

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

MÁRIO DOS ANJOS NETO FILHO

**Efeitos da isoprenalina e da forskolina sobre a
mobilização de Ca^{+2} e produção de óxido nítrico
em células endoteliais de aorta de ratos**

Ribeirão Preto
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MÁRIO DOS ANJOS NETO FILHO

**Efeitos da isoprenalina e da forskolina sobre a
mobilização de Ca^{+2} e produção de óxido nítrico
em células endoteliais de aorta de ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dra. Lusiane Maria Bendhack

Ribeirão Preto
2008

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.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Neto, Mário dos Anjos

Efeitos da isoprenalina e da forskolina sobre a mobilização de Ca^{+2} e produção de óxido nítrico em células endoteliais de aorta de ratos / Mário dos Anjos Neto Filho; orientadora: Lusiane Maria Bendhack, Ribeirão Preto, 2008

Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Palavras-chave: endotélio, óxido nítrico, cálcio, isoprenalina e forskolina

FOLHA DE APROVAÇÃO

**Efeitos da isoprenalina e da forskolina sobre a mobilização de Ca^{+2} e
produção de óxido nítrico em células endoteliais de aorta de ratos**

Mário dos Anjos Neto Filho

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em ____ / ____ / 2008

Banca Examinadora

Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack (Orientadora)

Instituição: FCFRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*“A vida de um indivíduo só faz sentido
se ajuda a tornar a vida das demais
criaturas mais nobre e mais bela”*

Albert Einstein

*Dedico este trabalho à minha amada esposa
Andréia e a minha filha querida Maria Lívia,
pessoas que fazem tudo valer à pena.*

Agradeço à Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório sob sua orientação, pela confiança, dedicação e paciência durante nossa convivência, desde a minha iniciação científica.

Muito obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

À **FAPESP** (processo: 04/14059-8) pelo financiamento do nosso trabalho.

A todos os colegas do grupo de pesquisa orientado pela Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack: Alice, Amanda, Bruno, Carolina (Carol), Claire, Daniela (Dani Bona), Gerson, José Wilson (Zé Wilson) e Matheus.

Às técnicas Mayara Santos Gomes, Juliana Aparecida Vercesi (Ju) e Mirian Cristina C. de Melo, pelo essencial apoio técnico e amizade.

Às secretárias Marlene Rodrigues da Silva (FCFRP-USP), Sônia Maria Stefanelli (Soninha), José Waldik Ramón (FMRP-USP) e Fátima Helena Petean (FMRP-USP). À Aparecida Rosa da Silva, nossa “D. Nina”, (FCFRP-USP), pela amizade e convivência agradável.

Agradeço a todos os pós-graduandos do Laboratório de Farmacologia da FCFRP-USP e do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, pela amizade, pelas discussões acadêmicas, pelo companheirismo nos “Cursos de Inverno” e pelos momentos de descontração.

À Fabiana Rossetto de Moraes, pelo valioso auxílio técnico nos experimentos de citometria de fluxo.

Agradeço especialmente a Deus por me permitir desfrutar a emoção deste momento.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação da hipótese de modulação do fluxo de Ca^{+2} e da produção de NO em célula endotelial de aorta de rato	26
Figura 2:	Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para obtenção das curvas concentração-efeito para isoprenalina (0,1 nmol/L a 10 $\mu\text{mol/L}$) e forskolina (0,1 nmol/L a 1 $\mu\text{mol/L}$)	30
Figura 3:	Efeito relaxante da isoprenalina e da forskolina em anéis de aorta de ratos	44
Figura 4:	Efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}	46
Figura 5:	Efeito da associação do 2-APB com a tetracaína sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}	48
Figura 6:	Efeito do 2-APB sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}	50
Figura 7:	Efeito da tetracaína sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}	52
Figura 8:	Efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em células endoteliais de aortas de ratos em meio Ca^{+2} 1,6 mmol/L.	54
Figura 9:	Efeito do verapamil sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L	56
Figura 10:	Efeito do propranolol sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L	58
Figura 11:	Efeito do KT5720 sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L	60
Figura 12:	Efeito do L-NNA sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L	62

- Figura 13:** Efeito do KT5720 sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L 64
- Figura 14:** Efeito do Ca^{+2} sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos 66
- Figura 15:** Efeito do verapamil sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L 68
- Figura 16:** Efeito da associação do 2-APB com a tetracaína sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2} 70
- Figura 17:** Efeito do 2-APB sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2} 72
- Figura 18:** Efeito da tetracaína sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2} 74
- Figura 19:** Efeito do W7 sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L 76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca⁺²]_c: concentração citoplasmática de Ca⁺²

2-APB: borato de 2-aminoetoxidifenil (antagonista de receptores de IP₃)

AC: enzima adenilato-ciclase

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

ANOVA: análise de variância

ATP: nucleotídeo adenosina trifosfato

BSA fração V: soro albumina bovina isenta de ácidos graxos

BSA: soro albumina bovina

DAF-2/DA: 2-diacetato de 4,5- diaminofluoresceína

DAF-2T: 4,5- diaminofluoresceína-2-triazol

DAG: diacilglicerol

DMSO: dimetilsulfóxido

EC₅₀: Concentração efetiva da droga que produz 50% do efeito máximo

EDRF: fator relaxante derivado do endotélio

E_{max}: Efeito máximo

eNOS: isoforma endotelial da enzima NO-sintase

FSK: forskolina

Fura-2: ácido 1-[2-(5-carboxioxazol-2-il)-6-aminobenzofurano-5-oxi]-2-(2'-amino-5'-metil-fenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético

Fura-2/AM: ácido 1-[2-(5-carboxioxazol-2-il)-6-aminobenzofurano-5-oxi]-2-(2'-amino-5'-metil-fenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético-pentaacetoximetil éster.

GTP: nucleotídeo guanosina trifosfato

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

iNOS: isoforma induzida da enzima NO-sintase

IP₃: inositol 1,4,5-trisfosfato

ISO: isoprenalina

KT5720: ácido (9S,10S,12R)-2,3,9,10,11,12-hexahidro-10-hidroxi-9-metil-1-oxo-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-][1,6]benzodiazocina-10-carboxílico, hexil éster

L-NNA: N^G-nitro-L-arginina

NOS: enzima NO-sintase

nNOS: isoforma neuronal da enzima NO-sintase

pEC₅₀: logarítmo negativo da EC₅₀

PIP₂: fosfatidilinositol 4-5 bifosfato

PKA: proteína quinase A

PKG: proteína quinase G

PLC_β: fosfolipase C_β

Prop: propranolol

Tet: tetracaína

Ver: verapamil

W7: hidrocloreto de N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftalenosulfonamida

Φ Ca⁺²: meio zero-Ca⁺²

RESUMO

Mário dos Anjos Neto Filho **Efeitos da isoprenalina e da forskolina sobre a mobilização de Ca^{+2} e produção de óxido nítrico em células endoteliais de aorta de ratos** 2008. 101f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A enzima adenilato-ciclase pode ser ativada via receptores β -adrenérgicos acoplados à proteína G_s por agonistas como a isoprenalina ou pela ativação direta com forskolina, resultando na produção de AMPc, que ativa a PKA, capaz de modular a concentração citoplasmática de Ca^{+2} ($[\text{Ca}^{+2}]_c$). A hipótese do estudo foi de que a isoprenalina (via receptores β -adrenérgicos) e a forskolina (diretamente) poderiam ativar o aumento da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ pela mobilização dos estoques de Ca^{+2} do retículo endoplasmático, via receptores de IP_3 e de rianodina, e/ou pelo influxo de Ca^{+2} , favorecendo a formação do complexo Ca^{+2} -calmodulina, ativando a eNOS que produz NO em células endoteliais de aorta de ratos. Demonstramos que a isoprenalina e a forskolina mobilizaram Ca^{+2} do retículo endoplasmático, uma vez que a incubação das células (meio zero- Ca^{+2}) com a associação de 2-APB e tetracaína diminuiu a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ abaixo do basal. O 2-APB inibiu mais significativamente o efeito da isoprenalina sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ do que o efeito da forskolina. Por outro lado, a tetracaína teve maior efeito inibitório sobre a forskolina em aumentar a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ do que a isoprenalina. Em meio contendo Ca^{+2} (1,6 mmol/L), a incubação das células com verapamil diminuiu o efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$. O efeito da isoprenalina sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ foi mais inibido do que o da forskolina quando as células foram incubadas com KT5720. A isoprenalina e a forskolina aumentaram a produção de NO, que foi parcialmente inibida pelo L-NNA. Entretanto, a incubação das células com KT5720 não modificou a produção de NO ativada pela isoprenalina ou forskolina. A produção de NO foi semelhante em meio contendo Ca^{+2} (1,6 mmol/L) ou em meio zero- Ca^{+2} . A incubação das células com verapamil não modificou a produção de NO ativada pela isoprenalina ou forskolina. Entretanto, a associação de 2-ABP e tetracaína inibiu a produção de NO ativada com isoprenalina e forskolina. A incubação das células apenas com o 2-APB diminuiu mais significativamente a produção de NO ativada pela forskolina do que a ativada pela isoprenalina. Já a incubação das células apenas com tetracaína teve maior efeito inibitório sobre a produção de NO ativada pela isoprenalina do que a ativada pela forskolina. A inibição da calmodulina com o W7 praticamente aboliu a produção de NO ativada pela isoprenalina e pela forskolina. O conjunto dos nossos resultados permite sugerir que em células endoteliais da aorta de ratos, a isoprenalina e forskolina aumentam a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ via ativação da PKA pela liberação de Ca^{+2} do retículo endoplasmático através de receptores de IP_3 e de rianodina e pelo influxo extracelular de Ca^{+2} . A produção de NO é dependente de Ca^{+2} e da formação do complexo Ca^{+2} -calmodulina, mas independente da PKA. Os íons Ca^{+2} relacionados à produção de NO são primariamente liberados do retículo endoplasmático, via receptores de IP_3 e de rianodina.

Palavras-chave: endotélio, óxido nítrico, AMPc, cálcio, isoprenalina e forskolina.

ABSTRACT

Mário dos Anjos Neto Filho **Effect of isoprenaline and forskolin on Ca⁺² mobilization and NO production in rat aorta endothelial cells** 2008. 101f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The enzyme adenylyl-cyclase is activated by the agonists of β -adrenoceptors (β -AR) coupled to Gs protein such as isoprenaline or by its direct activation with forskolin. The activation of this enzyme produces cyclic AMP (cAMP), which in turn activates protein kinase-A (PKA), that modulates the cytosolic concentration of Ca⁺² ([Ca⁺²]_c). The hypothesis of the present study was that isoprenaline via β -AR activation and forskolin (FSK) by direct activation of adenylyl-cyclase induce the [Ca⁺²]_c increase through the release of endoplasmic reticulum (ER) by the activation of IP₃ or ryanodine receptors (RyR) and/or Ca⁺² influx that induces the formation of Ca⁺²-calmodulin complex, that activates nitric oxide synthase (eNOS) producing NO in the rat aortic endothelial cells. In the present study, isoprenaline as well forskolin release Ca⁺² from ER, since the cells incubation in Ca⁺² free Krebs solution containing both the IP₃R and RyR antagonist, 2-APB and tetracaine, decreased [Ca⁺²]_c to levels lower than the basal levels. 2-APB had a greater inhibitory effect on isoprenaline-induced response than on FSK-induced response. On the other hand, tetracaine had greater effect in inhibiting FSK than isoprenaline-induced [Ca⁺²]_c increase. In 1.6 mmol/L Ca⁺² Krebs solution, verapamil reduced the increase of [Ca⁺²]_c induced by isoprenaline and FSK. The inhibitor of PKA, KT5720 had greater effect on isoprenaline than in FSK-induced response. Both isoprenaline and FSK increased NO production that was partially inhibited with the NOS inhibitor L-NNA. However, KT5720, the extracellular Ca²⁺ concentration or verapamil did not alter the production of NO stimulated with isoprenaline or FSK, but it was inhibited by 2-APB and tetracaine. 2-APB had a greater inhibitory effect on the production of NO induced by FSK than that induced by isoprenaline. Otherwise, tetracaine had a greater inhibitory effect on the production of NO induced by isoprenaline than promoted by FSK. The inhibitor of calmodulin (W7) almost abolished the production of NO activated by isoprenaline or FSK.

Taken together, our results indicate that in the rat aortic endothelial cells, isoprenaline and FSK increase the [Ca⁺²]_c via PKA activation through the Ca⁺² release from the ER by the activation of IP₃R and RyR and Ca⁺² influx. The NO production is dependent of Ca⁺²-calmodulin, but independent of the activation of PKA. The Ca⁺² ions involved on the production of NO are released from the ER via IP₃ and ryanodine receptors.

Key Words: endothelial cells, nitric oxide, cAMP, calcium, isoprenaline, forskolin.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	07
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	09
RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	
Ativação farmacológica da via do AMPc	18
Mobilização farmacológica de Ca^{+2} em células endoteliais	21
Produção endotelial de NO	23
HIPÓTESE	25
OBJETIVO GERAL	27
OBJETIVO ESPECÍFICO	27
MATERIAL E MÉTODOS	
Animal Experimental	29
Efeito relaxante do agonista β -adrenérgico isoprenalina e do ativador da adenilato-ciclase forskolina em anéis de aorta de ratos	29
Isolamento de células endoteliais de aorta de ratos	30
I – Estudo da $[Ca^{+2}]_c$ com a sonda fluorescente Fura-2/AM	31
1. Cultura primária de células endoteliais de aorta de ratos	31
2. Carregamento das células com a sonda fluorescente Fura-2/AM	31
3. Medida da $[Ca^{+2}]_c$	32
Protocolos experimentais para medida da $[Ca^{+2}]_c$	32
1- Efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}	32
2- Efeito da associação do 2-APB com a tetracaína sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}	33
3- Efeito do 2-APB sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}	33
4- Efeito da tetracaína sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}	33

5- Efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L	34
6- Efeito do verapamil sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L	34
7- Efeito do propranolol sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L	35
8- Efeito do KT5720 sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio Ca^{+2} 1,6 mmol/L	35
II – Estudo da produção de NO com a sonda fluorescente DAF-2/DA	36
1. Carregamento das células com a sonda fluorescente DAF-2/DA para medida da produção de NO	36
Protocolos experimentais para medida da produção de NO	37
1- Efeito do L-NNA sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L	37
2- Efeito do KT5720 sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L.	37
3- Efeito da ausência (zero- Ca^{+2}) ou da presença de Ca^{+2} (Ca^{+2} 1,6 mmol/L) sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos.	38
4- Efeito do verapamil sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L.	38
5- Efeito da associação do 2-APB e tetracaína sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2} .	39
6- Efeito do 2-APB sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}	39

7- Efeito da tetracaína sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero-Ca ⁺²	39
8- Efeito do W7 sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio 1,6 mmol/L.	40
Análise Estatística	40
Drogas e Soluções	41

RESULTADOS

1- Efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a reatividade vascular de anéis de aorta de ratos, com endotélio	43
2- Efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a [Ca ⁺²] _c em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero-Ca ⁺²	45
3- Efeito da associação do 2-APB com a tetracaína sobre a [Ca ⁺²] _c em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero-Ca ⁺²	47
4- Efeito do 2-APB sobre a [Ca ⁺²] _c em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero-Ca ⁺²	49
5- Efeito da tetracaína sobre a [Ca ⁺²] _c em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero-Ca ⁺²	51
6- Efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a [Ca ⁺²] _c em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca ⁺² 1,6 mmol/L	53
7- Efeito do verapamil sobre a [Ca ⁺²] _c em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio contendo Ca ⁺² 1,6 mmol/L	55
8- Efeito do propranolol sobre a [Ca ⁺²] _c em resposta à isoprenalina em células endoteliais de aorta de ratos em meio contendo Ca ⁺² 1,6 mmol/L	57
9- Efeito do KT5720 sobre a [Ca ⁺²] _c em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio contendo Ca ⁺² 1,6 mmol/L	59
10- Efeito do L-NNA sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio contendo Ca ⁺² 1,6 mmol/L.	61

11- Efeito do KT5720 sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L.	63
12- Efeito do Ca^{+2} sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos.	65
13- Efeito do verapamil sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L.	67
14- Efeito da associação do 2-APB e tetracaína sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}	69
15- Efeito do 2-APB sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2} .	71
16- Efeito da tetracaína sobre a produção de NO ativada com isoprenalina e com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}	73
17- Efeito do W7 sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L.	75
DISCUSSÃO	78
CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXO	

Receptores β -adrenérgicos no sistema cardiovascular

Introdução

Ativação farmacológica da via do AMPc

Até meados do século XX, o endotélio vascular possuía apenas relevância anatômica. A partir dos anos 80 do século passado, vários grupos de pesquisa passaram a estudar a expressão de receptores β -adrenérgicos em células endoteliais (Steinberg et al., 1984; Buxton et al., 1987; Summers et al., 1987; Howell et al., 1988; Lefroy et al., 1993).

Muitos desses estudos mostram que o relaxamento do músculo liso vascular ativado por agonistas β -adrenérgicos poderia ser ao menos em parte, dependente do endotélio em diferentes leitos vasculares como: aorta de ratos (Neto, 2005), artéria mesentérica (Graves & Poston, 1993) e artéria pulmonar (Priest et al., 1997). Estes estudos também estão de acordo com outros dados que mostram um menor efeito relaxante da isoprenalina quando o endotélio vascular é removido (Rubanyi & Vanhoutte, 1985; Kamata et al., 1989; Gray & Marshall, 1992), ou quando a síntese de NO é inibida (Gray & Marshall, 1992; Blankesteyn & Thien, 1993).

A isoprenalina, agonista β -adrenérgico não-seletivo, foi sintetizada e desenvolvida como fármaco por Heribert Konzett (1940), o que trouxe importantes avanços à medicina. Entretanto, seu efeito não é seletivo entre os diferentes subtipos de receptores β -adrenérgicos (Black & Stephenson, 1962; Lands et al., 1967), assim como ocorre com o antagonista, propranolol (Black et al., 1965).

Os receptores β -adrenérgicos apresentam sete domínios transmembrana e estão ligados à proteína G_s . Após a ativação destes receptores por agonistas como a isoprenalina, ocorre a ligação do nucleotídeo guanosina trifosfato (GTP) à subunidade α do complexo $\alpha\beta\gamma$ da proteína G_s .

promovendo a dissociação do complexo α GTP da subunidade $\beta\gamma$ (Sternweis, 1986; Birnbaumer et al., 1993; Clapham & Neer, 1993; Clapham & Neer, 1997) e ativação da enzima adenilato-ciclase com produção de diferentes concentrações do AMPc.

O AMPc é um segundo mensageiro celular e o reconhecimento de sua natureza hidrofílica, levou à idéia inicial de que esta molécula poderia alcançar rapidamente todos os compartimentos celulares (Rall et al., 1956). Entretanto, ainda hoje, aproximadamente meio século depois da descoberta do AMPc (Rall et al., 1956; Kuo & Greengard, 1969; Hayes et al., 1979) não é completamente esclarecido como diferentes estímulos externos que levam ao aumento da concentração intracelular de AMPc poderiam controlar eventos fisiológicos celulares de forma seletiva. Alguns autores atribuem estas diferenças regulatórias à existência de diferentes isoformas da enzima adenilato-ciclase (Manolopoulos et al., 1995a, 1995b), o que poderia ser um das justificativas para as diferentes concentrações do AMPc produzido.

