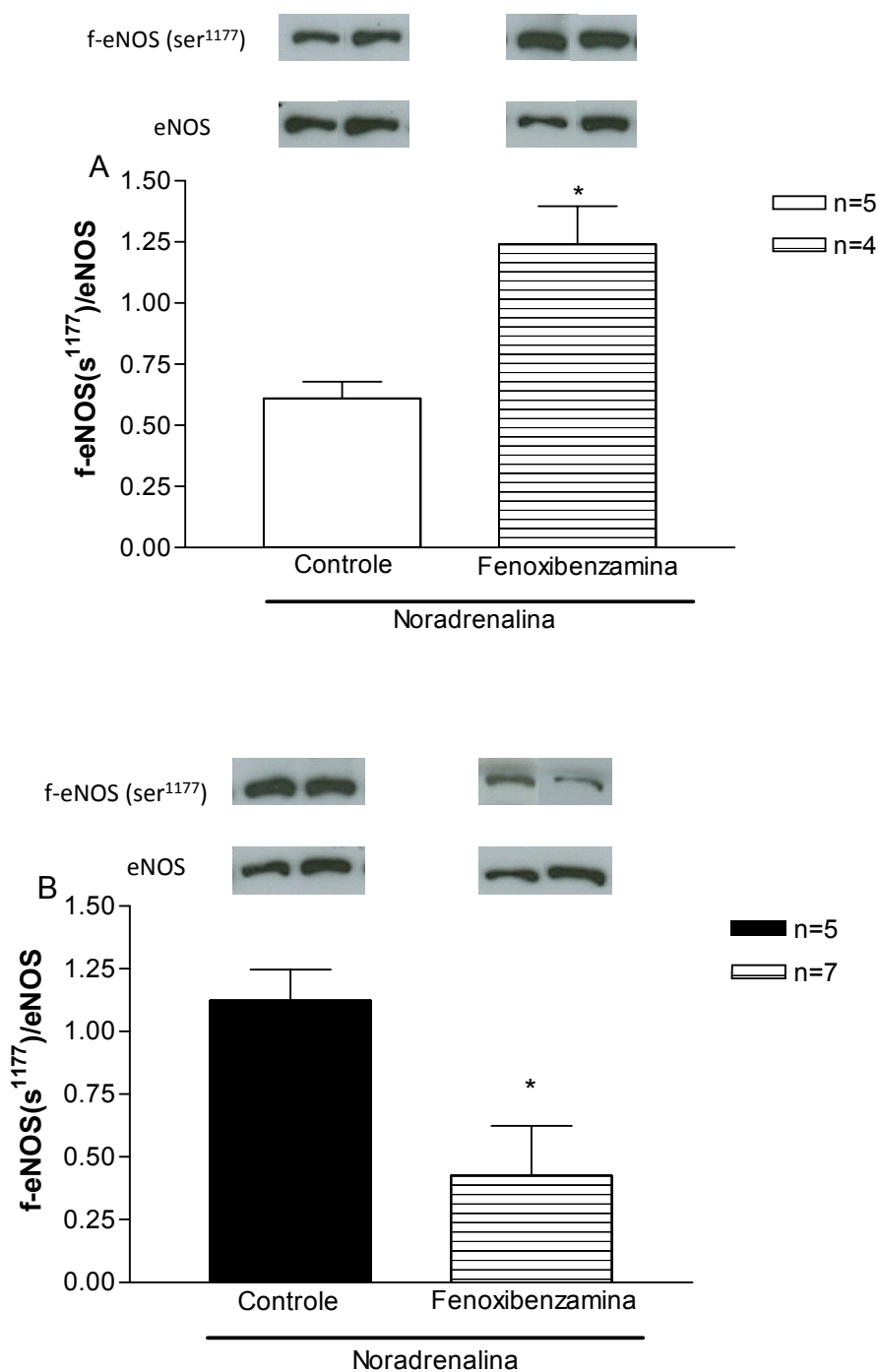


Fig. 13. Efeito da fenoxibenzamina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, estimulada com noradrenalina em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B). A expressão de Ser¹¹⁷⁷ foi verificada após incubação com fenoxibenzamina ou em ausência do antagonista (controle). As barras representam a média \pm EPM de “n” preparações isoladas de diferentes ratos. (* $p < 0.05$) Representa diferença em relação a seus controles.

4.13 Participação da via PI₃K/AKT ou peróxido de hidrogênio na fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS estimulada com noradrenalina em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R-1C

Em aortas de ratos 2R-1C estimuladas com noradrenalina, houve redução na expressão de Ser¹¹⁷⁷ fosforilada da eNOS (f-eNOS) nas aortas incubadas com wortmannin ($0,61 \pm 0,05$) ou com catalase ($0,69 \pm 0,03$) em relação ao controle 2R-1C ($1,02 \pm 0,9$) (Fig. 14).

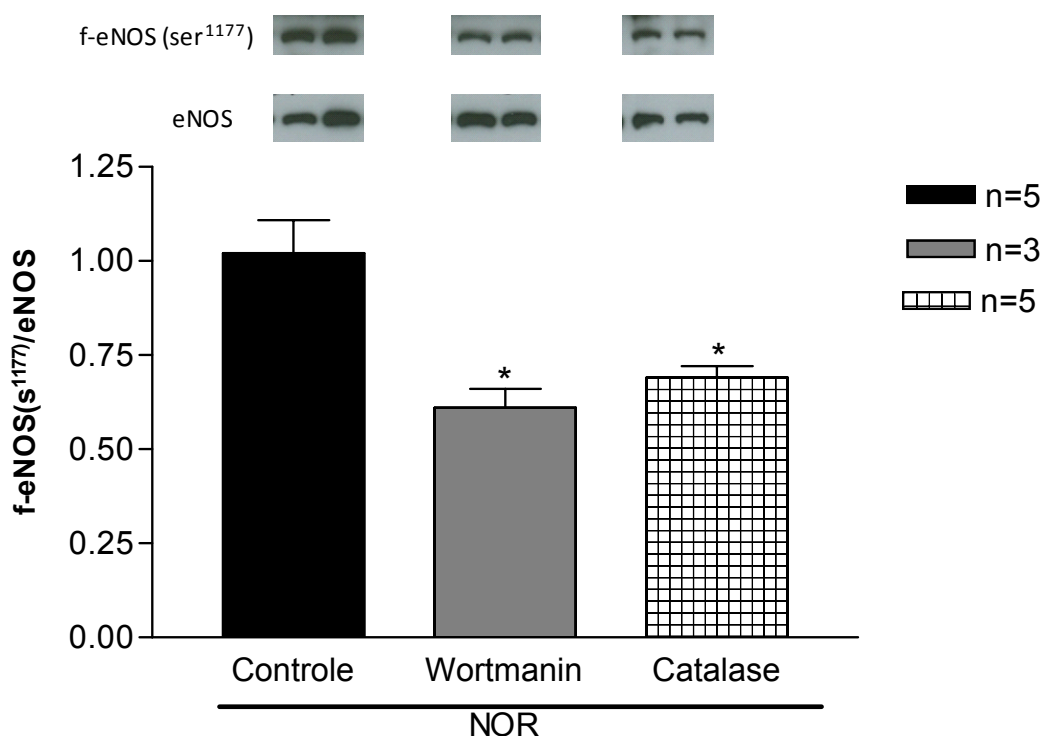


Fig. 14. Efeito do wortmannin ou catalase sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, estimulada por noradrenalina em aortas com endotélio, isoladas de ratos hipertensos renais 2R-1C. A expressão de Ser¹¹⁷⁷ foi verificada após incubação com wortmannin ou catalase ou em ausência dos inibidores (controle). As barras representam a média ± EPM de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. (* $p < 0,05$) Representa diferença em relação ao controle.

4.14 Medida de noradrenalina plasmática em ratos 2R e 2R-1C

A concentração de noradrenalina plasmática não foi diferente entre animais normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C) (Fig. 15). Os dados numéricos estão apresentados na Tab.3.

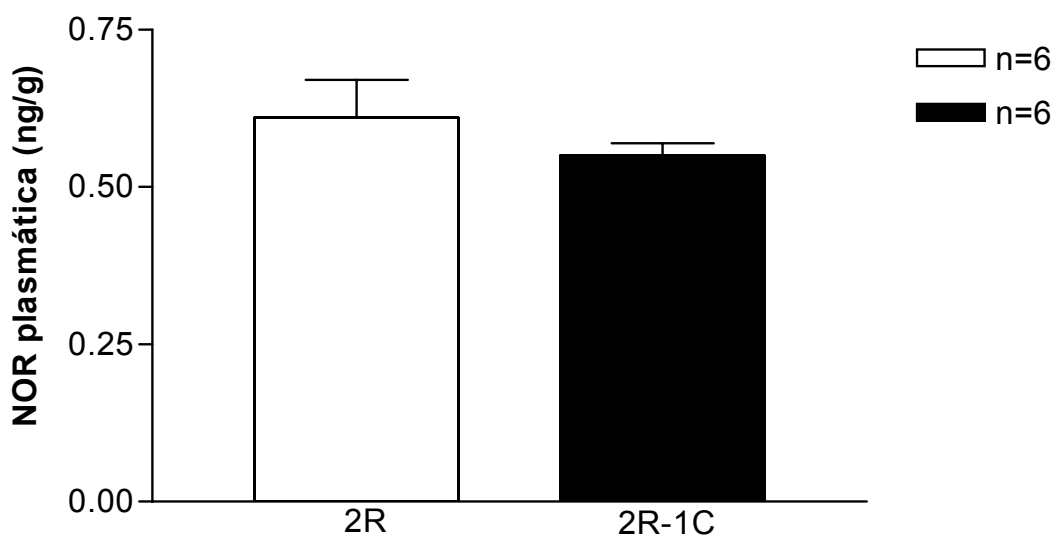


Fig. 15. Concentração de noradrenalina (NOR) em plasma de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). As barras representam a média \pm EPM de “n” preparações isoladas de diferentes ratos.

Tabela 3. Valores da concentração de noradrenalina plasmática e tecidual (adrenais) em animais 2R e 2R-1C.

	Plasma	Adrenal Direita	Adrenal Esquerda
2R	0,61 \pm 0,06	6,43 \pm 0,49	5,68 \pm 0,45
2R-1C	0,55 \pm 0,02	5,27 \pm 0,45	5,92 \pm 0,32

Os valores representam a concentração de noradrenalina \pm erro padrão da média (EPM), obtidos de “n” amostras (plasma, adrenal direita ou adrenal esquerda) de diferentes ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C).

4.15 Medida de noradrenalina tecidual de ratos 2R e 2R-1C

Não houve diferença na concentração de noradrenalina entre as adrenais direita e esquerda de animais normotensos (Fig.16A) e hipertensos renais (Fig. 16B). Os dados numéricos estão apresentados na Tab. 3.

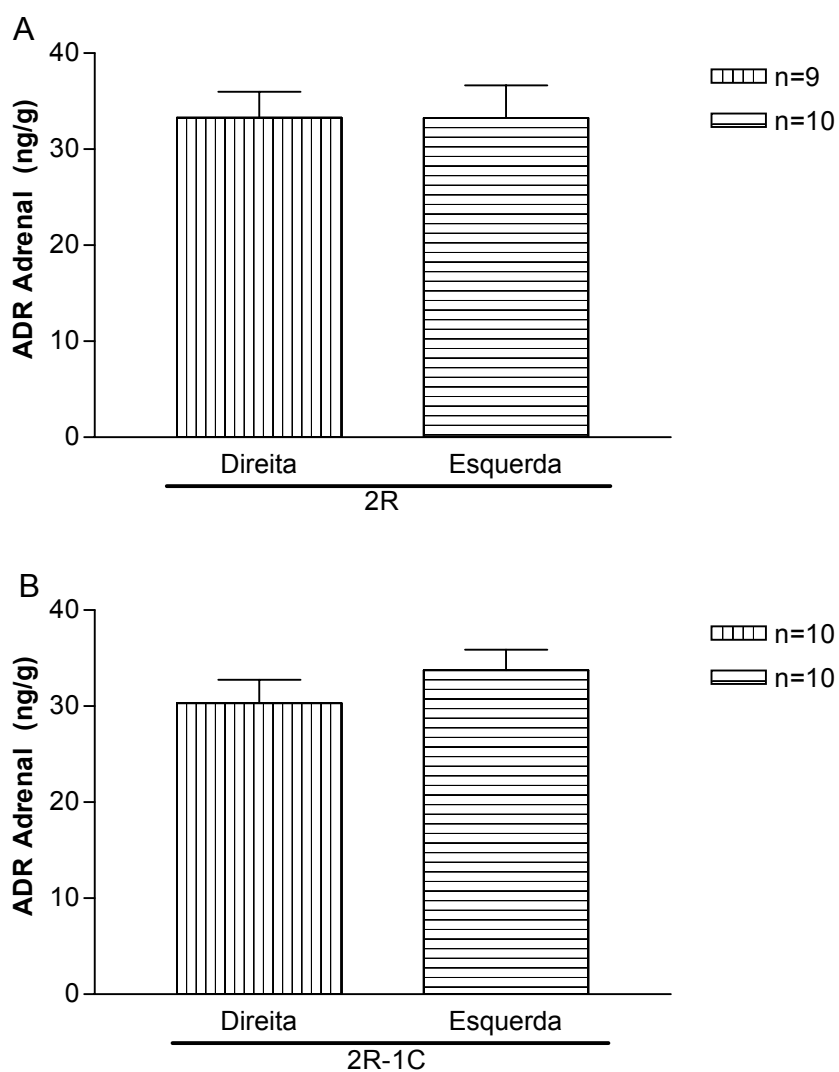


Fig. 16. Concentração de noradrenalina (NOR) nas adrenais, direita e esquerda, de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B). As barras representam a média \pm EPM de "n" preparações isoladas de diferentes ratos.

A concentração de noradrenalina entre as adrenais direita (Fig.17A) e entre as adrenais esquerdas (Fig. 17B) de 2R e 2R-1C não foi diferente. Os dados numéricos estão apresentados na Tab. 3.

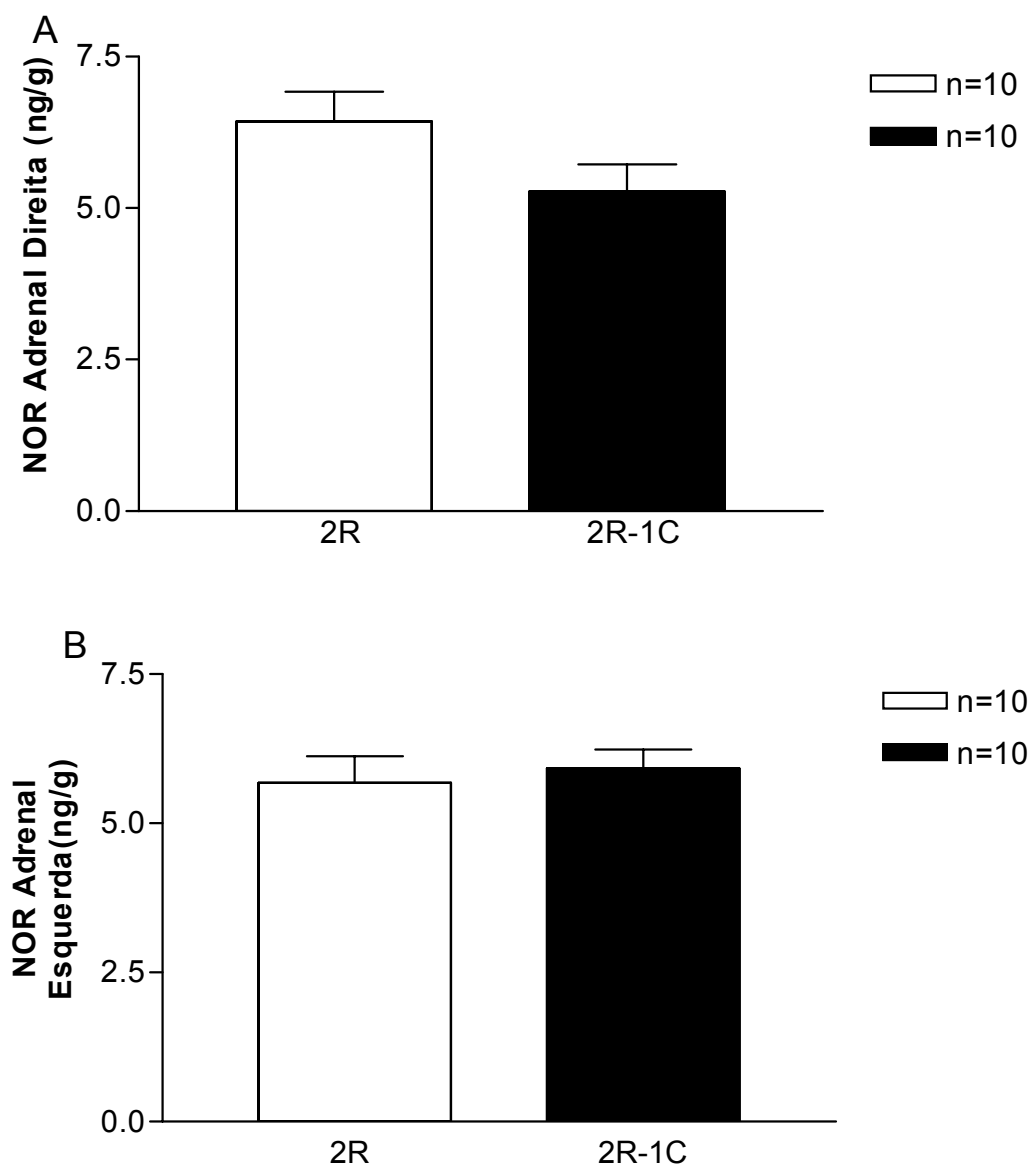


Fig. 17. Concentração de noradrenalina (NOR) nas adrenais, direita (A) e esquerda (B), de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). As barras representam a média \pm EPM de "n" preparações isoladas de diferentes ratos.

