



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL
(CLINEX)

Dissertação de Mestrado

**Relação entre o diâmetro arteriolar médio e a vasomotricidade
espontânea: Importância do óxido nítrico, da prostaciclina e dos
canais de potássio**

Rio de Janeiro

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL
(CLINEX)

Relação entre o diâmetro arteriolar médio e a vasomotricidade espontânea: Importância do óxido nítrico, da prostaciclina e dos canais de potássio

Dissertação apresentada à Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro para obtenção de grau de mestre em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

Rio de Janeiro

2007



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL
(CLINEX)

Dissertação de Mestrado

Relação entre o diâmetro arteriolar médio e a vasomotricidade espontânea: Importância do óxido nítrico, da prostaciclina e dos canais de potássio

Maria das Graças Coelho de Souza

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliete Bouskela

Aprovada em 07/12/2007 pela banca examinadora:

Prof^a. Dr^a.: Ângela de Castro Resende (UERJ)

Prof^a. Dr^a.: Regina Coeli dos Santos Goldenberg (UFRJ)

Prof. Dr.: Mario Fritsch Toros Neves (UERJ)

Rio de Janeiro

2007

Souza, Maria das Graças Coelho

Relação entre o diâmetro arteriolar médio e a vasomotricidade espontânea:
Importância do óxido nítrico, da prostaciclina e dos canais de potássio / Maria das
Graças Coelho de Souza - 2007

xi, 59:il

Orientadora: Eliete Bouskela

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ,
Faculdade de Ciências Médicas.

1-vasomotricidade espontânea. 2-diâmetro arteriolar. 3- óxido nítrico. 4-
prostaciclina. 5-canais de potássio. 6-Teses. I. Bouskela, Eliete. II. Universidade do
Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Faculdade de Ciências Médicas. III. Relação entre
o diâmetro arteriolar médio e a vasomotricidade espontânea: Importância do óxido
nítrico, da prostaciclina e dos canais de potássio

À todos que me querem bem.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar até aqui.

Aos meus pais e irmãos por todo amor e carinho.

Aos meus tios e primos pelo afeto e incentivo.

À Cristiane Conde e família pela grande amizade.

À Profa. Eliete Bouskela pela orientação e pelo exemplo de profissionalismo e determinação.

Aos membros da banca examinadora por terem se disposto a avaliar esse trabalho.

Ao amigo Rodrigo Torres pelos conselhos.

À Amélia Gomes pela boa vontade em ajudar sempre.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Pesquisas em Microcirculação ao longo desses 12 anos pelo carinho e por torcerem por mim.

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas	viii
Resumo	x
Abstract	xi
Introdução	1
Objetivo	15
Material e métodos	16
Resultados	21
Discussão	34
Conclusão	44
Referências bibliográficas	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh -Acetilcolina

AMPC- Monofosfato de adenosina cíclica

ATP – Trifosfato de adenosina

BK-Bradicinina

BK_{Ca}- Canais de potássio ativados pelo cálcio de alta condutância

CMLV- Células da musculatura lisa vascular

DAG- Diacilglicerol

EDHF – Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRF- Fator de relaxamento derivado do endotélio

Glib- Glibenclamida

GMPc- Monofosfato de guanosina cíclica

IK_{Ca}- Canais de potássio ativados pelo cálcio de condutância intermediária

IP₃- 1,4,5 trisfosfato de inositol

K_{ATP}- Canais de potássio dependentes de ATP

K_{IR}- Canais retificadores de potássio

K_V- Canais de potássio ativados por voltagem

L-NA- N^ω-nitro-L-arginine

NO- Óxido nítrico

NOS- Sintase de óxido nítrico

PGI₂- Prostaciclina

PIP₂- Bifosfato de fosfatidilinositol

PKC - proteína quinase C

PLC - Fosfolipase C

RS- Retículo sarcoplasmático

SERCA- Cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático

SK_{Ca}- Canais de potássio de ativados pelo cálcio pequena condutância

SNP- Nitroprussiato de sódio

TEA- Tetraetilamônio

RESUMO

Vasos pré-capilares apresentam variações rítmicas espontâneas do diâmetro vascular denominadas de vasomotricidade. Acredita-se que este fenômeno seja dependente de um delicado equilíbrio entre as correntes de membrana dentre as quais as correntes de K^+ exercem um importante papel. Uma vez que o endotélio tem a capacidade de regular o tônus da musculatura lisa e de ativar os canais de K^+ através dos fatores de relaxamento dele derivados (EDRFs), como o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI_2), nós decidimos estudar a relação entre esses fatores, os canais de K^+ , o diâmetro arteriolar médio e a vasomotricidade através da observação *in vivo* da microcirculação da bolsa da bochecha de hamster antes e após a aplicação tópica de acetilcolina (ACh) e bradicinina (BK), agonistas da produção de NO e PGI_2 ; L-NA (N^{ω} -nitro-L-arginina), inibidor da síntese do NO; o azul de metileno (AM), inibidor da síntese de GMPc; a atropina, antagonista do receptor muscarínico; a indometacina, inibidor da produção de PGI_2 ; dois bloqueadores de canais de K^+ , o tetraetilamônio (TEA) e a glibenclamida; o nitroprussiato de sódio (SNP), doador de NO e o iloprost, análogo estável da PGI_2 . O L-NA (10^{-10} - 10^{-6} M) reduziu o diâmetro e aboliu a vasomotricidade; o AM (10^{-7} - 10^{-5} M) induziu vasoconstrição sem afetar a vasomotricidade. A adição de AM (10^{-6} M) aboliu e a adição de glibenclamida (10^{-6} M) restaurou a vasomotricidade na presença de L-NA (10^{-6} M). Os efeitos da ACh sobre o diâmetro e a vasomotricidade foram completa e parcialmente bloqueados pela adição de atropina (10^{-7} M) e L-NA (10^{-6} M), respectivamente. Glibenclamida (10^{-6} M) reduziu o efeito vasodilatador da ACh (10^{-7} M) e diminuiu a frequência da vasomotricidade. TEA (5mM) diminuiu a resposta vasodilatadora da ACh (10^{-7} M) e promoveu redução da frequência e aumento da amplitude da vasomotricidade. O L-NA (10^{-6} M) suprimiu a vasodilatação induzida pela BK (10^{-7} - 10^{-5} M), aumentou a frequência e reduziu a amplitude da vasomotricidade. A indometacina (10^{-6} M) inibiu a vasodilatação promovida pela BK (10^{-10} - 10^{-5} M) e aumentou a vasomotricidade. A combinação de L-NA (10^{-6} M) e Indometacina (10^{-6} M), inibiu a vasodilatação induzida pela BK (10^{-10} - 10^{-5} M) e a vasomotricidade. A cessação da vasomotricidade induzida pela BK (10^{-7} M) foi revertida pela glibenclamida (10^{-6} M) e pelo TEA (5mM). O SNP (10^{-10} - 10^{-6} M) e o iloprost (10^{-12} - 10^{-8} M) provocaram vasodilatação, diminuíram e aboliram a vasomotricidade. Em combinação com L-NA (10^{-6} M), SNP e iloprost restauraram o diâmetro e a vasomotricidade. Com base nesses resultados, esse estudo sugere a existência de uma dissociação entre o tônus vascular e a vasomotricidade e que o NO (e não o GMPc) e os canais de K^+ sensíveis ao ATP e ao TEA estão implicados na modulação da oscilação espontânea do diâmetro arteriolar.

ABSTRACT

Precapillary vessels display spontaneous rhythmic luminal variations, termed vasomotion. This phenomenon seems to depend on a delicate balance of membrane currents in which K^+ currents play an important role. Since endothelium derived relaxing factors (EDRFs), such as nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI_2) have the capacity to regulate smooth muscle cell tone and to activate K^+ channels, we decided to study the relationships between them, K^+ currents, mean arteriolar diameter and vasomotion through topical application of two of their agonists (ACh and BK); the blockade of their synthesis by N^{ω} -nitro-L-arginine (L-NA) and indomethacin, respectively; the blockade of K^+ channels using glibenclamide and tetraethylammonium chloride (TEA) and addition of atropine, a muscarinic receptor antagonist; methylene blue (MB), an inhibitor of cGMP production; sodium nitroprusside (SNP), an exogenous NO donor and iloprost, a stable PGI_2 analogue, in the hamster cheek pouch preparation observed *in vivo*. L-NA reduced diameter and abolished vasomotion; MB induced constriction without changes in vasomotion; L-NA+MB abolished and L-NA+glibenclamide restored vasomotion without further diameter change. ACh and BK increased diameter and decreased vasomotion. ACh effects on diameter and in vasomotion were blocked completely by atropine and partially by L-NA. ACh+glibenclamide decreased vasomotion and ACh+TEA decreased frequency but increased vasomotion amplitude. L-NA suppressed BK-induced vasodilation, increased vasomotion frequency but reduced its amplitude. Indomethacin inhibited BK-induced vasodilation and increased vasomotion. BK+L-NA+indomethacin decreased diameter and vasomotion. Cessation of vasomotion elicited by BK was reverted by glibenclamide and TEA. SNP and Iloprost increased diameter and abolished vasomotion but restored both when combined with L-NA. The present study support the concept that a dissociation between vessel tone and vasomotion do exist and that NO (but not cGMP), ATP and TEA-sensitive K^+ channels have an important modulatory role on spontaneous vasomotion.

INTRODUÇÃO

1- A Microcirculação

A microcirculação pode ser entendida como unidade funcional do sistema circulatório que reúne uma série de estruturas com funções particulares e harmônicas organizadas de modo a atender as exigências metabólicas de cada tecido. Sob o ponto de vista anatômico, este sistema é composto por uma rede de vasos sanguíneos com diâmetros médios inferiores a 100 μm , denominados arteríolas, metarteríolas, capilares, vênulas pós-capilares, vênulas, comunicações arterio-venosas, sistema linfático e estruturas perivasais, imersos no fluido intersticial (Guyton & Hall, 2002).

As arteríolas são vasos oriundos das artérias de pequeno calibre que avançam em direção ao sistema capilar através de ramificações progressivas. Em certos leitos microvasculares, o sangue das arteríolas flui por metarteríolas até chegar aos capilares. Após passar pelos capilares, o sangue então retorna à circulação periférica por meio das vênulas.

As arteríolas apresentam uma parede vascular espessa e contínua, com camadas de células musculares lisas, capaz de fechar completamente a arteríola ou de permitir sua dilatação por várias vezes seu diâmetro tendo assim a capacidade de alterar, muito acentuadamente, o fluxo sanguíneo para os capilares. As metarteríolas não apresentam capa muscular contínua, mas apenas fibras musculares lisas que circundam os vasos em pontos intermitentes. Nos pontos em que os capilares emergem das metarteríolas, pode existir um ponto de

fibra muscular lisa denominado esfíncter pré-capilar cuja abertura ou fechamento regula o fluxo sanguíneo para os capilares (Guyton & Hall, 2002).

Devido à ausência de inervação nas arteríolas terminais e esfíncteres pré-capilares, o controle do fluxo sanguíneo nesses vasos é realizado por produtos do metabolismo liberados por tecidos circunjacentes.

Os capilares são estruturas extremamente delgadas, com paredes constituídas por uma camada de células endoteliais e membrana basal externa envolvida por fina rede de fibras de colágeno com diâmetro médio de 4 a 10 μm , sem camada muscular lisa. São vasos muito permeáveis que permitem trocas de nutrientes e de excretas celulares entre os tecidos e o sangue circulante. Podem ser divididos em capilares arteriais e venosos, dependendo da sua proximidade da metarteríola ou da vênula coletora (Guyton & Hall, 2002).

2- A Vasomotricidade

A regulação do fluxo sanguíneo nos capilares é realizada pelas arteríolas e metarteríolas através da vasomotricidade que é a variação espontânea do lúmen desses vasos (Bouskela & Grampp, 1992) que resulta de ciclos de contração e relaxamento das células da musculatura lisa vascular (CMLV) (Mauban & Wier, 2004).

A vasomotricidade espontânea é observada em vasos pré-capilares da microcirculação da pele (Rossi et al., 2006) e em uma infinidade de preparações experimentais incluindo a bolsa da bochecha de hamster (Bouskela & Grampp,

1992), músculo cremaster de rato (Faber et al., 1982) e mesentério de gato (Burrows & Johnson, 1981). Em outras preparações, a vasomotricidade pode ser induzida através da adição de agentes vasoconstrictores (Chemtob et al., 1992; Eddinger & Ratz, 1997), em resposta a alterações na pressão (Gustafsson, 1993) e ao estiramento (Hayashida et al., 1986) dos vasos.

A vasomotricidade acarreta oscilações lentas de fluxo (*flow motion*) (Aalkjær & Nilsson, 2005), fluxo intermitente (*flux motion*) (Wiernesperger & Bouskela, 2003) e flutuações rítmicas de hematócrito (Verbeuren et al., 1997). Além disso, esse fenômeno oscilatório não parece ser dependente de fatores sistêmicos uma vez que pode ser observada em preparações de vasos sanguíneos isolados (Rossi et al., 2006) e não apresenta correlação com outros ritmos fisiológicos como batimento cardíaco e a respiração (Schuster et al., 2004).