A adenilato-ciclase é uma proteína integral da membrana plasmática com seu sítio ativo na face citoplasmática e pode ser encontrada nas células endoteliais além de outros tipos celulares (Kuo & Greengard, 1969). A ativação de apenas uma molécula de adenilato-ciclase leva à conversão de muitas moléculas de ATP em AMPc. Atualmente, são conhecidas nove isoformas da enzima adenilato-ciclase na membrana (Ludwig & Seuwen, 2002; Sayner & Stevens, 2005; Kamenetsky et al., 2006). Destas, seis isoformas são encontradas em diferentes tecidos do rato, incluindo o endotélio vascular (tipos II-VI e VIII) (Manolopoulos et al., 1995a).

Dentre as nove isoformas da enzima adenilato-ciclase, oito delas (AC1-AC8), mas não a AC9, podem ser ativadas pela forskolina, um diterpeno isolado por Pehr Forskål a partir da raiz de uma planta indiana que foi denominada *Coleus forskohlii* em sua homenagem (Seamon & Daly, 1986; Tang & Hurley, 1998). A ativação da adenilato-ciclase pela forskolina ocorre pela ligação da droga à subunidade catalítica da enzima (Tesmer et al., 1997; Tang & Hurley, 1998). Porém, tanto a forskolina como a subunidade α da proteína G_s regulatória, podem ligar-se à adenilato-ciclase formando um complexo ternário (Laurenza et al., 1987). Assim, seja pela ligação de agonistas β -adrenérgicos como a isoprenalina a seu receptor associado à proteína $G_{s\alpha}$, como pela ativação direta da adenilato-ciclase pela forskolina, o AMPc produzido é capaz de ativar a proteína quinase-A (PKA) em células endoteliais vasculares.

A PKA é uma quinase dependente de AMPc, isto é, ativada pelo AMPc. Esta enzima é organizada na forma de um tetrâmero com duas unidades regulatórias (R) e duas unidades catalíticas (C), na forma R_2C_2 . Após a ligação do AMPc nas unidades R da PKA, ocorre a dissociação das subunidades regulatórias e ativação das subunidades catalíticas (Francis & Corbin, 1994).

A PKA catalisa e transfere o grupo fosfato terminal do ATP alterando a função de várias proteínas celulares como consequência da fosforilação de resíduos de serina e treonina dessas proteínas (Walsh & van Patten, 1994). Por outro lado, a PKA pode regular negativamente sua própria ativação, fosforilando e dessensibilizando o receptor β -adrenérgico que a ativou (Hausdorff et al., 1990), ou ainda ativando um gene capaz de promover sua inibição (Lum et al., 1999). Além dessa auto-regulação, a PKA também pode

ser farmacologicamente inibida de forma seletiva por drogas como o KT5720 (Mayet et al., 1997).

Mobilização farmacológica de Ca^{+2} em células endoteliais

De acordo com Hartzell (1988) e Pelzer et al. (1990) a ativação da via β -adrenérgica com a conseqüente ativação da PKA levando à fosforilação de proteínas dos canais para Ca^{+2} do tipo L, resulta no influxo de Ca^{+2} em células endoteliais de aorta. Como a ativação das isoformas constitutivas da NOS é dependente de Ca^{+2} , estímulos farmacológicos que resultam no aumento da concentração citoplasmática de Ca^{+2} em células endoteliais poderiam estar relacionados à produção de NO. Entretanto, em células endoteliais de alguns vasos existem poucos canais para Ca^{+2} dependentes de voltagem. Assim, fenômenos como a despolarização da membrana *per se*, não seriam capazes de promover o influxo de Ca^{+2} , cujo gradiente eletroquímico ocorreria principalmente pelo vazamento passivo, mesmo nas condições de repouso (Seiden et al., 2000).

Estes canais para Ca^{+2} são classificados de acordo com sua capacidade de condutância ao Ca^{+2} e características eletrofisiológicas, podendo ser bloqueados alostericamente por drogas como as fenil-alquilaminas (verapamil). Porém, a interação de drogas com estes canais depende de seu estado conformacional, o qual é definido por vários fatores como potencial de membrana e ativação por fosforilação pela ação de proteínas quinases como a PKA (Triggle, 1996).

Por outro lado, o aumento da concentração citoplasmática de Ca^{+2} também pode ser conseguido pela liberação de Ca^{+2} de estoques intracelulares

como os estoques mitocondriais e os do retículo endoplasmático. Bourguignon e colaboradores (1994) demonstraram a existência de receptores de IP₃ e de rianodina (Wang et al., 1995; Kohler et al., 2001) no retículo endoplasmático de células endoteliais.

O receptor de IP₃ é uma importante via de liberação de Ca⁺² do retículo endoplasmático. A interação de agonistas com receptores α -adrenérgicos leva à formação de IP₃ e diacilglicerol (DAG) pela hidrólise do fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP₂) da membrana plasmática por ação da enzima fosfolipase C (PLC β) em células de músculo liso vascular (Berridge, 1984). Entretanto, o receptor de IP₃ também pode ser ativado pela PKA que fosforila os resíduos de serina (Ser-1589 e Ser-1755) do receptor de IP₃. Curiosamente, a posição destes resíduos na proteína do receptor de IP₃ é que permite a diferenciação entre suas três distintas isoformas (Danoff et al., 1991).

Independentemente da via ativadora dos receptores de IP₃, o 2-APB, um antagonista dos receptores de IP₃, têm se mostrado uma importante ferramenta farmacológica nos estudos de mobilização intracelular de Ca⁺² em diferentes tipos celulares (Maruyama et al., 1997).

Outro receptor localizado no retículo endoplasmático relacionado com a liberação de estoques de Ca⁺² é o receptor de rianodina. Proteínas quinases como a PKA e fosfatases como PP1 e PP2A, ligam-se aos resíduos de leucina e isoleucina do receptor de rianodina modulando sua fosforilação (Marx et al., 2001). Por outro lado, substâncias como a tetracaína e a rianodina agem como antagonistas do receptor de rianodina no retículo endoplasmático (Shoshan-Barmatz & Zchut, 1994).

É importante lembrar que os estímulos que resultam na depleção dos estoques de Ca^{+2} ativam o influxo de Ca^{+2} através da membrana plasmática para o restabelecimento destes estoques. Mesmo na ausência da interação agonista-receptor ou formação de IP_3 , a depleção do estoque de Ca^{+2} é observado em células não excitáveis sendo capaz de ativar o influxo capacitivo (Putney, 1986).

A partir da possibilidade de detecção dos íons Ca^{+2} presentes no citoplasma das células com sondas como o Fura-2/AM (Grynkiewicz et al., 1985), grandes avanços foram dados acerca dos mecanismos relacionados ao influxo extracelular ou mobilização de estoques intracelulares Ca^{+2} , frente a estímulos farmacológicos (Barceñas-Ruiz & Wier, 1987; Peach et al., 1987; Paltauf-Doburzynska et al., 1999). Assim, a liberação de Ca^{+2} do retículo endoplasmático bem como o influxo de Ca^{+2} extracelular poderia ativar a produção endotelial de NO (Govers & Rabelink, 2001). Esta assertiva é a própria justificativa da relevância dos estudos sobre o aumento da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em células endoteliais, com vistas à função endotelial de produção do NO, o mais importante fator relaxante derivado do endotélio (EDRF – *endothelium-derived relaxing factor*).

Produção endotelial de NO

A descoberta do NO como sendo um dos três fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRFs) (Murad, 1977; Furchgott & Zawadzki, 1980; Ignarro et al., 1987) permitiu que muitos estudos a respeito da produção e liberação endotelial de NO fossem realizados. Neste contexto, Palmer e colaboradores (1988) verificaram que uma oxidase chamada óxido nítrico sintase (NOS) catalisa a reação da L-arginina com o O_2 formando NO e

L-citrulina. Estes estudos permitiram, por exemplo, que posteriormente análogos da L-arginina, como o N ω -nitro-L-arginine (L-NNA), dentre outros, pudessem ser desenvolvidos agindo como falsos substratos e inibidores competitivos da produção de NO (Mülsch & Busse, 1990). Também o desenvolvimento de sondas fluorescentes específicas para o NO, como o DAF-2/DA, permitiram visualizar e quantificar diretamente os estímulos farmacológicos que resultam na produção do NO, independentemente de qual isoforma de NOS fosse ativada (Kojima et al., 1998).

Atualmente, são conhecidas três isoformas de NOS: a isoforma induzida (iNOS), a isoforma neuronal (nNOS) e a isoforma endotelial (eNOS), associada à membrana e expressa nas células endoteliais (Bredt & Snyder, 1990; Bredt et al., 1991; Janssens et al., 1992; Xie et al., 1992; Charles et al., 1993).

Em células endoteliais, a eNOS pode ser encontrada em muitos sítios específicos, como próxima de organelas citoplasmáticas (Robinson et al., 1995; Sessa et al., 1995). Também as regiões de contato célula-célula foram descritas como sítios com grandes quantidades de eNOS. Interessantemente, a PKA foi encontrada próximo à eNOS em todos os sítios celulares pesquisados (Govers et al., 2002). Posteriormente, Boo e colaboradores (2003) propuseram que a eNOS poderia ser ativada pela PKA em aortas bovinas, quando a concentração citoplasmática de Ca²⁺ não estava aumentada, uma vez que nestas condições a PKA fosforila os resíduos de serina 635, serina 1179 e treonina 497 da eNOS.

Porém, estudos anteriores ao de Boo e colaboradores (2003), como o de Gadano et al. (1997) já haviam demonstrado a dependência de Ca²⁺ para ativação das isoformas constitutivas da NOS, a nNOS e eNOS, uma vez que a

inibição da enzima calmodulina com o W7 foi capaz de impedir a produção endotelial de NO. Outros grupos de pesquisa também identificaram a necessidade da ligação do Ca^{2+} com a proteína calmodulina, formando o complexo Ca^{+2} -calmodulina para ativação da produção de NO (Bredt e Snyder, 1990; Vogel, 1994; Li & Poulos, 2005).

Hipótese

Com base na literatura e em dados anteriores do nosso laboratório, a hipótese deste trabalho foi de que a isoprenalina (via receptores β -adrenérgicos) e a forskolina (diretamente) poderiam ativar a enzima adenilato-ciclase ativando a produção de AMPc, que poderia ativar a PKA. A ativação da PKA levaria ao aumento da concentração citoplasmática de Ca^{+2} pela liberação de Ca^{+2} dos estoques do retículo endoplasmático e/ou pelo influxo extracelular de Ca^{+2} . Tal fato favoreceria a formação do complexo Ca^{+2} calmodulina, que ativaria a eNOS com conseqüente produção de NO em células endoteliais de aorta de ratos (Figura 1).

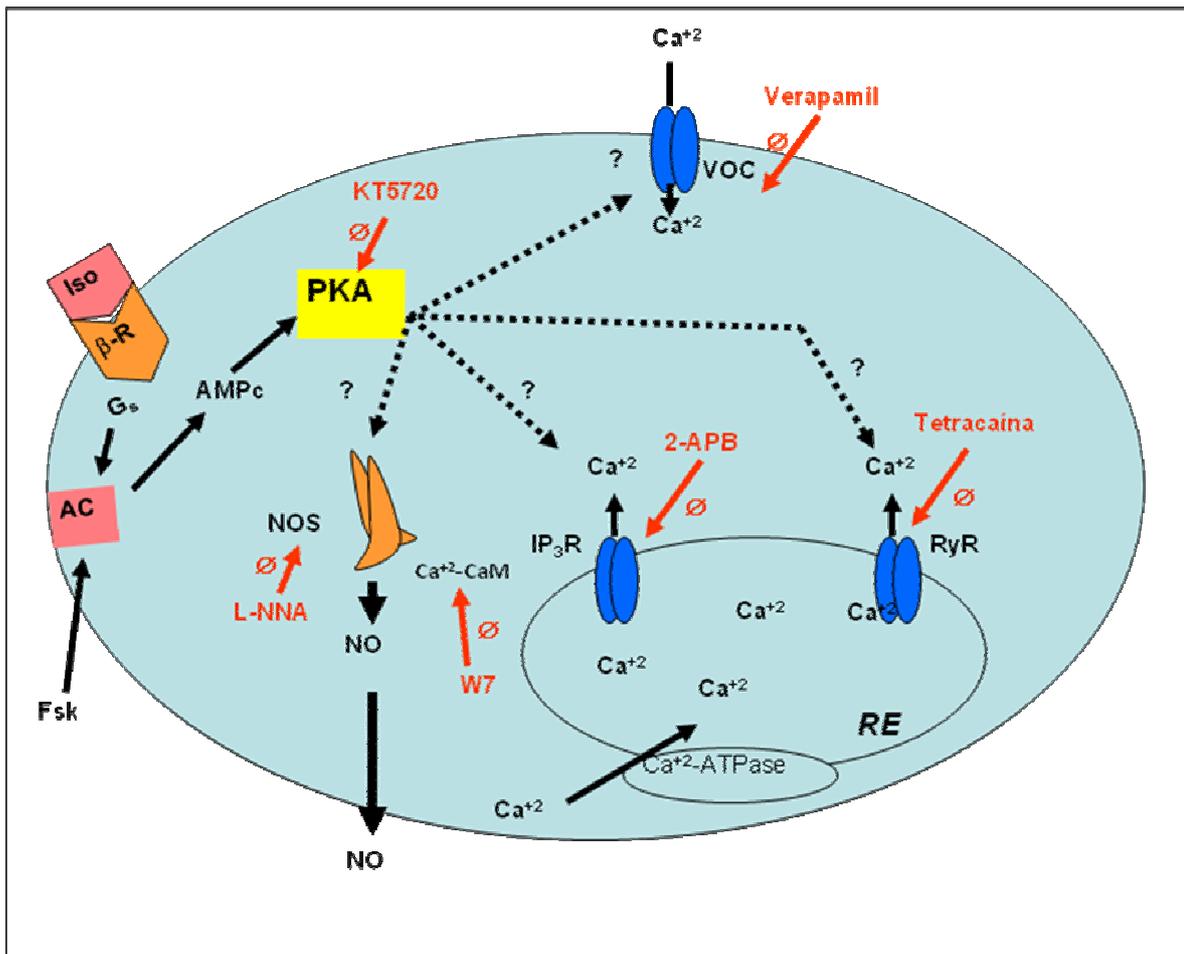


Figura 1. Representação da hipótese de modulação do fluxo de Ca^{+2} e da produção de NO em célula endotelial de aorta de rato. Isoprenalina (Iso) e forscolina (Fsk) ativando a enzima adenilato-ciclase (AC) estimulariam a produção de AMPc, o que poderia ativar a proteína quinase A (PKA) levando ao aumento da concentração citoplasmática de Ca^{+2} pela depleção dos estoques de Ca^{+2} do retículo endoplasmático (RE) via receptores de IP_3 (RIP₃) ou de rianodina (RyR) e/ou pelo influxo de Ca^{+2} através dos canais de Ca^{+2} operados por voltagem (VOC) favorecendo a formação do complexo Ca^{+2} -calmodulina (Ca^{+2} -CaM), ativando a enzima NO-sintase (eNOS) com conseqüente produção de óxido nítrico (NO). Verapamil, bloqueador de canais de Ca^{+2} do tipo L; 2-APB, antagonista do receptor de IP_3 ; Tetracaina, antagonista de receptores de rianodina; KT5720, inibidor da PKA; L-NNA, inibidor da NOS e W7, inibidor da calmodulina.

Objetivo Geral

Estudar o efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a concentração citoplasmática de Ca^{+2} e a produção de NO em células endoteliais isoladas da aorta de ratos.

Objetivos específicos

- 1- Verificar se o aumento da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ ativado pela isoprenalina e pela forskolina é resultado da liberação de estoques de Ca^{+2} do retículo endoplasmático;
- 2- Verificar se o aumento da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ ativado pela isoprenalina e pela forskolina é resultado do influxo extracelular de Ca^{+2} ;
- 3- Verificar o efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a produção de NO em células endoteliais de aorta de ratos;
- 4- Verificar se a produção de NO ativada pela isoprenalina e/ou pela forskolina é dependente de Ca^{+2} .

Material e Métodos

Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos (200-250g) do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP). Os animais tiveram livre acesso à ração e água e foram mantidos em sala climatizada sob ciclo claro-escuro de 12h. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para uso de animais (CEUA 05.1.257.53.9).

Efeito relaxante do agonista β -adrenérgico isoprenalina e do ativador da adenilato-ciclase forskolina em anéis de aorta de ratos

Anéis da aorta torácica de ratos (15 mm) foram isolados e cortados em anéis de 4mm. Em seguida, foram montados em banho para órgão isolado contendo solução de Kerbs modificada (composição discriminada na pág. 34) saturada pela mistura carbogênica (O₂: 95% e 5% de CO₂) em pH 7,4 a 37 °C. Os anéis de aortas foram submetidos à tensão isométrica de 1,5 g e estabilizados por 50 min. Em seguida, os anéis de aorta foram estimulados com noradrenalina (100 nmol/L) e após a contração mantida as preparações foram lavadas. Novamente estimuladas com noradrenalina (100 nmol/L), sobre a contração mantida as preparações foram estimuladas com acetilcolina (10 μ mol/L) para a verificação da presença e integridade do endotélio vascular. Os anéis de aorta que responderam à acetilcolina com relaxamento maior ou igual a 80% foram considerados com endotélio e utilizados para a realização das curvas concentração-efeito para isoprenalina e forskolina. Após nova lavagem e estabilização, os anéis de aorta foram pré-contraídos com a EC₅₀ da fenilefrina (100 nmol/L) e sobre a contração mantida foram realizadas curvas

concentração-efeito cumulativas para isoprenalina (0,1 nmol/L a 10 µmol/L) ou para forskolina (0,1 nmol/L a 1 µmol/L).

A maior concentração de forskolina, que foi diluída em DMSO, não excedeu 0,01% do diluente no volume final do banho de incubação (10 mL).

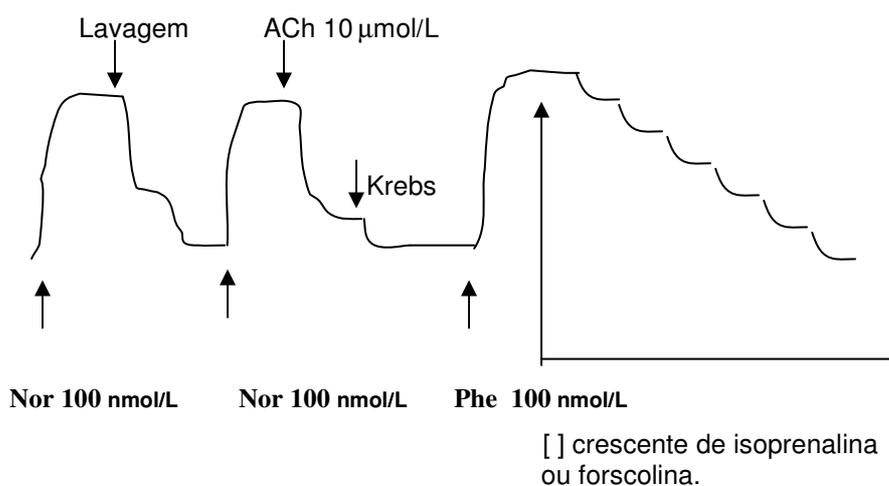


Figura 2. Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para obtenção das curvas concentração-efeito para isoprenalina (0,1 nmol/L a 10 µmol/L) e forskolina (0,1 nmol/L a 1 µmol/L). Acetilcolina (ACh), Fenilefrina (Phe) e Noradrenalina (Nor). As lavagens foram realizadas com solução de Krebs modificada.

Isolamento de células endoteliais de aorta de ratos

Anéis de aorta torácica de ratos (15 mm) foram isolados, cortados longitudinalmente e mantidos em solução de Hanks (pH 7,4). A remoção das células endoteliais foi feita mecanicamente com o auxílio de uma haste plástica e plana (rodinho), como descrito por Hirano et al. (1993).