4.16 Resposta contrátil estimulada com adrenalina em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

As curvas concentração-efeito cumulativas para adrenalina (ADR) demonstram contração concentração-dependente em aortas de ratos 2R e 2R-1C. Tanto em aortas com endotélio (Fig. 18A) quanto sem endotélio (Fig. 18B) o E_{max} da ADR de aortas de ratos 2R-1C foi menor comparado ao de aortas de ratos 2R. Os valores de pD_2 não foram diferentes entre aortas de ratos 2R e 2R-1C (Tab. 4.).

A remoção do endotélio de aortas de ratos 2R apenas potencializou a resposta contrátil. Em aortas de 2R-1C aumentou pD_2 e o E_{max} da resposta da ADR. Dados numéricos estão apresentados na Tab. 4.

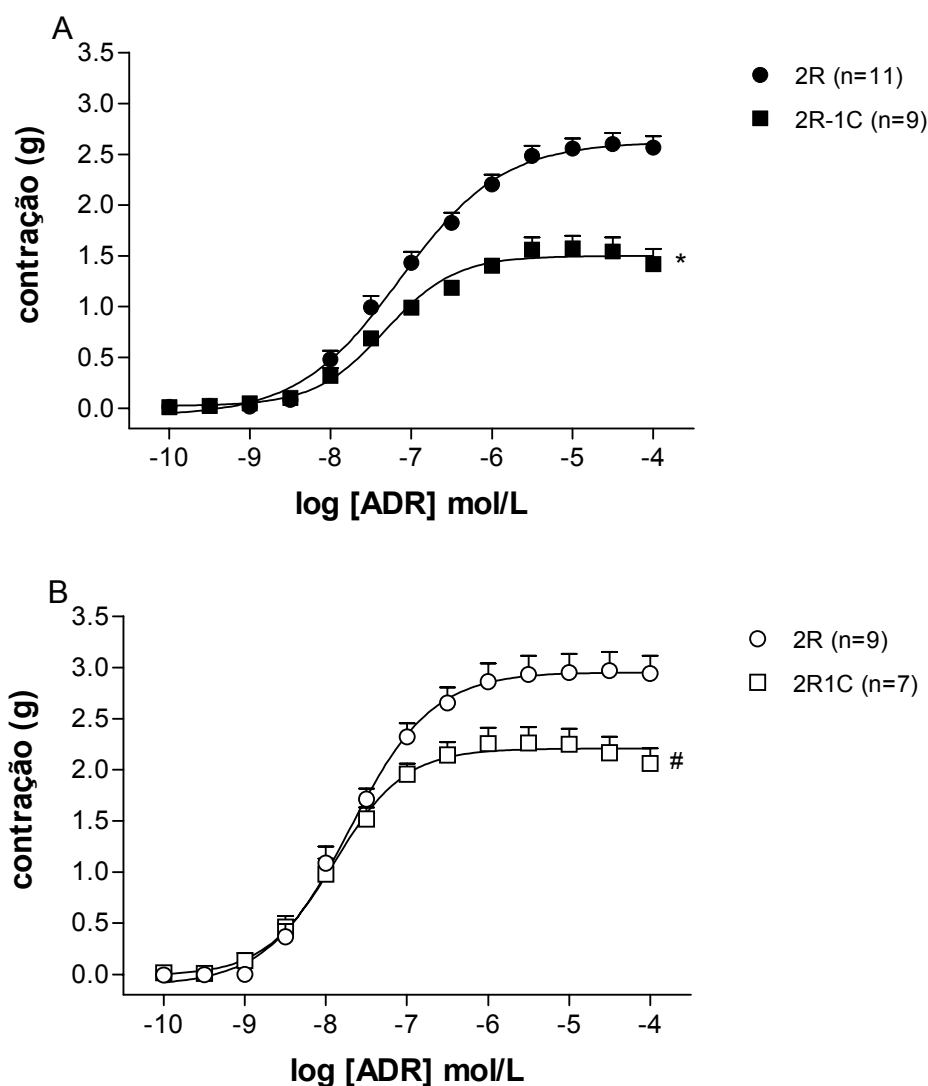


Fig. 18. Resposta contrátil induzida com adrenalina (ADR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). Os pontos representam a média \pm EPM, em grama (g) de tensão, de "n" preparações, isoladas de diferentes ratos. (* $p < 0,05$ e # $p < 0,05$) Representam diferença em relação ao controle 2R.

Tabela 4. Valores de Emax (em gramas de tensão) e pD₂ obtidos da resposta contrátil estimulada com adrenalina em aorta de ratos na ausência ou presença de inibidor de NO-Sintase ou de antagonistas adrenérgicos

	2R				2R-1C			
	E+		E-		E+		E-	
	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂
ADR	2,6 ± 0,1	7,13 ± 0,11	2,9 ± 0,2	7,74 ± 0,09**	1,4 ± 0,1*	7,37 ± 0,16	2,1 ± 0,1 [#] **	7,92 ± 0,10**
L-NAME	2,9 ± 0,2	7,33 ± 0,13	ND	ND	2,0 ± 0,2 [†]	7,71 ± 0,18	ND	ND
Propranolol	3,1 ± 0,2 ^a	6,86 ± 0,05	3,7 ± 0,3 ^a	7,48 ± 0,19	1,8 ± 0,2	6,80 ± 0,10 ^a	2,2 ± 0,1	7,49 ± 0,12 ^a
loimbina	2,5 ± 0,1	5,60 ± 0,09 ^a	3,5 ± 0,1	6,39 ± 0,04 ^a	1,5 ± 0,1	5,46 ± 0,19 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	6,04 ± 0,15 ^a
Propranolol/ loimbina	3,2 ± 0,1 ^a	5,74 ± 0,12 ^a	3,2 ± 0,3	6,40 ± 0,09 ^a	2,3 ± 0,2 ^a	5,81 ± 0,17 ^a	1,8 ± 0,2	6,34 ± 0,09 ^a

Os valores representam o efeito contrátil máximo (Emax) ± erro padrão da média (EPM) expresso em grama e pD₂ (-log EC₅₀) obtidos de “n” aortas com endotélio (E+) ou sem (E-) de diferentes animais 2R e 2R-1C. (*p<0,05) Representa diferença em relação a 2R E+. ([#]p<0,05) Representa diferença em relação a 2R E-. (**p<0,05) Diferença em relação a a 2R E+ e 2R-1C E+. ([†]p<0,05) Diferença em relação a 2R-1C E+. (^ap<0,05) Diferença em relação aos seus controles. ND (não determinado).

4.17 Resposta contrátil induzida com adrenalina em relação à resposta contrátil estimulada com KCl, em aortas com endotélio ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

O Emax da ADR em aortas com endotélio de ratos 2R-1C foi menor do que de aortas de ratos 2R (Fig. 19A). Em aortas sem endotélio, as respostas contráteis foram semelhantes em aortas de 2R e 2R-1C (Fig. 19B). Dados numéricos estão apresentados na Tab. 5.

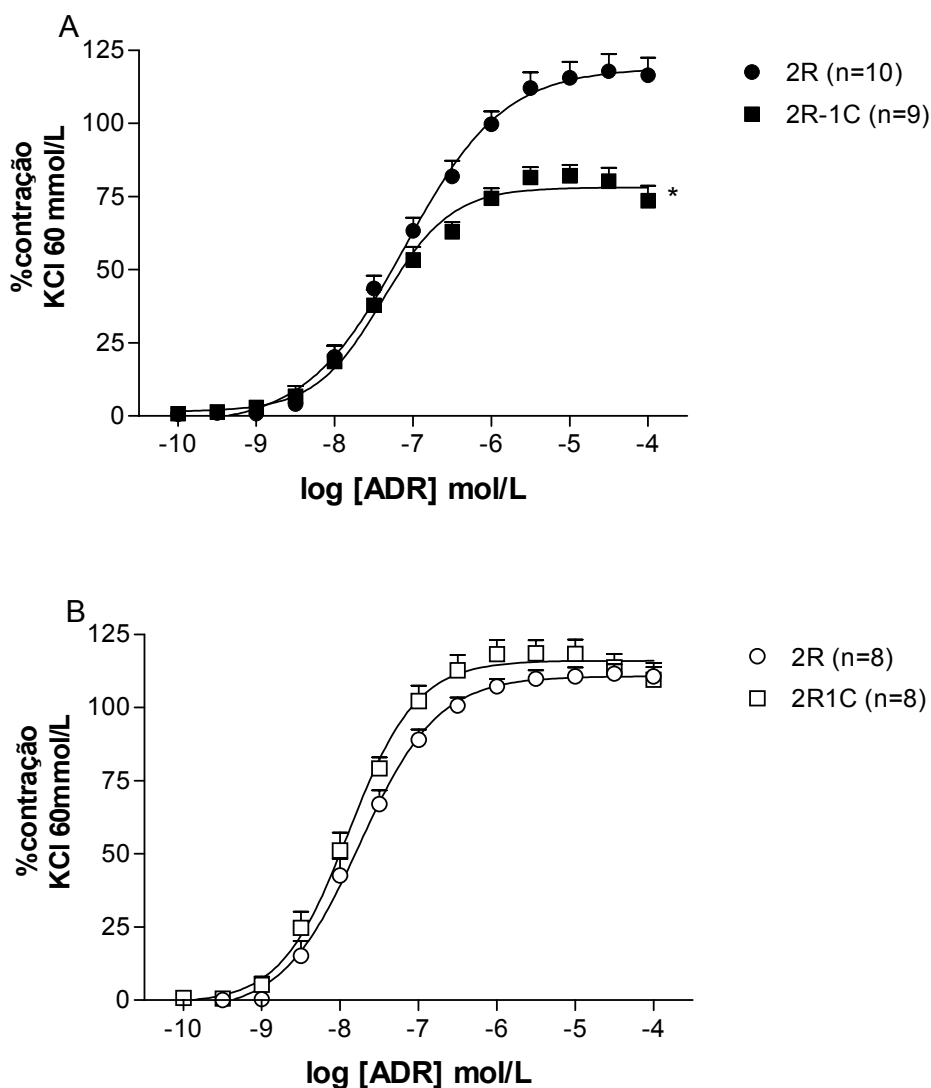


Fig. 19. Resposta contrátil induzida com adrenalina (ADR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). Os pontos representam a média \pm EPM, expressos em porcentagem da contração prévia estimulada por KCl 60 mmol/L, de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença em relação ao controle 2R ($p < 0,05$).

Tabela 5. Valores de Emax e pD₂ obtidos com adrenalina, expressa como percentual da contração prévia estimulada por KCl 60 mmol/L, estimulada com adrenalina em aorta de ratos

	2R				2R-1C			
	E+		E-		E+		E-	
	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂
ADR	116,5 ± 6,0	7,10 ± 0,12	110,7 ± 3,1	7,77 ± 0,10	73,5 ± 5,1*	7,37 ± 0,16	109,6 ± 5,7	7,91 ± 0,09

Os valores representam o efeito contrátil máximo (Emax) ± erro padrão da média (EPM) expresso em % contração KCl 60 mmol/L e pD₂ (-logEC₅₀) obtidos de "n" aortas com endotélio (E+) ou sem (E-) de diferentes ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). *Representa diferença em relação ao 2R E+ (p<0,05).

4.18 Efeito da inibição da enzima NO-Sintase sobre a contração vascular induzida com adrenalina em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

O inibidor não seletivo da NO-Sintase (L-NAME) não alterou a contração induzida pela ADR em aortas de ratos 2R (Fig. 20A e Tab. 4). Mas, nas preparações isoladas de ratos 2R-1C, o L-NAME promoveu aumento do Emax da ADR (Fig. 20B e Tab. 4).

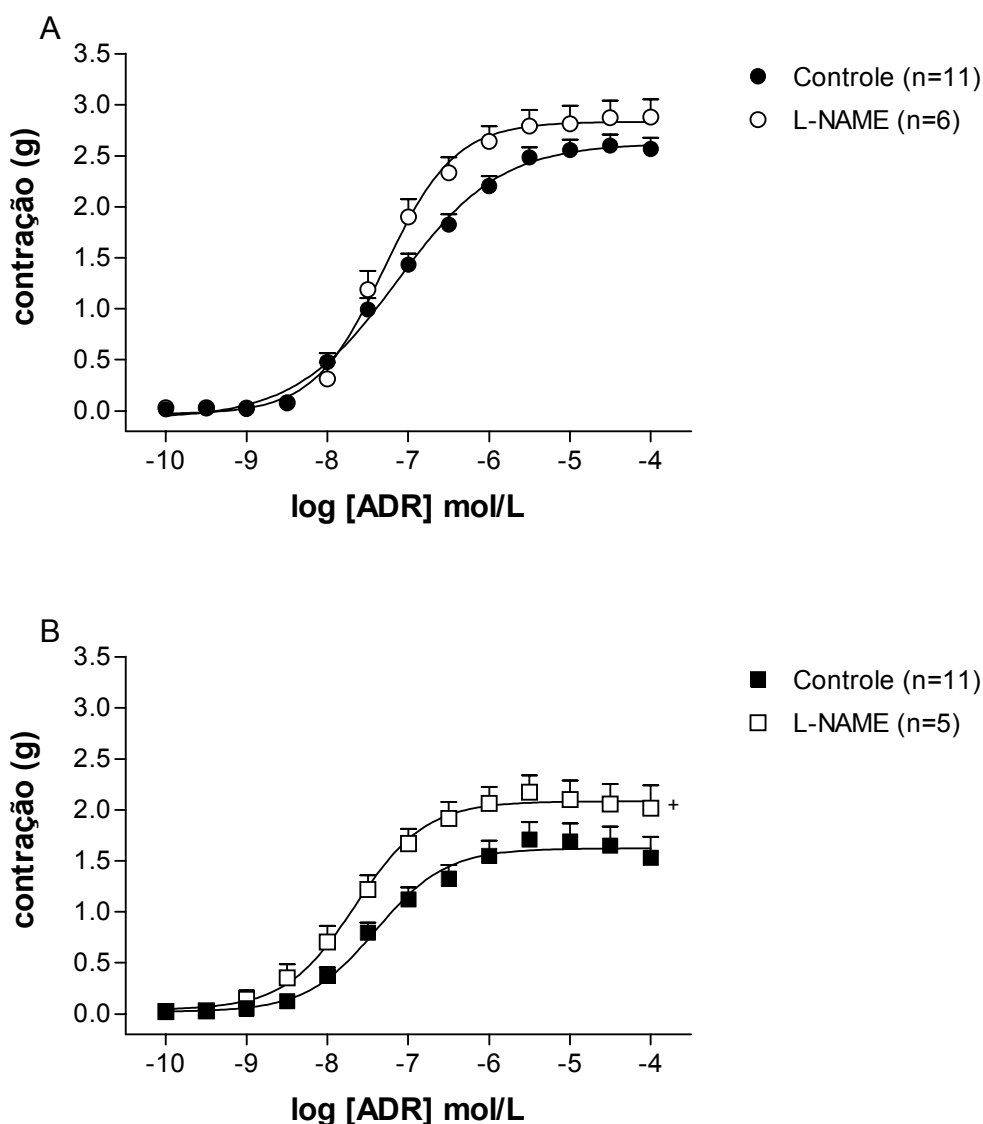


Fig. 20. Efeito da inibição da NO-Sintase com L-NAME sobre a resposta contrátil da adrenalina (ADR), em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B). As curvas concentração-efeito foram realizadas após incubação com L-NAME ou na ausência do inibidor (controle). Os pontos representam a média \pm EPM, em grama (g) de tensão, de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ⁺Indica diferença de Emax em relação ao controle ($p < 0,05$).

4.19 Efeito do propranolol sobre a resposta contrátil induzida pela adrenalina em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

Em aortas de ratos 2R, a incubação com propranolol promoveu aumento do E_{max} da ADR tanto em aortas com endotélio (Fig. 21A), quanto sem endotélio (Fig. 21B) e não alterou o valor de pD_2 em relação aos controles (Tab. 4).

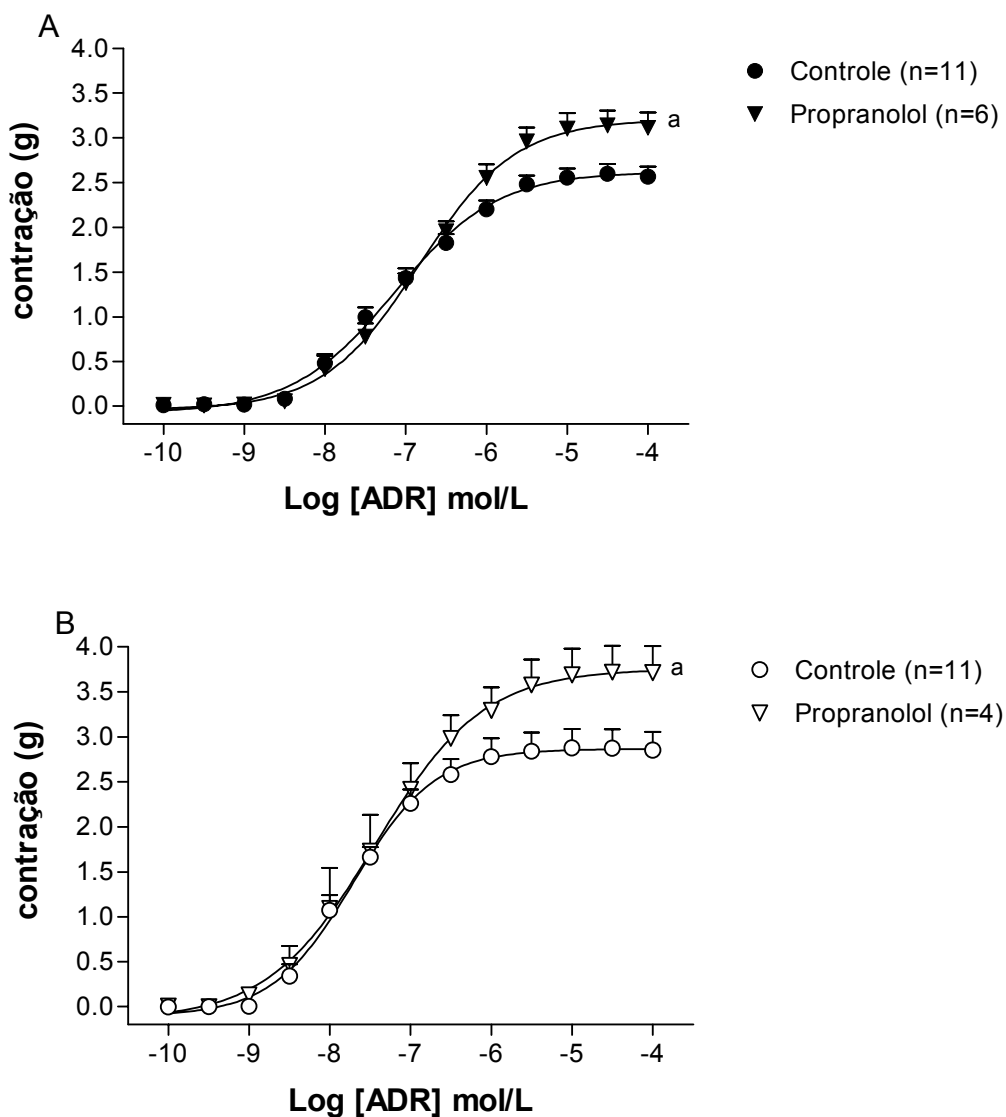


Fig. 21. Efeito do propranolol sobre a resposta contrátil induzida com adrenalina (ADR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos. As curvas concentração-efeito foram realizadas após incubação com propranolol ou na ausência do antagonista não seletivo β -AR (controle). Os pontos representam a média \pm EPM, em grama (g) de tensão, de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ^a Indica diferença em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$).