A importância funcional da vasomotricidade ainda permanece desconhecida. Alguns estudos envolvendo simulações em modelos matemáticos revelaram que a presença da vasomotricidade em uma rede microvascular aumenta o fluxo sanguíneo médio de 40 a 60% em relação à condição controle (sem oscilações no lúmen das arteríolas) (Ursino et al., 1996). Outros estudos sugerem que a vasomotricidade diminui a resistência no leito microvascular, assegura um fluxo sanguíneo intermitente, porém adequado, para tecidos afetados por uma reduzida oferta sanguínea (Bertuglia et al., 1991) e que também pode influenciar a troca de fluidos a nível capilar (Mayrovitz et al., 1977).

Muitos investigadores têm mostrado que a vasomotricidade é deflagrada após a contração arteriolar seguida de oscilações no potencial de membrana

(Wiernesperger & Bouskela, 2003; Conde et al., 2007).

A contração arteriolar é provocada pelo aumento da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) nas CMLV. Ela pode ser induzida *in vivo* pela presença de agentes vasoconstritores no sangue ou *in vitro* pela ligação de agonistas aos receptores de membrana nas CMLV (Koenigsberger et al., 2006). A ligação do agonista ao seu receptor ativa primeiramente a proteína G acoplada ao receptor que ativa em seguida a fosfolipase C (PLC). A PLC hidrolisa o bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) para formar diacilglicerol (DAG) e 1,4,5 trisfosfato de inositol (IP_3), que por sua vez, libera íons cálcio do retículo sarcoplasmático (RS). Os íons Ca^{2+} liberados se combinam com a calmodulina que então se liga à cinase de cadeia leve da miosina (Levy, 2004). O complexo Ca^{2+} - calmodulina - cinase de cadeia leve da miosina ativado fosforila uma das cadeias leves de cada cabeça de miosina. A cabeça da cadeia leve da miosina fosforilada interage com o filamento de actina originando os ciclos das pontes cruzadas e conseqüentemente a contração muscular (Guyton & Hall, 2002). A contração é inibida quando ocorre a defosforilação da cadeia leve da miosina e a diminuição da $[Ca^{2+}]_i$. (Levy, 2004).

O aumento de pressão intraluminal do vaso sanguíneo pode induzir também a contração das CMLV caracterizando um fenômeno denominado resposta miogênica (Bayliss, 1902). O estresse mecânico provocado pelo aumento da pressão intraluminal aumenta a $[Ca^{2+}]_i$ através da ativação dos canais ativados pelo estiramento localizados na membrana da CMLV (Takenaka et al., 1998). Uma vez ativados, esses canais medeiam a passagem de cátions mono e bivalentes como o K^+ , Na^+ e Ca^{2+} para o interior das CMLV (Davis et al., 1992), promovendo

o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ tanto diretamente através da entrada de cálcio quanto indiretamente por meio da despolarização e conseqüente abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Koenigsberger et al., 2006).

2.1-Mecanismos envolvidos no controle da vasomotricidade

Apesar da vasomotricidade ter sido primeiramente observada há mais de 150 anos (Jones, 1852), os mecanismos que a causam ou que a controlam ainda permanecem desconhecidos (Conde et al., 2007). Acredita-se que este fenômeno oscilatório dependa da interação de variáveis regulatórias e biomecânicas que atuam simultaneamente nos vasos sanguíneos, como por exemplo: as características das células musculares lisas, os mecanismos de controle local (que podem ser de natureza miogênica, neurogênica ou dependente do endotélio) e o padrão de ramificação da rede microvascular (Ursino et al., 1995).

A freqüência e a amplitude da vasomotricidade variam de acordo com o calibre dos vasos. Arteríolas proximais (com diâmetro entre 50 e 100 μ m) exibem freqüências de vasomotricidade da ordem de 2-3 ciclos por minuto (cpm) e amplitudes que correspondem a 10-20% do diâmetro médio enquanto as arteríolas terminais apresentam freqüências de vasomotricidade que variam entre 10 e 25 cpm e amplitudes que podem chegar até a 100% do diâmetro médio, levando à abertura e ao fechamento periódico desses vasos (Intaglietta, 1991). Esse padrão parece ser comum à maioria dos tecidos e presume-se que ele seja uma conseqüência do tamanho (volume) de um grupo de CMLV (células marca-passo)

que coordena este fenômeno (Intaglietta, 1989). Acredita-se que as células marca-passo estejam situadas prioritariamente próximo às bifurcações dos vasos sanguíneos, porque é nestas regiões que existe uma maior concentração de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L na superfície das CMLV e em segundo lugar a contração dos vasos sanguíneos parece se originar destes pontos (Goligorsky et al., 1995).

Segundo a hipótese elaborada por Folkow (1964), a vasomotricidade depende das células marca-passo que são capazes de produzir oscilações elétricas na membrana que podem ser transmitidas para as células vizinhas através de *gap junctions*. A frequência desta atividade oscilatória é ajustada pelo grau de despolarização da membrana que por sua vez é determinado pela intensidade de tensão a qual as células marca-passo estão submetidas. A geração de oscilações espontâneas no potencial de membrana envolve um delicado equilíbrio entre correntes de membrana dentre as quais as correntes polarizantes de K^+ exercem um importante papel (Bouskela & Grampp, 1992; Conde et al., 2007).

Os canais de K^+ são os principais reguladores do potencial de membrana das CMLV e, por conseguinte são importantes determinantes do tônus e do diâmetro vascular (Sobey, 2001). A abertura desses canais promove a saída de íons K^+ , e a conseqüente hiperpolarização das CMLV. A hiperpolarização induz o fechamento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, diminuição da entrada de Ca^{2+} e vasodilatação. Por outro lado, o fechamento destes canais leva à despolarização da CMLV, abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, aumento da

$[Ca^{2+}]_i$ e vasoconstrição (Jackson, 2005; Sobey, 2001).

As CMLV expressam quatro tipos diferentes de canais de K^+ , os canais de K^+ dependentes de ATP (K_{ATP}), canais retificadores de K^+ (K_{IR}), os canais de K^+ dependentes de voltagem (K_V) e canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} de alta condutância (BK_{Ca}).

Os canais de K_{ATP} foram inicialmente descritos por Noma (1983) em miócitos cardíacos. Posteriormente, outros estudos mostraram a expressão destes canais em outros tipos celulares incluindo as CMLV (Jackson, 2000). Esses canais fecham à medida em que a concentração intracelular de ATP aumenta. Além disso, os canais de K_{ATP} podem ser regulados por outras vias de transdução de sinal, independentemente das variações na concentração de ATP (Jackson, 2005). Alguns estudos mostraram que a glibenclamida, um inibidor seletivo dos canais de K_{ATP} , causou vasoconstrição em diversos leitos microvasculares de diferentes espécies, incluindo a humana, evidenciando que esses canais encontram-se ativos em condições de repouso (Jackson, 2000; Wilson et al., 2000).

Os canais de K_{IR} foram descobertos por Katz (1949) em músculo esquelético e posteriormente identificados tanto em células excitáveis quanto nas não excitáveis (Jackson, 2000). Esse nome advém do fato desses canais conduzirem íons K^+ para o interior das células quando o potencial de membrana encontra-se mais negativo do que o potencial de equilíbrio dos íons K^+ (Jackson, 2005). Quando a concentração extracelular de íons K^+ sofre um pequeno acréscimo, paradoxalmente ocorre hiperpolarização e relaxamento das CMLV

devido à saída de íons K^+ (Sobey, 2001).

Os canais de K_V são ativados pela despolarização das CMLV quando o potencial de membrana varia entre -35 e -55 mV, participando assim, da regulação do potencial de membrana por *feedback* negativo (Sobey, 2001; Jackson, 2005). A utilização de 4-aminopiridina, um bloqueador dos canais de K_V amplamente empregado, leva à despolarização e vasoconstricção sugerindo que esses canais estão ativos em condições basais (Sobey, 2001)

Os canais de BK_{Ca} são os canais de K^+ mais abundantes nas CMLV sendo ativados pelo aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e pela despolarização dessas células (Jackson, 2005). O aumento dos níveis de Ca^{2+} no espaço abaixo da membrana sarcoplasmática (Ca^{2+} sparks), em decorrência da liberação de íons Ca^{2+} pela ativação dos receptores de rianodina no retículo sarcoplasmático, tem sido apontado como importante regulador da atividade desses canais (Sobey, 2001). Os agentes farmacológicos mais amplamente empregados para inibir esses canais são a tetraetilamônia (TEA), caribdotoxina e iberiotoxina (Jackson, 2005).

A vasomotricidade é diretamente relacionada ao tônus vascular, assim qualquer estímulo fisiológico e farmacológico que altere a tensão na parede do vaso pode afetar essa atividade (Intaglietta, 1989). O tônus vascular é regulado pela $[Ca^{2+}]_i$ e pela sensibilidade da maquinaria contrátil das CMLV pelos íons Ca^{2+} (Somlyo & Somlyo, 1994).

A $[Ca^{2+}]_i$ é determinada de um lado pelo equilíbrio entre o influxo e liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares e do outro pela extrusão e seqüestro de íons Ca^{2+} (Nilsson, 1998). A sensibilidade ao Ca^{2+} pelo aparato contrátil é

regulada pelo equilíbrio entre a fosforilação e defosforilação da cadeia leve da miosina (Lincoln et al., 2001).

As células endoteliais situadas na interface entre o sangue e as CMLV exercem um importante papel na modulação do tônus vascular (Vanhoutte, 2003; Koenigsberger et al., 2005), não apenas secretando substâncias vasodilatadoras como também aumentando o tônus vasoconstrictor via geração de endotelina e prostanóides vasoconstrictores e via conversão da angiotensina I em angiotensina II na superfície endotelial (Deanfield et al., 2006).

As células endoteliais também expressam vários tipos de canais de K^+ , entretanto pouco se sabe a respeito de suas funções nessas células (Jackson, 2005). Estudos realizados em células endoteliais de diferentes tecidos mostraram que elas expressam 5 tipos de canais de K^+ : K_{ATP} , K_V , K_{IR} e IK_{Ca} (canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} de condutância intermediária) e SK_{Ca} (canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} de pequena condutância). Esses canais parecem ser importantes para a regulação do potencial de membrana da célula endotelial e para sinalização entre essas células. As alterações no potencial de membrana de uma célula endotelial podem ser transmitidas para outra por acoplamento elétrico através de *gap junctions*. Além disso, mudanças nos potenciais de membrana das células endoteliais podem ser transmitidas por acoplamento elétrico (através das junções mioendoteliais) também para as CMLV que então alteram seu tônus apropriadamente (Jackson, 2005).

Os mais importantes fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRFs) são o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante

derivado do endotélio (EDHF) (Vanhoutte, 2003)

Furchgott e Zawadski (1980) foram os primeiros pesquisadores a demonstrar claramente a importância do endotélio para o relaxamento vascular. Eles mostraram que a vasodilatação em resposta à acetilcolina era somente observada nas preparações de anéis de aorta de coelho que tinham o endotélio preservado. Estudos subsequentes revelaram que a vasodilatação induzida pela acetilcolina e outros agentes vasodilatadores como a bradicinina, histamina e a 5-hidroxitriptamina era decorrente da liberação de uma substância efêmera que inicialmente ficou conhecida como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (Moncada & Higgs, 2006). Alguns anos mais tarde, Ignarro e colaboradores (1987) e Palmer e colaboradores (1987) chegaram independentemente à conclusão de que o EDRF era o NO.

O NO é produzido através da enzima sintase de óxido nítrico (NOS) que ocorre nas isoformas neuronal (nNOS ou NOS1), induzida (iNOS ou NOS2) e endotelial (eNOS ou NOS3). A eNOS é a isoforma predominante na vasculatura sendo responsável pela maior parte do NO produzido neste tecido (Förstermann & Münzel, 2006). Uma eNOS funcional converte seu substrato L-arginina em L-citrulina e NO na presença de NADPH, O₂ e de seu co-fator essencial, a tetra-hidrobiopterina (Förstermann & Münzel, 2006). Uma vez produzido pelo endotélio, o NO se difunde para o interior das CMLV onde induz a produção de GMPc através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (Ignarro & Kadowitz, 1985). O aumento dos níveis celulares de GMPc diminuem a [Ca²⁺]_i (Cohen & cols., 1999) bem como a sensibilidade do aparato contrátil aos íons Ca²⁺ (Ungvari

& Koller, 2001), causando o relaxamento das CMLV.