I – Estudo da $[Ca^{2+}]_c$ com a sonda fluorescente Fura-2/AM

1. Cultura primária de células endoteliais de aorta de ratos

A suspensão de células obtida da forma descrita acima foi centrifugada por 5 min a 200 g e concentrada em solução de Hanks pH 7,4. A seguir, a suspensão de células (200 μ L) foi dispensada em lamínulas de 32 mm de diâmetro, previamente tratadas com poli-L-lisina (10%) e em seguida acondicionadas em estufa (CO_2 5%) a 37 °C, por 4 h. A seguir, iniciamos o carregamento das células com a sonda fluorescente Fura-2/AM (5 μ mol/L).

2. Carregamento das células com a sonda fluorescente Fura-2/AM

A solução estoque em DMSO de Fura-2/AM 10 mmol/L foi diluída (1 μ L) em 25 μ L de BSA 25% em solução aquosa e submetida à sonicação por 1 min. A seguir, a solução contendo Fura-2/AM recebeu solução de Hanks/ Ca^{2+} 1,6 mmol/L e BSA (Fração V) 0,1%, 1000 μ L (q.s.p.) resultando numa concentração final de 5 μ mol/L, submetida à sonicação por mais 4 min. As células aderidas em lamínulas foram incubadas com 1 mL de Fura-2/AM 5 μ mol/L durante 45 min a 37 °C em incubadora de CO_2 a 5%. Após o período de carregamento, a lamínula foi montada em câmara aquecida a 37 °C e as células foram imersas em solução de Hanks. A câmara contendo as células foi acoplada a um microscópio invertido equipado para fluorescência (PTI, Consortium Court, London, Ontário - Canadá) e focalizadas com objetiva de fluorescência em imersão a óleo com aumento de 40 vezes. Foram utilizadas células que apresentaram intensidade de fluorescência acima de 4×10^5 contagens (Dias et al., 2007).

3. Medida da $[Ca^{+2}]_c$

As células foram excitadas com luz proveniente de lâmpada de xenônio (75 Watts) em λ 340 e 380 nm, por um conjunto de filtros inseridos em dispositivo controlado por computador. A fluorescência emitida das células foi detectada por uma foto-multiplicadora após a passagem por um espelho dicróico para comprimento de onda de 510 nm. Os sinais de emissão foram captados e processados em computador. Os dados foram expressos pela razão entre a fluorescência nos comprimentos de onda de 340 e 380 nm.

Protocolos experimentais para medida da $[Ca^{+2}]_c$

1- Efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}

As células endoteliais isoladas de aorta de ratos foram imersas em solução de Hanks zero- Ca^{+2} (pH 7,4 a 37 °C) e a $[Ca^{+2}]_c$ basal foi medida antes de qualquer estímulo farmacológico. A seguir, as células endoteliais foram estimuladas com isoprenalina (30 nmol/L) ou com forskolina (10 nmol/L) e foi medida a $[Ca^{+2}]_c$. Os resultados foram expressos pela diferença (Δ) em porcentagem do aumento da intensidade de fluorescência da sonda Fura-2 acima do basal.

2- Efeito da associação do 2-APB e tetracaína sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}

Após a determinação da leitura basal, as células foram incubadas por 10 min com a associação de 2-APB (10 $\mu\text{mol/L}$) com tetracaína (10 $\mu\text{mol/L}$) e medida a $[Ca^{+2}]_c$. Em seguida, adicionamos isoprenalina (30 nmol/L) ou forskolina (10 nmol/L) às células endoteliais incubadas com 2-APB e tetracaína para a medida da $[Ca^{+2}]_c$.

3- Efeito do 2-APB sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}

Após a determinação do basal, as células foram incubadas por 10 min com o 2-APB (10 $\mu\text{mol/L}$) e medida a $[Ca^{+2}]_c$. Em seguida, adicionamos isoprenalina (30 nmol/L) ou forskolina (10 nmol/L) às células endoteliais incubadas com o 2-APB para a medida da $[Ca^{+2}]_c$.

4- Efeito da tetracaína sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}

Após a determinação do basal, as células foram incubadas por 10 min com a tetracaína (10 $\mu\text{mol/L}$) e medida a $[Ca^{+2}]_c$. Em seguida, adicionamos isoprenalina (30 nmol/L) ou forskolina (10 nmol/L) às células endoteliais incubadas com tetracaína para a medida da $[Ca^{+2}]_c$.

5. Efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L

As células endoteliais isoladas de aorta de ratos foram imersas em solução de Hanks zero- Ca^{+2} (pH 7,4 a 37 °C) e a $[Ca^{+2}]_c$ basal foi medida antes de qualquer estímulo farmacológico. A seguir, a solução de Hanks zero- Ca^{+2} foi substituída por outra solução contendo Ca^{+2} (1,6 mmol/L) onde as células permaneceram em repouso por 5 min, para realização do registro basal da intensidade de fluorescência da sonda Fura-2. A seguir, as células endoteliais foram estimuladas com isoprenalina (30 nmol/L) ou com forskolina (10 nmol/L) e medida a $[Ca^{+2}]_c$.

Os resultados obtidos em resposta à isoprenalina e à forskolina em meio com Ca^{+2} (1,6 mmol/L) foram expressos pela diferença (Δ) em porcentagem do aumento da intensidade de fluorescência da sonda Fura-2 a partir da fluorescência basal do Fura-2 (0,0 %), emitida pela célula endotelial em meio com Ca^{+2} (1,6 mmol/L).

6- Efeito do verapamil sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L

As células endoteliais isoladas de aorta de ratos foram imersas em solução de Hanks com Ca^{+2} 1,6 mmol/L (pH 7,4 a 37 °C) e a $[Ca^{+2}]_c$ basal (0,0 %) foi medida antes de qualquer estímulo farmacológico. Após a determinação do basal, as células foram incubadas por 10 min com verapamil (10 μ mol/L) e medida a $[Ca^{+2}]_c$. Em seguida, adicionamos isoprenalina

(30 nmol/L) ou forskolina (10 nmol/L) às células endoteliais incubadas com o verapamil para a medida da $[Ca^{+2}]_c$.

7- Efeito do propranolol sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L

As células endoteliais isoladas de aorta de ratos foram imersas em solução de Hanks com Ca^{+2} 1,6 mmol/L (pH 7,4 a 37 °C) e a $[Ca^{+2}]_c$ basal (0,0 %) foi medida antes de qualquer estímulo farmacológico. Após a determinação do basal, as células foram incubadas por 10 min com propranolol (10 μ mol/L) e medida a $[Ca^{+2}]_c$. Em seguida, adicionamos isoprenalina (30 nmol/L) ou forskolina (10 nmol/L) às células incubadas com o propranolol para a medida da $[Ca^{+2}]_c$.

8- Efeito do KT5720 sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio Ca^{+2} 1,6 mmol/L

As células endoteliais isoladas de aorta de ratos foram imersas em solução de Hanks com Ca^{+2} 1,6 mmol/L (pH 7,4 a 37 °C) e a $[Ca^{+2}]_c$ basal (0,0 %) foi medida antes de qualquer estímulo farmacológico. Após a determinação do basal, as células foram incubadas por 10 min com KT5720 (10 μ mol/L) e medida a $[Ca^{+2}]_c$. Em seguida, adicionamos isoprenalina (30 nmol/L) ou forskolina (10 nmol/L) às células incubadas com o KT5720 para a medida da $[Ca^{+2}]_c$.

II – Estudo da produção de NO com a sonda fluorescente DAF-2/DA

1. Carregamento das células com a sonda fluorescente DAF-2/DA para medida da produção de NO

As células endoteliais de aorta de ratos foram isoladas como descrito acima, 30 min antes dos experimentos. A suspensão de células foi centrifugada a 200 g por 5 min e concentrada em 500 μ L de solução de Hanks contida em tubos de poliestireno para citometria de fluxo, para obtenção de 3×10^6 contagens ou eventos (células endoteliais). Após esta etapa, as células permaneceram acondicionadas em estufa de CO₂ (37 °C) até o momento do experimento.

A suspensão de células, sem qualquer estimulação farmacológica ou pré-incubação foi submetida à análise citométrica para verificação da homogeneidade e viabilidade das células endoteliais. Em seguida, a suspensão de células foi incubada por 20 min com a sonda fluorescente DAF-2/DA (Calbiochem, San Diego, CA-USA) (10 μ mol/L) que se liga especificamente ao NO, originando o complexo fluorescente DAF-2T, que é diretamente proporcional à produção de NO intracelular (Kojima et al., 1998). Após o período de incubação com o DAF-2/DA, nova leitura da amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DAF-2T no interior das células endoteliais. Depois disso, isoprenalina (30 μ mol/L) ou forskolina (10 nmol/L) foi adicionada à suspensão de células e a intensidade de fluorescência da sonda DAF-2T foi verificada após 10 min.

Os resultados foram obtidos através da razão entre os valores após a adição da isoprenalina (em presença ou ausência de antagonistas ou inibidores

farmacológicos) sobre o valor antes da adição de isoprenalina (basal). Os valores foram expressos em porcentagem de aumento da intensidade de fluorescência sobre o basal.

Protocolos experimentais para medida da produção de NO

1- Efeito do L-NNA sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L

As células endoteliais em suspensão foram incubadas com a sonda fluorescente DAF-2/DA (10 $\mu\text{mol/L}$) e com L-NNA (10 $\mu\text{mol/L}$) por 20 min. Após a determinação da intensidade de fluorescência basal (0,0 %), as células foram estimuladas com isoprenalina (30 nmol/L) ou com forskolina (10 nmol/L) e a fluorescência emitida pelas células em resposta à isoprenalina e à forskolina foi medida após 10 min.

2- Efeito do KT5720 sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L

As células endoteliais em suspensão foram incubadas com a sonda fluorescente DAF-2/DA (10 $\mu\text{mol/L}$) e com o KT5720 (10 $\mu\text{mol/L}$) por 20 min. Após a determinação da intensidade de fluorescência basal (0,0 %), as células foram estimuladas com isoprenalina (30 nmol/L) ou com forskolina (10 nmol/L) e a fluorescência emitida pelas células em resposta à isoprenalina e à forskolina foi medida após 10 min.

3- Efeito da ausência (zero- Ca^{+2}) ou da presença de Ca^{+2} (Ca^{+2} 1,6 mmol/L) sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos.

Dois grupos de tubos para citometria de fluxo, um contendo a suspensão de células endoteliais em meio zero- Ca^{+2} e outro em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L foram incubados com a sonda fluorescente DAF-2/DA (10 $\mu\text{mol/L}$), por 20 min. Após a determinação da fluorescência basal de ambos os grupos, as células foram estimuladas com isoprenalina (30 nmol/L) ou com forskolina (10 nmol/L) e as intensidades de fluorescência de cada grupo foi medida após 10 min.

4- Efeito do verapamil sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L

As células endoteliais em suspensão foram incubadas com a sonda fluorescente DAF-2/DA (10 $\mu\text{mol/L}$) e com o verapamil (10 $\mu\text{mol/L}$) por 20 min. Após a determinação da intensidade de fluorescência basal (0,0 %), as células foram estimuladas com isoprenalina (30 nmol/L) ou com forskolina (10 nmol/L) e a fluorescência emitida pelas células em resposta à isoprenalina e à forskolina foi medida após 10 min.

5- Efeito da associação do 2-APB com a tetracaína sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero-Ca⁺²

As células endoteliais em suspensão foram incubadas com a sonda fluorescente DAF-2/DA (10 µmol/L) e com a associação de 2-APB (10 µmol/L) e de tetracaína (10 µmol/L) por 20 min. Após a determinação da intensidade de fluorescência basal (0,0 %), as células foram estimuladas com isoprenalina (30 nmol/L) ou com forskolina (10 nmol/L) e a fluorescência emitida pelas células em resposta à isoprenalina e à forskolina foi medida após 10 min.

6- Efeito do 2-APB sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero-Ca⁺²

As células endoteliais em suspensão foram incubadas com a sonda fluorescente DAF-2/DA (10 µmol/L) e com o 2-APB (10 µmol/L) por 20 min. Após a determinação da intensidade de fluorescência basal (0,0 %), as células foram estimuladas com isoprenalina (30 nmol/L) ou com forskolina (10 nmol/L) e a fluorescência emitida pelas células em resposta à isoprenalina e à forskolina foi medida após 10 min.

7- Efeito da tetracaína sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero-Ca⁺²

As células endoteliais em suspensão foram incubadas com a sonda fluorescente DAF-2/DA (10 µmol/L) e com a tetracaína (10 µmol/L) por 20 min. Após a determinação da intensidade de fluorescência basal (0,0 %), as células

foram estimuladas com isoprenalina (30 nmol/L) ou com forskolina (10 nmol/L) e a fluorescência emitida pelas células em resposta à isoprenalina e à forskolina foi medida após 10 min.

8- Efeito do W7 sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero-Ca⁺²

As células endoteliais em suspensão foram incubadas com a sonda fluorescente DAF-2/DA (10 µmol/L) e com o inibidor da calmodulina W7 (10 µmol/L) por 20 min. Após a determinação da intensidade de fluorescência basal (0,0 %), as células foram estimuladas com isoprenalina (30 nmol/L) ou com forskolina (10 nmol/L) e a fluorescência emitida pelas células em resposta à isoprenalina e à forskolina foi medida após 10 min.

Análise Estatística

Os dados apresentados são as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.) de pelo menos 3 amostras diferentes. A comparação entre duas médias, supondo distribuições normais para a mesma população, mas em dois momentos diferentes: antes e após a incubação com uma droga, foi realizada pelo Teste *t* de *Student* pareado.

A comparação entre três ou mais médias supondo distribuições normais para a mesma população, foi realizada pela análise de variância, ANOVA de uma via, ($p < 0,05$), com pós-teste de *Newman-Keuls*.

Drogas:

2-APB: antagonista de receptores de IP₃

DAF-2/DA: sonda fluorescente específica para o NO

DAF-2T: composto que emite fluorescência verde após a reação com NO

Forscolina: ativador direto da enzima adenilato-ciclase

Fura-2: composto que ligado especificamente ao Ca⁺² citoplasmático emite fluorescência verde

Fura-2/AM: sonda fluorescente para Ca⁺²

Isoprenalina: agonista β-adrenérgico não-seletivo

KT5720: inibidor seletivo da PKA

L-NNA: inibidor da enzima NO-sintase

Propranolol: antagonista β-adrenérgico não-seletivo

Tetracaína: antagonista do receptor de rianodina

Verapamil: bloqueador de canais tipo L para Ca⁺²

W7: inibidor da calmodulina

Soluções:

Krebs modificada (em mmol/L): 130 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 NaH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 1,6 CaCl₂, 14,9 NaHCO₃, 5,5 glicose e 0,026 EDTA (pH 7,4).

Hank com Ca⁺² 1,6 mM (em mmol/L): 145,0 NaCl, 1,6 CaCl₂, 5,0 KCl, 1,0 MgCl₂, 0,5 NaH₂PO₄, 10,0 glicose e 10,0 HEPES (pH 7,4).

Hank zero-Ca⁺² (em mmol/L): 145,0 NaCl, 5,0 KCl, 1,0 MgCl₂, 0,5 NaH₂PO₄, 10,0 glicose e 10,0 HEPES (pH 7,4).

Resultados

1. Efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a reatividade vascular de anéis de aorta de ratos, com endotélio

Antes de iniciarmos os estudos com as células endoteliais, foram feitas curvas concentração-efeito para isoprenalina e forskolina em aortas de ratos com endotélio, a fim de determinarmos os parâmetros farmacológicos E_{max} e pEC_{50} . As concentrações de EC_{50} obtidas para isoprenalina e forskolina foram utilizadas nos protocolos experimentais desenvolvidos com as células endoteliais.

Isoprenalina e forskolina atingiram o relaxamento máximo de $100 \pm 0 \%$ ($n=5$). Entretanto, a potência da isoprenalina ($pEC_{50}: 7,84 \pm 0,12$) foi menor do que a da forskolina ($pEC_{50}: 7,41 \pm 0,11$; $p < 0,03$).

A partir destes resultados os protocolos experimentais com as células endoteliais foram conduzidos utilizando isoprenalina 30 nmol/L e forskolina 10 nmol/L.

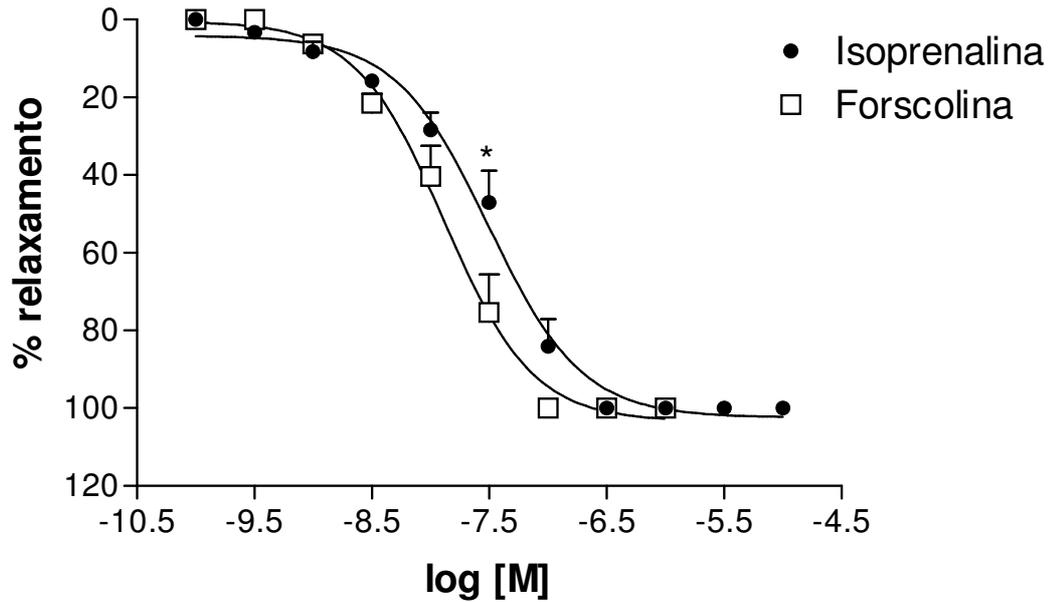


Figura 3. Efeito relaxante da isoprenalina e da forskolina em anéis de aorta de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para isoprenalina (0,1 nmol/L a 10 μ mol/L) ou forskolina (0,1 nmol/L a 1 μ mol/L) foram realizadas em anéis de aorta de ratos com endotélio intacto, pré-contraídos com fenilefrina 100nmol/L. Os pontos representam a média \pm E.P.M. (n = 5). Os valores são expressos em porcentagem de relaxamento da resposta contrátil induzida com fenilefrina. *significa diferença entre os valores de pEC_{50} obtidos com isoprenalina e forskolina ($p < 0,03$) (Teste *t* de Student).

2. Efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}

Inicialmente, as células endoteliais isoladas foram mantidas em solução de Hanks zero- Ca^{+2} e a fluorescência obtida nestas condições foi assumida como resposta basal (0,0 %). Em seguida, as células endoteliais foram estimuladas com isoprenalina ou com forskolina. Em meio zero- Ca^{+2} , a isoprenalina produziu aumento da $[Ca^{+2}]_c$ de $3,9 \pm 0,2$ % ($p < 0,05$; $n=3$), enquanto a forskolina aumentou a $[Ca^{+2}]_c$ em $3,3 \pm 0,3$ % ($p < 0,05$; $n=3$), ambos em relação ao basal (0,0 %) (Figura 4).