Em aortas de ratos 2R-1C, o propranolol reduziu a potência da contração da ADR em aortas com endotélio (Fig. 22A) ou sem endotélio (Fig. 22B) e não alterou o E_{max} da ADR. Dados numéricos estão apresentados na Tab. 4.

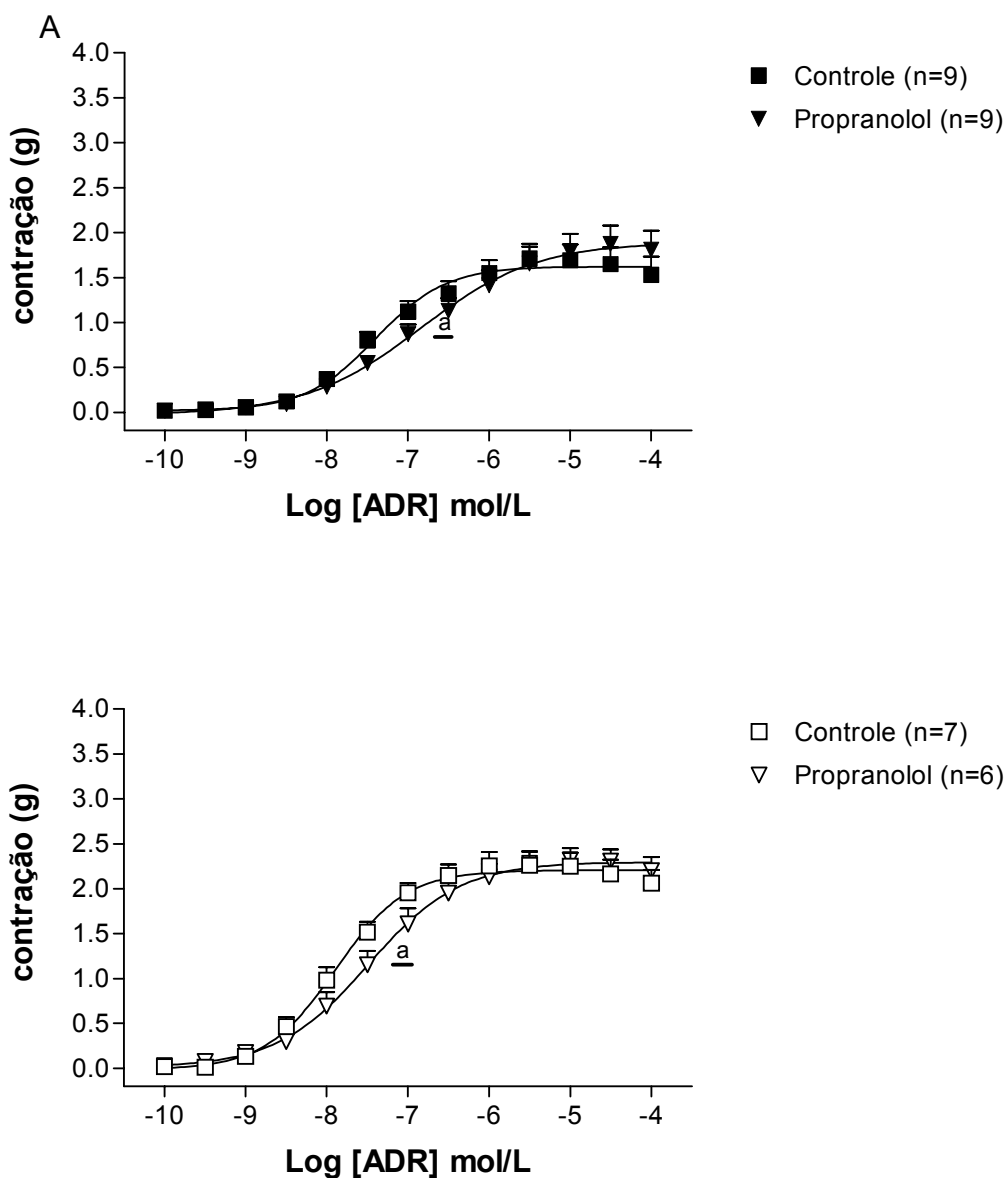


Fig. 22. Efeito do propranolol sobre a resposta contrátil induzida com adrenalina (ADR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos hipertensos renais. As curvas concentração-efeito foram realizadas após incubação com propranolol ou na ausência do antagonista não seletivo β -AR (controle). Os pontos representam a média \pm EPM, em grama (g) de tensão, de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ^a Indica diferença de pD_2 em relação ao controle ($p < 0,05$).

4.20 Efeito da ioimbina sobre a resposta contrátil induzida pela adrenalina em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

Em aortas de ratos 2R, a ioimbina reduziu os valores de pD_2 e não alterou os valores de E_{max} da ADR em aortas com endotélio ou sem endotélio (Fig. 23A e Fig. 23B) respectivamente. Dados numéricos estão apresentados na Tab. 4.

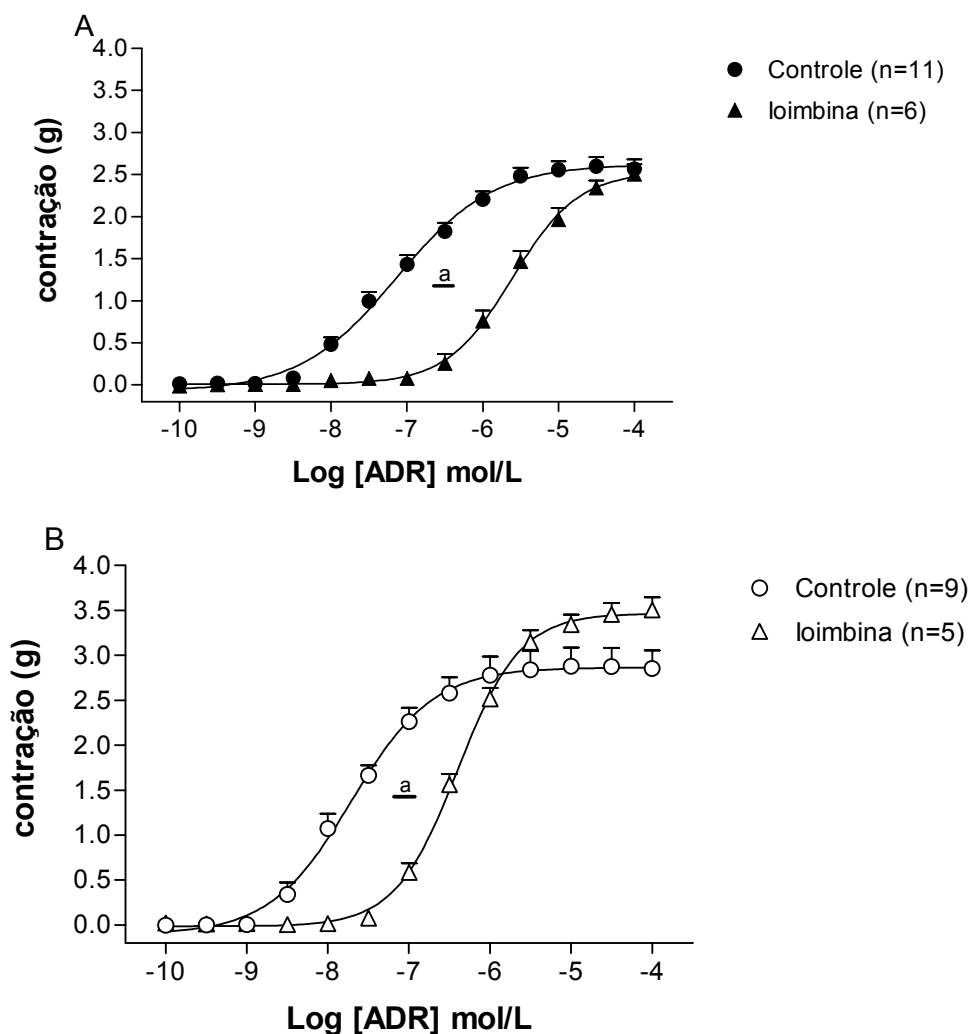


Fig. 23. Efeito da ioimbina sobre a resposta contrátil induzida com adrenalina (ADR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos normotensos. As curvas concentração-efeito foram realizadas após incubação com ioimbina ou na ausência do antagonista seletivo α_2 -AR (controle). Os pontos representam a média \pm EPM, em grama (g) de tensão, de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ^a Indica diferença em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$).

Em aortas de ratos 2R-1C com endotélio, houve redução apenas do valor de pD_2 da ADR (Fig. 24A). Em aortas sem endotélio (Fig. 24B) a ioimbina reduziu o E_{max} e pD_2 comparado ao controle ADR.

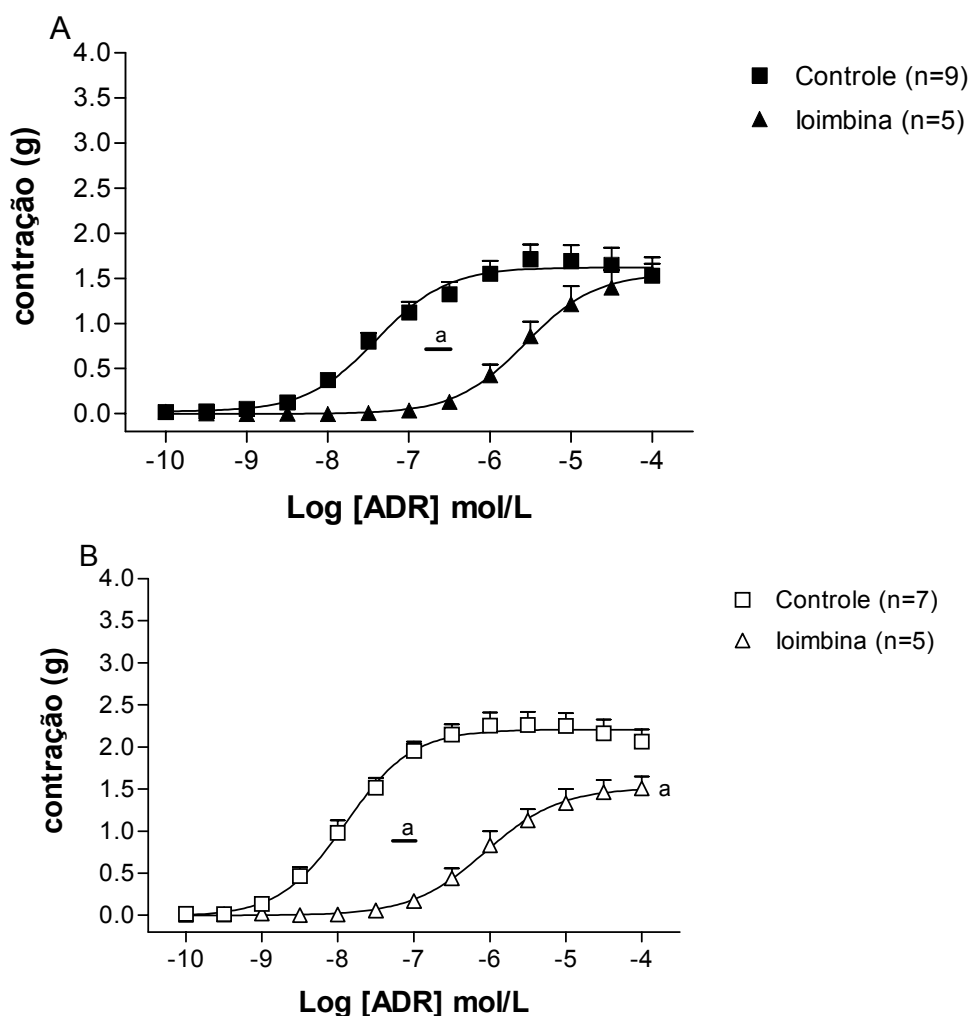


Fig. 24. Efeito da ioimbina sobre a resposta contrátil induzida com adrenalina (ADR) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B), isoladas de ratos hipertensos renais. As curvas concentração-efeito foram realizadas após incubação com ioimbina ou na ausência do antagonista seletivo α_2 -AR (controle). Os pontos representam a média \pm EPM, em grama (g) de tensão, de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. (^a $p < 0,05$) Indica diferença em relação aos respectivos controles.

4.21 Efeito da ativação de receptores α_1 -adrenérgicos sobre a resposta contrátil induzida pela adrenalina em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

A combinação dos antagonistas β -AR e α_2 -AR, propranolol e ioimbina reduziu o valor de pD_2 da ADR em aortas com ou sem endotélio de ratos 2R e 2R-1C. E também, ocorreu aumento de E_{max} apenas em aortas com endotélio, isoladas de 2R e 2R-1C (Tab. 4).

4.22 Efeito da adrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷, da eNOS em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

Não houve diferença na expressão de Ser¹¹⁷⁷ fosforilada (f-eNOS) entre aortas de ratos 2R-1C ($1,38 \pm 0,20$) e 2R ($0,86 \pm 0,12$) (Fig. 25).

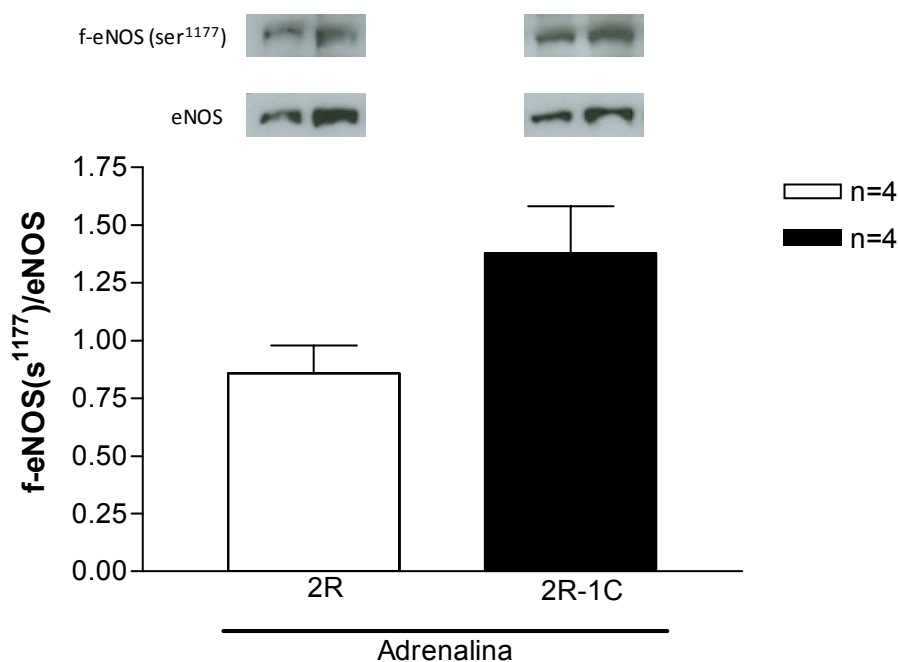


Fig. 25. Efeito da adrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ (S¹¹⁷⁷) da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, em aortas com endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). As barras representam a média \pm EPM de "n" preparações isoladas de diferentes ratos.

4.23 Efeito do antagonista de receptores β -adrenérgicos ativados pela adrenalina na fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R1C

Não houve diferença na expressão de Ser¹¹⁷⁷ fosforilada da eNOS entre aortas de ratos 2R controle ($0,86 \pm 0,12$) e as incubadas com propranolol ($0,72 \pm 0,16$) (Fig. 26A). Em aortas de ratos 2R-1C, o propranolol reduziu a expressão de Ser¹¹⁷⁷ fosforilada da eNOS (f-eNOS $0,74 \pm 0,12$) em relação ao controle 2R-1C ($1,38 \pm 0,20$) (Fig. 26B).