A PGI₂ foi o primeiro dos principais vasodilatadores produzidos pelo endotélio a ser descoberto (Parkington et al., 1996). Em 1976, Moncada e colaboradores relataram que uma prostaglandina gerada pelo tecido vascular tinha a capacidade de dilatar tiras de artérias pré-contraídas. Posteriormente essa prostaglandina foi identificada como PGI₂ (Whittaker et al., 1976). A PGI₂ é o principal metabólito do ácido araquidônico produzido pela enzima ciclooxigenase nas células endoteliais (Moncada & Vane, 1979). A ligação da PGI₂ ao seu receptor específico (receptor IP), situado na superfície da membrana das CMLV, ativa a enzima adenilato ciclase (Gryglewski et al, 1991; Wise & Jones, 1996), responsável pela síntese de AMPc. A elevação da concentração intracelular de AMPc, induz vasodilatação tanto pela redução da [Ca²⁺]_i (Conti & Adelstein, 1981) quanto pela diminuição da sensibilidade da maquinaria contrátil aos íons Ca²⁺ (De Lanerolle et al., 1984).

A diminuição da [Ca²⁺]_i induzida pelo GMPc e AMPc envolve o bombeamento de íons Ca²⁺ do citossol para o interior do retículo sarcoplasmático (RS) pela Ca²⁺-ATPase do RS (SERCA) e a extrusão de íons Ca²⁺ pelas enzimas Ca²⁺-ATPase e Troca Na⁺-Ca²⁺ da membrana sarcoplasmática (Nishimura, 2006). Por outro lado, os mecanismos relacionados à redução da sensibilidade ao Ca²⁺ pela maquinaria contrátil das CMLV induzidos pelo GMPc incluem a ativação da via da fosfatase da cadeia leve da miosina, inibição da proteína quinase C (PKC) e inibição da RhoA (Ungvari & Koller, 2001). Entretanto, ainda não se conhece os mecanismos pelos quais o AMPc diminui a sensibilidade do aparato contrátil aos

íons Ca^{2+} (Pfitzer, 2001).

O NO e a PGI_2 através de seus segundos mensageiros (GMPc e AMPc, respectivamente) podem hiperpolarizar a musculatura lisa vascular subjacente através da ativação dos canais de K_v , K_{IR} , K_{ATP} e BK_{Ca} (Jackson, 2005). Porém diferentemente da PGI_2 , o NO tem a capacidade de ativar canais de K^+ diretamente (Bolotina et al., 1994).

No final da década de 80, tornou-se evidente que existia mais um mecanismo dependente do endotélio capaz de causar o relaxamento das CMLV. Este mecanismo foi caracterizado por uma hiperpolarização resistente a inibidores da produção de NO e de PGI_2 que pode ocorrer sem aumento dos níveis de nucleotídeos cíclicos nas CMLV (Carvalho et al., 2005). Esse terceiro vasodilatador produzido pelo endotélio foi denominado EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio) e, ao contrário do EDRF, ainda não possui identidade química definida (Félétou & Vanhoutte, 2006). É provável que vários fatores distintos possam desempenhar o papel do EDHF em circunstâncias específicas (Laurindo et al., 2005). As identidades mais prováveis do EDHF são: metabólitos do ácido araquidônico derivados do citocromo P450, junções mioendoteliais, íons K^+ e peróxido de hidrogênio (Griffith, 2004; Bryan Jr & et al., 2005; Laurindo et al., 2005). A hiperpolarização mediada pelo EDHF envolve uma elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nas células endoteliais, com conseqüente abertura dos canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} de condutância intermediária (IK_{Ca}) e pequena (SK_{Ca}) causando saída de íons K^+ e hiperpolarização das células endoteliais. A hiperpolarização é transmitida para o músculo liso subjacente por acoplamento

elétrico via junções mioendoteliais e/ou pelo acúmulo dos íons K^+ no espaço intercelular (Féléto & Vanhoutte, 2006), que por sua vez, ativam a Na^+/K^+ ATPase e os canais retificadores de K^+ (K_{IR}) (Edwards et al., 1998). A hiperpolarização então inibe os canais de cálcio dependentes de voltagem e diminui o influxo de cálcio nas CMLV induzindo relaxamento (Koenigsberger et al., 2005).

A influência do endotélio na vasomotricidade depende do leito vascular (Aalkjær & Nilsson, 2005). Em alguns estudos, a remoção do endotélio ou inibição da produção de NO por análogos da L-arginina inibe a vasomotricidade (Jackson, 1988; Jackson et al, 1991; Gustafsson et al., 1993; Peng et al., 2001; Okasaki et al., 2003). Em outros estudos, a vasomotricidade é observada mesmo na ausência do endotélio (Griffith & Edwards, 1993; Bertuglia, 1995; Sell et al., 2002).

Com o objetivo de investigar a relação entre o diâmetro arteriolar, a vasomotricidade e as correntes de K^+ , nós estudamos as influências do NO e da PGI_2 no diâmetro arteriolar médio e na modulação da vasomotricidade, uma vez que estas substâncias são capazes de regular tanto o tônus das CMLV quanto de ativar canais de K^+ . Sendo assim, o papel do NO e da PGI_2 em termos de diâmetro arteriolar médio e de frequência e amplitude de vasomotricidade foram avaliados na microcirculação da bolsa da bochecha do hamster através da aplicação tópica de acetilcolina (ACh) e bradicinina (BK), agonistas da produção de EDRFs, como o NO e a PGI_2 , adição de N^{ω} -nitro-L-arginine (L-NA) e indometacina, inibidores da síntese de NO (Moncada et al., 1991) e de PGI_2 , respectivamente, bloqueio de canais de K^+ usando a glibenclamida e TEA, adição

de nitropussiado de sódio (SNP), um doador exógeno de NO e iloprost um análogo estável da PGI₂ (Bouskela & Rubanyi, 1995). Os efeitos da atropina, um antagonista do receptor muscarínico, e do azul de metileno, um inibidor da síntese de GMPc (Ignarro & Kadowitz, 1985) foram também observados usando a mesma preparação experimental.

OBJETIVO

Investigar a influência do NO, da PGI₂ e dos canais de K⁺ na relação entre o diâmetro arteriolar e a vasomotricidade espontânea.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação experimental

As experiências foram realizadas na bolsa da bochecha de 98 hamsters machos, *Mesocricetus auratus*, com massa corporal de $104,5 \pm 2,6$ g (média \pm desvio-padrão) conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Estes animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus de Botucatu, SP e mantidos no Laboratório de Pesquisas em Microcirculação com ciclos de dia/noite, temperatura e umidade controlados. Após sua chegada, os animais foram alimentados com a ração padrão usada para animais de laboratório Nuvilab (Nuvital, Curitiba, Paraná, Brasil).

A anestesia dos animais foi induzida por uma injeção intraperitoneal de 0,1-0,2 ml de pentobarbital sódico (Sanofi, Paris, França 60mg/mL) e mantida com α -cloralose [1,2-O-(2,2,2-trichloretilideno) α -D-glucofuranose, Merck, Darmstadt, Alemanha, 100mg/kg] administrada através da veia femoral por um catéter de polietileno. Em seguida foi realizada uma traqueostomia para facilitar a respiração espontânea do animal. Durante a cirurgia e o experimento subsequente, a temperatura dos animais foi mantida a 36,5°C por uma manta de aquecimento controlada por um termistor retal (Thermostat System, modelo 750, Uppsala Processdata AB, Uppsala, Suécia).

A bolsa da bochecha do hamster foi cuidadosamente evertida utilizando um cotonete umedecido e teve sua parte distal, não muscular, identificada e fixada a

um anel de silicone. Em seguida, com auxílio do esteromicroscópio (Leica, modelo M651, Wetzlar, Alemanha) foi realizada uma incisão na camada superior da bolsa da bochecha e remoção do tecido areolar com intuito de permitir a observação da microcirculação da parte inferior ao microscópio (Figura 1).

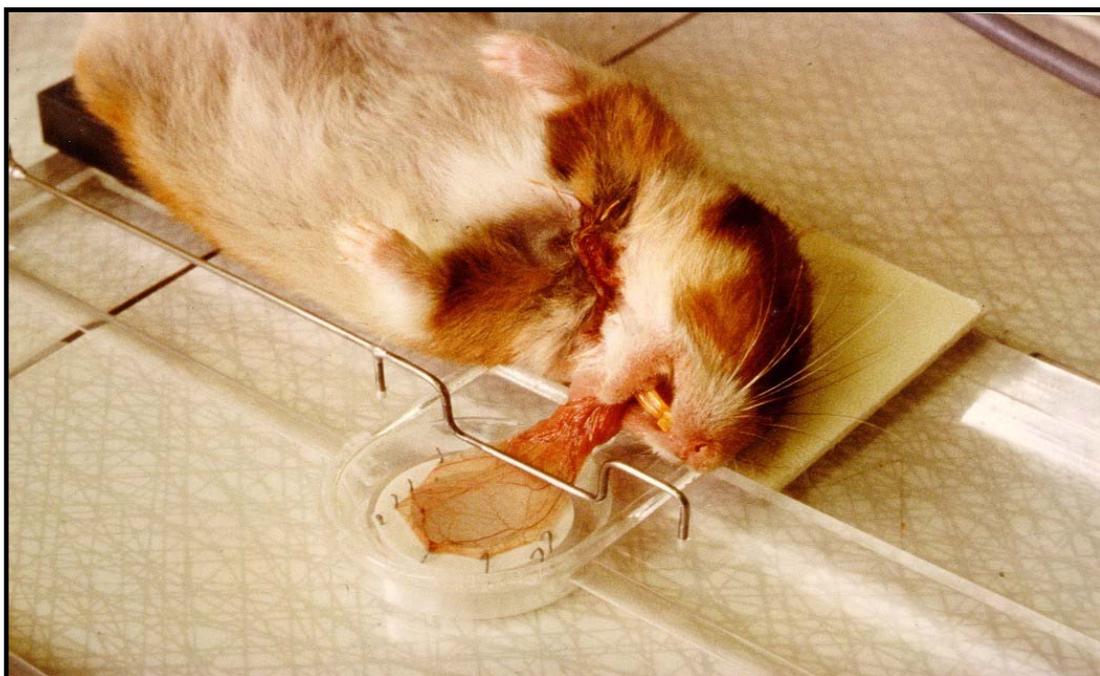


Figura 1: Preparação da bolsa da bochecha do hamster apta a visualização em microscópio.

Durante a preparação e a experiência subsequente, a bolsa da bochecha foi continuamente superfundida, com uma velocidade de 4,6ml/min, com uma solução salina tamponada por bicarbonato e HEPES (N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2 ácido etanossulfônico) (composição: NaCl 110,0mM, KCl 4,7mM, CaCl₂ 2,0mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 18,0mM, HEPES 15,39mM e HEPES sal de Na⁺ 14,61mM). O pH foi ajustado em 7,4 borbulhando a solução de superfusão

continuamente com 5% CO₂ – 95% N₂. Durante as experiências, a mesma mistura gasosa foi também colocada sobre a câmara experimental para manter o nível da pressão parcial de O₂, monitorada por um eletródio de O₂, em 12-15mmHg na solução de superfusão. A temperatura da solução de superfusão foi mantida em 36,5° C (Bouskela & Grampp, 1992).

As soluções contendo as drogas atropina, azul de metileno, ACh, BK, glibenclâmida, indometacina, L-NA, SNP, papaverina e TEA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e iloprost (Schering AG, Berlim, Alemanha) foram preparadas para cada experimento. As drogas foram dissolvidas na solução de superfusão e aplicadas topicamente com a finalidade de evitar efeitos sistêmicos como, por exemplo, alterações na pressão sanguínea, que poderiam comprometer a análise dos dados. As curvas dose-resposta foram cumulativas e as medidas de diâmetro foram sempre realizadas no mesmo campo de observação para cada arteríola estudada. Por isso, a escolha de cada arteríola estudada levou em consideração a presença de células adiposas e bifurcações que permitem o retorno exatamente ao mesmo campo de observação.

Medida do diâmetro arteriolar

Para as medidas do diâmetro arteriolar, as preparações foram colocadas em um microscópio intravital (Leitz, Wetzlar, Alemanha) acoplado a um circuito fechado de televisão (magnificação final de 400x) onde permaneceram em acomodação por um período de 30 min a 36,5°C. Foram incluídas nesse estudo as preparações que apresentavam: (1) um bom tônus vascular, ou seja, aumento

do diâmetro arteriolar médio em torno de $58\pm 3\%$ após aplicação tópica de papaverina ($10\mu\text{g}/\text{mL}$), em relação ao diâmetro controle (teste feito em 12 controles separados no final do experimento), (2) fluxo de sangue em todas as partes do leito vascular incluindo as grandes veias (onde as hemácias individuais não devem ser visualizadas na imagem da corrente sanguínea) e (3) ausência de leucócitos aderidos à parede vascular. Caso os 3 critérios fossem atendidos, os experimentos eram realizados registrando em *videotape* 3 min de imagens de uma ou de duas arteríolas selecionadas por preparação em condições controle (antes da adição de cada droga) e subsequente em intervalos de 10-15 min, após cada intervenção experimental.