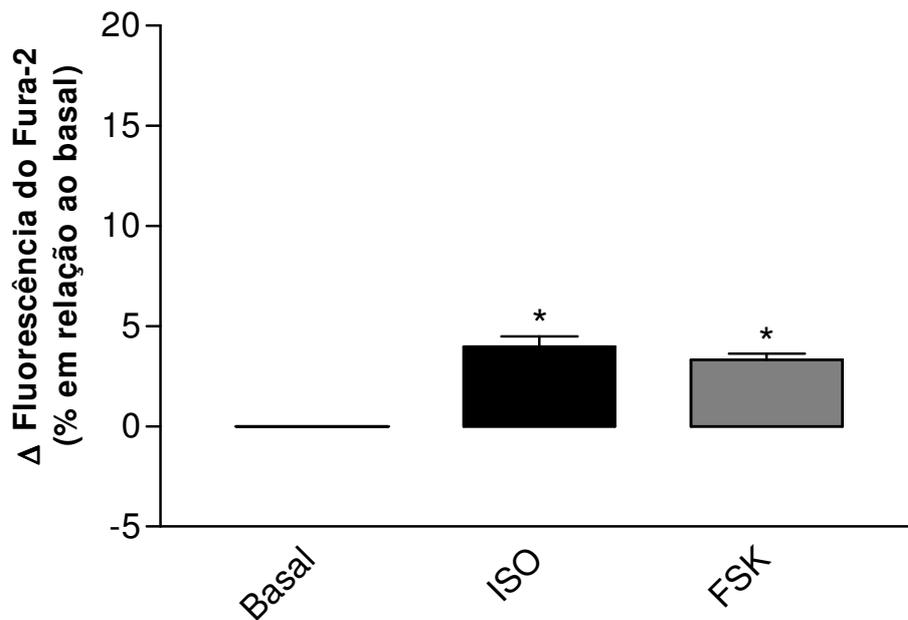


Figura 4. Efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células endoteliais de aortas de ratos em meio zero- Ca^{+2} . Valores expressos pela média \pm E.P.M. da fluorescência da sonda Fura-2 em relação ao basal (em porcentagem) de células endoteliais em meio zero- Ca^{+2} (Basal) em presença de isoprenalina 30 nmol/L (ISO) ou de forskolina 10 nmol/L (FSK). *vs Basal (n=3; p<0,05), (ANOVA).

3- Efeito da associação do 2-APB com a tetracaína sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}

Os estudos com células endoteliais em meio zero- Ca^{+2} (0,0 %) mostraram que a associação de 2-APB e tetracaína diminuiu a $[Ca^{+2}]_c$ para valores abaixo do basal: $-6,3 \pm 0,7$ % (n=3; $p < 0,001$) (Figura 5). Entretanto, quando as células incubadas com 2-APB e tetracaína foram estimuladas com isoprenalina, a $[Ca^{+2}]_c$ foi aumentada de $-6,3 \pm 0,7$ % para $-1,9 \pm 0,0$ % (n=3; $p < 0,01$) (Figura 5). Resultados semelhantes foram obtidos quando as células incubadas com 2-APB e tetracaína foram estimuladas com forskolina, aumentando a $[Ca^{+2}]_c$ de $-6,3 \pm 0,7$ % para $-3,2 \pm 0,4$ % (n=3; $p < 0,01$) (Figura 5).

Estes valores revelaram ainda que em células endoteliais incubadas com a associação do 2-APB e tetracaína, o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina foi maior ($p < 0,05$) do que o obtido com forskolina (Figura 5).

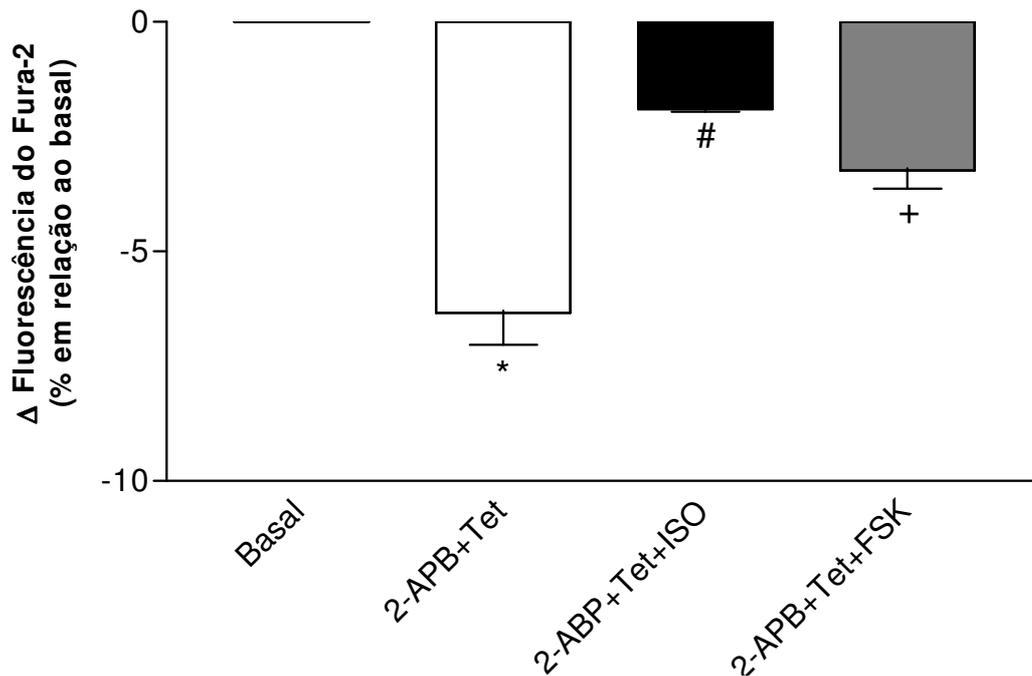


Figura 5. Efeito da associação do 2-APB com a tetracaína sobre o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina (ISO) e à forskolina (FSK) em células endoteliais de aortas de ratos em meio zero- Ca^{+2} . Valores expressos pela média \pm E.P.M. da fluorescência da sonda Fura-2 acima do basal (em porcentagem) de células endoteliais antes de qualquer estímulo farmacológico (basal), em células incubadas com 2-APB 10 μ mol/L e tetracaína 10 μ mol/L (2-APB+Tet) e após 10 min estimuladas com ISO 30 nmol/L (2-APB+Tet+ISO) ou com FSK 10 nmol/L (2-APB+Tet+FSK). *vs Basal (n=3; p<0,001); # vs 2-APB+Tet (n=3; p<0,01), + vs 2-APB+Tet (n=3; p<0,001), (ANOVA).

4- Efeito do 2-APB sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}

Os resultados obtidos com células endoteliais em meio zero- Ca^{+2} (0,0 %) mostraram que o 2-APB diminuiu a $[Ca^{+2}]_c$ para valores abaixo do basal: $-5,3 \pm 0,4$ % (n=3; p<0,01) (Figura 6). Entretanto, quando as células incubadas com 2-APB foram estimuladas com isoprenalina, a $[Ca^{+2}]_c$ foi aumentada de $-5,3 \pm 0,4$ % para $1,6 \pm 0,2$ % (n=3; p<0,01) (Figura 6).

Resultados semelhantes foram obtidos quando as células incubadas com 2-APB foram estimuladas com forskolina, aumentando a $[Ca^{+2}]_c$ de $-5,3 \pm 0,4$ % para $5,2 \pm 0,4$ % (n=3; p<0,01) (Figura 6). Estes valores revelaram ainda que em células endoteliais incubadas com 2-APB, o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à forskolina foi maior (p<0,05) do que o obtido em resposta à isoprenalina (Figura 6).

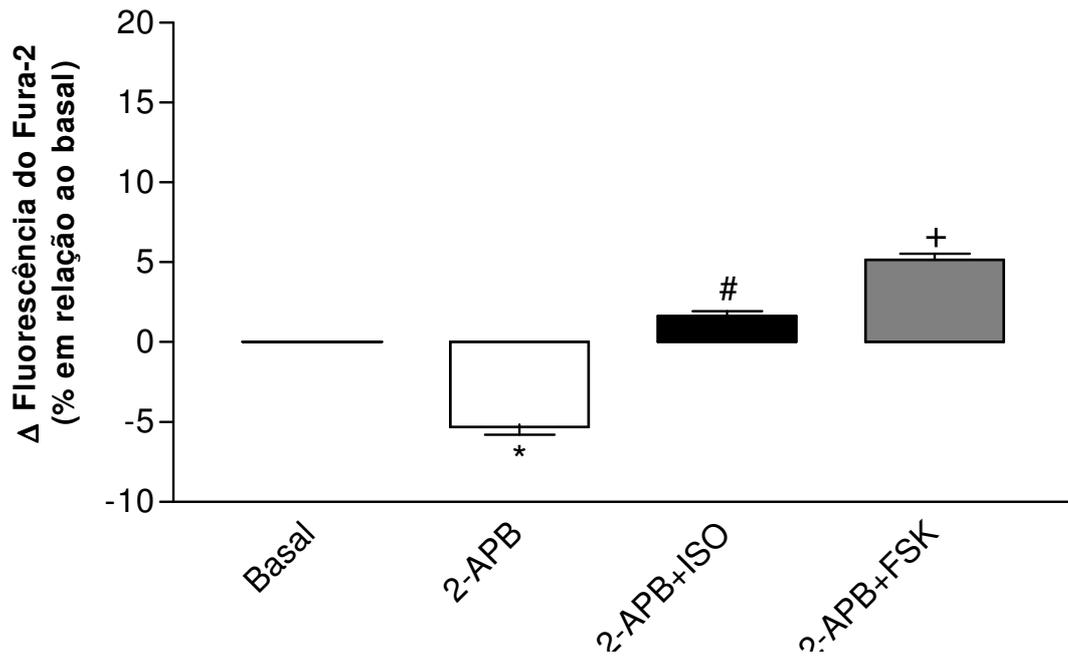


Figura 6. Efeito do 2-APB sobre o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina (ISO) e à forskolina (FSK) em células endoteliais de aortas de ratos em meio zero- Ca^{+2} . Valores expressos são a média \pm E.P.M. da fluorescência da sonda Fura-2 em relação ao basal (em porcentagem) de células endoteliais antes de qualquer estímulo farmacológico (Basal), em células incubadas com 2-APB 10 μ mol/L (2-APB) e após 10 min estimuladas com ISO 30 nmol/L (2-APB+ISO) ou com FSK 10 nmol/L (2-APB+FSK). *vs Basal (n=3; p<0,01); # vs 2-APB (n=3; p<0,001); + vs 2-APB (n=3; p<0,001), (ANOVA).

5- Efeito da tetracaína sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero- Ca^{+2}

Células endoteliais em meio zero- Ca^{+2} (0,0 %) mostraram que a tetracaína diminuiu a $[Ca^{+2}]_c$ para valores abaixo do basal: $-4,1 \pm 0,4$ % (n=3; $p < 0,01$) (Figura 7). Entretanto, quando as células incubadas com tetracaína foram estimuladas com isoprenalina, a $[Ca^{+2}]_c$ foi aumentada de $-4,1 \pm 0,4$ % para $4,2 \pm 0,5$ % (n=3; $p < 0,01$) (Figura 7).

Resultados semelhantes foram obtidos quando as células incubadas com tetracaína e estimuladas com forskolina. A $[Ca^{+2}]_c$ aumentou de $-4,1 \pm 0,4$ % para $2,8 \pm 0,1$ % (n=3; $p < 0,01$) (Figura 7). Os valores obtidos mostraram ainda que nas células endoteliais incubadas com tetracaína, o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina foi maior ($p < 0,05$) do que o obtido com forskolina (Figura 7).

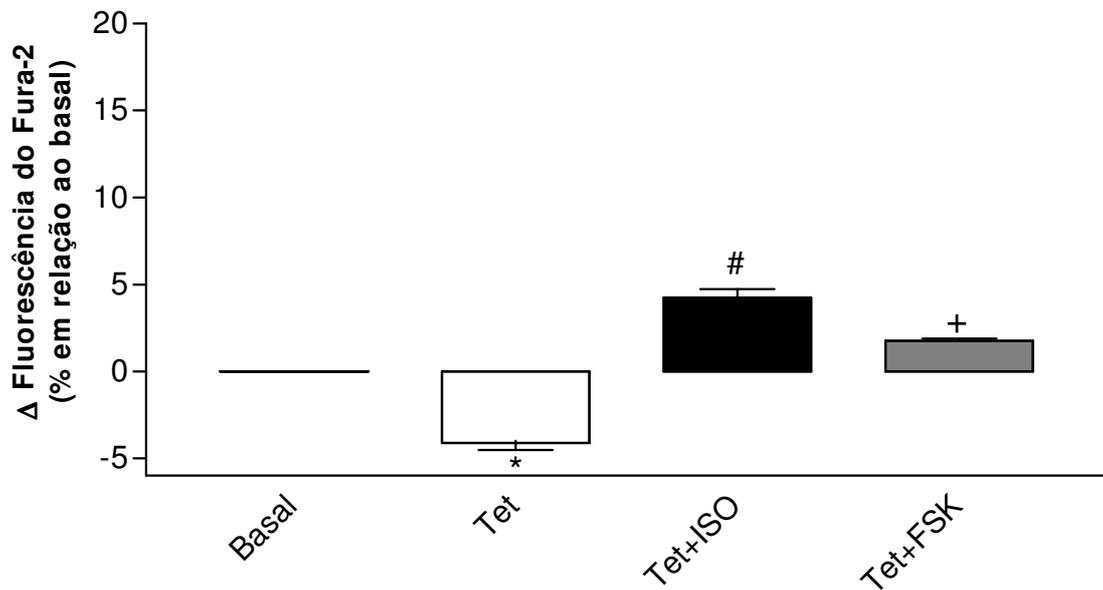


Figura 7. Efeito da tetracaína sobre o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina (ISO) e à forskolina (FSK) em células endoteliais de aortas de ratos em meio zero- Ca^{+2} . Valores expressos são a média \pm E.P.M. da fluorescência da sonda Fura-2 em relação ao basal (em porcentagem) de células endoteliais antes de qualquer estímulo farmacológico (Basal), em células incubadas com tetracaína 10 μ mol/L (Tet) e após 10 min estimuladas com ISO 30 nmol/L (Tet+ISO) ou com FSK 10 nmol/L (Tet+FSK). *vs Basal (n=3; p<0,01); # vs Tet (n=3; p<0,001); + vs Tet (n=3; p<0,01), (ANOVA).

6. Efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células endoteliais de aorta de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L

Quando a solução de Hanks zero- Ca^{+2} foi substituída por Hanks contendo Ca^{+2} (1,6 mmol/L) a $[Ca^{+2}]_c$ das células endoteliais aumentou em $2,0 \pm 0,3$ % ($p < 0,05$; $n=3$) em relação ao basal em meio zero- Ca^{+2} (0,0 %), mostrando que a presença de Ca^{+2} no meio extracelular produziu aumento da $[Ca^{+2}]_c$ (Figura 8). Entretanto, a estimulação das células endoteliais com isoprenalina em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L aumentou a $[Ca^{+2}]_c$ de $2,0 \pm 0,3$ % para $13,1 \pm 1,7$ % ($p < 0,01$; $n=3$) (Figura 8). De modo semelhante, a forskolina aumentou a $[Ca^{+2}]_c$ para $6,1 \pm 0,6$ % ($p < 0,05$; $n=3$) (Figura 8).

Estes resultados nos mostram ainda que o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ estimulada com isoprenalina é maior ($p < 0,05$) do que a obtida com forskolina em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L (Figura 8).

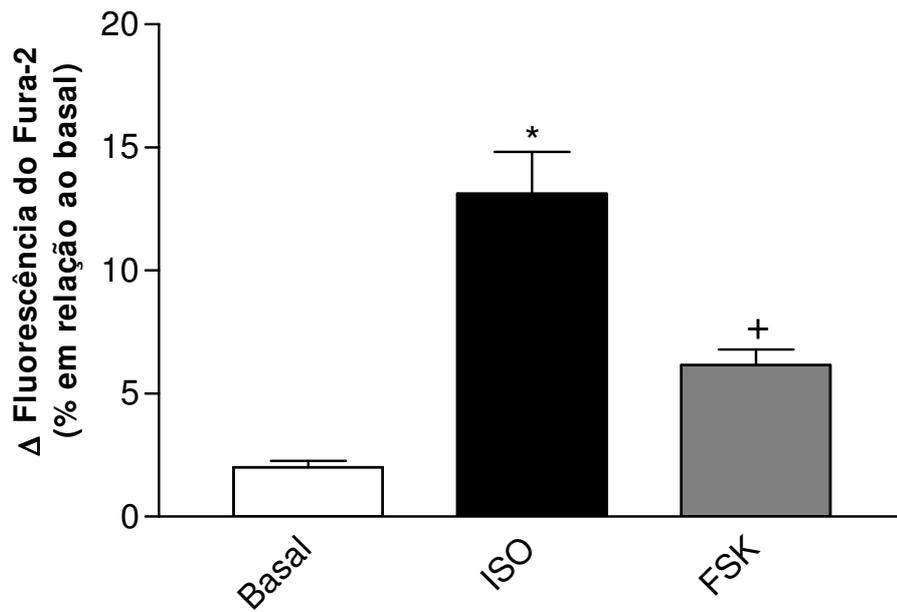


Figura 8. Efeito da isoprenalina (ISO) e da forskolina (FSK) sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em células endoteliais de aortas de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L. Valores expressos são a média \pm E.P.M. da fluorescência da sonda Fura-2 em relação ao basal (em porcentagem) de células endoteliais em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L (Basal) em presença de ISO 30 nmol/L ou de FSK 10 nmol/L. *vs Basal (n=3; $p < 0,01$); + vs Basal (n=3; $p < 0,05$), (ANOVA).

7- Efeito do verapamil sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L

O aumento da $[Ca^{+2}]_c$ obtida em resposta à isoprenalina ($13,1 \pm 1,7$ %) foi diminuído quando as células endoteliais foram incubadas com verapamil ($5 \mu\text{mol/L}$ e $10 \mu\text{mol/L}$) e estimuladas com isoprenalina, respectivamente: $7,6 \pm 0,5$ % ($n=3$; $p<0,01$) e $4,8 \pm 0,3$ % ($n=3$; $p<0,001$), ambos sobre o basal (Figura 9). Entretanto, o efeito da forskolina sobre a $[Ca^{+2}]_c$ ($6,1 \pm 0,6$ %) foi semelhante ao obtido em células endoteliais incubadas com verapamil ($5 \mu\text{mol/L}$) e estimuladas com forskolina: $5,9 \pm 0,5$ % (Figura 9). Apenas quando as células endoteliais foram incubadas com verapamil ($10 \mu\text{mol/L}$) e estimuladas com forskolina a $[Ca^{+2}]_c$ foi diminuída: $3,9 \pm 0,4$ %, ($p<0,05$; $n=3$) (Figura 9).