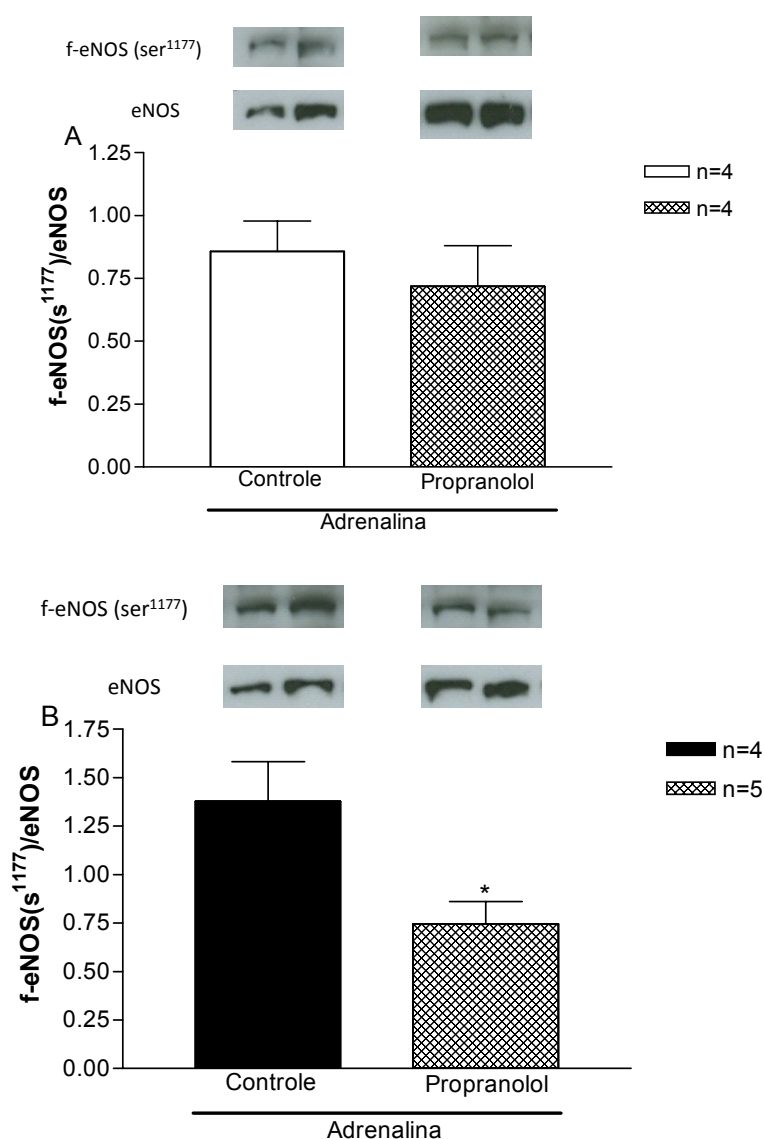


Fig. 26. Efeito do propranolol sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ (S¹¹⁷⁷) da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, estimulada por adrenalina em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B). A expressão de Ser¹¹⁷⁷ foi verificada após incubação com propranolol ou em ausência do antagonista (controle). As barras representam a média \pm EPM de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. (*p<0,05) Representa diferença entre aortas incubadas com propranolol e controle 2R-1C.

4.24 Efeito da adrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

Houve maior expressão de Ser¹¹⁷⁷ fosforilada (f-eNOS) em aortas de ratos 2R-1C ($0,80 \pm 0,05$) em relação às aortas de ratos 2R ($0,61 \pm 0,03$) (Fig. 27).

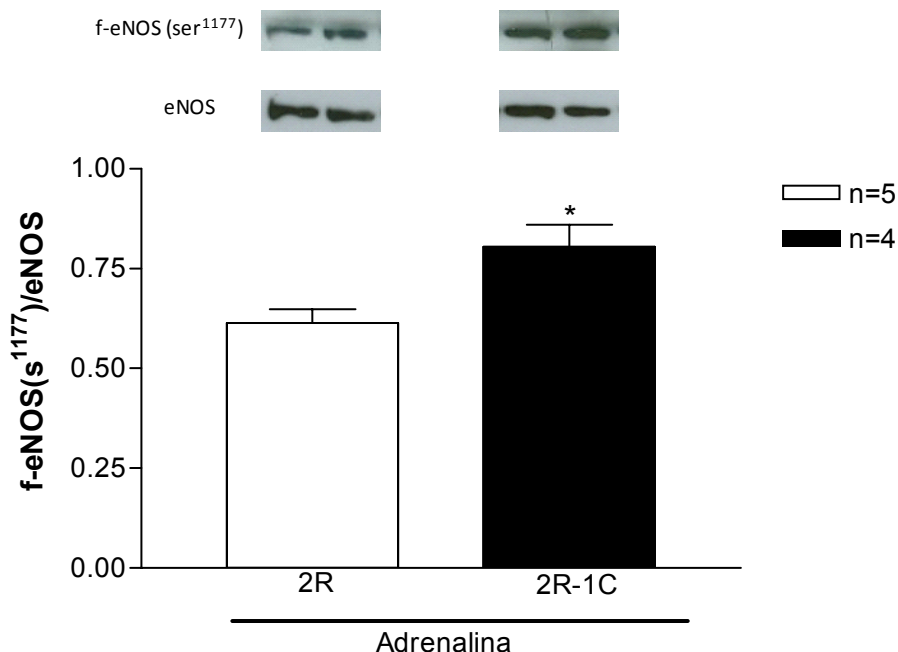


Fig. 27. Efeito da adrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, em aortas com endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). As barras representam a média \pm EPM de “n” preparações isoladas de diferentes ratos. * Representa diferença entre 2R-1C e 2R ($p < 0,05$).

4.25 Participação de receptores α -adrenérgicos ativados pela adrenalina na fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

Em aortas de ratos 2R, a incubação com fenoxibenzamina resultou em maior expressão de Ser¹¹⁷⁷ fosforilada ($0,99 \pm 0,13$) comparado ao controle 2R ($0,61 \pm 0,03$) (Fig. 28A). Em aortas de ratos 2R-1C, a incubação com fenoxibenzamina não alterou a expressão de Ser¹¹⁷⁷ fosforilada ($0,75 \pm 0,076$) em relação ao controle 2R-1C ($0,80 \pm 0,05$) (Fig. 28B).

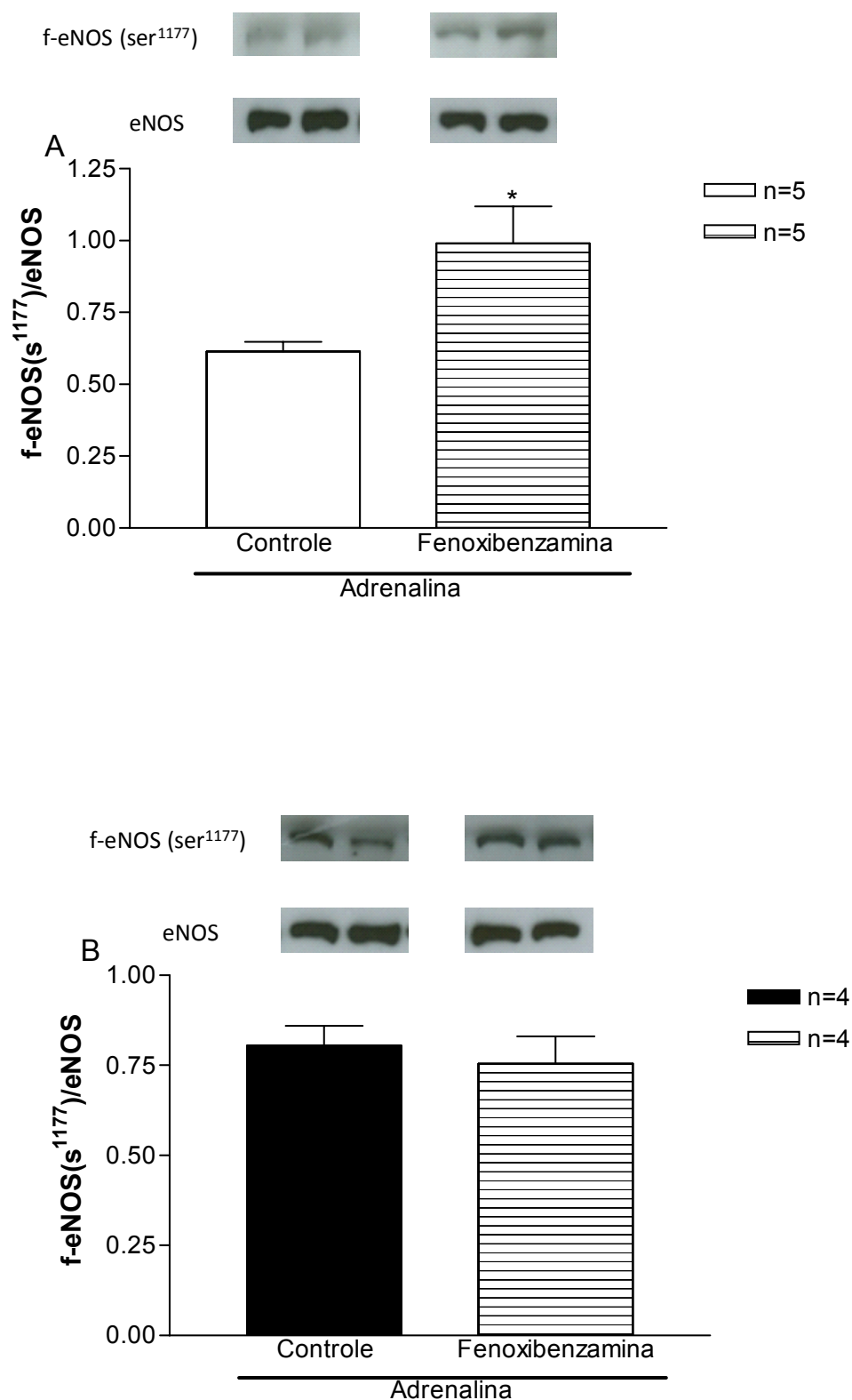


Fig. 28. Efeito da fenoxibenzamina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ (S¹¹⁷⁷) da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, estimulada por adrenalina em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B). A expressão de Ser¹¹⁷⁷ foi verificada após incubação com fenoxibenzamina ou em ausência do antagonista (controle). As barras representam a média ± EPM de “n” preparações isoladas de diferentes ratos. (*p<0,05) Representa diferença entre aortas incubadas com fenoxibenzamina e controle 2R.

4.26 Efeito da ADR sobre a expressão do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ fosforilado da eNOS em aortas com endotélio de ratos 2R e 2R-1C

Ao aumentar o número amostral certificamos que o estímulo com adrenalina resultou em maior expressão do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ fosforilado da eNOS em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R-1C ($1,18 \pm 0,07, n=6, p<0,01$) em relação a 2R ($0,83 \pm 0,03, n=5$), como mostra a Fig. 29.

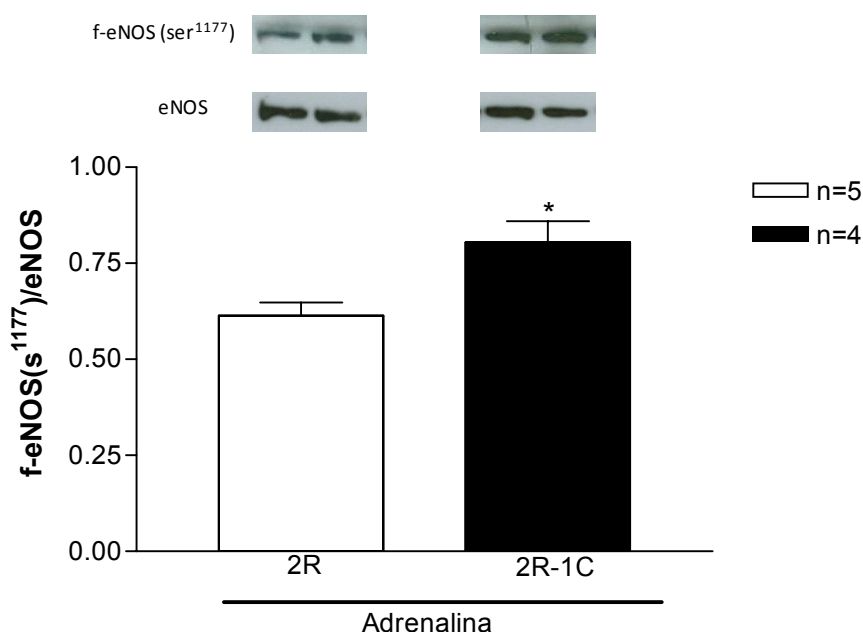


Fig. 29. Efeito da adrenalina sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ (S¹¹⁷⁷) da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, em aortas com endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). As barras representam a média ± EPM de “n” preparações isoladas de diferentes ratos. * Representa diferença entre 2R-1C e 2R ($p<0,05$).

4.27 Participação da via PI₃K/AKT ou peróxido de hidrogênio na fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS induzida pela adrenalina em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R-1C

Em aortas de ratos 2R-1C estimuladas com adrenalina, não houve redução na expressão de Ser¹¹⁷⁷ fosforilada da eNOS nas aortas incubadas com wortmannin ($0,79 \pm 0,10$) ou com catalase ($0,65 \pm 0,11$) em relação ao controle 2R-1C ($0,98 \pm 0,15$) (Fig. 30).

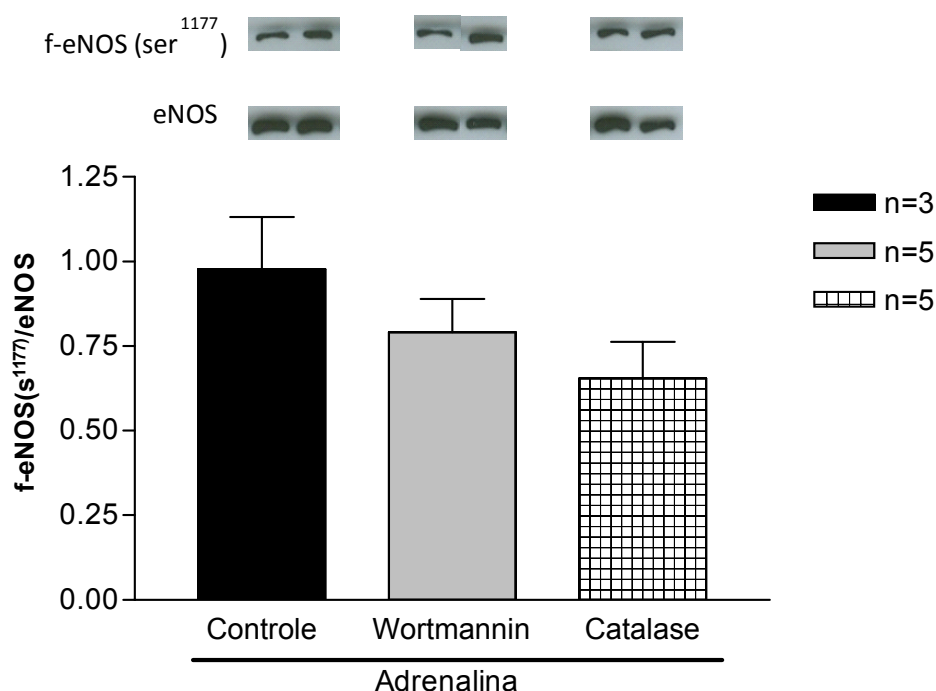


Fig. 30. Efeito do wortmannin ou catalase sobre a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ (S¹¹⁷⁷) da eNOS, normalizada pela expressão da eNOS total, estimulada por adrenalina em aortas com endotélio isoladas de ratos hipertensos renais. A expressão de Ser¹¹⁷⁷ foi verificada após incubação com wortmannin ou catalase ou em ausência dos inibidores (controle). As barras representam a média \pm EPM de "n" preparações isoladas de diferentes ratos.

4.28 Medida de adrenalina plasmática de ratos 2R e 2R-1C

A concentração de adrenalina plasmática foi menor em animais hipertensos renais 2R-1C do que no plasma de ratos 2R (Fig. 31). Os dados numéricos estão apresentados na Tab. 6.

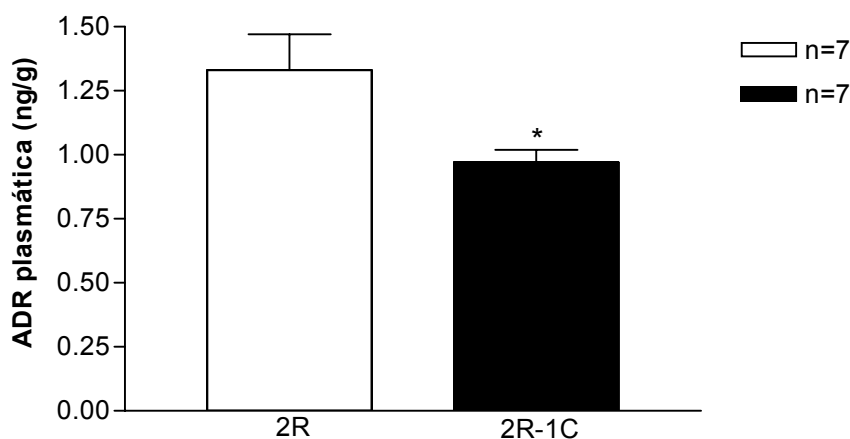


Fig. 31. Concentração de adrenalina (ADR) em plasma de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). As barras representam a média \pm EPM de "n" preparações isoladas de diferentes ratos. (*p<0,05) Representa diferença entre 2R e 2R-1C.

4.29 Medida de adrenalina tecidual de ratos 2R e 2R-1C

Não existe diferença na concentração de adrenalina entre as adrenais direita e esquerda de animais normotensos (Fig.32A) e hipertensos renais (Fig. 32B). Os dados numéricos estão apresentados na Tab. 6.