A partir das gravações em *videotape*, o registro contínuo do diâmetro interno das arteríolas foi obtido através de um monitor que faz o alinhamento vertical e o corte óptico da imagem (Image Shearing Device, modelo 908, Vista Electronics, San Diego, CA, USA; Figura 2).



Figura 2: Representação da imagem no monitor que faz o alinhamento vertical e corte óptico da imagem, permitindo o registro das variações do diâmetro interno dos vasos.

As médias temporais do diâmetro arteriolar interno, a frequência e a amplitude da vasomotricidade foram inferidas usando todo período durante o qual o diâmetro foi registrado. Quando presente, a vasomotricidade normalmente faz com que o vaso sanguíneo oscile simetricamente em torno de um valor médio estável. Apenas em poucas experiências, a vasomotricidade observada foi irregular e, nestes casos, as estimativas do diâmetro médio arteriolar foram feitas por métodos gráficos (Bouskela & Grampp, 1992). Em todas as experiências, a frequência e amplitude da vasomotricidade foram determinadas a partir de cada registro de diâmetro. A amplitude da vasomotricidade foi definida como a diferença entre a média do diâmetro arteriolar interno máximo e mínimo e a frequência da vasomotricidade como o inverso do período médio do ciclo (Bouskela, 1989; Slaaf et al., 1987). Para as curvas dose-resposta, os valores de diâmetro estão apresentados como frações normalizadas pelos valores de diâmetro obtidos na situação controle (100%), ou seja, no início de cada experimento, antes da aplicação tópica de qualquer droga.

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média, a menos que seja mencionado. A significância estatística foi determinada usando-se o teste t de Student. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando houve uma probabilidade menor que 1% ($p < 0,01$). O método de Bonferroni foi utilizado para compensar os múltiplos testes.

RESULTADOS

Todas as preparações investigadas em condições controle mostraram oscilações rítmicas de diâmetro arteriolar (vasomotricidade). Essa atividade vasomotora foi estudada mais detalhadamente em 105 arteríolas com diâmetros internos que variavam de 14,0 a 56,0 μm (média \pm erro padrão; $36,2 \pm 1,1 \mu\text{m}$). A frequência da vasomotricidade variou entre 6 e 11 ciclos/ min [$8,6 \pm 0,2$ ciclos/min (cpm)]. A amplitude da vasomotricidade variou entre 4,8 e 12,2 μm ($6,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$).

Inibição da síntese de NO

Para investigar os efeitos da inibição da síntese de NO no diâmetro arteriolar médio e na vasomotricidade espontânea, a preparação foi superfundida com a solução controle a qual foi adicionada L-NA em diferentes concentrações. L-NA (10^{-10} a 10^{-6} M) reduziu de maneira concentração-dependente o diâmetro arteriolar médio. Em concentrações inferiores a 10^{-8} M, a adição de L-NA não teve efeito na frequência nem na amplitude da vasomotricidade arteriolar espontânea (Figuras 3 a, b e c). Entretanto, o L-NA nas maiores concentrações utilizadas reduziu (10^{-7} M) e finalmente aboliu a vasomotricidade (10^{-6} M; n=6).

Efeitos do azul de metileno

Para avaliar os efeitos da inibição da produção do GMPc no diâmetro arteriolar médio e na vasomotricidade arteriolar espontânea (frequência e amplitude), a preparação foi superfundida com azul de metileno, um inibidor da

enzima guanilato ciclase solúvel. O azul de metileno (10^{-7} - 10^{-5} M) induziu vasoconstrição sem modificações significativas na frequência ou na amplitude da vasomotricidade (Figuras 3 d, e e f; n=7). Não foi possível utilizar concentrações de azul de metileno mais elevadas porque ele tingia a preparação de azul, não permitindo a visualização da bolsa da bochecha ao microscópio. Na presença de 10^{-6} M de azul de metileno, a adição tanto de 10^{-6} M quanto de 10^{-4} M de L-NA aboliu totalmente a vasomotricidade sem nenhuma vasoconstrição adicional (Figuras 3 g, h e i).

Efeitos da glibenclamida e do tetraetilamônio na inibição da síntese de NO

A inibição da síntese de NO pela aplicação tópica de L-NA (10^{-6} M) induziu vasoconstrição e cessação da vasomotricidade. A adição de glibenclamida (10^{-6} M, um inibidor dos canais de K_{ATP} , à solução de superfusão contendo L-NA em concentração equimolar, restaurou a vasomotricidade sem ocasionar nenhuma variação significativa de diâmetro. Por outro lado, a adição de TEA (5mM), um inibidor dos canais de K_{Ca} e dos canais de K_V , à solução de superfusão contendo L-NA (10^{-6} M) provocou vasodilatação e não restaurou a vasomotricidade (Figuras 4 a, b, c e d; n= 8).

Efeitos da acetilcolina (ACh)

Os efeitos da aplicação tópica de ACh no diâmetro arteriolar médio e na vasomotricidade estão mostradas nas figuras 5 a, b e c. A ACh (10^{-7} - 10^{-5} M)

aumentou de maneira concentração-dependente o diâmetro arteriolar e diminuiu a frequência e amplitude da vasomotricidade (n=6). A inibição do receptor muscarínico pela atropina a 10^{-7} M (Figuras 5 d, e e f; n=7) ou o bloqueio da síntese de NO induzido pelo L-NA a 10^{-6} M (Figuras 5, g, h e i; n=7) diminuiu a vasodilatação arteriolar induzida pela ACh e aumentou a frequência de vasomotricidade quando comparada a condição controle.

A glibenclamida (10^{-6} M) e o TEA (5mM) reduziram a resposta vasodilatadora induzida pela ACh (10^{-7} M) e alteraram o padrão da vasomotricidade induzida pela ACh (10^{-7} M): a glibenclamida diminuiu a sua frequência enquanto o TEA reduziu sua frequência e aumentou sua amplitude (Figura 6).

Efeitos da bradicinina (BK)

A adição de BK em concentrações crescentes (10^{-10} M – 10^{-5} M) promoveu um aumento progressivo do diâmetro arteriolar médio, diminuição e finalmente cessação da vasomotricidade a 10^{-7} M como mostrado nas figuras 7 a, b and c (n=6). A adição de L-NA (10^{-5} M), suprimiu a vasodilatação induzida pela BK, aumentou a frequência e reduziu a amplitude da vasomotricidade (Figuras 7 d, e and f; n=7). A indometacina, um inibidor não seletivo da ciclooxigenase, inibiu a vasodilatação induzida pela BK, aumentou a frequência e amplitude da vasomotricidade em relação a aplicação da BK isoladamente, como mostrado nas figuras 7 g, h e i (n=6). A combinação de L-NA (10^{-6} M) e indometacina (10^{-6} M),

reduziu a resposta vasodilatadora induzida pela BK (10^{-10} - 10^{-5} M) e diminuiu a frequência e a amplitude da vasomotricidade (Figuras 7 j, l e m; n=7).

A glibenclamida (10^{-6} M) e TEA (5mM) atenuaram a resposta vasodilatadora induzida pela BK (10^{-7} M) e restauraram a frequência e a amplitude da vasomotricidade como mostrado na figura 8.

Efeitos do nitroprussiato de sódio (SNP)

Os efeitos do SNP no diâmetro arteriolar médio e na vasomotricidade são mostrados nas figuras 9 a, b e c. Esse nitrovasodilatador induziu um aumento do diâmetro arteriolar médio de maneira concentração-dependente (10^{-10} – 10^{-6} M), supressão e cessação da vasomotricidade a 10^{-6} M (n=6).

Para investigar se o doador exógeno de NO poderia restaurar o diâmetro arteriolar médio e a vasomotricidade após adição de L-NA (10^{-6} M), o SNP nas diferentes concentrações supracitadas foi topicamente aplicado à preparação na presença de L-NA (Figuras 9 d, e e f). Os efeitos de L-NA no diâmetro arteriolar foi completamente abolido pelo SNP a 10^{-9} M, porém a frequência e amplitude da vasomotricidade não foi restaurada ao nível da condição controle (n=6).

Efeitos do Iloprost

Os efeitos das diferentes concentrações de iloprost (10^{-12} M a 10^{-6} M) no diâmetro arteriolar médio e na vasomotricidade são mostrados nas figuras 10 a, b e c. Enquanto a vasodilatação pode ser detectada já em 10^{-12} M, concentrações

mais elevadas de iloprost foram necessárias para reduzir significativamente a frequência (10^{-11} M) e a amplitude (10^{-8} M) da vasomotricidade. Entretanto, em concentrações entre 10^{-11} e 10^{-10} M o análogo estável da PGI_2 causou aumento significativo da amplitude da vasomotricidade. A abolição completa da vasomotricidade induzida pelo iloprost a 10^{-7} M ocorreu paralelamente ao aumento significativo do diâmetro arteriolar médio (n=6).

Para investigar se o análogo estável da PGI_2 poderia restaurar o diâmetro arteriolar médio e a vasomotricidade após adição de L-NA (10^{-6} M), o iloprost nas concentrações supracitadas foi topicamente aplicado à preparação na presença de L-NA como mostrado nas figuras 10 d, e e f. A vasomotricidade foi restaurada ao nível do controle pelo iloprost nas concentrações entre 10^{-12} e 10^{-9} M. Entretanto, as concentrações mais elevadas do análogo estável da PGI_2 reduziram a frequência e a amplitude da vasomotricidade. Ao contrário da vasomotricidade, a vasoconstrição induzida pelo L-NA foi abolida somente com altas concentrações (10^{-10} - 10^{-7} M) de iloprost (n=6).

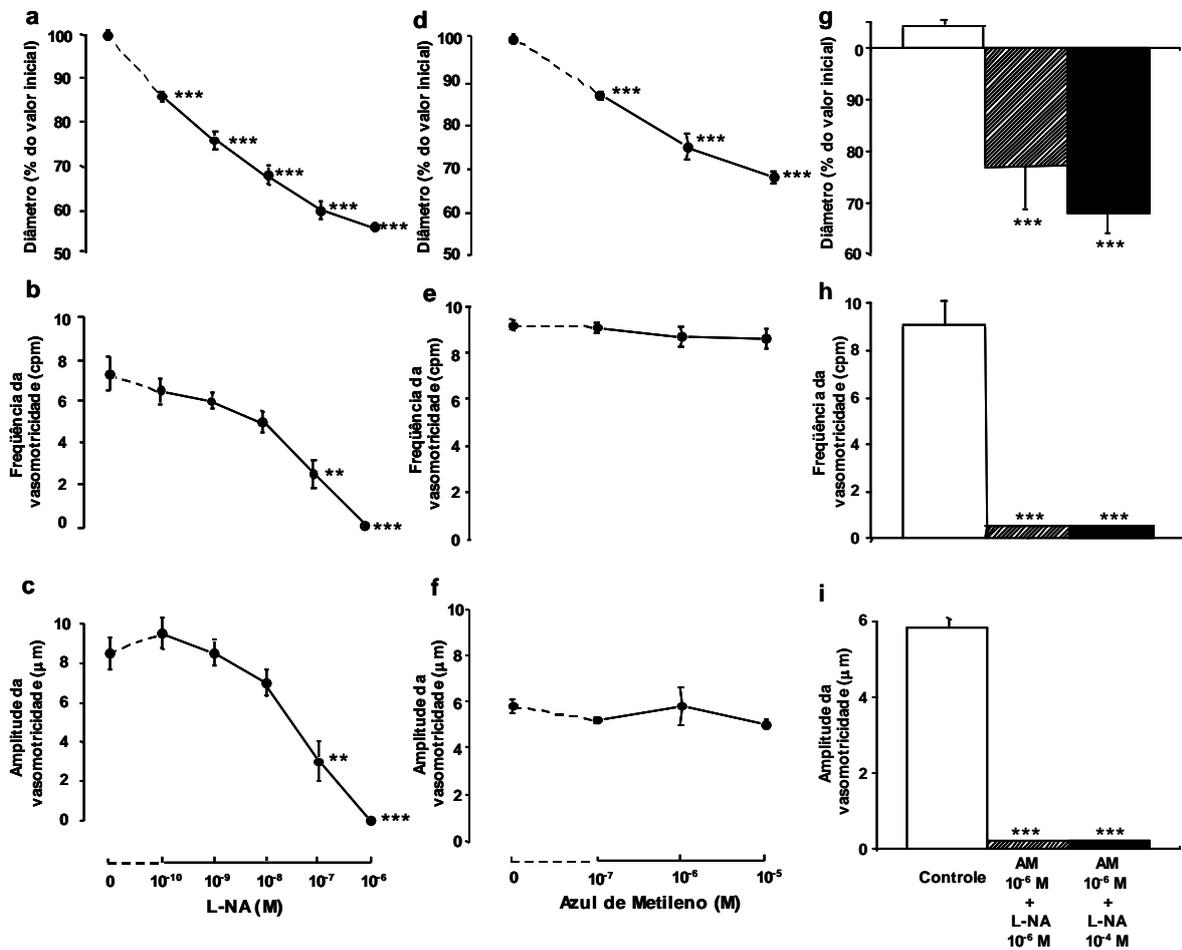


Figura 3: Relação entre concentrações crescentes de N^ω-nitro-L-arginina (L-NA) e azul de metileno (AM), adicionadas a solução de superfusão, o diâmetro arteriolar e a vasomotricidade em 13 arteríolas de 12 hamsters. **a** e **d**: Relação entre a concentração das drogas e o diâmetro arteriolar médio. **b**, **c**, **e** e **f**: Relação entre as concentrações das drogas e a freqüência e amplitude da vasomotricidade. Medida do diâmetro arteriolar (**g**) e freqüência e amplitude da vasomotricidade (**h** e **i**) sob condições controle e após a adição de L-NA (10^{-6} M) em combinação com AM (10^{-6} M) ou de L-NA (10^{-4} M) em combinação com AM (10^{-6} M) a solução de superfusão em 6 arteríolas. Os valores de diâmetro foram apresentados como frações normalizadas pelos valores do controle (100%) obtidos no início de cada experimento. Os asteriscos indicam a diferença entre os valores controle e os valores obtidos após a adição das drogas aos níveis de significância estatística de: 1%(*), 0,2% (**) e 0,02% (***) . Todos os registros foram realizados 10-15 min depois de cada mudança na solução de superfusão.