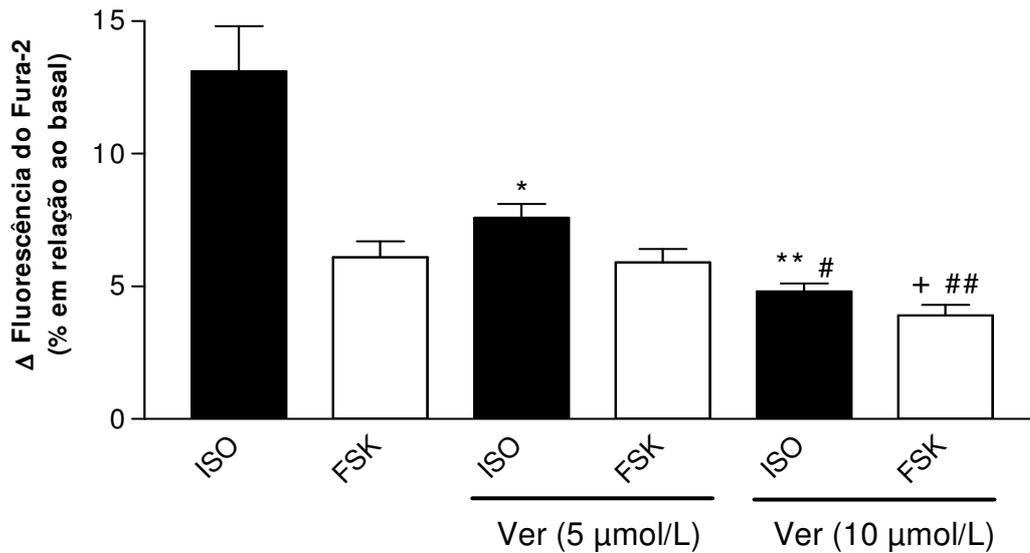


Figura 9. Efeito do verapamil sobre o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina (ISO) e à forskolina (FSK) em células endoteliais de aortas de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L. Valores expressos são a média \pm E.P.M. da fluorescência da sonda Fura-2 em relação ao basal (em porcentagem) de células endoteliais estimuladas com ISO 30 nmol/L ou com FSK 10 nmol/L ou incubadas com 5 μ mol/L ou 10 μ mol/L de verapamil e após 10 min estimuladas com ISO nmol/L ou com FSK 10 nmol/L. * vs ISO (n=3; p<0,01); ** vs ISO (n=3; p<0,05); # vs Ver(5 μ mol/L)-ISO (p<0,05); + vs FSK (n=3; p<0,05), (ANOVA).

8- Efeito do propranolol sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina em células endoteliais de aorta de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L

Células endoteliais em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L ($2,0 \pm 0,3$ %) foram incubadas com propranolol, que não modificou a $[Ca^{+2}]_c$ basal: $1,0 \pm 0,2$ % ($n=3$; $p<0,01$) (Figura 10).

Em relação às células estimuladas apenas com isoprenalina ($13,1 \pm 0,1\%$), a incubação com propranolol diminuiu a $[Ca^{+2}]_c$ estimulada com isoprenalina para $7,6 \pm 0,7$ % ($n=3$; $p<0,01$) (Figura 10).

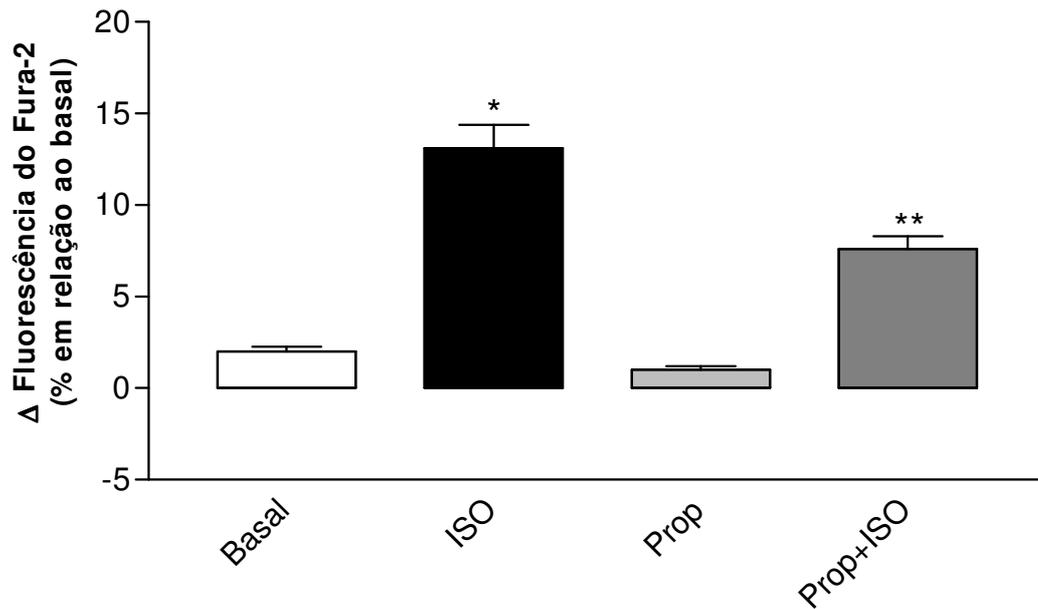


Figura 10. Efeito do propranolol sobre o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina (ISO) em células endoteliais de aortas de ratos em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L. Valores expressos são a média \pm E.P.M. da fluorescência da sonda Fura-2 em relação ao basal (em porcentagem) de células endoteliais antes de qualquer estímulo farmacológico (Basal), em células incubadas com propranolol 10 μ mol/L (Prop) e após 10 min estimuladas com ISO 30 nmol/L (Prop+ISO). * vs Basal (n=3; p<0,001); ** vs ISO (n=3 p<0,01), (ANOVA).

9- Efeito do KT5720 sobre a $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina e à forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L

O aumento da $[Ca^{+2}]_c$ sobre o basal em resposta à isoprenalina ($13,1 \pm 0,1$ %) foi diminuído para $8,8 \pm 0,6$ % ($n=3$; $p<0,05$) quando as células endoteliais foram incubadas com o inibidor da proteína quinase-A, KT5720, e estimuladas com isoprenalina (Figura 11).

De modo semelhante, o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à forskolina ($6,1 \pm 0,6$ %) foi diminuído para $3,6 \pm 0,3$ % ($n=3$; $p<0,05$), quando as células endoteliais foram incubadas com o KT5720 e estimuladas com forskolina (Figura 11). Estes resultados nos mostram ainda que o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ em células incubadas com o KT5720 e estimulada com isoprenalina é maior ($p<0,05$) do que o obtido com forskolina sob as mesmas condições (Figura 11).

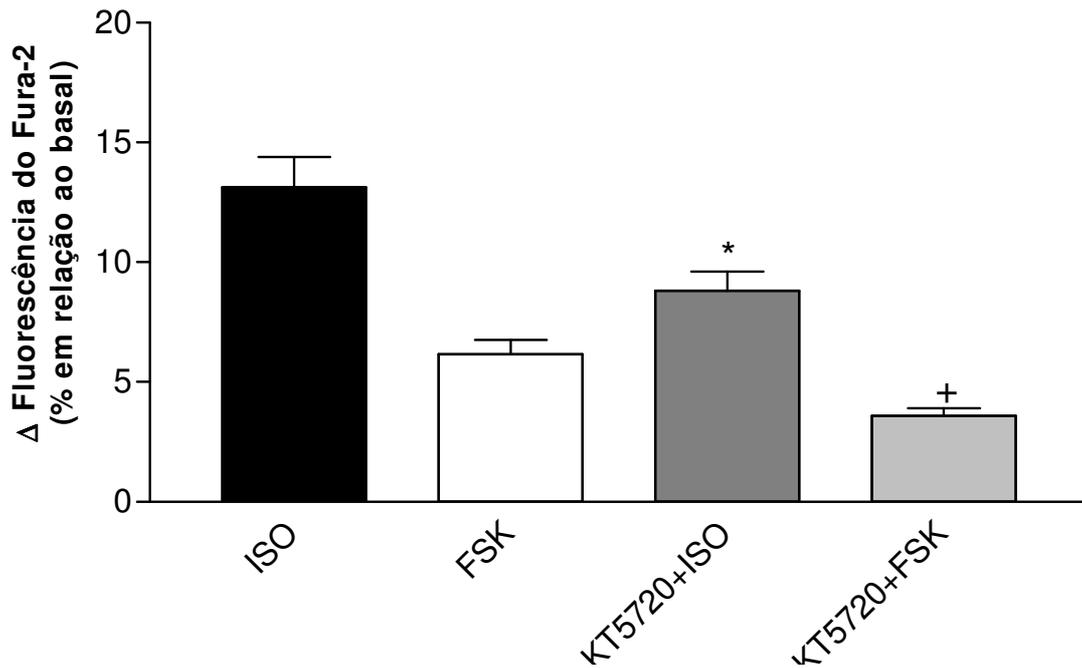


Figura 11. Efeito do KT5720 sobre o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ em resposta à isoprenalina (ISO) e à forskolina (FSK) em células endoteliais de aortas de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L. Valores expressos são a média \pm E.P.M. da fluorescência da sonda Fura-2 em relação ao basal (em porcentagem) de células endoteliais estimuladas com ISO 30 nmol/L ou com FSK 10 nmol/L, ou em células incubadas com KT5720 10 μ mol/L e após 10 min estimuladas com ISO 30 nmol/L (KT5720+ISO) ou com FSK 10 nmol/L (KT5720+FSK). * vs ISO (n=3; p<0,05); + vs FSK (n=3; p<0,05), (ANOVA).

10- Efeito do L-NNA sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L.

Após 10 min da adição de isoprenalina à suspensão de células endoteliais, a intensidade de fluorescência do DAF-2T foi $168,4 \pm 14,3$ % (n=3; $p < 0,01$) acima do basal (0,0 %) (Figura 12). De modo semelhante, a forskolina, sob as mesmas condições, aumentou a intensidade de fluorescência do DAF-2T para $189,2 \pm 16,7$ % acima do basal (Figura 12). Entretanto, quando a suspensão de células foi incubada com L-NNA, os efeitos da isoprenalina e da forskolina foram diminuídos, respectivamente, para: $108,7 \pm 2,5$ % (n=3; $p < 0,05$) e $113,5 \pm 10,9$ % (n=3; $p < 0,05$) acima do basal (Figura 12).

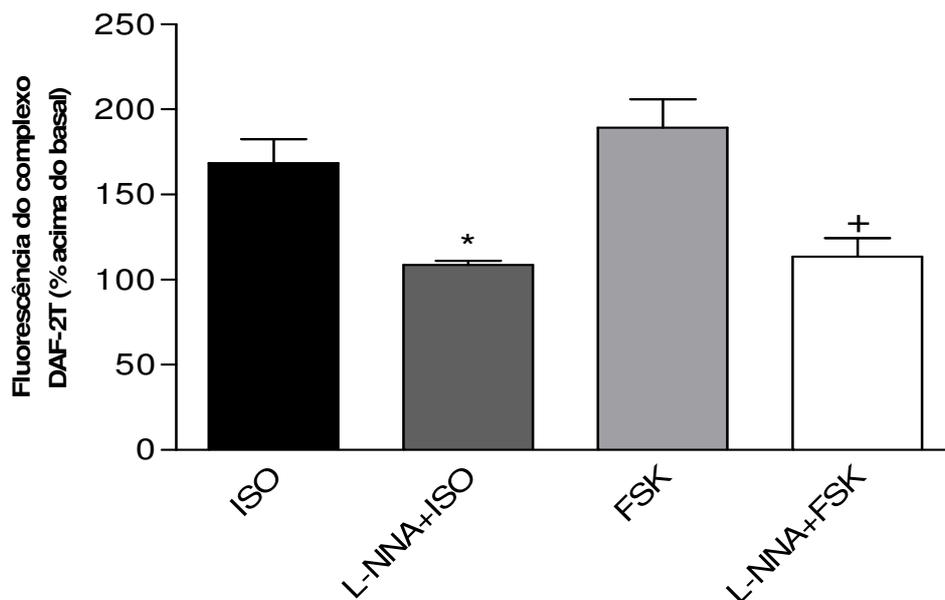


Figura 12. Efeito do L-NNA sobre a produção de NO ativada com isoprenalina (ISO) ou com forskolina (FSK) em células endoteliais de aortas de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L. Valores expressos são a média \pm E.P.M. da fluorescência do complexo DAF-2T acima do basal (em porcentagem) em 10.000 células endoteliais estimuladas com ISO 30 nmol/L ou com FSK 10 nmol/L ou em células incubadas com L-NNA 10 $\mu\text{mol/L}$ e após 10 min estimuladas com ISO 30 nmol/L (L-NNA+ISO) ou com FSK 10 nmol/L (L-NNA+FSK). *vs ISO (n=3; p<0,05); + vs FSK (n=3; p<0,05), (ANOVA).

11- Efeito do KT5720 sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L.

O aumento da intensidade de fluorescência do DAF-2T em resposta à isoprenalina ($168,4 \pm 14,3$ %) foi semelhante ao obtido quando as células foram incubadas com KT5720 e estimuladas com isoprenalina ($187,0 \pm 9,7$ %; $n=3$; $p<0,05$) (Figura 13).

Sob as mesmas condições, a intensidade de fluorescência do DAF-2T em resposta à forskolina ($189,2 \pm 16,7$ %) não foi modificada quando as células foram incubadas com KT5720 e estimuladas com forskolina ($198 \pm 12,9$ %; $n=3$; $p<0,05$) (Figura 13).

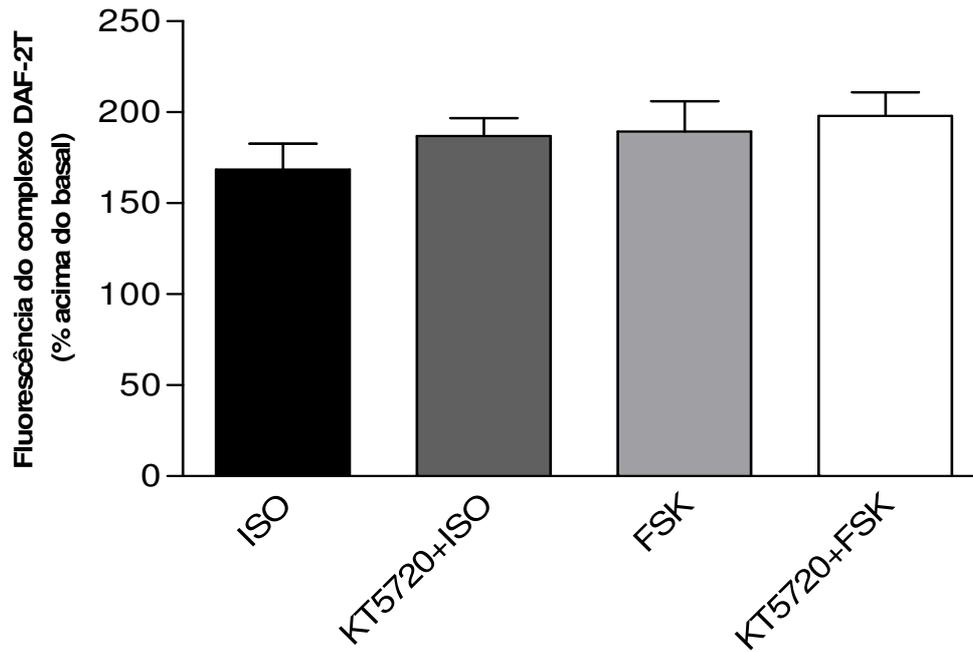


Figura 13. Efeito do KT5720 sobre a produção de NO ativada com isoprenalina (ISO) ou com forskolina (FSK) em células endoteliais de aortas de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L. Valores expressos são a média \pm E.P.M. da fluorescência do complexo DAF-2T acima do basal (em porcentagem) em 10.000 células endoteliais estimuladas com ISO 30 nmol/L ou com FSK 10 nmol/L ou em células incubadas com KT5720 10 $\mu\text{mol/L}$ e após 10 min estimuladas com ISO 30 nmol/L (KT5720+ISO) ou com FSK 10 nmol/L (KT5720+FSK). ANOVA.

12- Efeito do Ca^{+2} sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos.

Em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L, a isoprenalina promoveu aumento da intensidade de fluorescência do DAF-2T acima do basal ($168,4 \pm 14,3$ %). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos quando as células foram estimuladas com isoprenalina em meio zero- Ca^{+2} ($177,4 \pm 4,4$ %; n=3) (Figura 14).

De modo semelhante, o aumento da intensidade de fluorescência do DAF-2T em resposta à forskolina em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L ($189,2 \pm 16,7$ %) não foi modificado quando as células foram estimuladas com forskolina em meio zero- Ca^{+2} ($186,7 \pm 7,8$ %) (Figura 14).

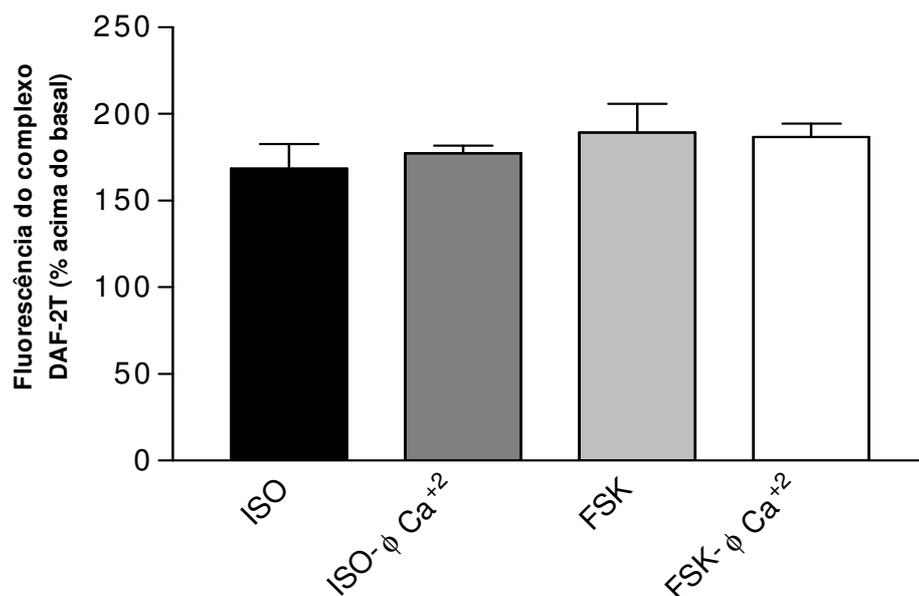


Figura 14. Efeito do Ca⁺² sobre a produção de NO ativada com isoprenalina (ISO) ou com forskolina (FSK) em células endoteliais de aorta de ratos. Valores expressos são a média \pm E.P.M. da fluorescência do complexo DAF-2T acima do basal (em porcentagem) em 10.000 células endoteliais em meio com Ca⁺² 1,6 mmol/L ou em meio zero-Ca⁺² e estimuladas com ISO 30 nmol/L ou com FSK 10 nmol/L. ANOVA.

13- Efeito do verapamil sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L

A figura 12 mostra que em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L, a isoprenalina promoveu aumento da intensidade de fluorescência do DAF-2T acima do basal ($168,4 \pm 14,3$ %). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos quando as células foram incubadas com verapamil e estimuladas com isoprenalina ($176,4 \pm 18,6$ %; n=3) (Figura 15).

De modo semelhante, o aumento da intensidade de fluorescência do DAF-2T em resposta à forskolina em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L ($189,2 \pm 16,7$ %) não foi modificado quando as células foram incubadas com verapamil e estimuladas com forskolina ($184,9 \pm 16,1$ %) (Figura 15).