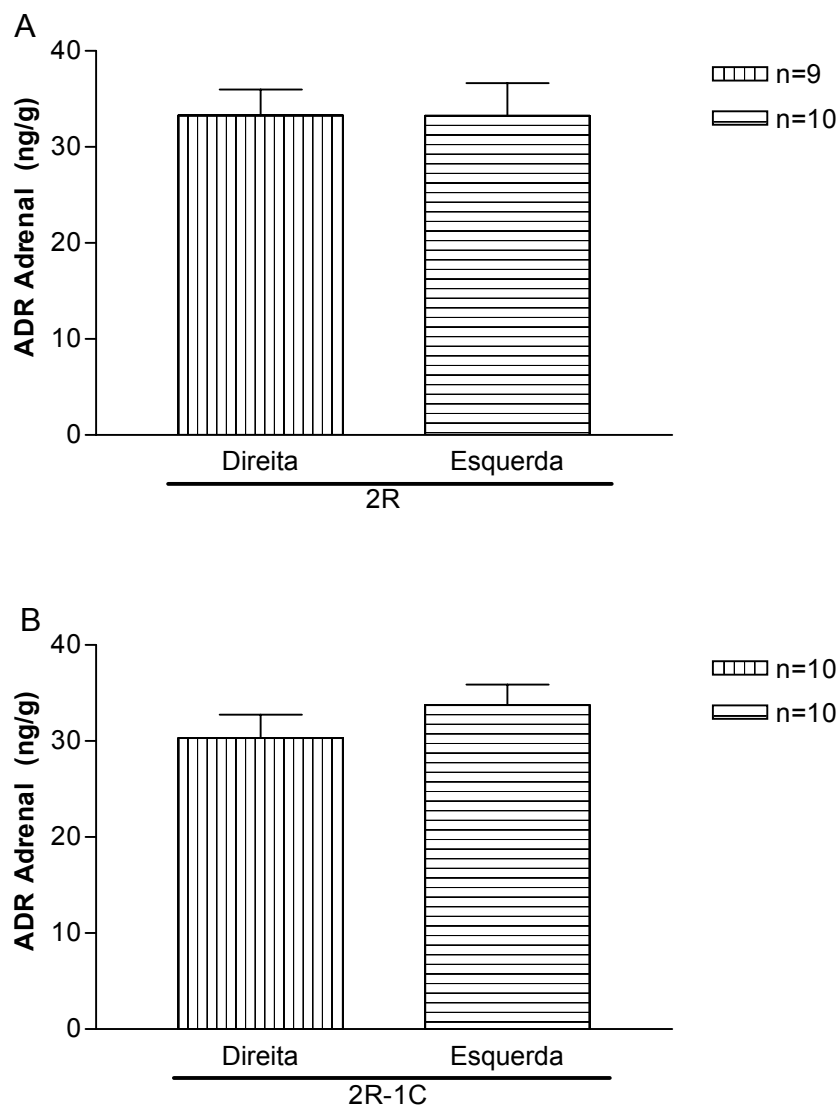


Fig. 32. Concentração de adrenalina (ADR) nas adrenais, direita e esquerda, de ratos normotensos (A) e hipertensos renais (B). As barras representam a média \pm EPM de "n" preparações isoladas de diferentes ratos.

A concentração de adrenalina entre as adrenais direita (Fig.33A) e esquerda (Fig. 33B) de 2R e 2R-1C não foi diferente. Os dados numéricos estão apresentados na Tab. 6.

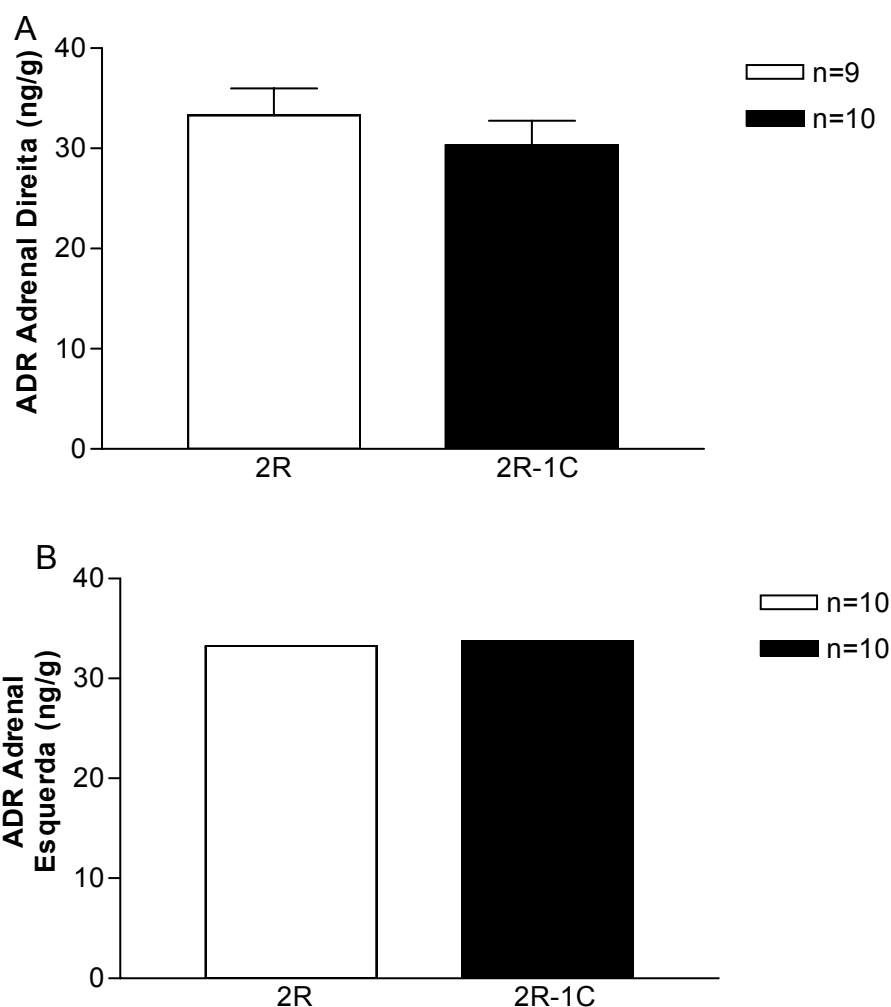


Fig. 33. Concentração de adrenalina (ADR) nas adrenais, direita (A) e esquerda (B), de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). As barras representam a média \pm EPM de "n" preparações isoladas de diferentes ratos.

Tabela 6. Valores da concentração plasmática e tecidual (adrenais) de adrenalina em animais 2R e 2R-1C

	Plasma	Adrenal Direita	Adrenal Esquerda
2R	1,33 \pm 0,14	33,3 \pm 2,68	33,24 \pm 3,41
2R-1C	0,97 \pm 0,05 *	30,32 \pm 2,42	33,76 \pm 2,11

Os valores representam a concentração de adrenalina \pm erro padrão da média (EPM), obtidos de "n" amostras (plasma, adrenal direita ou adrenal esquerda) de diferentes ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). *Representa diferença entre 2R-1C e 2R ($p < 0,05$).

4.30 Produção de NO em células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C, estimuladas com noradrenalina ou adrenalina

Verificamos que não houve diferença na produção de NO entre células endoteliais de aorta de ratos 2R ($6,20 \pm 1,47$, $n=4$) e células endoteliais isoladas da aorta de ratos 2R-1C ($4,80 \pm 1,21$, $n=4$) estimuladas com noradrenalina (Fig. 34A), ou estimuladas com adrenalina 2R ($8,60 \pm 3,41$, $n=4$) 2R-1C ($5,27 \pm 0,97$, $n=4$) (Fig. 34B).

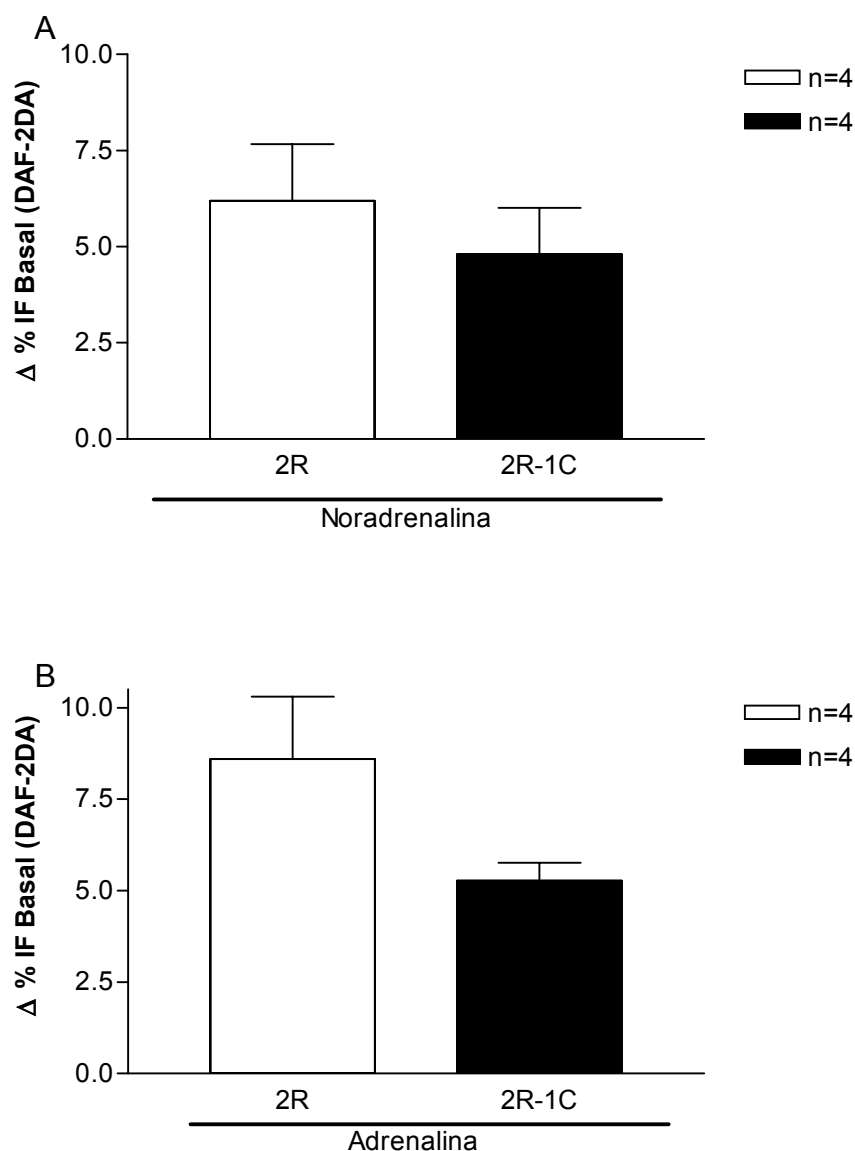


Fig. 34. Delta da Intensidade de fluorescência (ΔIF) em % emitida pela sonda sensível ao NO (DAF-2DA) em células endoteliais de aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C) estimuladas com noradrenalina (A) e adrenalina (B). As barras representam a média \pm EPM de amostras de células endoteliais isoladas de aortas de "n" diferentes ratos.

Discussão

5 DISCUSSÃO

A pressão arterial (PA) é determinada por dois parâmetros funcionais importantes, o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica (RVP). Múltiplas vias incluindo o Sistema Nervoso Autônomo, Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona e outras substâncias vasoativas atuam sobre o DC e RVP para regular a PA precisamente, garantindo adequada perfusão sanguínea para vários órgãos do do corpo humano (Guyenet, 2006; Saper, 2002). Ao ressaltar outras substâncias vasoativas, torna-se evidente a importância do endotélio para controle da PA, devido à produção de fatores de contração derivados do endotélio (EDCFs), fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRFs) e o fator de hiperpolarização de membrana dependente do endotélio (EDHF).

O nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a estudar o papel do NO na resposta vascular de relaxamento e contração em ratos hipertensos renais (2R-1C). Neste modelo de hipertensão, ocorre o aumento da atividade simpática devido ao aumento do estresse oxidativo (Oliveira-Sales et al., 2009; Oliveira-Sales et al., 2008). Além disso, ocorre a disfunção endotelial caracterizada como a menor resposta relaxante dependente de endotélio relacionada a múltiplos fatores associados a várias condições patológicas da capacidade anticoagulante e anti-inflamatória do endotélio (Gimbrone et al, 1995).

No trabalho de Linder e Bendhack (2002) demonstraram que a resposta contrátil na artéria caudal de ratos hipertensos renais 2R-1C foi menor do que em artéria caudal de ratos normotensos 2R, com ou sem endotélio. Recentemente, Silva e cols (2013) demonstraram que a fenilefrina promoveu resposta contrátil menor em aortas de ratos 2R-1C do que em aortas de 2R e que esta menor resposta depende do endotélio. Os autores relacionaram o efeito à hiperatividade da enzima NO-sintase endotelial (eNOS).

Considerando a hiperatividade simpática neste modelo de hipertensão, em que é esperado aumento sistêmico de NOR e ADR, no presente trabalho, propusemos investigar se a menor resposta vascular em aortas de ratos 2R-1C para fenilefrina, agonista α_1 -AR sintético, seria também ativada pelos agonistas NOR e ADR, catecolaminas endógenas. Investigamos os mecanismos celulares relacionados à resposta destes agonistas adrenérgicos não seletivos em aorta de ratos hipertensos renais e normotensos controles.

Os receptores se apresentam em diversos estados conformacionais, que podem ser estabilizados de acordo com o ligante ativando efetores e vias de sinalização intracelular preferenciais (Deupi e Kobilka, 2010; Vaidehi e Kenakin, 2010). Desta forma, vale ressaltar que nosso interesse não é comparar a resposta vascular induzida pela NOR com a da ADR. Estes agonistas adrenérgicos não seletivos ativam preferencialmente, diferentes vias de transdução de sinal e ainda, os segundos mensageiros produzidos podem interagir entre si e alterar a resposta celular (Bouvier, 1990). E sim, se a resposta contrátil destes agonistas ou de um deles, envolve ativação da eNOS, dada a importância do controle simpático na modulação da função vascular. Mesmo sabendo que vasos de condutância não participam do controle da PA, é válido estudo nesses leitos vasculares para melhor compreender as vias de sinalização celular tanto em condições fisiológicas ou patológicas.

No presente estudo, a resposta contrátil induzida pela NOR, assim como ocorre com a PE, apresentou menor Emax em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R-1C, porém o pD₂ da resposta aumentou. Alterações de pD₂ podem ser decorrentes de alterações na densidade de receptores, afinidade e acesso do agonista ao receptor, ou nos mecanismos de transdução de sinal intracelular (Kenakin, 1997). No modelo de hipertensão SHR, foi evidenciado aumento na expressão de α -AR em aorta (Oliver et al., 2008).

Questionamos se o endotélio, importante no controle do tônus vascular, seria o único responsável pelo menor Emax da NOR em induzir contração em aortas de ratos 2R-1C. Verificamos, em aortas sem endotélio, que a resposta do músculo liso vascular de ratos 2R-1C também apresentou menor Emax, comparado ao 2R. Porém, a resposta à PE foi semelhante em aorta de ratos 2R-1C e 2R, sem endotélio como demonstrado por Silva et al. (2013). Esta divergência de resposta pode ser justificada pela não seletividade da NOR, característica do agonista endógeno, que aproxima seu efeito de uma situação fisiológica e ao ativar várias vias evidencia possíveis diferenças na sinalização em células do músculo liso vascular entre animais 2R-1C e 2R. Além disso, sabemos que na hipertensão 2R-1C ocorre deficiência de ativação de canais para potássio no músculo liso vascular (Callera, 2000), o que poderia justificar este efeito.

Ao investigar se o endotélio independente da condição patológica modularia a resposta da NOR, verificamos que a remoção do endotélio de aortas de ratos 2R e

2R-1C, não alterou a resposta. Este resultado foi intrigante, já que há anos é conhecido que a resposta vascular ao estímulo simpático é aumentada pela remoção do endotélio ou administração de inibidores da NOS (Matsuda et al., 1995; Bennet et al, 1992; Vanhoutte e Miller, 1989; Angus et al., 1986). Entretanto, isso reforça o conceito de que para comparação de resultados é necessário considerar o agonista, a distribuição de receptores no tipo celular, as condições experimentais, além da forma de representação dos resultados do estudo.

A maioria dos estudos de contração por reatividade vascular, para detectar alterações em mecanismos celulares relacionadas a receptores metabotrópicos, expressa a resposta contrátil em termos percentuais da contração máxima induzida por altas concentrações de KCl. Nestas condições, o efluxo de íons potássio é reduzido, o que despolariza a membrana celular e abre canal para Ca^{2+} dependente de voltagem Tipo L (L-VDDC), logo induz contração independente da ativação de receptor metabotrópico (Haeusler, 1983).

Desta forma, induzimos contração com KCl 60 mmol/L (Callera et al., 2000). Ao comparar os resultados expressos em gramas de tensão, com os dados em porcentagem de contração com KCl 60 mmol/L, obtivemos o mesmo perfil de resposta em aortas com endotélio, menor E_{max} e maior pD_2 em 2R-1C. Entretanto, o menor E_{max} (g), em aortas sem endotélio de ratos 2R-1C comparado a 2R foi semelhante quando expresso de maneira normalizada. Tal discrepância entre os dados obtidos pode ser justificada pelos resultados em que verificamos que KCl 60 mmol/L induziu menor E_{max} de contração em aortas com ou sem endotélio de ratos 2R-1C.

Estudos do nosso laboratório de Callera e cols (2000) demonstraram prejuízo na ativação dos canais para potássio na membrana de das células do músculo liso vascular, pois o potencial de repouso da membrana plasmática foi menos eletronegativo e a hiperpolarização encontra-se prejudicada em aorta de ratos 2R-1C. No mesmo sentido, Bonaventura e cols (2005) evidenciaram comprometimento na participação de canais para potássio em aorta sem endotélio, de ratos 2R-1C ativada pelo doador de NO, 15-ANE. Ao analisarmos a contração máxima induzida com KCl 60 mmol/L, nossos dados também evidenciam provável disfunção dos canais para potássio no modelo de hipertensão 2R-1C. Verificamos prejuízo na inativação destes canais para contração dependente e independente de endotélio. Dados coerente ao observado em estudos prévios de contração com KCl de nosso

laboratório (Silva, B.R., Tese de Doutorado FMRP–USP, 2013). Portanto, solução de Krebs modificado para KCl 60 mmol/L não pode ser considerada padrão para normalização e as curvas concentração-efeito normalizadas podem resultar em conclusões equivocadas. Desta forma, optamos por expressar os resultados em grama absoluta de contração.

Passamos a questionar se o NO poderia estar envolvido na modulação da menor resposta à NOR. A inibição da NOS com L-NAME, em aortas com endotélio, não alterou a resposta da NOR de ratos 2R, enquanto que em 2R-1C parece haver maior atividade desta enzima. Portanto, a menor resposta contrátil da NOR obtida em aortas com endotélio de 2R-1C deve estar associada à maior atividade da eNOS. Nossos dados corroboram resultados de nosso laboratório (Silva et al., 2013) com PE em aorta de ratos 2R-1C e estão de acordo com o estudo de Berg (2005) que observou maior ativação da eNOS para NOR endógena em SHR.

Avaliamos a resposta contrátil estimulada pela NOR na presença dos antagonistas adrenérgicos propranolol e ioimbina para avaliar a participação de β -ARs e α_2 -ARs na resposta da NOR em aorta de ratos 2R e 2R-1C. Isto porque vários autores demonstraram a participação de β -ARs no vaso-relaxamento dependente ou não do endotélio (Tanaka et al., 2005; Gray et al., 1992), e no efeito anti-contrátil (Davel, et al., 2012) e a participação de α_2 -AR endotelial nesta resposta (Molin e Bendhack, 2000; Vidrio et al. 2006; Shafaroudi et al, 2005).