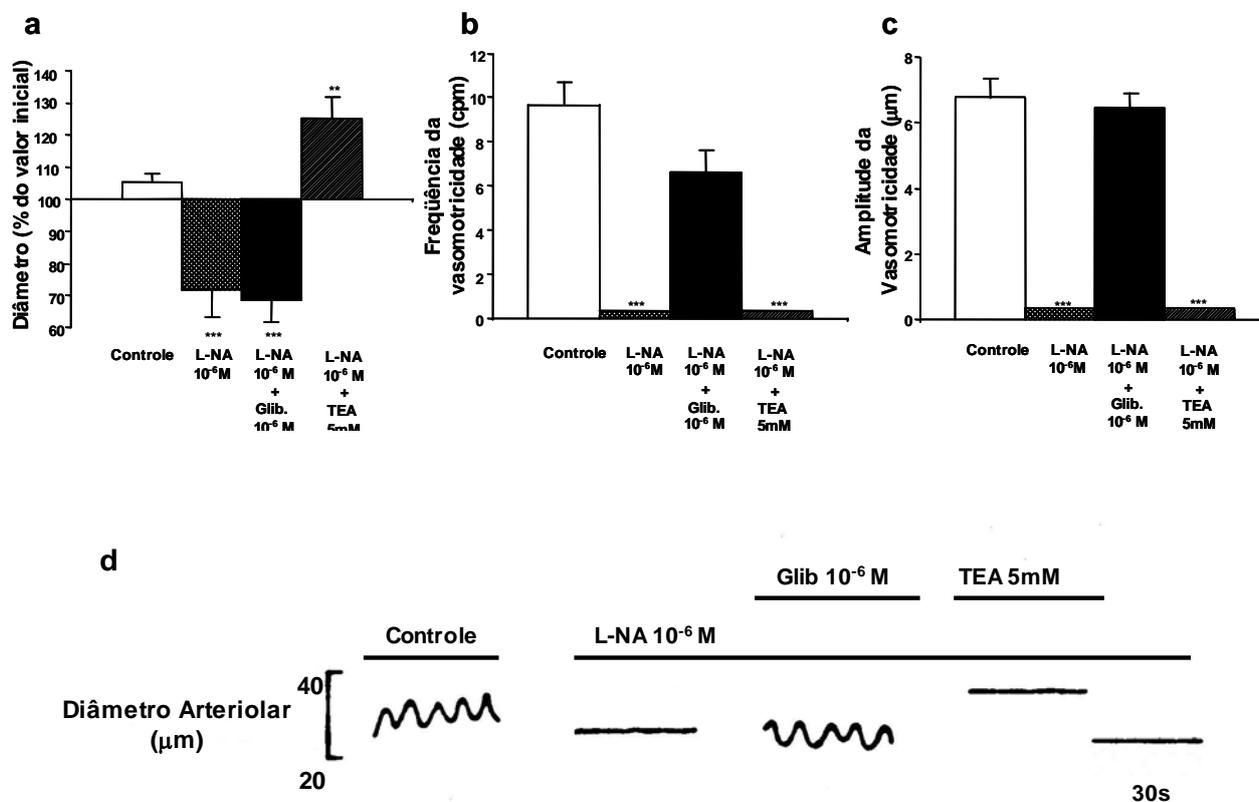


Figura 4: Medida do diâmetro arteriolar (a) e frequência e amplitude da vasomotricidade (b e c) de 8 arteríolas de 6 hamsters sob condições controle e após a adição de N^ω-nitro-L-arginina (L-NA 10⁻⁶ M) combinado ou não com glibenclamida (Glib; 10⁻⁶ M) e cloreto de tetraetilamônio (TEA; 5mM) a solução de superfusão. Os valores de diâmetro foram apresentados como frações normalizadas pelos valores do controle (100%) obtidos no início de cada experimento. **d:** Registros de diâmetro em uma arteríola em condições controle na ausência e na presença de glibenclamida (Glib) a 10⁻⁶ M e cloreto de tetraetilamônio (TEA) a 5mM na solução de superfusão. Os asteriscos indicam a diferença entre os valores controle e os valores obtidos após a adição das drogas aos níveis de significância estatística de: 0,2% (**) e 0,02% (***). Todos os registros foram realizados 10-15 min depois de cada mudança na solução de superfusão.

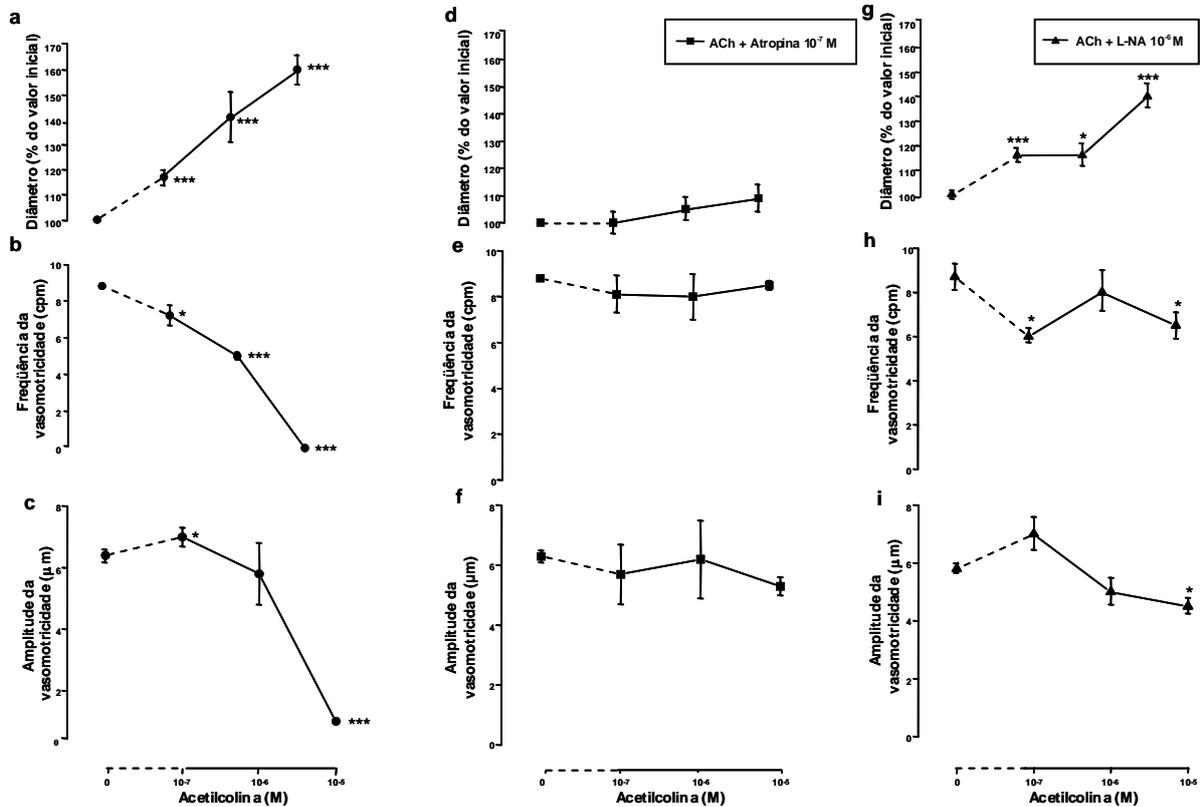


Figura 5: Relação entre a adição de concentrações crescentes de acetilcolina (ACh) em combinação ou não com atropina a $10^{-7}M$ e N^{ω} -nitro-L-arginina (L-NA) a $10^{-6}M$ a solução de superfusão, o diâmetro arteriolar e a vasomotricidade em 20 arteríolas de 18 hamsters. **a, d e g:** Relação entre a concentração das drogas e o diâmetro arteriolar médio. **b, c, e, f, h e i:** Relação entre as concentrações das drogas e a freqüência e amplitude da vasomotricidade. Os valores de diâmetro foram apresentados como frações normalizadas pelos valores do controle (100%) obtidos no início de cada experimento. Os asteriscos indicam a diferença entre os valores controle e os valores obtidos após a adição das drogas aos níveis de significância estatística de: 1%(*), 0,2% (**) e 0,02% (***). Todos os registros foram realizados 10-15 min depois de cada mudança na solução de superfusão.

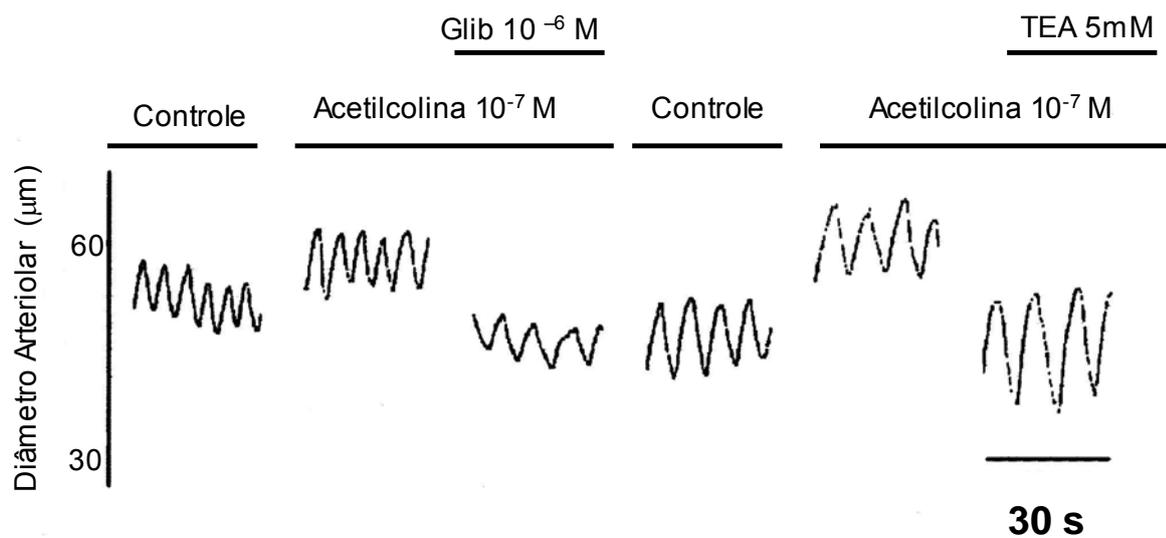


Figura 6: Registros de diâmetro em uma arteríola em condições controle na ausência e na presença de glibenclamida (Glib) a 10^{-6} M e cloreto de tetraetilamônio (TEA) a 5mM na solução de superfusão contendo acetilcolina (10^{-7} M).