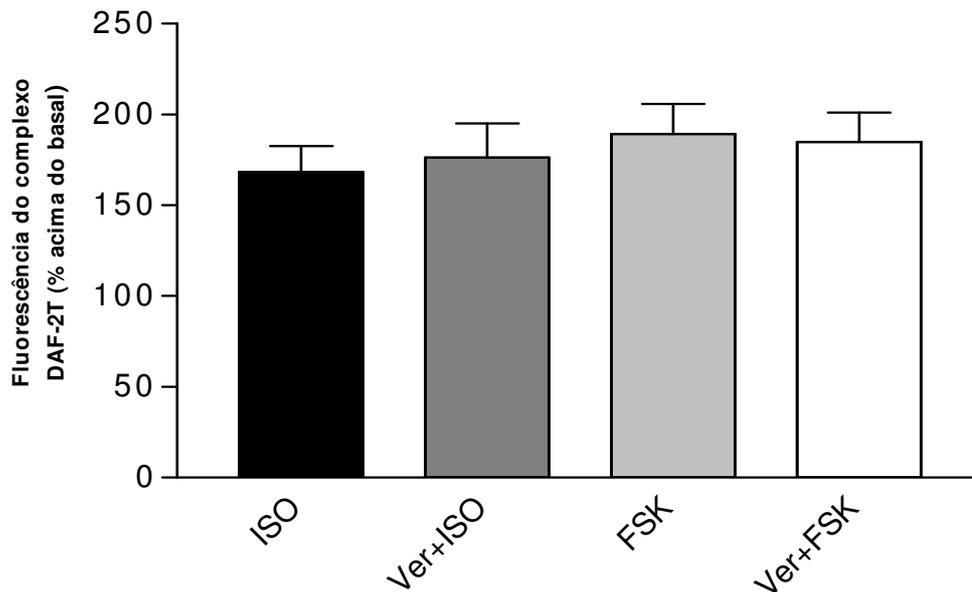


Figura 15. Efeito do verapamil sobre a produção de NO ativada com isoprenalina (ISO) ou com forskolina (FSK) em células endoteliais de aortas de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L. Valores expressos são a média \pm E.P.M. da fluorescência do complexo DAF-2T acima do basal (em porcentagem) em 10.000 células endoteliais estimuladas com ISO 30 nmol/L (ISO), com FSK 10 nmol/L, ou em células incubadas com verapamil 10 $\mu\text{mol/L}$ e após 10 min estimuladas com ISO 30 nmol/L (Ver+ISO) ou com FSK 10 nmol/L (Ver+FSK). ANOVA.

14- Efeito da associação do 2-APB com a tetracaína sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero-Ca⁺²

A isoprenalina promoveu aumento da intensidade de fluorescência do DAF-2T acima do basal ($177,4 \pm 4,4$ %). Porém, quando a suspensão de células foi incubada com a associação de 2-APB e tetracaína, a intensidade de fluorescência do DAF-2T em resposta à isoprenalina foi diminuída para $66,0 \pm 10,4$ % ($n=3$; $p<0,001$) (Figura 16).

A intensidade de fluorescência do DAF-2T em resposta à forskolina em meio zero-Ca⁺² ($186,7 \pm 7,8$ %) também foi diminuída quando a suspensão de células foi incubada com a associação de 2-APB e tetracaína: $59,2 \pm 4,1$ % ($n=3$; $p<0,001$) (Figura 16).

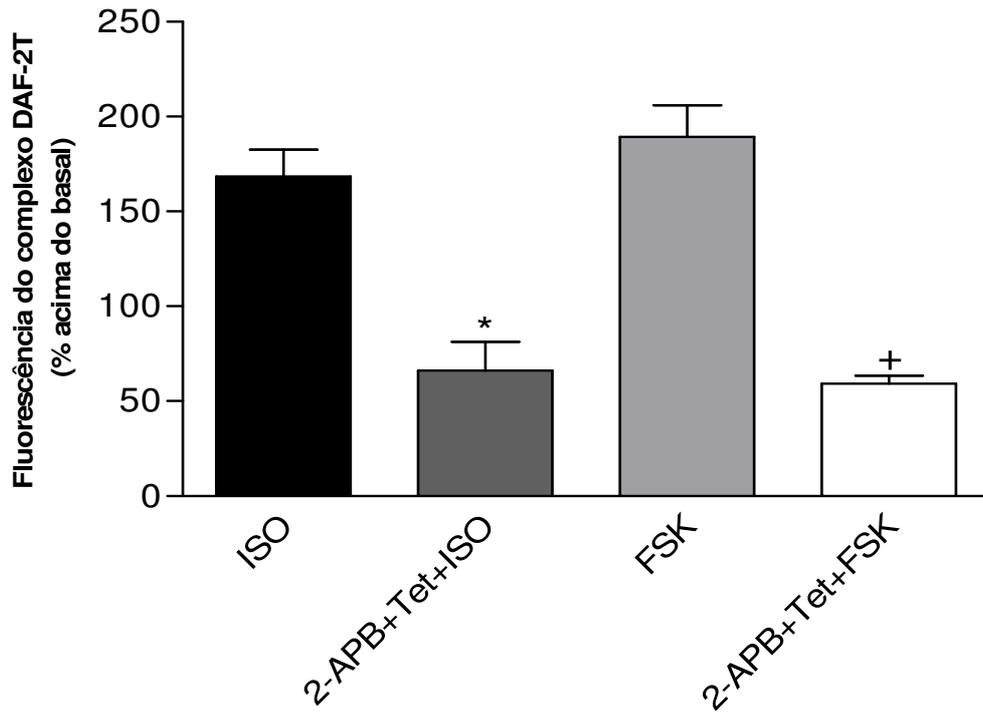


Figura 16. Efeito da associação do 2-APB com a tetracaína sobre a produção de NO ativada com isoprenalina (ISO) ou com forskolina (FSK) em células endoteliais de aortas de ratos em meio zero-Ca⁺². Valores expressos são a média \pm E.P.M. da fluorescência do complexo DAF-2T acima do basal (em porcentagem) em 10.000 células endoteliais estimuladas com ISO 30 nmol/L (ISO) ou com FSK 10 nmol/L ou em células incubadas com 2-APB 10 μ mol/L e tetracaína 10 μ mol/L e após 10 min estimuladas com ISO 30 nmol/L (2-APB+Tet+ISO) ou com FSK 10 nmol/L (2-APB+Tet+FSK). * vs ISO (n=3; p<0,001); + vs FSK (n=3; p<0,001), (ANOVA).

15- Efeito do 2-APB sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero-Ca²⁺.

A isoprenalina aumentou a intensidade de fluorescência do DAF-2T acima do basal ($177,4 \pm 4,4$ %). Porém, quando a suspensão de células foi incubada com o 2-APB, a intensidade de fluorescência do DAF-2T em resposta à isoprenalina foi diminuída para $114,3 \pm 4,2$ % ($n=3$; $p<0,01$) (Figura 17).

A intensidade de fluorescência do DAF-2T em resposta à forskolina, em meio zero-Ca²⁺ ($186,7 \pm 7,8$ %), também foi diminuída quando a suspensão de células foi incubada o 2-APB: $58,7 \pm 6,3$ % ($n=3$; $p<0,001$) (Figura 17).

A suspensão de células incubada com o 2-APB e estimulada com forskolina produziu menor intensidade de fluorescência do DAF-2T do que quando foram estimuladas com isoprenalina ($p<0,05$), sob as mesmas condições (Figura 17).

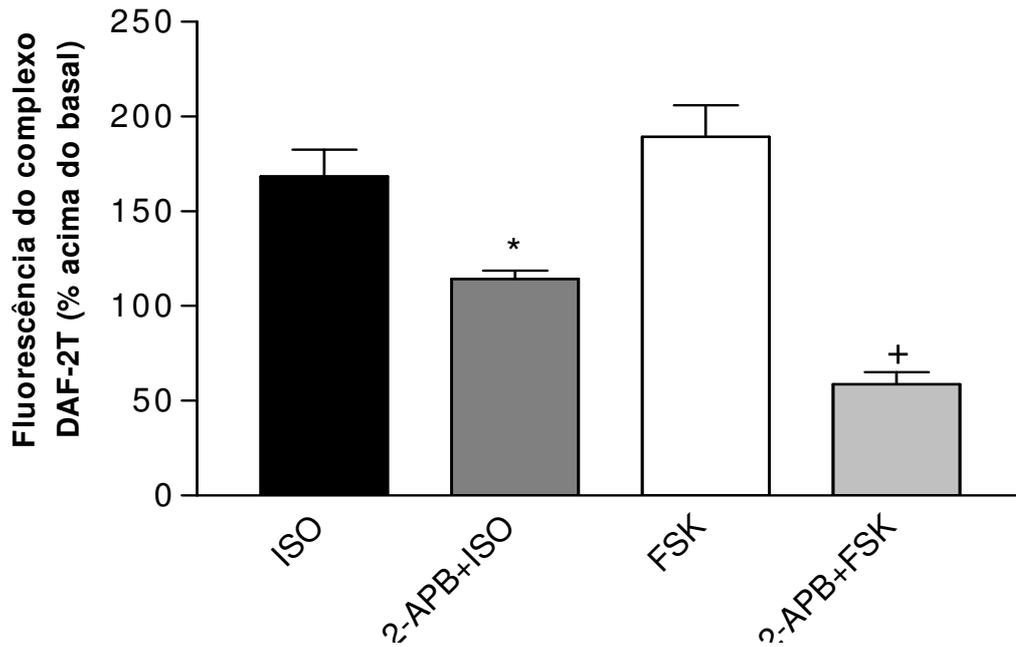


Figura 17. Efeito do 2-APB sobre a produção de NO ativada com isoprenalina (ISO) ou com forskolina (FSK) em células endoteliais de aortas de ratos em meio zero- Ca^{+2} . Valores expressos são a média \pm E.P.M. da fluorescência do complexo DAF-2T acima do basal (em porcentagem) em 10.000 células endoteliais estimuladas com ISO 30 nmol/L ou com FSK 10 nmol/L ou em células incubadas com 2-APB 10 $\mu\text{mol/L}$ e após 10 min estimuladas com ISO 30 nmol/L (2-APB+ISO) ou com FSK 10 nmol/L (2-APB+FSK). * vs ISO (n=3; p<0,01); + vs FSK (n=3; p<0,001), (ANOVA).

16- Efeito da tetracaína sobre a produção de NO ativada com isoprenalina e com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio zero-Ca²⁺

A isoprenalina aumentou a intensidade de fluorescência do DAF-2T acima do basal ($177,4 \pm 4,4$ %). Porém, quando a suspensão de células foi incubada com a tetracaína, a intensidade de fluorescência do DAF-2T em resposta à isoprenalina foi diminuída para $115,2 \pm 10,1$ % ($n=3$; $p<0,01$) (Figura 18).

A intensidade de fluorescência do DAF-2T em resposta à forskolina, em meio zero-Ca²⁺ ($186,7 \pm 7,8$ %), também foi diminuída quando a suspensão de células foi incubada a tetracaína: $160,5 \pm 5,9$ % ($n=3$; $p<0,001$) (Figura 18).

A suspensão de células incubada com a tetracaína e estimulada com isoprenalina produziu menor intensidade de fluorescência do DAF-2T do que quando estimulada com forskolina ($p<0,05$), sob as mesmas condições (Figura 18).

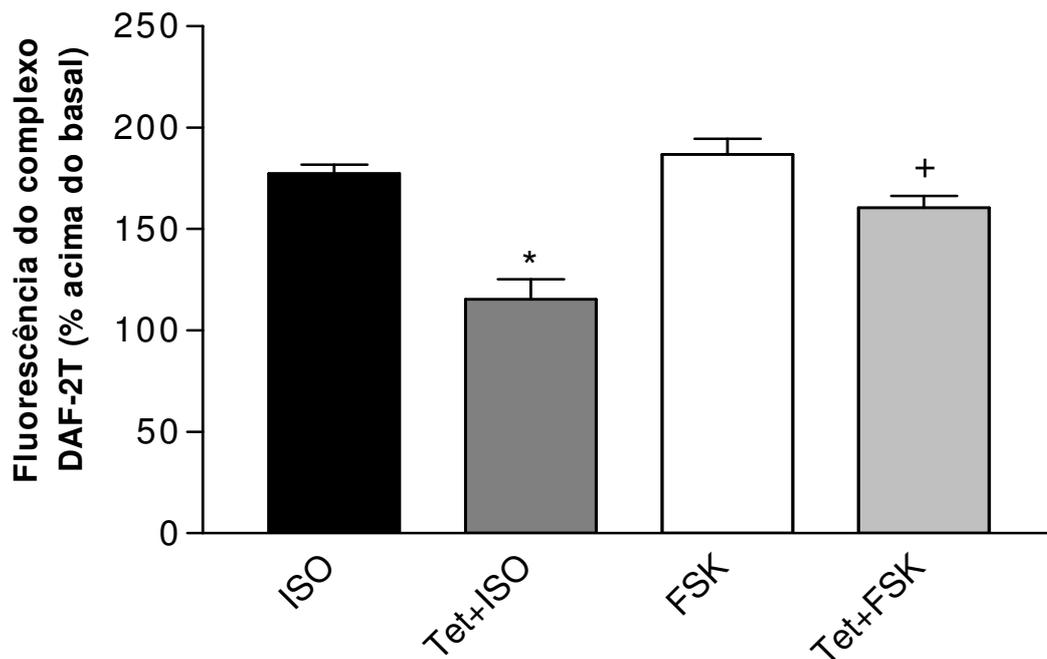


Figura 18. Efeito da tetracaína sobre a produção de NO ativada com isoprenalina (ISO) ou com forskolina (FSK) em células endoteliais de aortas de ratos em meio zero-Ca⁺². Valores expressos são a média ± E.P.M. da fluorescência do complexo DAF-2T acima do basal (em porcentagem) em 10.000 células endoteliais estimuladas com ISO 30 nmol/L ou com FSK 10 nmol/L ou em células incubadas com tetracaína 10 µmol/L e após 10 min estimuladas com ISO 30 nmol/L (Tet+ISO) ou com FSK 10 nmol/L (Tet+FSK). * vs ISO (n=3; p<0,01); + vs FSK (n=3; p<0,05), (ANOVA).

17- Efeito do W7 sobre a produção de NO ativada com isoprenalina ou com forskolina em células endoteliais de aorta de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L.

A isoprenalina aumentou a intensidade de fluorescência do DAF-2T acima do basal ($177,4 \pm 4,4$ %). Porém, quando a suspensão de células foi incubada com o W7, a intensidade de fluorescência do DAF-2T em resposta à isoprenalina foi diminuída para $17,5 \pm 2,5$ % ($n=3$; $p<0,001$) (Figura 19).

A intensidade de fluorescência do DAF-2T em resposta à forskolina, em meio com Ca^{+2} 1,6 mmol/L ($186,7 \pm 7,8$ %), também foi diminuída quando a suspensão de células foi incubada o W7: $29,5 \pm 3,2$ % ($n=3$; $p<0,001$) (Figura 19).

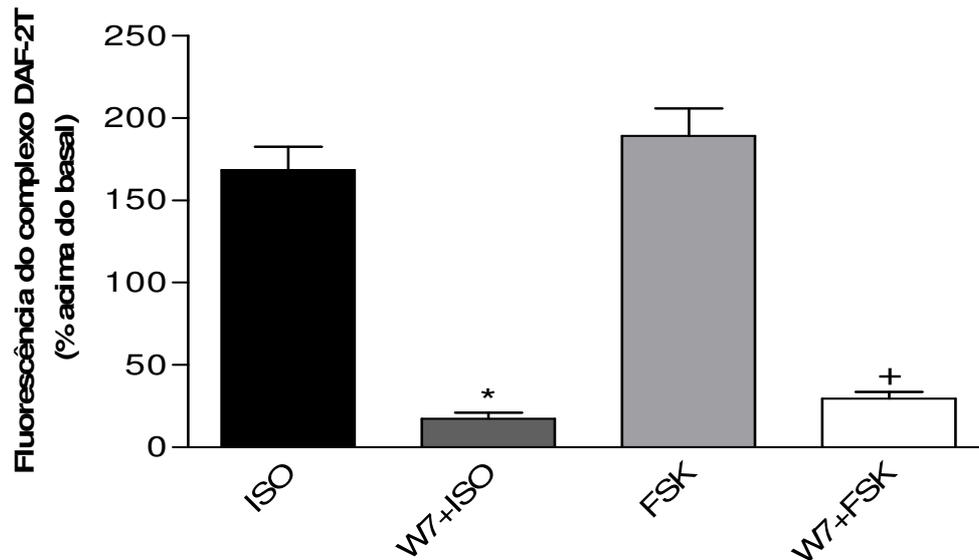


Figura 19. Efeito do W7 sobre a produção de NO ativada com isoprenalina (ISO) ou com forskolina (FSK) em células endoteliais de aortas de ratos em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L. Valores expressos são a média \pm E.P.M. da fluorescência do complexo DAF-2T acima do basal (em porcentagem) em 10.000 células endoteliais estimuladas com ISO 30 nmol/L ou com FSK 10 nmol/L ou em células incubadas com W7 10 $\mu\text{mol/L}$ e após 10 min estimuladas com ISO 30 nmol/L (W7+ISO) ou com FSK 10 nmol/L (W7+FSK). * vs ISO (n=3; $p < 0,001$); + vs FSK (n=3; $p < 0,001$), (ANOVA).

Discussão

Verificamos no presente estudo o efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a $[Ca^{+2}]_c$ e sobre a produção de NO em células endoteliais da aorta de ratos.

Trabalhos como o de Stephenson & Summers (1987) e o de Molenaar e colaboradores (1988) apontam para a presença de receptores β -adrenérgicos no endotélio vascular. Assim, dentre os possíveis agonistas β -adrenérgicos que poderiam ter sido utilizados em nosso estudo, escolhemos a isoprenalina por se tratar de um clássico agonista β -adrenérgico não-seletivo acoplado à proteína Gs e a enzima adenilato-ciclase (Nahorski et al., 1975; Gilman, 1986). Decidimos estudar a ativação da via do AMPc de maneira independente da ativação dos receptores β -adrenérgicos e para isto optamos pela utilização da forskolina, ativador direto da enzima adenilato-ciclase (Laurenza et al., 1987).

Como o relaxamento vascular ativado pela isoprenalina e pela forskolina está relacionado ao aumento de AMPc no músculo liso vascular (Eckly-Michel et al., 1997) e no endotélio vascular (Iranami et al., 1996; Brawley et al., 2000; Ferro et al., 2004), a comparação entre os efeitos da isoprenalina com os da forskolina em células endoteliais da aorta de ratos poderiam revelar particularidades sobre a $[Ca^{+2}]_c$ e a produção de NO modulados pelo AMPc, a partir da ativação dos receptores β -adrenérgicos.

Os resultados obtidos a partir dos estudos de reatividade vascular em anéis de aorta de ratos permitiram a determinação da concentração de isoprenalina (30 nmol/L) e de forskolina (10 nmol/L) que foi utilizada nos protocolos experimentais, desenvolvidos com células endoteliais da aorta de ratos. As curvas concentração-efeito obtidas mostram que os efeitos máximos da isoprenalina e da forskolina foram semelhantes, embora a isoprenalina

tenha sido menos potente do que a forskolina. Estes resultados estão de acordo com o observado anteriormente por Gray & Marshall (1992). Comparativamente, a maior sensibilidade das preparações à forskolina em relação à isoprenalina poderia ser explicada pelo fato da forskolina ativar todas as seis isoformas da enzima adenilato-ciclase encontradas em ratos (tipos II-VI e VIII) (Gao & Gilman, 1991; Manolopoulos et al., 1995b) enquanto a isoprenalina ativaria apenas as isoformas I, II e IV (Manolopoulos et al., 1995a).

Até há pouco tempo, acreditava-se que todos os receptores β -adrenérgicos estavam associados apenas à proteína G_s que ativa a adenilato-ciclase, resultando na produção do AMPc. Entretanto, o acoplamento simultâneo destes receptores com mais de uma proteína G pode ser evidenciado em modelos de receptores com alta densidade de recombinação (Eason et al., 1992; Kenakin, 1995) como o acoplamento dos receptores β_2 -adrenérgicos à proteína G_i (Xiao, 2000; Santos et al., 2005). Assim, o acoplamento dos receptores β -adrenérgicos à proteína G_i poderia ser outra possibilidade para explicar a menor sensibilidade da aorta com endotélio vascular, à isoprenalina quando comparada com a forskolina.