Em aortas sem endotélio de 2R, o efeito do antagonista não seletivo de β -AR (propranolol) está relacionado ao aumento do E_{max} da contração, o que era esperado. É bem estabelecida a indução de relaxamento ou efeito anti-contrátil via β -AR que ao acoplar a proteína Gs ativa a enzima Adenilil-ciclase resultando na produção de AMPc e ativação da PKA, quinase capaz de fosforilar inúmeros substratos nas células do músculo liso vascular o que leva à hiperpolarização de membrana e redução da $[Ca^{2+}]_c$ (Tanaka et al., 2005). Entretanto, em aortas com endotélio de 2R, verificamos menor pD_2 , sendo que esperávamos uma potencialização ou aumento de E_{max} da resposta, tendo em vista que ativação de β -ARs no endotélio induz relaxamento vascular via PKA e AKT (Ferro et al., 2004). Isto pode ser justificado pelo fato de que o dímero $\beta\gamma$ da proteína Gs também é capaz de exercer seus efeitos independentes da subunidade G α s. A ativação de L-VDDC, também envolve participação do dímero $\beta\gamma$ da proteína Gs, via PKC, em células do músculo liso vascular de veia de coelho (Zhong et al., 2001; Viard et al, 2001). Desta

forma, a ativação de β -AR também pode resultar em aumento de $[Ca^{2+}]_c$ via subunidade $G_{\beta\gamma}$ e PKC, o que provavelmente contribui para o maior pD_2 da contração quando β -ARs são ativados pela NOR. Por outro lado, essa redução de pD_2 pode ser decorrente de efeito do propranolol no endotélio. O propranolol é considerado classicamente um antagonista, logo não seria capaz por si só de desencadear efeito. Porém, existe a possibilidade de ativação de vias de sinalização não-canônicas que poderiam levar ao relaxamento da aorta de ratos, como estamos estudando em nosso laboratório. Conforme verificamos no nosso laboratório, o propranolol é capaz de induzir relaxamento sobre pré-contração de PE e o análogo do tromboxano, U46619.

Foi intrigante a resposta obtida em aortas sem endotélio de ratos 2R-1C, em que o propranolol não aumentou o efeito máximo da contração da NOR como ocorreu em aortas de 2R. Foi demonstrado que o vaso-relaxamento via β -ARs no modelo 2R-1C é menor do que em aortas de 2R (Callera et al., 2004). Nossos resultados são coerentes com a literatura, mesmo antagonizando β -ARs, o menor E_{max} da contração é mantido em 2R-1C, ou seja, o efeito anti-contrátil via β -ARs está prejudicado. Parece contraditório, porém existe um possível ponto em comum nas duas situações, a dessensibilização de β -ARs. Há vários sítios que permitem a fosforilação nas alças intracelulares de β -ARs (Ferguson et al., 1996) e a eficácia de sua sinalização é modulada de várias formas que inclui a fosforilação pelas quinases PKA, PKC e quinases de receptores acoplados à proteína G (GRKs) (Lefkowitz et al., 1998). Além disso, tecidos cardiovasculares expressam abundantemente GRK2 que ao fosforilar β -ARs engatilha o processo de dessensibilização (Eckhart et al., 2002 e Pitcher et al., 1998). Há evidências de maior atividade e expressão de GRK2, o que reduz o acoplamento de β -ARs com proteína Gs na hipertensão (Feldman e Gros, 1996; Oliver et al., 2008). Em aortas com endotélio de ratos 2R-1C o possível efeito via dímero $G_{\beta\gamma}$ -PKC dependente de β -ARs e de influxo de Ca^{2+} ou o provável efeito relaxante do propranolol parece ser ainda mais acentuado, reforçando que há alterações das vias de sinalização ativadas por β -ARs em aorta de ratos 2R-1C.

Mesmo sabendo que ativação de α_2 -AR classicamente inibe a via adenilil-ciclase-AMPC via proteína G_i e leva à contração do músculo liso (Nebigil e Malik, 1993; Limbird, 1988), ao antagonizar α_2 -ARs não esperávamos o acentuado deslocamento para direita. Ao analisar os resultados em aortas com endotélio de 2R, esperávamos potencialização da resposta, visto que o endotélio ao estímulo

adrenérgico é associado à menor resposta contrátil devido à produção de EDRF via α_2 -AR. Para garantir as mesmas condições experimentais, os controles 2R foram realizados simultaneamente a 2R-1C. Ao finalizar estes experimentos e analisar os dados obtidos em aortas com ou sem endotélio, de ratos 2R-1C, verificamos perda de potência da resposta. Diante destes resultados, nos questionamos se a concentração de ioimbina (10 $\mu\text{mol/L}$) utilizada foi seletiva para α_2 -AR. Para tanto, incubamos aortas sem endotélio, isoladas de 2R, com várias concentrações de ioimbina e realizamos curvas concentração efeito para PE, agonista seletivo α_1 -AR. Verificamos que 10 $\mu\text{mol/L}$ de ioimbina reduziu a potência da resposta da PE de forma considerável, e que este antagonista não foi seletivo para α_2 -AR e também antagonizou α_1 -AR. Como RX821103 apresenta maior afinidade para α_2 -AR ($K_i = 8.7-9.2$) do que a ioimbina ($K_i = 7.9-9.5$) (NC-IUPHAR), realizamos o mesmo experimento utilizando este antagonista. Da mesma forma como ocorreu com a ioimbina, verificamos que a concentração preconizada na literatura (0,1 $\mu\text{mol/L}$) antagonizou α_1 -AR.

Os resultados obtidos com a ioimbina representam o papel funcional de α -ARs na resposta da NOR e neste sentido são extremamente coerentes. Pois, α_1 -ARs quando ativados via acoplamento com a proteína Gq ativa a enzima fosfolipase C e síntese de diacilglicerol (DAG) e inositoltrisfosfato (IP_3) relacionados ao aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Huang et al., 2004). Dessa forma a ativação destes receptores está relacionada à maior contração, neste caso em termos de pD_2 . Vale ressaltar o quanto o efeito da ativação desta via é proeminente, já que o antagonismo de α -ARs reduziu a potência da contração em aortas com ou sem endotélio de ratos 2R e 2R-1C. Porém, não podemos desconsiderar que a ativação de receptor α_1 -AR endotelial está relacionada à produção de NO (Silva et al., 2013), mecanismo que pode contribuir para o menor E_{max} da resposta contrátil de ratos 2R-1C.

Os antagonistas, ioimbina e propranolol, também foram associados para verificarmos a ação da NOR sobre receptor α_1 -AR, em aortas com ou sem endotélio, de 2R e 2R-1C, pois dados prévios demonstraram que a menor resposta contrátil em aorta de 2R-1C ocorreu via α_1 -AR. Como a concentração utilizada de ioimbina não foi seletiva para antagonizar α_2 -ARs, estes resultados tornaram-se incoerentes com nosso objetivo. E ainda, devido a não seletividade da NOR e a não total exclusão de receptores da resposta pelos antagonistas, avaliação destas respostas foi inviável.

É claro que a ativação de adrenoceptores endoteliais relacionados ao aumento da $[Ca^{2+}]_c$ endotelial estimula a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina e ativa a produção de NO pela eNOS. Nossa maior curiosidade foi verificar se a NOR seria capaz de ativar a eNOS pela da fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ e se esta fosforilação teria relação com α -ARs ou β -ARs.

Para que pudéssemos comparar os resultados de fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ de 2R com 2R-1C associado a α -ARs ou β -ARs, amostras do controle 2R e 2R-1C e as respectivas amostras incubadas com propranolol foram corridas em mesmo gel de *Western Blot*. O mesmo foi realizado para controle 2R e 2R-1C e as respectivas amostras incubadas com fenoxibenzamina. Vale ressaltar que os resultados obtidos são expressos na forma normalizada, resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS fosforilada em relação à eNOS total. Silva e cols (2014) demonstraram que a expressão eNOS total não é diferente entre 2R e 2R-1C.

Verificamos que a NOR foi capaz de estimular a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS em aorta de ratos 2R e 2R-1C. Nossos resultados estão de acordo com Seya e cols (2006) que demonstraram que a NOR promove a fosforilação da Ser¹¹⁷⁷, em cultura de célula endotelial de veia humana (HUVEC). Além disso, verificamos que em aorta de ratos 2R-1C ocorreu maior fosforilação de Ser¹¹⁷⁷. Este resultado corrobora nossos ensaios funcionais em que verificamos hiperatividade da eNOS em aorta de ratos 2R-1C, além de reforçar dados anteriormente obtidos em nosso laboratório com PE (Silva et al., 2014).

Recorremos aos antagonistas, propranolol e fenoxibenzamina, para investigar com qual família de adrenoceptores a maior fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS em 2R-1C estaria relacionada. Verificamos que via β -AR a NOR não alterou a expressão de Ser¹¹⁷⁷ fosforilada em relação aos controles 2R e 2R-1C. Constatamos que o efeito investigado ocorre via α -AR para o estímulo NOR, pois em aorta de ratos 2R a ativação de α -ARs reduziu a fosforilação de Ser¹¹⁷⁷. Este resultado pode ser compreendido com base nos estudos de Michell e cols (2001) que demonstraram que ocorre desfosforilação de Ser¹¹⁷⁷ pela fosfatase PP2A dependente de PKC, em HUVEC e cultura de célula endotelial de aorta bovina (BAEC) estimulada com fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Ou seja, o estímulo NOR via α -AR-Gq-PKC pode levar à desfosforilação de Ser¹¹⁷⁷. Mas, em aortas 2R-1C a NOR via ativação de α -ARs, aumentou a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷. Este resultado reafirma que a menor resposta contrátil observada em aortas de ratos 2R-1C está

relacionada à maior atividade da eNOS, também devido a mecanismo relacionado à fosforilação do seu resíduo de ativação, Ser¹¹⁷⁷.

Oliveira-Sales e cols (2008) demonstraram que animais 2R-1C apresentam maior estresse oxidativo central e sistêmico. Silva e cols (2013), além de confirmarem maior estresse sistêmico, demonstraram que o estímulo α_1 -AR leva à maior produção de H₂O₂ em aortas com ou sem endotélio de 2R-1C, sendo que o endotélio confere maior aporte de H₂O₂. Em 2014, Silva e cols evidenciaram que a via PI₃K/AKT está relacionada à maior expressão da forma fosforilada da eNOS no resíduo Ser¹¹⁷⁷, em aortas de ratos 2R-1C. Vale ressaltar que a atividade da NOS via PI₃K/AKT aumenta de maneira concentração dependente a H₂O₂ (Cai et al., 2003).

Diante destes dados e sabendo que a NOR é capaz de ativar a via PI₃K/AKT (Hu et al., 1996) nos questionamos se o H₂O₂ e a via PI₃K/AKT estariam relacionadas à maior fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ induzida por NOR em aorta de ratos 2R-1C. E para nossa grande satisfação confirmamos esta hipótese. Este resultado confere maior compreensão aos mecanismos relacionados ao menor efeito máximo contrátil induzido pelo NOR em aorta de ratos 2R-1C. Dessa forma, a maior atividade da eNOS, verificada com L-NAME, está relacionada também à maior fosforilação do seu resíduo de ativação, Ser¹¹⁷⁷ via PI₃K/AKT e H₂O₂, em aortas de ratos 2R-1C.

Trabalhos demonstram maior concentração de NOR em plasma de animais hipertensos DOCA-Sal e também em modelo de hipertensão neurogênica (Dominiak et al., 1986; Bouvier e Champlain, 1986). Com o objetivo de melhor entender a contribuição da estimulação adrenérgica endógena via Sistema Nervoso Simpático-Adrenal para as alterações funcionais de receptores adrenérgicos no modelo 2R-1C, realizamos a dosagem de NOR no plasma e nas adrenais direita (referente ao rim contra-lateral) e esquerda (referente ao rim, cuja artéria aferente foi clipada), de animais 2R e 2R-1C, mesmo esta sendo a catecolamina secretada em menor proporção dela adrenal.

Não houve diferença nos níveis plasmáticos de NOR entre ratos 2R e 2R-1C. Este resultado difere de dados da literatura em que os autores estudaram os níveis plasmáticos em outros modelos de hipertensão, inclusive no modelo que mais se aproxima ao 2R-1C, o induzido por infusão de AngII por 14 dias. Dange e cols (2014) observaram maior concentração plasmática de NOR no modelo de infusão de AngII. Vale ressaltar que neste estudo, os maiores níveis de NOR na circulação,

foram detectados 14 dias após a infusão de AngII, sugerindo uma liberação aguda de catecolaminas. Em nosso estudo, realizamos a dosagem das catecolaminas na sexta semana após a implantação do clipe, período crônico da hipertensão 2R-1C, em que os níveis de AngII já não se encontram mais elevados. Escolhemos este período porque todos os demais experimentos foram realizados com os animais nesta fase da hipertensão renal. Com isso, nosso resultado é coerente com Oliveira-Sales e cols (2014) que demonstraram que nesta fase há aumento da baixa frequência da pressão arterial sistólica, que sugere que o fluxo simpático vasomotor é elevado durante a fase de manutenção da hipertensão.

Não verificamos diferença na concentração de NOR entre as adrenais direita e esquerda de ratos 2R ou 2R-1C, evidenciando que a síntese de NOR é uniforme entre as adrenais e a estenose da artéria aferente do rim esquerdo, em 2R-1C não influencia diretamente a síntese de NOR nas adrenais. Também não houve diferença na concentração de NOR nas adrenais direitas ou nas esquerdas entre 2R e 2R-1C, demonstrando que a hipertensão, nesta fase do processo patológico não é influenciada pela concentração de NOR.

Seguimos o mesmo raciocínio para investigar a ação da ADR. Verificamos que existe uma menor resposta contrátil em aortas de ratos 2R-1C dependente ou independente do endotélio. Este resultado reforça que há alteração da sinalização celular que resulta em prejuízo de contração em 2R-1C. Verificamos que o endotélio por si é um fator modulador da resposta da ADR, já que em aorta de ratos 2R a remoção do endotélio potencializou a resposta. Em aortas de 2R-1C a remoção do endotélio aumentou, além do pD_2 o E_{max} da contração. Portanto, mais um indício de que na hipertensão 2R-1C há acentuada alteração da sinalização endotelial.

Também verificamos que a menor resposta contrátil estimulada pela ADR em aortas sem endotélio isoladas de ratos 2R-1C foi semelhante a 2R, ao expressar os resultados normalizados pela contração máxima induzida com KCl 60 mmo/L. Demonstramos que esta ferramenta é inviável como fator de normalização. Desta forma, também iremos expressar os resultados da ADR em grama de tensão.

Investigamos a contribuição do NO para menor resposta contrátil de 2R-1C com inibição não seletiva de NOS em aortas com endotélio. Resultado que corrobora dados anteriores que demonstraram maior atividade desta enzima na aorta de ratos 2R-1C, o que não é observado em ratos 2R. Portanto, as alterações celulares são associadas à hipertensão renovascular, que resulta em aumento da

atividade da eNOS. Desta forma, iniciamos a busca em compreender se β -ARs ou α_2 -ARs quando ativados pela ADR poderiam estar relacionados com a menor resposta contrátil em aortas de 2R-1C.

Conforme esperado, antagonizar β -ARs aumentou o Emax da contração em aortas, com ou sem endotélio de ratos 2R. Verificamos menor Emax da contração quando β -ARs são ativados pela ADR, ou seja, ativação de β -ARs resulta em ativação de vias relacionadas ao vaso-relaxamento, o que já é bem definido, ou seja, resulta em ativação de vias que levam ao efeito anti-contrátil. Porém, em aortas de 2R-1C, com ou sem endotélio, houve perda de potência com propranolol, além de não ocorrer aumento do Emax. Quanto ao menor pD_2 , nossos resultados indicam duas possibilidades, a ativação β -ARs em aorta de ratos 2R-1C pela ADR, leva a maior ativação da via, dímero $\beta\gamma$ da proteína Gs e PKC, que ativa L-VDDC, mecanismo evidenciado por Zhong e cols (2001) ou a redução de potência é devida ao efeito do propranolol. O efeito mais relevante e que vai de encontro com nosso objetivo é o fato de não ter ocorrido aumento de Emax em aortas 2R-1C ao antagonizar β -ARs na resposta da ADR também. Estes resultados reforçam a provável dessensibilização de β -ARs no modelo de hipertensão 2R-1C. Com isso, não verificamos o esperado aumento da contração com o antagonismo de β -ARs e o relaxamento envolvendo esta via fica prejudicado inclusive no modelo 2R-1C (Callera et al., 2004).

Verificamos que a concentração que utilizamos de ioimbina, antagonizou α_2 -ARs e α_1 -ARs. Ocorreu redução de pD_2 em aortas de 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio, além de redução de Emax em aortas de 2R-1C sem endotélio. Estes efeitos eram esperados, já que a ativação de α_1 -AR está relacionada à vasoconstrição. Verificamos que o endotélio contribui para a menor contração até mesmo em aortas de ratos 2R estimuladas com ADR e acreditamos em maior contribuição para este efeito de β -ARs do que α_2 -ARs para este efeito.

Existe controvérsia na literatura em relação ao papel funcional de α_2 -ARs em aorta de ratos. Enquanto alguns autores defendem que a resposta contrátil em aorta de ratos ativada pelo para agonista α_2 -AR é diminuída pelo endotélio e que esta é aumentada pela inibição farmacológica da NOS (Matsuda et al., 1995; Kaneko e Susano, 1993; Martin et al., 1986; Carrier et al., 1985; Eglême, et, 1984), outros autores defendem que agonistas α_2 -AR podem interferir na vaso-constricção induzida via α_1 -AR (Artigues-Varin et al., 2002; Iwanaga et al., 1998), assim como foi

demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que em ausência de PE ou prazosin a clonidina pode ativar α_1 -ARs (Molin e Bendhack, 2004).