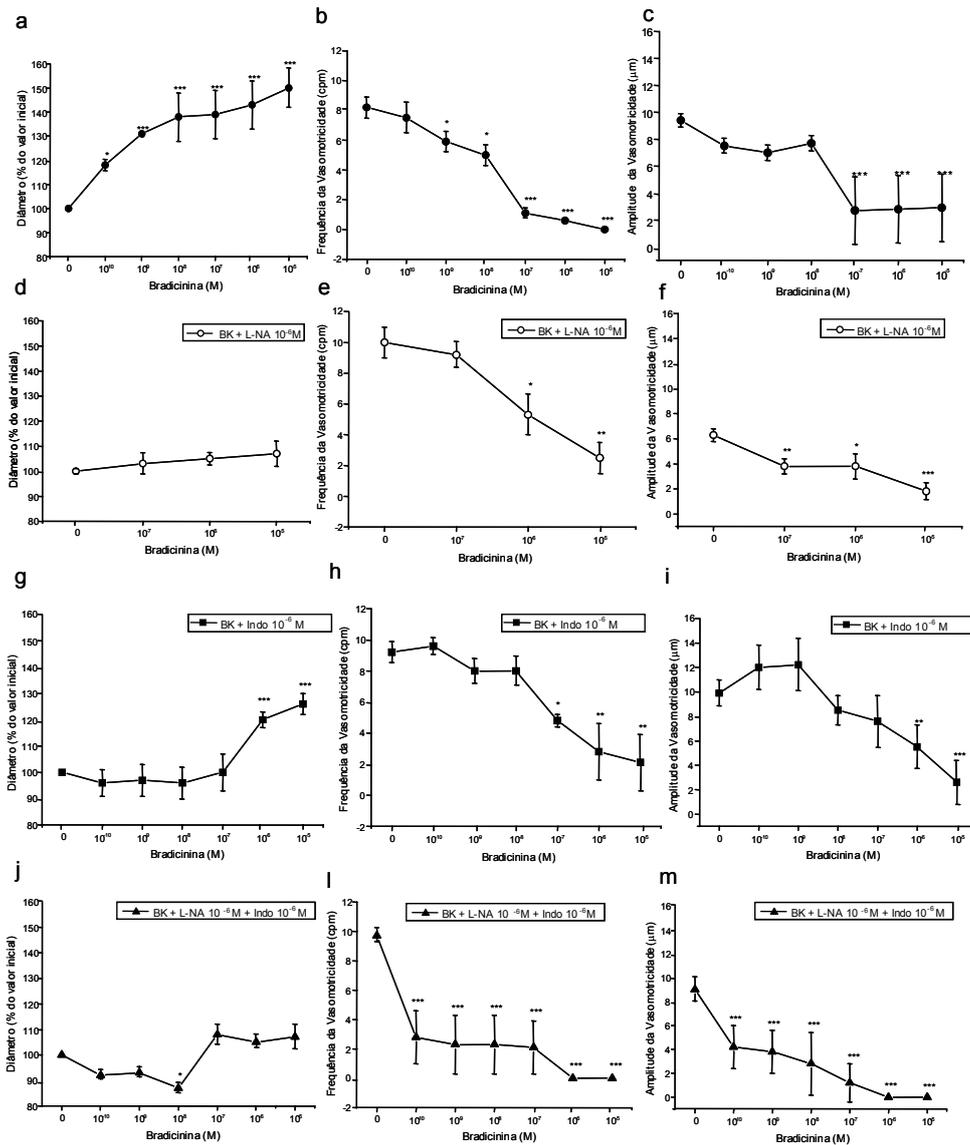


Figura 7: Relação entre a adição de concentrações crescentes de bradicirina (BK) em combinação ou não com N^ω-nitro-L-arginina (L-NA) a 10⁻⁶M, indometacina a 10⁻⁶M e L-NA a 10⁻⁶M mais a indometacina a 10⁻⁶M a solução de superfusão, o diâmetro arteriolar e a vasomotricidade em 26 arteríolas de 24 hamsters. **a, d, g e j:** Relação entre a concentração das drogas e o diâmetro arteriolar médio. **b, c, e, f, h, i, l e m:** Relação entre as concentrações das drogas e a freqüência e amplitude da vasomotricidade. Os valores de diâmetro foram apresentados como frações normalizadas pelos valores do controle (100%) obtidos no início de cada experimento. Os asteriscos indicam a diferença entre os valores controle e os valores obtidos após a adição das drogas aos níveis de significância estatística de: 1%(*), 0,2% (**), e 0,02% (***). Todos os registros foram realizados 10-15 min depois de cada mudança na solução de superfusão.

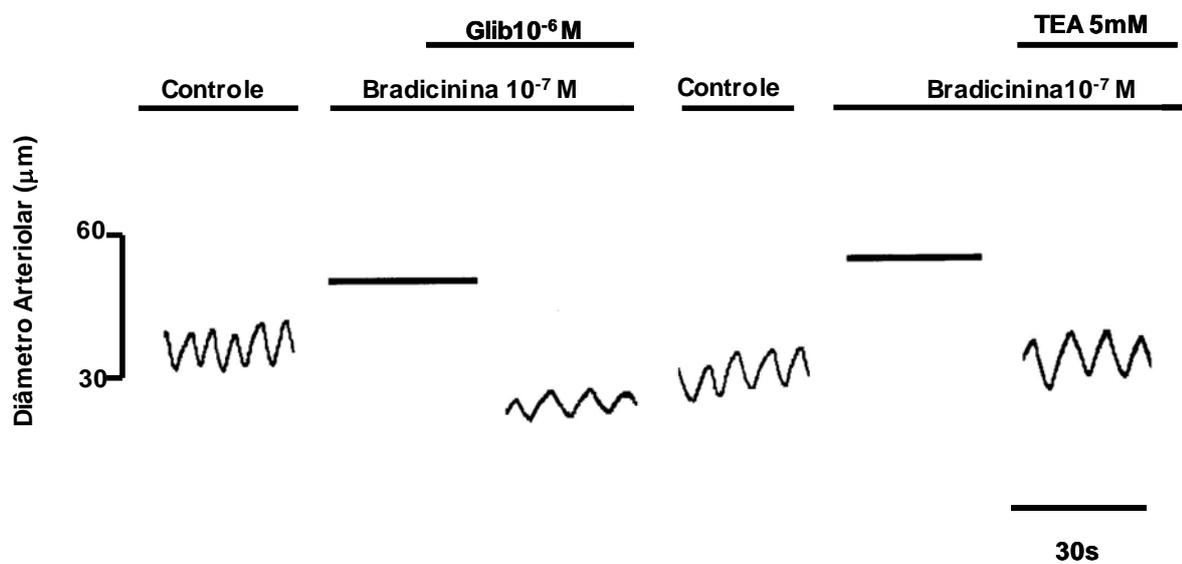


Figura 8: Registros de diâmetro em uma arteríola em condições controle na ausência e na presença de glibenclamida (Glib) a 10^{-6} M e cloreto de tetraetilamônio (TEA) a 5mM na solução de superfusão contendo bradicinina (10^{-7} M).

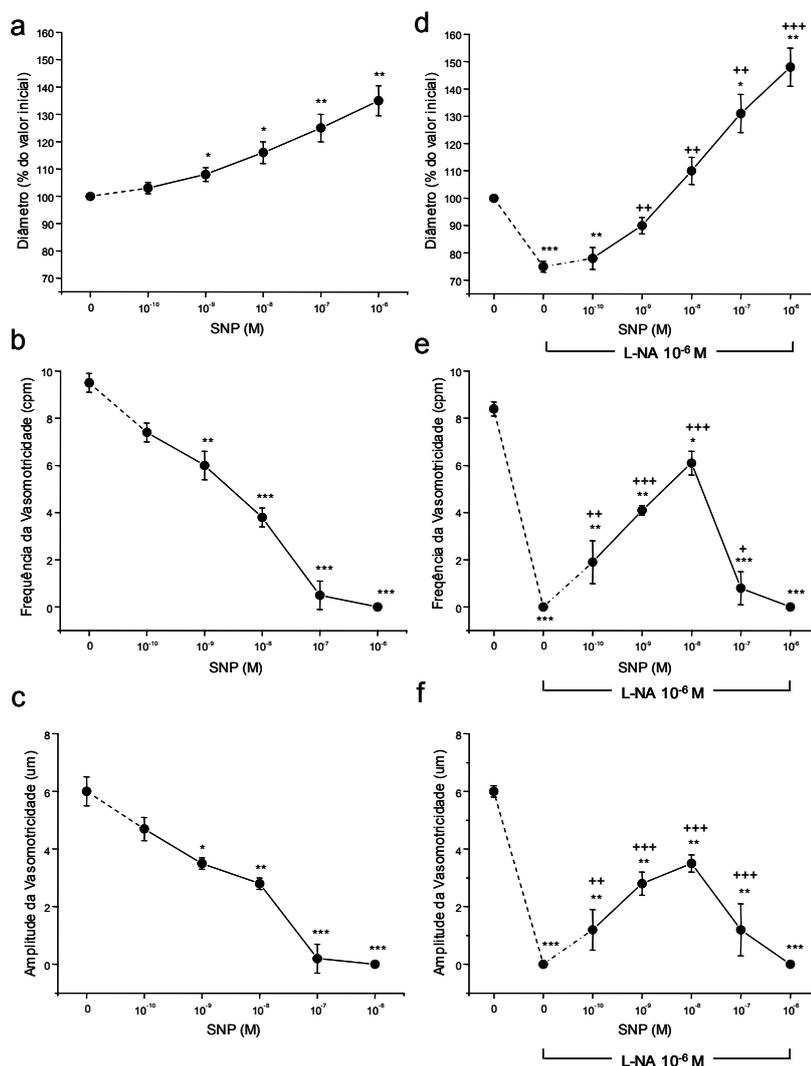


Figura 9: Relação entre a adição de concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio (SNP) em combinação ou não com N^(ω)-nitro-L-arginina (L-NA) a 10^{-6} M a solução de superfusão, o diâmetro arteriolar e a vasomotricidade em 12 arteríolas de 12 hamsters. **a e d** : Relação entre a concentração das drogas e o diâmetro arteriolar médio. **b, c, e e f**: Relação entre as concentrações das drogas e a frequência e amplitude da vasomotricidade. Os valores de diâmetro foram apresentados como frações normalizadas pelos valores do controle (100%) obtidos no início de cada experimento. Os asteriscos indicam a diferença entre os valores controle e os valores obtidos após a adição do SNP aos níveis de significância estatística de: 1%(*), 0,2% (**) e 0,02% (***). Os sinais de adição indicam a diferença entre os valores obtidos com L-NA e os valores obtidos após a adição do SNP, aos níveis de significância estatística de 1% (+), 0,2 % (++) e 0,02% (+++). Todos os registros foram realizados 10-15 min depois de cada mudança na solução de superfusão.

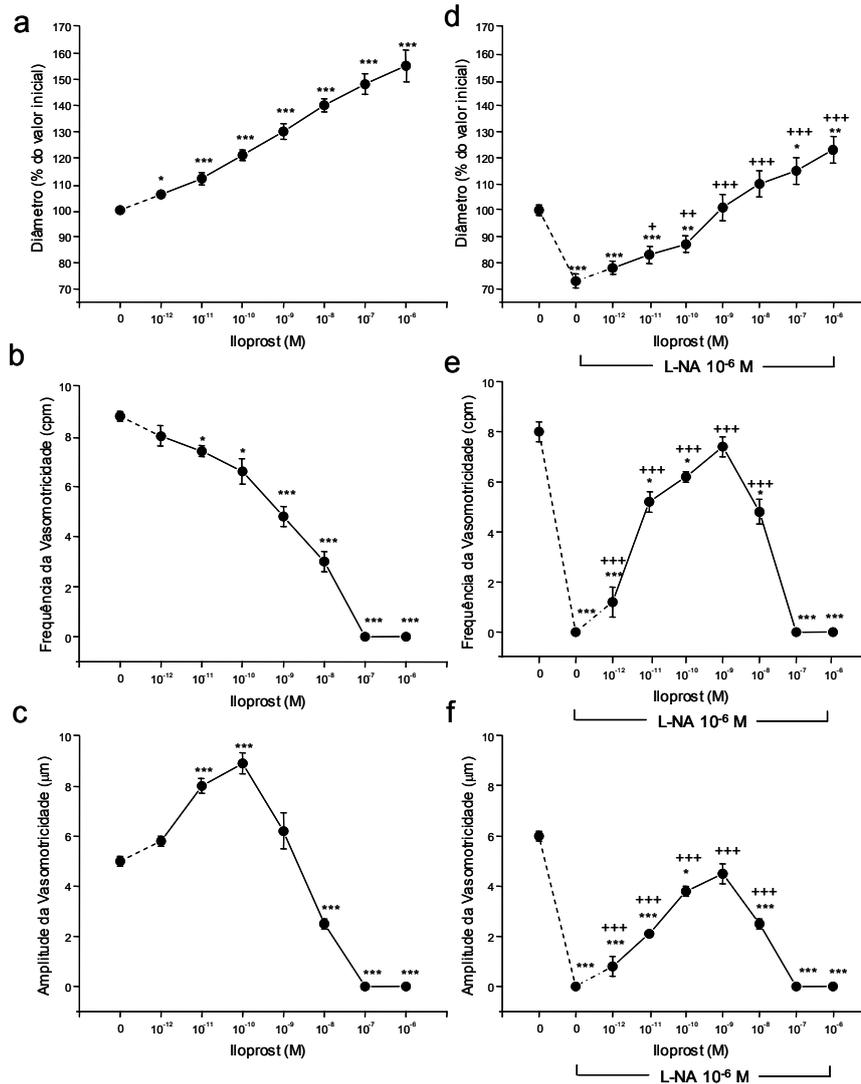


Figura 10: Relação entre a adição de concentrações crescentes de iloprost em combinação ou não com N^ω-nitro-L-arginina (L-NA) a 10⁻⁶M a solução de superfusão, o diâmetro arteriolar e a vasomotricidade em 12 arteríolas de 12 hamsters. **a e d** : Relação entre a concentração das drogas e o diâmetro arteriolar médio. **b, c, e e f**: Relação entre as concentrações das drogas e a freqüência e amplitude da vasomotricidade. Os valores de diâmetro foram apresentados como frações normalizadas pelos valores do controle (100%) obtidos no início de cada experimento. Os asteriscos indicam a diferença entre os valores controle e os valores obtidos após a adição do iloprost aos níveis de significância estatística de: 1%(*), 0,2% (**) e 0,02% (***). Os sinais de adição indicam a diferença entre os valores obtidos com L-NA e os valores obtidos após a adição do iloprost, aos níveis de significância estatística de 1% (+), 0,2 % (++) e 0,02% (+++). Todos os registros foram realizados 10-15 min depois de cada mudança na solução de superfusão.