Muitos estudos têm demonstrado que a remoção do endotélio vascular reduz o relaxamento induzido com isoprenalina em aortas torácicas de ratos (Neto, 2005), o que levou vários autores a supor que a isoprenalina pode produzir efeito sobre as células endoteliais (Grace et al., 1988; Kamata et al., 1989; Delpy et al., 1996; Trochu 1999). Neste sentido, Gray & Mashall (1992) propuseram que a isoprenalina ativa a produção endotelial de NO. Como a produção endotelial de NO é predominantemente realizada pela eNOS, cuja ativação é dependente de Ca^{+2} (Gadano et al., 1997; Boo et al., 2003),

verificamos a origem dos íons Ca^{+2} que poderiam ser mobilizados pela isoprenalina e pela forskolina. Investigamos também se a produção de NO nas células endoteliais estudadas seria dependente de Ca^{+2} .

Assim, inicialmente estudamos o efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ pela mobilização de Ca^{+2} a partir dos estoques intracelulares. Com base nestes resultados podemos sugerir que a isoprenalina e a forskolina podem modular a liberação de Ca^{+2} do retículo endoplasmático através dos receptores de IP_3 e de rianodina. Estes resultados estão de acordo com Tachado e colaboradores (1992) que também verificaram que a isoprenalina e a forskolina poderiam liberar Ca^{+2} a partir dos estoques do retículo sarcoplasmático.

Entretanto, a isoprenalina e a forskolina parecem modular de maneira diferente a liberação de Ca^{+2} reticular. O efeito da isoprenalina sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ foi mais inibido do que o da forskolina quando os receptores de IP_3 do retículo endoplasmático estavam bloqueados com o antagonista 2-APB. Leaver & Pappone (2002) também verificaram que a isoprenalina mobiliza Ca^{+2} através dos receptores de IP_3 . Por outro lado, o efeito da forskolina sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ foi mais atenuado do que o da isoprenalina quando os receptores de rianodina do retículo sarcoplasmático estavam inibidos com tetracaína. Nezu e colaboradores (2000) mostraram que a isoprenalina não é capaz de mobilizar Ca^{+2} após a depleção dos estoques com fenilefrina ou carbacol, sugerindo que o AMPc medeia o aumento da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ pela liberação de Ca^{+2} de estoque intracelular sensível ao IP_3 . Porém, outros estudos também apontam para liberação de Ca^{+2} através da ativação dos receptores de rianodina pela isoprenalina (Low et al., 1993; Pei et al., 2003).

Nossos resultados mostram ainda que o agonista isoprenalina é capaz de promover um maior aumento na $[Ca^{+2}]_c$ do que a forskolina. Uma possível explicação para o maior efeito da isoprenalina sobre o aumento da $[Ca^{+2}]_c$ em relação à forskolina é a de que haja uma sinalização cruzada entre receptores β_2 -adrenérgicos e a enzima fosfolipase C, de modo que pelo menos os subtipos de receptores β_2 -adrenérgicos poderiam ativar a proteína G_q , ativando a produção de IP_3 e liberação de estoques de Ca^{+2} (Mc Graw & Liggett, 2005). Talvez esta seja a razão porque observamos que a mobilização de Ca^{+2} do retículo endoplasmático via IP_3 ativada com isoprenalina foi fortemente reduzida pelo antagonista 2-APB e a ativação desses estoques com forskolina, cujo efeito independe da ativação das diferentes proteínas G, foi menos afetada pelo 2-APB.

Os nossos resultados sugerem que nas células endoteliais estudadas a isoprenalina e a forskolina poderiam ativar a liberação de outros estoques celulares de Ca^{+2} , além dos contidos no retículo endoplasmático, uma vez que as células incubadas com a associação de 2-APB e tetracaína ainda apresentavam um ligeiro aumento da $[Ca^{+2}]_c$. Segundo Nezu e colaboradores (2000) a isoprenalina ativa outros estoques de Ca^{+2} além do contido no retículo endoplasmático, porém com menor relevância.

Uma vez que muitos compartimentos celulares como as mitocôndrias, núcleo e o centro organizador dos microtúbulos, podem abrigar a enzima adenilato-ciclase, é possível supor que o efeito de drogas como a isoprenalina e a forskolina seja observado nestes sítios celulares (Zippin et al., 2003), gerando uma produção localizada de AMPc, que pode ativar proteínas como a PKA nestes compartimentos celulares (Scott et al., 1990; Qiao et al., 2002). A

estas evidências acrescentamos o fato de que depois do retículo endoplasmático, a mitocôndria é a organela citoplasmática que apresenta a maior capacidade de armazenar íons Ca^{+2} (Nixon et al., 1994; Malli 2005), o que reforça nossa hipótese de que a isoprenalina e a forskolina ativam outros estoques de Ca^{+2} além dos reticulares.

Observamos também que quando as células foram incubadas com a associação de 2-APB e tetracaína em meio zero- Ca^{+2} , os antagonistas *per se* diminuíram a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ para concentrações abaixo do basal. Este resultado sugere que mesmo em situações de repouso ocorreria a liberação de Ca^{+2} do retículo endoplasmático, contribuindo para a manutenção da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ basal. Esta hipótese está de acordo com o modelo de influxo capacitivo proposto por Putney (1986), onde mesmo na ausência da interação agonista-receptor ou produção de IP_3 , a depleção do estoque de Ca^{+2} é observada em células não excitáveis. Neste sentido, outros estudos mostram a existência do influxo capacitivo em células endoteliais vasculares (Holda et al., 1998; Huser et al., 1999; Sedova & Blatter, 2000; Sedova et al., 2000). Corrobora ainda com a idéia de que nas células endoteliais estudadas ocorreria um vazamento passivo de Ca^{+2} do retículo endoplasmático para o citoplasma, segundo o modelo capacitivo, a observação de que quando trocamos o meio zero- Ca^{+2} pelo meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L, a presença de Ca^{+2} *per se* no meio extracelular produziu aumento transitório da $[\text{Ca}^{+2}]_c$.

Além disso, estudamos o efeito da isoprenalina e da forskolina sobre o influxo extracelular de Ca^{+2} . Tanto a isoprenalina quanto a forskolina estimularam o influxo extracelular de Ca^{+2} , aumentando a $[\text{Ca}^{+2}]_c$. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que trazem informação

sobre o fato do próprio AMPc ser capaz de ativar canais iônicos na membrana plasmática (Walsh & Patten, 1994; Hanks & Hunter, 1995). Como a mobilização de estoques de Ca^{+2} poderia ativar o influxo extracelular de Ca^{+2} , Tirupathi e colaboradores (2002) demonstraram que a depleção de estoques de Ca^{+2} sensíveis ao IP_3 ativa canais para Ca^{+2} operados pelo estoque, causando o influxo de Ca^{+2} em células endoteliais da aorta.

Entretanto, em nosso estudo, quando bloqueamos com verapamil o influxo extracelular de Ca^{+2} ativado com isoprenalina ou com forskolina, a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ obtida foi apenas diminuída, mas não abolida. Estes resultados sugerem que parte do influxo de Ca^{+2} poderia ocorrer através de outros canais para Ca^{+2} que não os operados por voltagem sensíveis ao verapamil. Isto porque, segundo muitos autores, as proteínas dos canais para Ca^{+2} , como por exemplo, os canais do tipo L, são fosforilados e ativados pela PKA (Katz, 1983; Sperelakis & Wahler, 1988; Trautwein et al., 1990).

Frente ao efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a $[\text{Ca}^{+2}]_c$, estudamos também o papel da PKA sobre a mobilização do Ca^{+2} ativada pelos agentes relaxantes estudados. Verificamos que o aumento da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ promovido pela isoprenalina e pela forskolina foi atenuado quando a PKA foi inibida com o KT5720. Estes resultados estão de acordo com a literatura, onde já no final da década de 80, Hartzell (1988) e Pelzer e colaboradores (1990) relataram que a PKA é capaz de fosforilar canais de Ca^{+2} do tipo L, promovendo influxo de Ca^{+2} em células endoteliais da artéria coronária. Estes achados foram ratificados em meados dos anos 90, quando Walsh & Patten (1994) e Hanks & Hunter (1995) propuseram que o AMPc, via PKA, poderia ativar canais iônicos na membrana plasmática. Entretanto, além do influxo de

Ca^{+2} extracelular, a inibição do aumento da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ observado com o KT5720 também pode ocorrer pela inibição do efeito da PKA sobre a liberação de Ca^{+2} de estoques intracelulares, como do retículo endoplasmático (Ay et al., 2006). Assim, sugerimos que a PKA pode modular o aumento da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ em células endoteliais de aorta de ratos.

De forma resumida, podemos propor que a isoprenalina e forskolina devem ativar diferentes isoformas da enzima adenilato-ciclase, com conseqüente ativação da PKA, responsável pela fosforilação de receptores de organelas, como o retículo endoplasmático e/ou outros compartimentos celulares, com conseqüente liberação de estoques intracelulares de Ca^{+2} e/ou fosforilação de canais para Ca^{+2} e conseqüente influxo de Ca^{+2} extracelular. Entretanto, parte do influxo de Ca^{+2} estaria ocorrendo através de outros canais para Ca^{+2} além dos operados por voltagem, sensíveis ao verapamil.

Em nosso estudo, testamos o efeito da isoprenalina e da forskolina sobre a produção endotelial de NO e a importância do Ca^{+2} neste processo. Tanto a isoprenalina como a forskolina ativaram a produção de NO, enquanto o L-NNA atenuou o efeito de ambas as drogas. Estes resultados nos permitem dizer que o aumento da fluorescência do DAF-2T não foi inespecífico ou uma resposta obtida por artefato, mas resultado da atividade da enzima NO-sintase, produzindo NO.

Estes resultados estão de acordo com os estudos que mostram que o relaxamento de aortas estimuladas com isoprenalina é diminuído em presença de azul de metileno, um inibidor da enzima guanilato-ciclase, que é ativada pelo NO (Grace et al., 1988) e ainda, que tanto a isoprenalina como a

forscolina tiveram seus efeitos relaxantes inibidos pelo L-NOARG (Shimokawa et al., 1988; Gray & Marshall, 1992).

Tem sido descrito que a PKA pode ativar a eNOS pela fosforilação do aminoácido Ser 1179 (Butt et al., 2000; Fulton et al., 2002). Dessa forma, esperávamos que a inibição da PKA resultasse numa menor produção de NO, entretanto este não foi o efeito desta quinase. Outros estudos mostram que a ativação de receptores β -adrenérgicos pode resultar na ativação da proteína quinase G (PKG) via AMPc (Eckly-Michel et al., 1997), além do possível “cross-talk” entre as vias do GMPc e AMPc (Dhanakoti et al., 2000; White et al., 2000). Linder et al. (2005) reforçam os achados anteriores de sinalização cruzada entre as vias do AMPc e do GMPc. Isto poderia ocorrer uma vez que estes autores demonstram haver colocalização da enzima guanilato-ciclase, PKG, PKA, caveolina-1 e eNOS nas cavéolas endoteliais.

Cavéolas são pequenas invaginações da membrana, ricas em colesterol, envolvidas em muitos eventos envolvendo transdução de sinal por abrigarem grande variedade de proteínas. Nas cavéolas, a eNOS em seu estado inativo apresenta-se associada à proteína caveolina-1 (Garcia-Cardena et al., 1996; Ju et al., 1997). Sob estimulação que resulta em aumento da $[Ca^{+2}]_c$, a eNOS dissocia-se da caveolina-1 tornando-se ativa com a conseqüente produção de NO (Feron, et al., 1996; Gratton et al., 2000).

Assim, sugerimos que a isoprenalina e a forskolina aumentam a produção de AMPc, o que poderia ativar a PKA e a PKG. Esta última, poderia ser ativada diretamente ou por um “cross-talk” entre o GMPc e o AMPc, resultando na produção de NO que não foi sensível ao KT5720.

Existem vários tipos de canais para Ca^{+2} na membrana plasmática das células, que podem ser independentes ou dependentes de voltagem. Destacamos os canais ativados por alta voltagem, que são divididos em L, N, O, P, Q e R (Zhang et al., 1993; Oliveira et al., 1994). Estes canais são de alta condutância ao Ca^{+2} e possuem alto limiar de ativação. Fleckenstein-Grun (1996), observou que no estado de repouso os canais do tipo L podem estar fechados ou abertos. Zhou & Wu (2006) relataram a existência de canais para Ca^{+2} do tipo L em células endoteliais pulmonares. De acordo com Trautwein e colaboradores (1990) ocorre fosforilação AMPc-dependente dos canais para Ca^{+2} do tipo L, favorecendo a entrada de Ca^{+2} pela ativação de receptores β -adrenérgicos.

Assim, seria possível supor que o influxo extracelular de Ca^{+2} ativado por drogas como a isoprenalina e a forskolina poderia estar relacionado à produção endotelial de NO, uma vez que, como já citado anteriormente, a ativação da eNOS é dependente de Ca^{+2} (Gadano et al., 1997; Dedkova & Blatter, 2002; Boo et al., 2003). Decidimos então verificar a origem do Ca^{+2} relacionado à produção de NO endotelial. Nossos resultados mostram que a produção endotelial de NO foi semelhante em meio contendo Ca^{+2} 1,6 mmol/L ou em meio zero- Ca^{+2} , indicando que o Ca^{+2} relacionado com a ativação da eNOS pode ser liberado de estoques intracelulares. Corroboram com nossa hipótese os resultados obtidos quando as células endoteliais incubadas com verapamil e estimuladas com isoprenalina ou com forskolina não tiveram a produção de NO diminuída. Uchida e colaboradores (1999) mostraram que em células endoteliais coronarianas, os bloqueadores de canais para Ca^{+2} como nicardipina, diltiazem ou verapamil, não produziram efeito sobre a produção de

NO. Por outro lado, estudos como o de Ding & Vaziri (2000), mostram que a nifedipina e o diltiazem, mas não o verapamil, podem estimular um aumento na atividade da eNOS em células endoteliais de coronária humana.

A partir destes dados, verificamos se o retículo endoplasmático poderia ser um dos estoques de Ca^{+2} envolvidos na produção de NO ativada pela isoprenalina e pela forskolina. Observamos em presença de 2-APB e de tetracaína, que a produção de NO foi fortemente diminuída, confirmando nossa sugestão de que ao menos em parte, os íons Ca^{+2} relacionados com a produção de NO são originados do retículo endoplasmático das células endoteliais estudadas.

Por isso, passamos a verificar se a produção de NO ativada pela isoprenalina e pela forskolina seria ou não dependente dos receptores de IP_3 e de rianodina. Verificamos que a produção de NO estimulada com isoprenalina foi maior do que a induzida pela forskolina, quando os receptores de IP_3 foram inibidos com o antagonista 2-APB. Sugerimos que tal fato se deve à capacidade da isoprenalina de mobilizar outros estoques celulares além dos reticulares, como discutimos anteriormente. Porém, é inegável que parte do Ca^{+2} relacionado com a ativação da produção endotelial de NO seja liberado do retículo endoplasmático via receptores de IP_3 quando as células são estimuladas com isoprenalina ou com forskolina.

A produção de NO estimulada com isoprenalina foi mais atenuada do que a ativada pela forskolina quando os receptores de rianodina foram antagonizados com tetracaína. Uma possível explicação é de que a liberação de Ca^{+2} via IP_3 não ativa os receptores de rianodina, mas a inibição dos receptores de rianodina reduz a liberação de Ca^{+2} via IP_3 (Mac Millan et al.,

2005). Com base nestes resultados, sugerimos que a isoprenalina e a forskolina são capazes de ativar a liberação de Ca^{+2} através dos receptores de rianodina. Também é possível supor que o receptor de rianodina module a liberação de Ca^{+2} através dos receptores de IP_3 , resultando na diminuição da produção de NO. Ainda, que a produção de NO ativada pela isoprenalina é mais sensível a este mecanismo de Ca^{+2} do que a forskolina. Estes resultados permitem ainda inferir que a ativação da eNOS leva à depleção de estoques intracelulares de Ca^{2+} ativando o influxo extracelular de Ca^{2+} (influxo de Ca^{+2} capacitivo).

Entretanto, vale ressaltar que a atividade da eNOS é dependente de uma complexa combinação de substratos, cofatores, interações proteína-proteína, fosforilações, acilações e ainda, pela localização da enzima em locais específicos no meio intracelular (Govers & Oess, 2004). Neste contexto, o aumento da $[\text{Ca}^{+2}]_c$ é apenas um dos muitos fatores relacionados com a produção de NO. Por isso, a calmodulina figura como sendo o elo entre os íons Ca^{+2} e a produção de NO (Bredt e Snyder, 1990; Vogel, 1994; Li & Poulos, 2005). Verificamos que a produção de NO ativada pela isoprenalina e pela forskolina é praticamente abolida quando a calmodulina foi inibida com o W7. Assim, sugerimos que a produção endotelial de NO ativada pela isoprenalina e pela forskolina são dependentes da formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina.

Em conjunto, nossos resultados permitem sugerir que em células endoteliais da aorta de ratos, a isoprenalina e a forskolina aumentam a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ via ativação da PKA pela liberação de Ca^{+2} do retículo endoplasmático através de receptores de IP_3 e de rianodina e pelo influxo extracelular de Ca^{+2} . A produção de NO é dependente de Ca^{+2} e da formação do complexo

Ca⁺²-calmodulina, mas independente da PKA. Os íons Ca⁺² relacionados à produção de NO são primariamente liberados do retículo endoplasmático, via receptores de IP₃ e de rianodina.

CONCLUSÕES:

Em células endoteliais de aorta de ratos:

1. A isoprenalina e a forskolina aumentam a [Ca⁺²]_c
2. O aumento da [Ca⁺²]_c ativado com isoprenalina e com forskolina é pelo menos em parte, dependente da ativação da PKA
3. A isoprenalina e a forskolina ativam a liberação de Ca⁺² do retículo endoplasmático através de receptores de IP₃ e de rianodina
4. A isoprenalina e a forskolina ativam o influxo extracelular de Ca⁺² ao menos em parte por canais para Ca⁺² sensíveis ao verapamil.
5. A produção de NO ativada pela isoprenalina e pela forskolina é dependente de Ca⁺² e da formação do complexo Ca⁺²-calmodulina
6. A produção de NO ativada pela isoprenalina e pela forskolina é independente da PKA.
7. O Ca⁺² relacionado à produção de NO ativada pela isoprenalina e pela forskolina é liberado do retículo endoplasmático, via receptores de IP₃ e de rianodina.

Referências Bibliográficas

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. **1977**. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74(8):3203-3207.

Ay B, Iyanoye A, Sieck GC, Prakash YS, Pabelick CM. **2006**. Cyclic nucleotide regulation of store-operated Ca^{2+} influx in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 290(2):L278-L283.

Barceñas-Ruiz L, Wier WG. **1987**. Voltage dependence of intracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res*. 61(1):148-154.

Berridge DM. **1984**. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messenger. *Biochem J*. 220:345-360.

Birnbaumer L. **1992**. Receptor to effector signaling through G proteins: role for $\beta\gamma$ -dimers as well as α subunits. *Cell*. 71: 1069-1072.

Black JW, Stephenson JS. **1962**. Pharmacology of a new adrenergic beta-receptor blocking compounds. *Lancet*. 2: 311-314.

Black JW, Duncan WAM, Shanks RG. **1965**. Comparison of some properties of pronethalol and propranolol. *Br J Pharmac Chemother*. 25: 577-591.

Blankesteyn WM, Thien T. **1993**. Effect of N^G -monomethyl-L-arginine on the β -adrenoceptor-mediated relaxation of rat mesenteric resistance arteries. *Life Sci*. 52:PL135–PL139.

Boo YC, Sorescu GP, Bauer PM, Fulton D, Kemp BE, Harrison DG, Sessa WC, Jô H. **2003**. Endothelial NO synthase phosphorylated at SER^{635} produces NO without requiring intracellular calcium increase. *Free Rad Biol Med*. 35(7):729-741.