Acreditamos que o maior contribuinte para esta contradição é a limitação das ferramentas farmacológicas, relacionada à seletividade, conforme verificamos em nosso próprio trabalho. De acordo com Vanhoutte (2001), o fato de as contrações induzidas por agonistas α_2 -ARs serem potencializadas pela remoção do endotélio mais do que as induzidas por agonistas α_1 -ARs, não necessariamente justifica a conclusão de que α_2 -ARs endoteliais são ativados por agonistas α_2 -ARs seletivos. Diante de tudo disso, optamos em não continuar a avaliar o papel específico de α_2 -AR na resposta da ADR.

Kou e Michel (2007) demonstraram que a ADR aumenta a fosforilação de Ser¹¹⁷⁷ em BAEC. Ao investigar se a ADR é capaz de ativar a eNOS por meio de fosforilação de Ser¹¹⁷⁷ em aorta de ratos normotensos e hipertensos renais e se existe diferença na quantidade expressa de Ser¹¹⁷⁷ fosforilada, verificamos que os controles 2R e 2R-1C referentes ao gel com o macerado de amostras incubadas com propranolol apresentaram apenas uma tendência em maior fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ em aortas de 2R-1C. Porém, ao analisar os controles corridos em outro gel junto ao macerado de amostras incubadas com fenoxibenzamina, verificamos maior fosforilação de Ser¹¹⁷⁷ em aortas 2R-1C.

Nossos resultados funcionais na reatividade vascular favorecem a interpretação de que haja maior fosforilação da Ser¹¹⁷⁷, já que verificamos menor efeito máximo contrátil induzido pela ADR em aortas de 2R-1C. Nos resultados em que verificamos apenas a tendência em maior fosforilação, obtivemos a significância ($p=0,0705$). Diante desse dados contraditórios, aumentamos o número amostral, a fim de reduzir o erro padrão da média e obter um resultado fidedigno ao fenômeno biológico. Feito isso, a maior fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS para o estímulo ADR em aortas 2R-1C tornou-se evidente.

Em seguida, nos perguntamos se este efeito estaria relacionado à ativação específica de α -ARs ou β -ARs. É notável que em aorta de ratos 2R, a ADR via β -AR não altera a fosforilação de Ser¹¹⁷⁷. Porém, em aorta de ratos 2R-1C ocorreu maior fosforilação de Ser¹¹⁷⁷ via β -ARs. Este efeito pode contribuir para o menor E_{max} da contração de aortas de ratos 2R-1C e corrobora aos nossos resultados funcionais obtidos pela reatividade vascular, maior atividade da eNOS induzida por ADR.

Em relação aos α -ARs, na aorta de ratos 2R a ativação pela ADR reduziu a fosforilação de Ser¹¹⁷⁷, provavelmente via PKC e PP2A (Michell et al., 2001). Porém, em aortas de ratos 2R-1C, a ADR via α -ARs não alterou a fosforilação de Ser¹¹⁷⁷. Ou seja, o menor efeito contrátil máximo em aortas de ratos 2R-1C estimuladas com ADR também está relacionada à ativação da eNOS por mecanismo fosforilativo via β -ARs.

Em 1998, Fleming e cols evidenciaram que a inibição da via PI₃K/AKT ou a mutação de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS atenuava a fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ e impedia a ativação da eNOS. Além disso, Ferro e cols (2004) demonstraram que o albuterol, agonista β_2 -AR aumenta a fosforilação de Ser da eNOS, efeito que envolve a participação tanto de PKA quanto de AKT, em aorta de ratos jovens (175-200g). Somado ao conhecimento de aumento de estresse oxidativo em 2R-1C (Silva et al., 2013), investigamos se o H₂O₂ e a via PI₃k/AKT estariam relacionados a maior fosforilação de Ser¹¹⁷⁷ em 2R-1C. Observamos que não houve redução significativa da fosforilação de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS após a incubação com wortmannin ou catalase, inibidor da via PI₃K/AKT e enzima catalisadora da degradação de H₂O₂, respectivamente. Este resultado nos leva a considerar e discutir alguns pontos. Em aorta de ratos 2R-1C, a maior atividade da eNOS, verificada com L-NAME, e maior fosforilação de Ser¹¹⁷⁷ via β -AR pode estar relacionada principalmente com a PKA, o que precisa ser certificado. Ao analisar a figura 30, não podemos descartar que o H₂O₂ e a via PI₃K/AKT em parte contribuem para fosforilação da Ser¹¹⁷⁷, induzida pela ADR, estímulo não seletivo com maior afinidade para β -AR. Isso somado aos nossos resultados da NOR, agonista não seletivo com maior afinidade para α -AR e aos resultados relatados por Silva e Cols (2013) para PE nos leva a sugerir que as modulações relacionadas à fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ via H₂O₂ e PI₃K/AKT parecem estar vinculadas à ativação de α -AR em aorta de ratos 2R-1C. Isto nos parece bastante coerente, considerando que a ativação de receptores acoplados a proteína Gq induz a ativação de NADPH oxidase, enzima que catalisa a produção de superóxido por atuar como um doador de elétrons, promovendo redução de oxigênio ao utilizar NADH ou NADPH (Paravicini e Touyz, 2008; Babior et al., 2004). Silva e cols (2014) demonstraram que há participação de NADPH oxidase na produção de H₂O₂ para estímulo α_1 -AR. Ou seja, a ativação α -AR contribui para o aumento do estresse oxidativo e ativação da via PI₃K/AKT, enquanto a ativação de β -AR e acoplamento a proteína Gs, provavelmente não.

Estudos de Dominiak e cols (1986) demonstraram elevação na concentração de ADR circulante após total desnervação de barorreceptores em ratos Sprague-Dawley. Diante da hiperatividade simpática presente no modelo 2R-1C, pode se esperar hiper-estimulação da medula da adrenal, já que esta é innervada diretamente por uma fibra pré-ganglionar simpática. Para testarmos essa hipótese e melhor compreendermos a participação da ADR plasmática na modulação da resposta adrenérgica, realizamos a dosagem desta catecolamina liberada na circulação em maior proporção, no plasma e nas adrenais direita (referente ao rim contra-lateral) e esquerda (referente ao rim, cuja artéria aferente foi clipada), de animais 2R e 2R-1C.

Para nossa surpresa, não verificamos diferença na concentração de ADR entre as adrenais direita e esquerda de ratos 2R ou 2R-1C, evidenciando que a síntese de ADR é uniforme entre as adrenais e a estenose da artéria aferente do rim esquerdo, em 2R-1C não influencia diretamente a síntese de ADR nas adrenais. E também não existe diferença na concentração de ADR nas adrenais direitas entre 2R e 2R-1C ou nas esquerdas, demonstrando que a hipertensão, nesta fase do processo patológico não influencia na concentração de ADR nas adrenais. Entretanto, verificamos menor concentração de ADR no plasma de animais hipertensos comparado ao plasma de animais normotensos.

Durante a coleta das adrenais observamos uma diferença nítida a olho nu, as adrenais direita e esquerda de ratos 2R eram rosadas, enquanto ambas as adrenais direita e esquerda de ratos 2R-1C eram esbranquiçadas. Esta observação reforça a hipótese de que a estenose na artéria renal esquerda resulta em alterações sistêmicas e não apenas na adrenal respectiva a este rim. Que junto ao resultado de redução de ADR circulante em 2R-1C nos leva a sugerir a existência de um possível mecanismo compensatório à hiperatividade simpática. Sabendo que processos de hiper-estimulação levam à dessensibilização e que no modelo de hipertensão 2R-1C o aumento da pressão arterial é associado ao aumento de atividade simpática via estresse oxidativo, o qual é responsável por manter a hiperatividade simpática e provável e conseqüente hiper-estimulação da adrenal. O período, entre a sexta e oitava semana, após a implantação do clipe, período em que o aumento na pressão arterial se estabiliza e no qual realizamos os experimentos, reflete este possível processo de dessensibilização. Isto poderia acarretar em menor liberação de ADR na circulação de ratos 2R-1C, como um mecanismo compensatório a hiper-ativação simpática, nesta fase crônica da

hipertensão. Delano e cols. (2006) demonstraram que a adrenalectomia reduz a expressão de xantina oxidase e EROS, resultado coerente com a nossa interpretação, de este ser um mecanismo compensatório, porém fisiológico. E ainda correlaciona com o fato de não haver participação significativa da via PI3K/AKT e H_2O_2 na ativação da eNOS pela ADR.

É inevitável neste momento questionar porque observamos redução nos níveis de ADR circulante e não de NOR. Esta questão pode ser compreendida com os estudos de Morrison e Cao (2000) que demonstraram que o estímulo central ou a ativação de certos reflexos podem resultar na ativação diferencial de duas populações de células cromafins da medula das supra-renais, as que secretam ADR e as que secretam NOR. Estes dados sugerem que a descarga simpática é controlada por diferentes circuitos neurais centrais, para explicar a regulação diferencial da secreção de ADR e NOR pela medula adrenal em resposta a estímulos fisiológicos e experimentais.

Silva e cols (2013) demonstraram maior produção de NO por células endoteliais isoladas de ratos 2R-1C, para o estímulo PE, utilizando a técnica de citometria de fluxo. Entretanto, verificamos que em células estimuladas com NOR ou ADR, não existe diferença na produção de NO entre células endoteliais isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Inicialmente, estes resultados nos pareceram totalmente incoerentes, não corroboraram nem os nossos resultados funcionais, moleculares e nem os resultados anteriores de nosso laboratório. Mas vale ressaltar que estes são agonistas adrenérgicos não seletivos que ativam diferentes vias de sinalização, com suas específicas afinidades. Os efeitos que verificamos com a reatividade, expressam o resultado funcional e final da interação destas diferentes vias tanto em células do músculo liso vascular, quanto em células endoteliais. Apesar disso, é justamente esta a grande relevância de se estudar NOR e ADR, agonistas que melhor representam e aproximam resultados experimentais de efeitos fisiológicos.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

O conjunto dos nossos resultados demonstrou que tanto a NOR quanto a ADR induzem menor resposta contrátil em aorta de ratos 2R-1C comparado a 2R, o que está relacionado à maior atividade da eNOS. A NOR induz maior fosforilação de Ser¹¹⁷⁷ via ativação de α -AR e este mecanismo envolve a participação da via PI3K/AKT e H₂O₂ e a ADR induz maior fosforilação de Ser¹¹⁷⁷ em aorta de ratos hipertensos 2R-1C via ativação de β -AR e não envolve a participação da via PI3K/AKT e H₂O₂.

Referências

7 REFERÊNCIAS

- AHLQUIST, R.F. A study of the adrenotropic receptors. **Am J Physiol.** 153: 586–600, 1948.
- ANGUS, J.A.; COCKS, T.M.; SATOH, K. The adrenoceptors on endothelial cells. **Fed Proc.** 45(9), 2355-2359, 1986.
- ARTIGUES-VARIN, C.; RICHARD, V.; VARIN R.; MULDER, P.; THUILLEZ C. alpha2-Adrenoceptor ligands inhibit alpha1-adrenoceptor-mediated contraction of isolated rat arteries. **Fundam Clin Pharmacol.** 16(4), 281-287, 2002.
- BABIOR, B.M. NADPH oxidase. **Curr Opin Immunol.** 16(1), 42– 47, 2004.
- BARKI-HARRINGTON, L.; ROCKMAN, H.A. Beta-arrestins: multifunctional cellular mediators. **Physiology.** 23, 17-22, 2008.
- BENNET, M.A.; WATT, P.A.C.; THURSTON, H. Endothelium-dependent modulation of resistance vessel contraction: studies with NG-nitro-L-arginine methyl ester and NG-nitro-L-arginine. **Br J Pharmacol.** 107(2), 616–621, 1992.
- BERG, T. Increased counteracting effect of eNOS and nNOS on an α_1 -adrenergic rise in total peripheral vascular resistance in spontaneous hypertensive rats. **Cardiovasc Res.** 67(4), 736– 744, 2005.
- BERRIDGE, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signaling mechanisms. **Biochim Biophys Acta.** 1793(6), 933-940, 2009.
- BODIGA, S; GRUENLOH, S.K.; GAO, Y.; MANTHATI, V.L.; DUBASI, N.; FALCK, J.R., MEDHORA, M.; JACOBS, E.R. 20-HETE-induced nitric oxide production in pulmonary artery endothelial cells is mediated by NADPH oxidase, H_2O_2 , and PI_3 -kinase/Akt. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 298, L564–L574, 2010.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature.** 368, 850–3, 1994.
- BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F.S.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Decreased vasodilation induced by a new nitric oxide donor in two kidney, one clip hypertensive rats is due to impaired k^+ channel activation. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 32(5-6), 478-481, 2005.

- BOUVIER, M.; DE CHAMPLAIN, J. Increased sympatho-adrenal tone and adrenal medulla reactivity in DOCA-salt hypertensive rats. **J Hypertens.** 4(2), 157-163, 1986.
- BOUVIER, M. Cross-talk between second messengers. **Ann N Y Acad Sci.** 594, 120-129, 1990.
- BUSSE, R.; MÜLSCH, A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. **FEBS Lett.** 265 (1-2), 133-136, 1990.
- BYLUND, D.B.; EIKENBERG, D.C.; HIEBLE, J.P.; LANGER, S.Z.; LEFKOWITZ, R.J.; MINNEMAN, K.P.; MOLINOFF, P.B.; RUFFOLO, R.R. JR.; TRENDELENBURG, U. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. **Pharmacol Rev.** 46, 121–136, 1994.
- CAI, H.; LI, Z.; DAVIS, M.E.; KANNER, W.; HARRISON, D.G.; DUDLEY JR, S.C. Akt-Dependent Phosphorylation of Serine 1179 and Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Cooperatively Mediate Activation of the Endothelial Nitric-Oxide Synthase by Hydrogen Peroxide. **Mol Pharmacol.** 63(2), 325–331, 2003.
- CALLERA, G.E.; VARANDA, W.A.; BENDHACK, L.M. Impaired relaxation to acetylcholine in 2K-1C hypertensive rat aortas involves changes in membrane hyperpolarization instead of an abnormal contribution of endothelial factors. **Gen Pharmacol.** 34(6), 379- 389, 2000.
- CALLERA, G.E.; YEH, E.; TOSTES, R.C.; CAPERUTO, L.C.; CARVALHO, C.R.; BENDHACK, L.M. Changes in the vascular β -adrenoceptor-activated signaling pathway in 2 Kidney-1 Clip hypertensive rats. **Br J Pharmacol.** 141(7), 1151–1158, 2004.
- CAMPESE, V.M.; SHAOHUA, Y.; HUIQUIN, Z. Oxidative stress mediates angiotensin II-dependent stimulation of sympathetic nerve activity. **Hypertension.** 46(3), 533–539, 2005.
- CARAVAGGI, A.M.; BIANCHI, G.; BROWN, J.J.; LEVER, A.F.; MORTON, J.J.; POWELL-JACKSON, J.D.; Robertson, J.I.; SEMPLE, P.F. Blood pressure and plasma angiotensin II concentration after renal artery constriction and angiotensin infusion in the dog. (5-Isoleucine) angiotensin II and its breakdown fragments in dog blood. **Circ Res.** 38(4), 315-321, 1976.

- CARRIER, G.O.; WHITE, R.E. Enhancement of alpha1- and alpha2-adrenergic agonist-induced vasoconstriction by removal of endothelium in rat aorta. **J Pharmacol Exp Ther.** 232(3), 682-687, 1985.
- CARTER, W.O.; NARAYAN, P.K.; ROBINSON, P.J. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. **J Leukoc Biol.** 55(2), 253-8. 1994.
- COSTA, C.A.; AMARAL, T.A.S.; CARVALHO, L.C.R.M.; OGNIBENE, D.T.; DA SILVA, A.F.E.; MOSS, M.B.; VALENÇA, S.S.; DE MOURA, R.S.; RESENDE, A.C. Antioxidant Treatment With Tempol and Apocynin Prevents Endothelial Dysfunction and Development of Renovascular Hypertension. **Am J Hypertens.** 22(12), 1242-1249, 2009.
- DALE, H.H. On some physiological actions of ergot. **Am J Physiol.** 34, 163–206, 1905.
- DANGE, R.B.; AGARWAL, D.; MASSON, G.S.; VILA, J. WILSON, B.; NAIR, A.; FRANCIS, J. Central blockade of TLR4 improves cardiac function and attenuates myocardial inflammation in angiotensin II-induced hypertension. **Cardiovasc Res.** 103(1),17-27, 2014.
- DAVEL, A.P.; CERAVOLO, G.S.; WENCESLAU, C.F.; CARVALHO, M.H.; BRUM, P.C.; ROSSONI, L.V. Increased vascular contractility and oxidative stress in β_2 -adrenoceptor knockout mice: the role of NADPH oxidase. **J Vasc Res.** 49(4), 342-52, 2012.
- DELANO, F.A.; PARKS, D.A.; RUEDI, J.M.; BABIOR, B.M.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W. Microvascular display of xanthine oxidase and NADPH oxidase in the spontaneously hypertensive rat. **Microcirculation.** 13(7), 551–566, 2006.
- DEUPI, X.; KOBILKA, B.K. Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function. **Physiology.** 25(5), 293-303, 2010.
- DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; HERMANN, C.; BUSSE, R.; ZEIHNER, A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by akt-dependent phosphorylation. **Nature.** 399(6736), 601-605, 1999.
- DOMINIAK, P.; KEES, F.; GROBECKER H. Circulating and tissue catecholamines in rats with chronic neurogenic hypertension. **Basic Res Cardiol.** 81(1), 20-28, 1986.