DISCUSSÃO

A microcirculação pode ser avaliada *in vivo* através de uma série de preparações experimentais que envolvem a utilização de microscopia intravital. Neste estudo, escolhemos a preparação da bolsa da bochecha de hamster por permitir uma visualização nítida deste leito microvascular e por ser um modelo estável que assegura a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, os roedores possuem aspectos hemodinâmicos semelhantes à espécie humana (Fink & Heard, 1990) permitindo a correlação do estudo experimental com o estudo clínico.

Durante o procedimento experimental foram tomadas algumas precauções que tiveram o intuito de evitar o surgimento de variáveis que pudessem comprometer a análise dos dados, como por exemplo: cuidados com administração da anestesia, controle da temperatura corporal do animal e controle da temperatura e do pH da solução que banha a preparação.

Segundo Hoque e colaboradores (1996), a administração de várias doses de pentobarbital sódico pode prejudicar a função cardiovascular. Sendo assim, utilizamos uma única dose intraperitoneal deste fármaco apenas para indução da anestesia no animal. Durante todo experimento a anestesia foi mantida com injeção endovenosa de α -cloralose.

A temperatura corporal do animal foi mantida em 36,5°C para garantir a homeostasia da preparação e a traqueostomia foi realizada para facilitar a respiração espontânea do animal.

A preparação da bolsa da bochecha foi banhada por uma solução de perfusão para evitar que a mesma entrasse em contato diretamente com o

oxigênio atmosférico protegendo-a, dessa maneira, de possíveis alterações oxidativas. Esta solução teve pH (7,4) e temperatura ($36,0^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$) controlados para não afetar a atividade enzimática local.

A vasomotricidade foi primeiramente descrita na preparação da bolsa da bochecha de hamster por Duling (1973). Neste estudo ele relatou que este fenômeno depende de como o tecido é preparado e tratado e do tipo de soluções a que ele é exposto. Em 1992, Bouskela e Grampp constataram que a regularidade da vasomotricidade depende tanto do cuidado com a dissecação quanto do controle do pH, $p\text{O}_2$ e temperatura da solução de superfusão.

Na bolsa da bochecha a vasomotricidade parece ter origem miogênica uma vez que esse fenômeno é mantido mesmo na ausência de ativação nervosa ou de receptores α e β -adrenérgicos (Bouskela & Grampp, 1992).

Em experimentos prévios em nosso laboratório, foi mostrado que, na presença de vasomotricidade, o potencial de membrana das arteríolas da bolsa da bochecha de hamster oscila lentamente cerca de 20mV em torno de valores de aproximadamente -50mV, em perfeita sincronia com os movimentos vasomotores, as fases de despolarização coincidindo com vasoconstricções e as fases de polarização com as vasodilatações e que as variações espontâneas ou induzidas da polarização das CMLV foram acompanhadas por variações do diâmetro do vaso (Conde et al., 2007). A sincronia completa entre o potencial de membrana e as oscilações de diâmetro sugere um mecanismo de causa e efeito em que a intensidade de despolarização do potencial de membrana da CMLV pode refletir a

sua atividade contrátil. A lentidão das oscilações de potencial indicam que elas sejam governadas por correntes fracas de membrana (Edman et al., 1987).

As oscilações do potencial de membrana refletem a alternância entre abertura e o fechamento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e dos canais de K^+ e são dependentes da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, necessária para causar a despolarização que ativa os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Haddock & Hill, 2005).

A frequência e amplitude da vasomotricidade arteriolar na preparação da bolsa da bochecha de hamster são similares às observadas em outros tecidos conectivos como o da asa de morcego (Bouskela, 1989) e do mesentério de gato (Burrows & Johnson, 1981). No entanto, apresenta frequência e amplitude menores que as observadas nas preparações de músculo esquelético como a do músculo tenuissimus de coelho (5-32 ciclos/min) (Meyer et al., 1988; Slaaf et al., 1989) e do músculo coracocutâneo do morcego (24-75 ciclos/min) (Tuma & Wiedman, 1981).

A frequência e amplitude da vasomotricidade arteriolar da bolsa da bochecha de hamster, como em outras preparações de tecido conjuntivo (Bouskela, 1989) e de tecido muscular (Faber et al., 1982), não apresentam correlação direta com o diâmetro vascular, mas tendem a desaparecer durante a vasodilatação pronunciada (Bouskela & Grampp, 1992). No entanto, existem evidências na literatura que sugerem que a relação entre a vasomotricidade e o diâmetro arteriolar é muito mais complexa. Durante a vasodilatação a vasomotricidade pode também permanecer inalterada (Hundley et al., 1988; Oude

Vrieling et al., 1990) ou ainda durante a vasoconstrição pode aumentar (Gertsberger et al., 1987; Verbeuren et al., 1997) ou não ser afetada (Auer & Galhofer, 1981).

No presente estudo, a adição da ACh, da BK, do SNP e do iloprost em concentrações crescentes, inicialmente diminuiu e finalmente aboliu este fenômeno (Fig. 5, 7, 9 e 10). Segundo Schuster e colaboradores (2004), para que ocorra a vasomotricidade é necessário que a $[Ca^{2+}]_i$ atinja um certo limiar. Assim é provável que a adição de ACh ($10^{-5}M$), BK ($10^{-7}M$), SNP ($10^{-6}M$) e iloprost ($10^{-7}M$) à preparação diminua a $[Ca^{2+}]_i$ a tal ponto que esta não atinja o limiar necessário para manter a vasomotricidade, abolindo-a.

A inibição da vasomotricidade também pode ser atribuída a hiperpolarização das CMLV. A hiperpolarização inibe os canais de cálcio dependentes de voltagem que segundo alguns autores (Gustafsson, 1993; Hill & Meininger, 1994; Eddinger & Ratz, 1997) são essenciais para a ocorrência da vasomotricidade.

O L-NA ($10^{-6}M$), a atropina ($10^{-7}M$) e/ou indometacina ($10^{-6}M$) quando aplicadas juntamente com concentrações crescentes de ACh (Figura 5) e BK (Figura 7) mantiveram a vasomotricidade, provavelmente por atenuarem o relaxamento vascular induzido por esses vasodilatadores, mantendo a $[Ca^{2+}]_i$ e conseqüentemente o diâmetro vascular dentro da faixa em que a vasomotricidade opera.

Entretanto, existem algumas evidências em nossos resultados que suportam a noção de que pode existir uma dissociação entre o tônus vascular e a

vasomotricidade. A primeira delas foi a restauração da vasomotricidade após adição da glibenclamida, um antagonista de canais de K_{ATP} , à solução de perfusão contendo L-NA sem provocar nenhuma variação significativa do diâmetro arteriolar (Figura 4). Esses resultados sugerem que além do tônus vascular, alterações no potencial de membrana das CMLV provocadas, neste caso, pelo fechamento dos canais de K_{ATP} possam estar implicados na modulação dessa atividade rítmica.

Um outro exemplo de dissociação entre tônus da parede vascular e a vasomotricidade também foi observado após adição de L-NA seguida da aplicação de SNP e iloprost à preparação. Neste caso também, a perda da vasomotricidade não pode ser atribuída à vasoconstricção *per se* porque ela foi reiniciada tanto pela adição de SNP quanto pela adição de iloprost sem alterações significativas no diâmetro arteriolar médio (Figuras 9 e 10).

O endotélio pode ser considerado um órgão endócrino ativo que, em resposta a estímulos humorais, neurais e mecânicos, sintetiza e libera substâncias vasoativas que modulam o tônus e o diâmetro vasculares e o fluxo sanguíneo (Carvalho et al., 2005). Tendo em vista, a sua localização (entre o sangue e as CMLV) e a sua capacidade em modular o tônus vascular (Koenigsberger et al., 2005), é plausível que o endotélio também exerça um importante papel na modulação deste fenômeno (Rossi et al., 2006).

Todavia, a importância do NO para a vasomotricidade é bastante controversa. Um estudo realizado por Jackson e colaboradores (1991) em anéis de aorta torácica de hamster mostrou que a remoção mecânica do endotélio ou a utilização de um inibidor da síntese de NO inibiu a vasomotricidade que foi

restaurada após adição de 8-bromo-GMPc (um análogo do GMPc permeável à membrana). Em um outro estudo, Jackson (1988) observou que a vasomotricidade na aorta de hamsters foi abolida após aplicação de azul de metileno (inibidor da síntese de GMPc) e de hemoglobina (*scavenger* de NO) à preparação.

Segundo alguns estudos (Peng et al., 2001; Rahman et al., 2005; Jacobsen et al., 2007a; Jacobsen et al., 2007b) a importância do NO na vasomotricidade é de prover GMPc em concentrações suficientes para ativar canais de Cl⁻ dependentes de Ca²⁺ sensíveis ao GMPc e assim sincronizar as oscilações de Ca²⁺ intercelulares.

Por outro lado, Bertuglia e colaboradores (1994), usando a preparação de músculo esquelético em hamsters não anestesiados, constataram que a vasomotricidade não se correlaciona de maneira direta com o NO. Ainda nesse estudo, os autores observaram que pequenas arteríolas de hamsters anestesiados passaram a apresentar a vasomotricidade após o bloqueio da síntese de NO.

Em um outro estudo, Bertuglia e colaboradores (1995) mostraram que após 30 minutos de reperfusão, a inibição da produção de NO induziu o aparecimento de vasomotricidade em arteríolas da bolsa da bochecha de hamster submetidas à isquemia.

Nossos resultados sugerem que o endotélio desempenha um importante papel na modulação da vasomotricidade primeiramente porque a inibição da produção do NO pelo L-NA inicialmente reduziu e finalmente aboliu a vasomotricidade (Figura 3) e em segundo lugar porque a BK na presença de indometacina provocou vasoconstricção similar àquela induzida pelo L-NA e a

indometacina sem acarretar diminuição da frequência nem da amplitude da vasomotricidade (Figura 7). Entretanto, nesta preparação, parece ser o NO e não o GMPc que modula a vasomotricidade, uma vez que a adição de azul de metileno (10^{-7} a 10^{-5} M) ocasionou uma vasoconstrição concentração-dependente e manteve a frequência e amplitude da vasomotricidade praticamente constantes (Figura 3). Para confirmar esta hipótese, nós avaliamos o efeito do azul de metileno (10^{-6} M) em combinação com o L-NA (10^{-6} M ou 10^{-4} M) no diâmetro arteriolar médio e na vasomotricidade. Em presença do L-NA, o azul de metileno promoveu uma vasoconstrição comparável à induzida pelo azul de metileno sozinho (cerca de 20-30% do diâmetro arteriolar médio) que acarretou a cessação da vasomotricidade. O papel modulatório do NO na vasomotricidade, nesse estudo, parece ser decorrente de sua capacidade de regular o funcionamento dos canais de K_{ATP} , uma vez a adição de L-NA e glibenclamida em concentrações equimolares ocasionou a restauração da frequência e amplitude da vasomotricidade (Figura 4).

Em algumas preparações experimentais, como a de pequenas artérias de mesentério de ratos (Gustafsson et al, 1993) e a da microcirculação de músculo esquelético de hamster (Bertuglia et al., 1994), a adição de indometacina não afetou a vasomotricidade. Entretanto, Chemtob e colaboradores (1992) relataram que a vasomotricidade era parcialmente inibida após a exposição de fragmentos de aorta torácica de rato à indometacina.

Em nosso estudo, a inibição da produção de PGI_2 pela indometacina (10^{-6} M) inicialmente inibiu o efeito vasodilatador da BK (10^{-10} - 10^{-7} M). Em

concentrações superiores à 10^{-7} M de BK, houve vasodilatação e perda progressiva da freqüência e da amplitude da vasomotricidade (Figura 7).