Bourguignon LY, Iida N, Sobrin L, Bourguignon GJ. **1994**. Identification of an IP_3 receptor in endothelial cells. *J Cell Physiol*. 159(1):29-34.

Brawley L, Shaw AM, McDonald A. **2000**. Beta 1-, beta 2- and atypical beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol*. 129(4):637-644.

Bredt DS, Snyder SH. **1990**. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87(2):682-685.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. **1991**. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*. 351(6329):714-718.

Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Frohlich LG, Sickmann A, Meyer HE, Lohmann SM, Schmidt HH. **2000**. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem*. 275:5179–5187.

Buxton BF, Jones CR, Molenaar P, Summers RJ. **1987**. Characterization and autoradiographic localization of beta-adrenoceptor subtypes in human cardiac tissues. *Br J Pharmacol*. 92(2):299-310.

Charles IG, Chubb A, Gill R, Clare J, Lowe PN, Holmes LS, Page M, Keeling JG, Moncada S, Riveros-Moreno V. **1993**. Cloning and expression of a rat neuronal nitric oxide synthase coding sequence in a baculovirus/insect cell system. *Biochem Biophys Res Commun*. 196(3):1481-1489.

Clapham DE, Neer EJ. **1993**. New roles for G protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrana signaling. *Nature*. 365:403-406.

Clapham DE, Neer EJ. **1997**. G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 37:167-203.

Danoff SK, Ferris CD, Donath C, Fischer GA, Munemitsu S, Ullrich A, Snyder SH, Ross CA. **1991**. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: distinct neuronal and non neuronal forms derived by alternative splicing differ in phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88(7):2951-2955.

Dedkova EN, Blatter LA. **2002**. Nitric oxide inhibits capacitative Ca^{2+} entry and enhances endoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol*. 539(Pt 1):77-91.

Delpy E, Coste H, Gouville AC. **1996**. Effect of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br J Pharmacol*. 119:471-478.

Dhabakoti SN, Gao Y, Nguyen MQ, Raj JU. **2000**. Involvement of cGMP-dependent protein kinase in the relaxation of ovine pulmonary arteries to cGMP and cAMP. *J Appl Physiol*. 88(5):1637-1642.

Dias KL, Correia N de A, Pereira KK, Barbosa-Filho JM, Cavalcante KV, Araújo IG, Silva DF, Guedes DN, Neto MA, Bendhack LM, Medeiros IA. **2007**. Mechanisms involved in the vasodilator effect induced by diosgenin in rat superior mesenteric artery. *Eur J Pharmacol*. 574(2-3):172-178.

Ding Y, Vaziri ND. **2000**. Nifedipine and diltiazem but not verapamil up-regulate endothelial nitric-oxide synthase expression. *J Pharmacol Exp Ther*. 292(2):606-609.

Eason MG, Kurose H, Holt BD, Raymond JR, Liggett SB. **1992**. Simultaneous coupling of β_2 -adrenergic receptors to two G-protein with opposing effects. *J Biol Chem*. 267:15795-15801.

Eckly-Michel A, Martin V, Lugnier C. **1997**. Involvement of cyclic nucleotide-dependent protein kinases in cyclic AMP-mediated vasorelaxation. *Br J Pharmacol*. 122(1):158-164.

Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. **1996**. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with

caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem.* 271(37):22810-22814.

Ferro A, Coash M, Yamamoto T, Rob J, Ji Y, Queen L. **2004**. Nitric oxide-dependent beta 2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *Br J Pharmacol.* 143(3):397-403.

Fleckenstein-Grun G. **1996**. Calcium antagonism in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 432(3 Suppl):R53-R60.

Francis SH, Corbin JD. **1994**. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol.* 56:237-272.

Fulton D, Fontana J, Sowa G, Gratton JP, Lin M, Li KX, Michell B, Kemp BE, Rodman D, Sessa WC. **2002**. Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J Biol Chem.* 277:4277-4284.

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

Gadano AC, Sogni P, Yang S, Cailmail S, Moreau R, Nepveux P, Couturier D, Lebrec D. **1997**. Endothelial calcium-calmodulin dependent nitric oxide synthase in the in vitro vascular hyporeactivity of portal hypertensive rats. *J Hepatol.* 26(3):678-686.

Gao BN, Gilman AG. **1991**. Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88(22):10178-10182.

Garcia-Cardena G, Fan R, Stern DF, Liu J, Sessa WC. **1996**. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem.* 271(44):27237-27240.

Gilman AG. **1986**. Receptor-regulated G proteins. *Trends Neurosci.* 9:460-463.

Govers R, Rabelink T. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol.* 280:F193-F206.

Govers R, Beyers L, de Bree P, Rabelink TJ. **2002**. Endothelial nitric oxide synthase activity is linked to its presence at cell-cell contacts. *Biochem J.* 361(Pt 2):193-201.

Govers R, Oess S. **2004**. To NO or not to NO: 'where?' is the question. *Histol Histopathol.* 19(2):585-605.

Grace GC, McDonald OS, Dusting GJ. **1988**. Cyclic nucleotide interaction involved in endothelium-dependent dilatation in rat aortic rings. *Eur J Pharmacol.* 148:17-24.

Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, Sessa WC. **2000**. Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS),

hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem.* 275(29):22268-22272.

Gray DW, Marshall I. **1992**. Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent beta-adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol.* 107(3):684-690.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. **1985**. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260(6):3440-3450.

Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. **1995**. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9(8): 576-596.

Hartzell HC. **1988**. Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. *Prog Biophys Mol Biol.* 52(3):165-247.

Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. **1990**. Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J.* 4:2881-2889.

Hayes JS, Brunton LL, Brown JH, Reese JB, Mayer SE. **1979**. Hormonally specific expression of cardiac protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76:1570-1574.

Hirano T, Asai K, Matsukawa K, Kato T, Takeuchi M, Yonezawa M, Otsuka T, Matsui N. Establishment of an enzyme immunoassay system for gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF). *Biochim Biophys Acta.* 1176(3):299-304.

Holda JR, Klishin A, Sedova M, Huser J, Blatter LA. **1998**. Capacitative calcium entry. *News Physiol Sci.* 13:157-163.

Howell RE, Albeda SM, Daise ML, Levine EM. **1988**. Characterization of β -adrenergic receptors in cultured human and bovine endothelial cells. *J App Physiol.* 65:1251-1257.

Huser J, Holda JR, Kockskamper J, Blatter LA. **1999**. Focal agonist stimulation results in spatially restricted Ca^{2+} release and capacitative Ca^{2+} entry in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol.* 514 (Pt 1):101-109.

Ignarro LJ, Byrns R, Buga GM, Wood RS, Chaudhuri G. **1987**. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study the endothelium dependent and nitric oxide elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther.* 244:181-189.

Iranami H, Hatano Y, Tsukiyama Y, Maeda H, Mizumoto KA. **1996**. Beta-adrenoceptor agonist evokes a nitric oxide-cGMP relaxation mechanism modulated by adenylyl cyclase in rat aorta. *Anesthesiol* 85:1129-1138.

Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. **1992**. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 267(31):22694.

Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. **1997**. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem.* 272:18522–18525.

Kamata K, Miyata N, Kasuya Y. **1989**. Involvement of endothelial cells in relaxation and contraction responses of the aorta to isoproterenol in naive and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharmacol Exp Therap.* 249:890–894.

Kamenetsky M, Middelhaufe S, Bank EM, Levin LR, Buck J, Steegborn C. **2006**. Molecular Details of cAMP Generation in Mammalian Cells: A Tale of Two Systems. *J of Molec Biol.* 362(4):623-639.

Kenakin T. **1995**. Agonist-receptor efficacy I: mechanisms of efficacy and receptor promiscuity. *Trends Pharmacol Sci.* 16:188-192.

Kohler R, Brakemeier S, Kuhn M, Degenhardt C, Buhr H, Pries A, Hoyer J. **2001**. Expression of ryanodine receptor type 3 and TRP channels in endothelial cells: comparison of in situ and cultured human endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 51(1):160-168.

Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. **1998**. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: Diaminofluoresceins. *Anal Chem.* 70:2446-2453.

Kuo JF, Greengard P. **1969**. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. IV. Widespread occurrence of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom. *Proc Natl Acad Sci USA.* 64(4):1349-1355.

Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG. **1967**. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature.* 214:597-598.

Laurenza A, Khandelwal Y, De Souza NJ, Rupp RH, Metzger H, Seamon KB. **1987**. Stimulation of adenylate cyclase by water-soluble analogues of forskolin. *Mol Pharmacol.* 32(1): 133-139.

Leaver EV, Pappone PA. **2002**. Beta-adrenergic potentiation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release in brown fat cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282(5):C1016-C1024.

Lefroy DC, Donnelly LE, McEwan JR, Macdermont J. **1993**. Phorbol ester enhances activation of adenylate cyclase in bovine aortic endothelial cells. *Life Sci.* 54:87–94.

Li H, Poulos TL. **2005**. Structure-functions studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem.* 99:293–305.

Linder AE, McCluskey LP, Cole III KR, Lanning KM, Webb RC. **2005**. Dynamic Association of Nitric Oxide Downstream Signaling Molecules with Endothelial Caveolin-1 in Rat Aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 314:9–15.

Low AM, Darby PJ, Kwan CY, Daniel EE. **1993**. Effects of thapsigargin and ryanodine on vascular contractility: cross-talk between sarcoplasmic reticulum and plasmalemma. *Eur J Pharmacol.* 230(1):53-62.

Ludwig MG, Seuwen K. **2002**. Characterization of the human adenylyl cyclase gene family: cDNA, gene structure, and tissue distribution of the nine isoforms. *J Recept Signal Transduct Res.* 110:22-79.

Lum H, Jaffe HA, Schulz IT, Masood A, Ray Chaudhury A, Green RD. **1999**. Expression of PKA inhibitor gene abolishes cAMP-mediated protection to endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 277:C580-C588.

MacMillan D, Chalmers S, Muir TC, McCarron JG. **2005**. IP₃-mediated Ca²⁺ increases do not involve the ryanodine receptor, but ryanodine receptor antagonists reduce IP₃-mediated Ca²⁺ increases in guinea-pig colonic smooth muscle cells. *J Physiol.* 569(Pt 2):533-544.

Malli R, Frieden M, Trenker M, Graier WF. **2005**. The role of mitochondria for Ca²⁺ refilling of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 280(13):12114-12122.

Manolopoulos VG, Liu J, Unsworth BR, Lelkes PI. **1995a**. Adenylyl cyclase isoforms are differentially expressed in primary cultures of endothelial cells and whole tissue homogenates from various rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 208(1):323-331.

Manolopoulos VG, Samet MM, Lelkes PI. **1995b**. Regulation of the adenylyl cyclase signaling system in various types of cultured endothelial cells. *J Cell Biochem.* 57(4):590-598.

Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K. **1997**. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem.* 122(3):498-505.

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, Rosembliit N, Marks AR. **2001**. Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *J Cell Biol.* 153(4):699-708.

Mayet WJ, Schwarting A, Orth T, Sibelius U, Hattar K, Meyer zum Büschenfelde KH. **1997**. Signal transduction pathways of membrane expression of proteinase 3 (PR-3) in human endothelial cells. *Eur J Clin Invest.* 27(11):893-899.

Molenaar P, Malta E, Jones CR, Buxton BF, Summers RJ. **1988**. Autoradiographic localization and function of beta-adrenoceptors on the human internal mammary artery and saphenous vein. *Br J Pharmacol.* 95(1):225-233.

Mülsch A, Busse R. **1990**. NG-nitro-L-arginine (N5- [imino(nitroamino)methyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric

oxide synthesis from L-arginine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 341(1-2):143-147.

Naroski SR, Rogers KJ, Smith BM, Anson J. **1975**. Characterization of the adrenoceptor mediating changes in cyclic adenosine 3'-5' monophosphate in chick cerebral hemispheres. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 291:101-110.

Neto, MA. Participação do endotélio vascular no relaxamento ativado pelo AMP cíclico na aorta de ratos hipertensos renais 2 rins – 1 clipe. **2005**. Dissertação de Mestrado. *Biblioteca Central da PCARP-USP*.

Nezu A, Tanimura A, Tojyo Y. **2000**. Characterization of the Ca²⁺ response mediated by activation of beta-adrenoceptors in rat submandibular ducts. *Jpn J Pharmacol.* 84(1):25-31.

Nixon G, Mignery GA, Südhof TC, Somlyo AV. **1994**. Immunogold localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 15(6):682-700.

Oliveira BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME. **1994**. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem.* 63:823-867.

Palmer RMJ, Ferige AG, Moncada S. 1988. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327:524-526.

Paltauf-Doburzynska J, Frieden M, Graier WF. **1999**. Mechanisms of Ca²⁺ store depletion in single endothelial cells in a Ca²⁺-free environment. *Cell Calcium.* 25(5):345-353.

Peach MJ, Singer HA, Izzo NJ, Loeb AL. **1987**. Role of calcium in endothelium-dependent relaxation of arterial smooth muscle. *Am J Cardiol.* 59:35A-43A.

Pelzer D, Pelzer S, McDonald TF. **1990**. Properties and regulation of calcium channels in muscle cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 114: 107-207.

Priest RM, Hucks D, Ward JP. **1997**. Noradrenaline, beta-adrenoceptor mediated vasorelaxation and nitric oxide in large and small pulmonary arteries of the rat. *Br J Pharmacol.* 122(7):1375-1384.

Putney JW Jr. **1986**. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* 7(1): 1-12.

Qiao J, Mei FC, Ppopv VL, Vergara LA, Cheng X. **2002**. Cell cycle-dependent subcellular localization of exchange factor directly activated by cAMP. *J Biol Chem.* 277:26581–26586.

Rall TW, Sutherland EW, Wosilait WD. **1956**. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. III. Reactivation of liver phosphorylase in slices and in extracts. *J Biol Chem*. 218(1):483-495.

Robinsons LJ, Michel T. **1995**. Mutagenesis of palmitoylation sites in endothelial nitric oxide synthase identifies a novel motif for dual acylation and subcellular targeting. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(25):11776-11780.

Rubanyi G, Vanhoutte PM. **1995**. Endothelium-removal decreases relaxations of canine coronary arteries caused by β -adrenergic agonists and adenosine. *J Cardiovasc Pharmacol*. 7:139-144.

Santos IN, Sumitami M, Caceres VM, Moreira MF, Krieger MH, Spadari-Bratfisch RC. **2005**. Evidence for two atypical conformations of beta-adrenoceptors and their interaction with G_i proteins. *Eur J Pharmacol*. 513(1-2):109-118.

Sayner SL, Alexeyev M, Dessauer CW, Stevens T. **2006**. Soluble Adenylyl Cyclase Reveals the Significance of cAMP Compartmentation on Pulmonary Microvascular Endothelial Cell Barrier. *Circ Res*. 9:1-7.

Scott JD, Stofko RE, McDonald JR, Comer JD, Vitalis EA, Mangili JA. **1990**. Type II regulatory subunit dimerization determines the subcellular localization of the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 265: 21561-21566.

Seamon KB, Daly JW. **1981**. Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. *J Cyclic Nucleotide Res*. 7(4):201-224.

Sedova M, Blatter LA. **1999**. Dynamic regulation of $[Ca^{2+}]_i$ by plasma membrane Ca^{2+} -ATPase and Na^+/Ca^{2+} exchange during capacitative Ca^{2+} entry in bovine vascular endothelial cells. *Cell Calcium*. 25:333-343.

Sedova M, Klishin A, Huser J, Blatter LA. **2000**. Capacitative Ca^{2+} entry is graded with degree of intracellular Ca^{2+} store depletion in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol*. 523 (Pt 3):549-559.

Seiden JE, Platoshyn O, Bakst AE, McDaniel SS, Yuan JXJ. **2000**. High K^+ induced membrane depolarization attenuates endothelium-dependent pulmonary vasodilatation. *Am J Physiol*. 278:L261-L267.

Sahul PW, Smart EJ, Robinson IJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, Michel T. **1996**. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem*. 271(11):6518-6522.

Shoshan-Barmatz V, Zchut S. **1994**. The interaction of local anesthetics with the ryanodine receptor of the sarcoplasmic reticulum. *J Membr Biol*. 138(1):103.

Sperelakis N, Wahler GM. **1988**. Regulation of Ca^{2+} influx in myocardial cells by beta adrenergic receptors, cyclic nucleotides, and phosphorylation. *Mol Cell Biochem*. 82(1-2):19-28.

Steinberg SF, Jaffe EA, Bilezikian JP. **1984**. Endothelial cells contain beta adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 325(4):310-313.

Stephenson JA, Summers RJ. **1987**. Autoradiographic analysis of receptors on vascular endothelium. *Eur J Pharmacol*. 134(1):35-43.

Sternweis PC. **1986**. The purified alpha subunits of G_o and G_i from bovine brain require beta gamma for association with phospholipid vesicles. *J Biol Chem*. 261(2):631-637.

Summers RJ, Molenaar P, Stephenson JA, Jones CR. **1987**. Autoradiographic localization of receptors in the mammalian cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 14:437-447.

Tachado SD, Akhtar RA, Zhou CJ, Abdel-Latif AA. **1992**. Effects of isoproterenol and forskolin on carbachol- and fluoroaluminate-induced polyphosphoinositide hydrolysis, inositol trisphosphate production, and contraction in bovine iris sphincter smooth muscle: interaction between cAMP and IP₃ second messenger systems. *Cell Signal*. 4(1):61-75.

Tang WJ, Hurley JH. **1998**. Catalytic mechanism and regulation of mammalian systems activated by sympathomimetic amines. *Mol Pharmacol*. 54:231-240.

Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, and Sprang SR. **1997**. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gs-GTP. *Science*. 278:1907-1916.

Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, Malik AB. **2002**. Role of calcium signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vasc Pharmacol*. 39(4-5):173-185.

Trautwein W, Hescheler J. **1990**. Regulation of the L-type calcium current by phosphorylation and G proteins. *Annu Rev Physiol*. 2:257-274.

Triggle DJ. **1996**. Ion channels as pharmacologic receptors: the chirality of drug interactions. *Chirality*. 8(1):35-38.

Trochu JN, Leblais V, Rautureau Y, Bévèrelli F, Le Marec H, Berdeaux A, Gauthier C. **1999**. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol*. 128: 69-76.

Uchida H, Tanaka Y, Ishii K, Nakayama K. **1999**. L-type Ca²⁺ channels are not involved in coronary endothelial Ca²⁺ influx mechanism responsible for endothelium-dependent relaxation. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 104(2):127-144.

Vogel H. **1994**. Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. *Cell Biol*. 72:357-376.

Walsh DA, Van Patten SM. **1994**. Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *FASEB J*. 8(15):1227-1236.

Wang X, Lau F, Li L, Yoshikawa A, van Breemen. C. **1995**. Acetylcholine-sensitive intracellular Ca^{2+} store in fresh endothelial cells and evidence for ryanodine receptors. *Circ Res*. 77(1):37-42.

White RE, Kryman JP, El-Mowafy AM, Han G, Carrier GO. **2000**. cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate BK(Ca^{2+}) channel activity in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res*. 86:897–905.

Xiao RP. **2000**. Cell log IC for dual coupling of a single class of receptors to G_s and G_i proteins. *Circ Res*. 87: 635-637.

Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. **1992**. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 256:225-228

Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Home WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, Tsien RW. **1993**. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacol*. 32(11):1075-1088.

Zhou C, Wu S. **2006**. T-type calcium channels in pulmonary vascular endothelium. *Microcirculation*. 13(8):645-656.

Ziping JH, Chen Y, Nahirney P, Kamenetsky M, Wuttke MS, Fischman DA, Levis LR, Buck J. **2003**. Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *FASEB J*. 17:82–84.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)