- ECKHART, A.D.; OZAKI, T.; TEVAEARAI, H.; ROCKMAN, H.A.; KOCH, W.J. Vascular-targeted overexpression of G protein-coupled receptor kinase-2 in transgenic mice attenuates β -adrenergic receptor signaling and increases resting blood pressure. **Mol Pharmacol**. 61(4), 749-758, 2002.
- EDWARDS, G.; DORA, K.A.; GARDENER, M.J.; GARLAND, C.J.; WESTON, A.H. K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**. 396 (6708), 269-272, 1998.
- EGLÉME, C.; GODFRAIND, T.; MILLER, R.C. Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of the endothelial cells. **Br J Pharmacol**. 81(1), 16-18, 1984.
- ELLIS, A.; TRIGGLE, C.R. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. **Can J Physiol Pharmacol**. 81 (11), 1013-28, 2003.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. 288 (5789), 373-376, 1980.
- IGNARRO, L.J.; HARBISON, R.G.; WOOD, K.S.; KADOWITZ, P.J. Activation of Purified Soluble Guanylate Cyclase by Endothelium-Derived Relaxing Factor from Intrapulmonary Artery and Vein: Stimulation by Acetylcholine, Bradykinin and Arachidonic Acid. **J Pharmacol Exp Ther**. 237(3), 893-900, 1986.
- INSEL, P.A. Adrenergic receptors - evolving concepts and clinical implications. **N Engl J Med**. 334, 580-585, 1996.
- FELDMAN, R.D.; GROS, R. Defective vasodilatory mechanisms in hypertension: a G-protein-coupled receptor perspective. **Curr Opin. Nephrol Hypertens**. 15(2), 135-140, 2006.
- FERGUSON, S.S.G.; DOWNEY, W.E.; COLAPIETRO, A.M.; BARAK, L.S.; MÉNARD, L.; CARON, M.G. Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. **Science**. 271(5247), 363-366, 1996
- FERON, O.; SALDANA, F.; MICHEL, J.B.; MICHEL, T. The Endothelial Nitric-oxide Synthase-Caveolin Regulatory Cycle. **J Biol Chem**. 273(6), 3125-3128, 1998.

- FERRO, A.; COASH, M.; YAMAMOTO, T.; JUBLI, R.; JI, Y.; QEEN, L. Nitric Oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein Kinase A and AKT. **Br J Pharmacol**. 143, 397- 403, 2004.
- FLEMING, I.; BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 284(1), R1-R12, 2003.
- FLEMING, I.; BAUERSACHS, J.; FISSTHALER, B.; BUSSE, R. Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tryosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. **Circ Res**. 82(6), 686–695, 1998.
- FLUTTERT, M.; DALM, S.; OITZL, M.S. A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats. **Lab Anim**. 34(4), 372-8, 2000.
- FREDRIKSSON, R.; LAGERSTROM, M.C.; LUNDIN, L.G.; SCHIOTH, H.B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogentic analysis, paralogon groups, and fingerprints. **Mol Pharmacol**. 63(6), 1256-1272, 2003.
- FULTON, D.; GRATTON, J.P.; MCCABE, T.J.; FONTANA, J.; FUJIO, Y.; WALSH, K.; FRANKE, T.F.; PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W.C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase akt. **Nature**. 399(6736), 597-601, 1999.
- GIMBRONE JR, M.A. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. **Am J Cardiol**. 75(6), 67B–70B, 1995.
- GOLDBLATT, H.; LYNCH, J.; HAMZAL, R.F.; SUMMERVILLE, W.W. Studies on experimental hypertension: I. the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **J Exp Med**. 59(3), 347–379, 1934.
- GRAY, D.W.; MARSHALL, I. Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent β -adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. **Br J Pharmacol**. 107(3), 684-690, 1992.
- GRIENDLING, K.K.; MINIERI, C.A.; OLLERENSHAW, J.D.; ALEXANDER, R.W. Angiotensin II Stimulates NADH and NADPH Oxidase Activity in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. **Circ Res**. 74, 1141-1148, 1994.

- GUYENET, P.G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci.** 7(5), 335–346, 2006.
- GUYENET, P.G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci.** 7, 335–46, 2006.
- HAEUSLER, G. Contraction, membrane potential and calcium fluxes in rabbit pulmonary arterial muscle. **Fed Proc.** 42(2): 263-268, 1983.
- HEITZLER, D.; DURAND, G.; GALLAY, N.; RIZK, A.; AHN, S.; KIM, J.; VIOLIN, J.D.; DUPUY, L.; GAUTHIER, C.; PIKETTY, V.; CRÉPIEUX, P.; POUPON, A.; CLÉMENT, F.; FAGES, F.; LEFKOWITZ, R.J.; REITER, E. Competing G protein-coupled receptor kinases balance G protein and β -arrestin signaling. **Mol Syst Biol.** 8, 590, 2012.
- HIGASHI, Y.; SASAKI, S.; NAKAGAWA, K.; MATSUURA, H.; OSHIMA, T.; CHAYAMA, K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. **N Engl J Med.** 346 (25),1954-1962, 2002.
- HUANG, J.S.; RAMAMURTHY, S.K.; LIN, X.; LE BRETON, G.C. Cell signalling through thromboxane A₂ receptors. **Cell Signal.** 16(5), 521-533, 2004.
- HU, Z.W.; SHI X.Y.; LIN, R.Z. HOFFMAN, B.B. Alpha1 Adrenergic Receptors Activate Phosphatidylinositol 3-Kinase in Human Vascular Smooth Muscle Cells Role in mitogenesis. **J Biol Chem.** 271(15), 8977-8982, 1996.
- IWANAGA, S.; SHIBATA, O.; TSUDA, A. HASHIMOTO, S.; MAKITA, T.; CHO, S.; SUMIKAWA, K. The role of alpha1-adrenoceptors in the clonidine-induced contraction and relaxation of rat aorta. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol.** 102(2), 137-147, 1998.
- KANEKO, K.; SUNANO, S. Involvement of alpha-adrenoceptors in the endothelium-dependent depression of noradrenaline-induced contraction in rat aorta. **Eur J Pharmacol.** 240(2-3), 195-200, 1993.
- KENAKIN, T.P. Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction. **Lippincott-Raven Publishers (Philadelphia)**, 3rd. edition, 1997.
- KONISHI, M.; SU, C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. **Hypertension.** 5(6), 881– 886, 1983.

- KOU, R.; MICHEL, T. Epinephrine regulation of the endothelial nitric-oxide synthase: roles of Rac1 and β 3-adrenergic receptor in the endothelial NO signaling. **J Biol Chem.** 282(45), 32719-32729, 2007.
- LEFKOWITZ, R.J.; PITCHER, J.; KRUEGER, K.M.; DAAKA, Y. Mechanisms of β -adrenergic receptor desensitization and resensitization. **Adv. Pharmacol.** 42: 416-420, 1998.
- LIMBIRD, L.E. Receptors linked to the inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms. **FASEB J.** 2 (11) 2686-2695, 1988.
- LINDER, A.E.; BENDHACK, L.M. Endothelin-1-induced contraction is impaired in tail artery of renal hypertensive rats. **Vascul Pharmacol.** 39(1-2), 77-82, 2002.
- MARTIN, W.; FURCHGOTT, R.F.; VILLANI, G.M.; JOTHIANANDAN, D. Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. **J Pharmacol Exp Ther.** 237(2), 529-538, 1986.
- MARTINEZ-MALDONADO, M. Pathophysiology of renovascular hypertension **Hypertension.** 17(5), 707-719, 1991.
- MATSUDA, K.; SEKIGUCHI, F.; TOJO, M.; SHIMAMURA, K.; SUNANO, S. Effects of NG-nitro-L-arginine on alpha-agonists-induced contraction of aortae from Wistar Kyoto rats and stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **J Smooth Muscle Res.** 31(2), 51-60, 1995.
- MAZZACORATTI, M.G.; AMADO, D.; CAVALHEIRO, E.A. HPLC determination of norepinephrine, 5-hydroxytyramine and 5-hydroxytryptamine in rat brain using sodium dodecyl sulphate as ion-pair. **Braz J Med Biol Res.** 23(3-4), 255-62, 1990.
- MEDDINGS, J.B.; SCOTT, R.B.; FICK, G.H. Analysis and comparison of sigmoidal curves: application to dose-response data. **Am J Physiol.** 257 (6), G982-G989, 1989.
- MICHELL, B.J.; CHEN, Z.P.; TIGANIS, T.; STAPLETON, D.; KATSIS, F.; POWER, D.A.; SIMI, A.T.; KEMP, B. E. Coordinated Control of Endothelial Nitric-oxide Synthase Phosphorylation by Protein Kinase C and the cAMP-dependent Protein Kinase. **J Biol Chem.** 276(21), 17625-17628, 2001.

- MITCHELL, J.A.; DE NUCCI, G.; WARNER, T.D.; VANE, J.R. Different patterns of release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. **Br J Pharmacol.** 105(2), 485–489, 1992.
- MOLIN, J.C.; BENDHACK, L.M. Clonidine induces rat aorta relaxation by nitric oxide-dependent and -independent mechanisms. **Vascul Pharmacol.** 42(1), 1-6, 2004.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.** 43(2), 109-142, 1991.
- MORRISON, S.F.; CAO, W.H. Different adrenal sympathetic preganglionic neurons regulate epinephrine and norepinephrine secretion. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 279: R1763–R1775, 2000.
- MURGA, C.; LAGUINGE, L.; WETZKER, R.; CUADRADO, A.; GUTKINDI, J.S. Activation of Akt/Protein Kinase B by G Protein-coupled Receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinasegamma **J Biol Chem.** 273(30), 19080–19085, 1998.
- NC-IUPHAR – International Union of Basic and Clinic Pharmacology.
<http://www.iuphar-db.org>
- NEBIGIL, C.; MALIK, K.U. Alpha adrenergic receptors subtypes involved in prostaglandin synthesis are coupled to Ca⁺⁺ channels through a pertussis toxin-sensitive guanine-nucleotide binding protein. **J Pharmacol Exp Ther.** 266, 1113-1124, 1993.
- NISHI, E.E.; OLIVEIRA-SALES, E.B.; BERGAMASHI, C.T.; OLIVEIRA, T.G.C.; BOIM, M.A.; CAMPOS, R.R. Chronic Antioxidant Treatment Improves Arterial Renovascular Hypertension and Oxidative Stress Markers in the Kidney in Wistar Rats. **Am J of Hypertens.** 23(5), 473-480, 2010.
- OLIVEIRA-SALES, E.B.; TOWARD, M.A.; CAMPOS, R.R.; PATON, J.F.R. Revealing the role of the autonomic nervous system in the development and maintenance of Goldblatt hypertension in rats. **Auton Neurosci.** 183, 23–29, 2014.
- OLIVEIRA-SALES, E.B.; COLOMBARI, D.S.A.; DAVISSON, R.L.; KASPAROV, S.; HIRATA, A.E.; CAMPOS, R.R.; PATON, J.F. Kidney-Induced Hypertension Depends on Superoxide Signaling in the Rostral Ventrolateral Medulla. **Hypertension.** 56(2), 290-296, 2010.

- OLIVEIRA-SALES, E.B.; NISHI, E.E.; CARILLO, B.A.; BOIM, M.A.; MIRIAM S. DOLNIKOFF, M.S.; BERGAMASCHI, C.T.; CAMPOS, R.R. Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. **Am J Hypertens**. 22(5): 484-492, 2009.
- OLIVEIRA-SALES, E.B.; DUGAICH, A.P.; CARILLO, B.A.; ABREU, N.P.; BOIM, M.A.; MARTINS, P.J.; D'ALMEIDA, V.; DOLNIKOFF, M.S.; BERGAMASCHI, C.T.; CAMPOS, R.R. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. **Am J Hypertens**. 21(1), 98-104, 2008.
- OLIVER, E.; MARTÍ, D.; MONTO, F.; FLACCO, N.; MORENO, L.; BARETTINO, D.; IVORRA, M. D.; D'OCÓN, P. The Impact of α_1 -Adrenoceptors Up-Regulation Accompanied by the Impairment of β_1 -Adrenergic Vasodilatation in Hypertension. **J Pharmacol Exp Ther**. 328(3), 982–990, 2009.
- PAGANO, P.J.; ITO, Y.; TORNHEIM, K.; GALLOP, P.M.; TAUBER, A.I.; COHEN, R.A. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. **Am J Physiol**. 268, H2274–H2280, 1995.
- PARAVACINI, T.M.; TOUYZ, R.M. NADPH Oxidases, reactive Oxygen Species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**. 31 (2), S170–S180, 2008.
- PARK, S.; RASMUSSEN, H. Activation of tracheal smooth muscle contraction: synergism between Ca^{2+} and activators of protein kinase C. **Proc Natl Acad Sci USA**. 82 (24), 8835-8839, 1985.
- PITCHER, J.A.; FREEDMAN, N.J.; LEFKOWITZ, R.J. G protein-coupled receptor kinases. **Annu Rev Biochem**. 67, 653–692, 1998.
- PUTNEY, J.W.Jr.; TAKEMURA, H.; HUGHES, A.R.; HORSTMAN, D.A.; THASTRUP, O. How do inositol phosphates regulate calcium signaling? **Faseb J**. 3, 1899-1905, 1989.
- RODRIGUES, G. J.; LUNARDI, C. N.; LIMA, R.G.; SANTOS, C. X.; LAURINDO, F.R.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**. 18(3), 176-183, 2008.
- SAPER, C.B. The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. **Annual Rev Neurosci**. 25, 433–469, 2002.

- SCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDY, A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Lett.** 364(3), 279-282, 1995.
- SESSA, W.C. eNOS at a glance. **J Cell Sci** 117(Pt 12), 2427-2429, 2004
- SEYA, Y.; FUKUDA, T.; ISOBE, K.; KAWAKAMI, Y.; TAKEKOSHI, K. Effect of norepinephrine on RhoA, MAP kinase, proliferation and VEGF expression in human umbilical vein endothelial cells. **Eur J Pharmacol.** 553(1-3), 54-60, 2006.
- SHAFAROUZI, M.M.; MCBRIDE, M.; DEIGHAN, C.; WOKOMA, A.; MACMILLAN, J.; DALY, C.J.; MCGRATH, J.C. Two “knockout” mouse models demonstrate that aortic vasodilatation is mediated via α_{2A} -adrenoceptors located on the endothelium. **J Pharmacol Exp Ther.** 314(2), 804-810, 2005.
- SILVA, B.R.; PERNOMIAN, L.; BENDHACK, L.M. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Front Physiol.** 3:441, 2012
- SILVA, B.R.; PERNOMIAN, L.; GRANDO, M.D.; AMARAL, J.H.; TANUS-SANTOS, J.E.; BENDHACK, L.M. Hydrogen peroxide modulates phenylephrine-induced contractile response in renal hypertensive rat aorta **Eur J Pharmacol.** 721(1-3), 193–200, 2013.
- SILVA, B.R. Resposta contrátil induzida pela fenilefrina é modulada pelo peróxido de hidrogênio em aortas de ratos hipertensos renais. **Tese (Doutorado)** – Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2013.
- SILVA, B.R.; PERNOMIAN, L.; GRANDO, M.D.; BENDHACK, L.M. Phenylephrine activates eNOS Ser1177 phosphorylation and nitricoxide signaling in renal hypertensive rat aorta. **Eur J Pharmacol.** 738, 192–199, 2014.
- SHUKLA, A.K.; Xiao, K.; LEFKOWITZ, R.J. Emerging paradigms of β -arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. **Trends Biochem Sci.** 36(9), 457-469, 2011.
- SUMMERS, R.J.; MCMARTIN, L.R. Adrenoceptors and their second messenger systems. **J Neurochem.** 60, 10-23, 1993.
- TANAKA, Y.; HORINOUCI, T.; KOIKE, K. New insights into β -adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 32, 503–514, 2005.

- THOMAS, D.D.; RIDNOUR, L.A.; ISENBERG, J.S.; FLORES-SANTANA, W.; SWITZER, C.H.; DONZELLI, S.; HUSSAIN, P.; VECOLI, C.; PAOLOCCI, N.; AMBS, S.; COLTON, C.A.; HARRIS, C.C.; ROBERTS, D.D.; WINK, D.A. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free Radic Biol Med.** 45, 18–31, 2008.
- VAIDEHI, N.; KENAKIN, T. The role of conformational ensembles of seven transmembrane receptors in functional selectivity. **Curr Opin Pharmacol.** 10(6), 775-781, 2010.
- VANHOUTTE, P.M. Combined alpha-and beta-adrenergic blockade in the treatment of hypertension. Introductory remarks: alpha-and beta-adrenergic receptors and the cardiovascular system. **J Cardiovasc Pharmacol.** Suppl 1, S1-13, 1981.
- VANHOUTTE, P.M.; MILLER, V.M. Alpha 2-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. **Am J Med.** 87(3C), 1S–5S, 1989.
- VANHOUTTE, P.M. Endothelial Adrenoceptors. **J Cardiovasc Pharmacol.** 38(5), 796-808, 2001.
- VIARD, P.; MACREZ, N.; MIRONNEAU, C.; MIRONNEAU, J. Involvement of both G protein α s and $\beta\gamma$ subunits in β -adrenergic stimulation of vascular L-type Ca^{2+} channels. **Br J Pharmacol.** 132, 669-76, 2001.
- VIDRIO, H.; CARRASCO, O. F.; RODRÍGUEZ, R. Antivasoconstrictor effect of the neuroprotective agent dexrazoxane in rat aorta. **Life Sci.** 80(2), 98-104, 2006.
- WU, X.; MAKYNEN, H.; KAHONEN, M.; ARVOLA, P.; PORSTI, I. Mesenteric arterial function in vitro in three models of experimental hypertension. **J Hypertens.** 14(3), 365–372, 1996.
- YOGI, A.; CALLERA, G.E.; HIPÓLITO, U.V.; SILVA, C.R.; TOUYS, R.M.; TIRAPELLI, C.R. Ethanol-induced vasoconstriction is mediated via redox-sensitive cyclo-oxygenase-dependent mechanisms. **Cli Sci.** 118(11), 657–668, 2010.
- ZHENG, H.; LOH, H.H.; LAW, P.Y. Agonist-selective signaling of G protein-coupled receptor: mechanisms and implications. **IUBMB Life.** 62(2), 112-119, 2010.
- ZHONG, H.; MINNEMAN, K.P. Alpha 1-adrenoceptor subtypes. **Eur. J. Pharmacol.** 375(1-3), 261-276, 1999.

ZHONG, J.; HUME, J.R.; KEEF, K.D. β -Adrenergic receptor stimulation of L-type Ca^{2+} channels in rabbit portal vein myocytes involves both α s and $\beta\gamma$ G protein subunits. **J Physiol.** 531(Pt1), 105–115, 2001.

ZSCHAUER, A.O.A.; SIELCZAK, M.W.; SMITH, D.A.S.; WANNER, A. Norepinephrine-induced contraction of isolated rabbit bronchial artery: Role of α_1 - and α_2 -adrenoceptor activation. **J Appl Physiol.** 82 (6), 1918–1925, 1997.