O iloprost possui propriedades farmacológicas semelhantes à PGI_2 . Como observado nas plaquetas, a ligação do iloprost ao receptor IP na membrana das CMLV é seguida do aumento dos níveis citossólicos de AMPc (Müller et al., 1991) acompanhado do aumento da polarização do potencial de membrana. Esta hiperpolarização pode ser atribuída ao aumento da condutividade da membrana aos íons K^+ (Siegel et al., 1987; Siegel et al., 1989) provavelmente em decorrência da ativação dos canais de K_{ATP} e BK_{Ca} (Schubert et al., 1997). Um estudo realizado em artéria carótida de cobaias mostrou que a PGI_2 ativa simultaneamente os receptores IP e TP (receptor do tromboxano A_2) enquanto o iloprost estimula somente o receptor IP (Corriu et al., 2001).

O Iloprost restaurou a vasomotricidade abolida pelo L-NA, provavelmente por diminuir a $[Ca^{2+}]_i$ e conseqüentemente aumentar o componente vasodilatador da vasomotricidade, sugerindo que a PGI_2 e o iloprost modulem a freqüência e amplitude da vasomotricidade simplesmente por regular a $[Ca^{2+}]_i$.

A adição de concentrações acima de 10^{-8} M de BK em combinação com o L-NA e a indometacina induziu vasodilatação que presumidamente foi mediada pelo EDHF (Figura 7). Apesar de ter restaurado o diâmetro arteriolar médio ao nível observado na situação controle, a vasodilatação induzida pelo EDHF reduziu e, finalmente aboliu a vasomotricidade (Figura 7). A redução da freqüência e da amplitude da vasomotricidade induzida pelo EDHF não parece ser atribuída a vasoconstricção *per se*. A indometacina na presença de BK provocou

vasoconstricção similar sem acarretar diminuição acentuada da frequência nem da amplitude da vasomotricidade. Aparentemente, esses resultados sugerem que a vasomotricidade nesta preparação não depende do EDHF. Entretanto para nos certificarmos da importância do EDHF para a vasomotricidade, nesse estudo, seria necessário a utilização de inibidores dos canais de IK_{Ca} e SK_{Ca} , (como a caribdotoxina e apamina, respectivamente) uma vez que esses canais medeiam a vasodilatação induzida pelo EDHF. Em outros estudos a utilização de caribdotoxina e apamina provocou cessação da vasomotricidade induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de rato demonstrando que o EDHF é essencial para o início e manutenção da vasomotricidade naquela preparação (Mauban & Wier, 2004; Okazaki et al., 2003).

A aplicação tópica de glibenclamida associada à ACh, atenuou o relaxamento vascular provocado pela ACh e resultou na redução da frequência e amplitude da vasomotricidade. Por outro lado, alguns estudos mostraram que a inibição dos canais de K_{ATP} não afeta de forma significativa a vasomotricidade induzida pela fenilefrina nem em arteríolas de cremaster de hamster (Yashiro & Duling, 2003) nem em aortas torácicas de camundongo (Jiang et al., 1999).

O TEA (5mM), um inibidor dos canais de K_v e K_{Ca} , reduziu a resposta vasodilatadora à ACh, aumentou a amplitude e diminuiu a frequência da vasomotricidade (Figura 6). A vasoconstricção mediada pelo TEA pode ser decorrente da despolarização do potencial de membrana das CMLV (Bouskela et al., 1991). A despolarização provavelmente ativou os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Gustafsson & Nilsson, 1994), elevou a $[Ca^{2+}]_i$, e em consequência

aumentou a amplitude da vasomotricidade. Jiang e colaboradores (1999) reportaram em seu estudo que o TEA também atenuou o relaxamento das CMLV induzido pela ACh e causou aumento da frequência e da amplitude da vasomotricidade induzida pela fenilefrina em aortas torácicas de camundongos.

A BK induziu vasodilatação e cessação da vasomotricidade que foi restaurada pela inibição de canais de K^+ ATP e TEA-sensíveis. O fechamento desses canais possivelmente causou a abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Jackson, 2005), aumento de $[Ca^{2+}]_i$ nas CMLV e, conseqüentemente vasoconstricção (Figura 8).

A combinação do L-NA (10^{-6} M) com o TEA (5mM) paradoxalmente resultou em vasodilatação significativa e na perda da frequência e amplitude da vasomotricidade (Figura 4). A resposta vasodilatadora induzida pela combinação dessas duas drogas nunca foi reportado antes e merece futuras investigações.

CONCLUSÃO

O presente estudo sustenta a hipótese de que pode existir uma dissociação entre o tônus vascular e a vasomotricidade e que o NO (e não o GMPc), canais de K^+ sensíveis ao ATP e TEA desempenham um papel modulatório na oscilação espontânea do diâmetro arteriolar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-Aalkjær, C. & Nilsson, H.: Vasomotion: cellular background for the oscillator and for synchronization of smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 144:605-616, 2005.

2-Auer, S. M. & Galhofer, B.: Rhythmic activity of cat pial vessels in vivo. *Eur Neurol* 20:448-468, 1981.

3-Bayliss, W. M.: On the local reactions of the arterial wall to changes in internal pressure. *J Physiol* 28:220-231, 1902.

4-Bertuglia, S., Coluanti, A. & Intaglietta, M. Effects of L-NMMA and indomethacin on the arteriolar vasomotion in skeletal muscle microcirculation of conscious and anesthetized hamsters. *Microvasc Res* 48: 68-84, 1994.

5-Bertuglia, S., Colantuoni, A. & Intaglietta, M.: Capillary reperfusion after L-arginine, L-NMMA, L-NNA treatment in cheek pouch microvasculature. *Microvasc Res* 50:162-174, 1995.

6-Bertuglia, S., Coluanti, A., Coppini, G. & Intaglietta, M.: Hypoxia or hyperoxia – induced changes in arteriolar vasomotion in skeletal muscle microcirculation. *Am J Physiol* 260: H362-H372, 1991.

7-Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J. & Cohen, R.: Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-853, 1994.

8-Bouskela, E.: Vasomotion frequency and amplitude related to intraluminal pressure and temperature in the wing of the intact, unanesthetized bat. *Microvasc Res* 37:339-351, 1989.

9-Bouskela, E., Grampp, W. & Mellander, S.: In vivo membrane potentials of smooth muscle cells in microvessels of the hamster cheek pouch. In Mulvany MJ (eds). *Resistance arterioles, structure and function*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 192-195, 1991.

10-Bouskela, E.; & Grampp, W.: Spontaneous vasomotion in hamster cheek pouch arterioles in varying experimental conditions. *Am J Physiol*. 262: H478-H485, 1992.

11-Bouskela, E. & Rubanyi, G. M. Effects of iloprost, a stable prostacyclin analog, and its combination with N ω -nitro-L-arginine on early events following lipopolysaccharide injection: observations in the hamster cheek pouch microcirculation. *Int J Microcirc Clin Exp* 15:170-80. 1995.

12-Bryan Jr, R. M., You, J., Golding, E. M. & Marrelli, S. P.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology* 102:1261–1277, 2005.

13-Burrows, M. E. & Johnson, P. C.: Diameter wall tension and flow in mesenteric arterioles during autoregulation. *Am J Physiol* 241:H829-H837, 1981.

14-Carvalho, M. H. C, Fortes, Z. B., Passaglia, R. C. A. T. & Nigro, D.: Funções normais do endotélio: Uma visão geral. In Da Luz, P. L., Laurindo, F. R. M. & Chagas, A. C. P. (eds). Endotélio e doenças cardiovasculares. Atheneu, São Paulo, pp. 17-32, 2005.

15-Chemtob, S., Inayatulla, A. & Varma, D. R.: Eicosanoid-dependent and endothelium independent oscillations of rat aorta. *J Vasc Res* 29: 270-280, 1992.

16-Cohen, R. A., Weisbrod, R. M., Gericke, M., Yaghoubi, M., Bierl, C & Bolotina, V. M. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and inhibition of store operated Ca^{2+} influx. *Circ Res* 84: 210 -219, 1999.

17-Conde, C. M. S., Cyrino, Z. G. A., Bottino, D. A, Gardette, J. & Bouskela, E. Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and microvascular reactivity: Observation in the hamster cheek pouch. *Microvasc Res* 73: 42-53, 2007.

18-Conti, M. A. & Adelstein, R. S.: The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by catalytic subunit of 3'5' cAMP dependent protein kinase. *J Biol Chem* 256: 3178-3181, 1981.

19-Corriu, C., Féléto, M., Edwards, G., Weston, A. H. & Vanhoutte, P. M.: Differential effects of prostacyclin and iloprost in the isolated carotid artery of guinea-pig. *Eur J Pharmacol* 426:89-94, 2001.

20-Davis, M. J., Donovitz, J. A. & Hood J. D.: Stretch-activated single channel and whole cell currents in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 262: C1083-C1088, 1992.

21-Deanfield, J. E., Halcox, J. P. & Tabetink, T. J.: Endothelial function and dysfunction. Testing and clinical relevance. *Circulation* 115: 1285-1295, 2007.

22-De Lanerolle, P., Nishikawa, M., Yost, A. & Adelstein, R. S.: Increased phosphorylation of myosin light chain kinase after an increase in cyclic AMP in smooth muscle. *Science* 223: 1415-1417, 1984.

23-Dirnagl, U., Lindauer, U. & Villringer, A.: Nitric oxide synthase blockade enhances vasomotion in the cerebral microcirculation of anesthetized rats. *Microvasc Res* 45: 318-323, 1993.

24-Duling, B. R.: The preparation and use of hamster cheek pouch for studies of the microcirculation. *Microvasc Res* 5:423-429, 1973.

25-Eddinger, T.J. & Ratz PH.: Alpha adrenoreceptor activation induces rhythmic contractile activity in carotid arteries from young, not adults, rats. *Acta Physiol Scand* 159 (2): 123-129, 1997.

26-Edwards, G., Dora, K. A., Gardener, M. J., Garland, C. J. & Weston, A. H.: K^+ is an endothelium-derived factor in rat arteries. *Nature* 396: 269-272, 1998.

27-Faber, J. E., Harris, P. D. & Miller, F. N.: Microvascular sensitivity to PGE₂ and PGI₂ in skeletal muscle of decerebrated rat. *Am J Physiol* 243: H844-H851, 1982.

28-Félétou, M. & Vanhoutte, P. M.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor - Where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1215-1225, 2006.

29-Fink, M. P. & Heard, S. O.: Laboratory Models of sepsis and septic shock: Current Research Review. *J Surg Res* 49: 186-196, 1990.

30-Folkow, B.: Description of the myogenic hypothesis. *Circ Res* 15: 279-87, 1964.

31-Förstermann, U. & Münzel, T.: Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease - from marvel to menace. *Circulation* 113:1708-1714, 2006.

32-Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.

33-Gertsberger, R., Meyer, J. U, Rettig, R., Printz, M. & Intaglietta, M.: Regulatory role of vasoactive peptides in subcutaneous skin microcirculation in the hamster. *Int J Microcirc Clin Exp* 7: 3-14 1987.

34-Goligorsky, M. S., Colflesh, D., Gordienko, D. & Moore, L. C.: Branching points of renal resistance arteries are enriched in L-type calcium channels and initiate vasoconstriction. *Am J Physiol* 268: F251-F257, 1995.

35-Griffith, T.M.: Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br J Pharmacol* 141:881-903, 2004.

36-Griffith, T.M. & Edwards, D. H.: Modulation of chaotic pressure oscillations in isolated resistance arteries by EDRF. *Eur Heart J* 14: 60-67, 1993.

37-Gryglewski, R. J., Bierion, K., Dembinska-Kiec, A., Kostka-Trabka, E. & Zembowicz, A.: Interaction between prostacyclin and molsidomine in blood cells and plasma. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 21B: 655-8, 1991.

38-Gustafsson, H.: Vasomotion and underlying mechanism in small arteries. An in vitro study of rat blood vessels. *Acta Physiol Scand Suppl* 614:1-44, 1993.

39-Gustafsson, H., Mulvany, M. J. & Nilsson, H.: Rhythmic contractions of isolated small arteries from rat: influence of the endothelium. *Acta Physiol Scand.* 148(2):153-63, 1993.

40-Gustafsson, H. & Nilsson, H.: Rhythmic contractions in isolated small arteries of rat: role of K^+ channels and the Na^+ , K^+ -pump. *Acta Physiol Scand.* 150(2):161-170, 1994.

41-Guyton, A. C. & Hall, J. E.: A microcirculação e o sistema linfático: troca de líquido capilar, líquido intersticial e fluxo da linfa. In: Guyton, A. C. and Hall, J. E.: *Tratado de fisiologia médica*. Editora Guanabara Koogan S.A. 10ª edição, Rio de Janeiro, pp. 153-161, 2002.

42-Haddock, R. E. & Hill, C. E.: Rhythmicity in arterial smooth muscle. *J Physiol* 566: 645-656, 2005.

43-Hayashida, N., Okui, K. & Fukuda, Y.: Mechanism of spontaneous rhythmic contraction in isolated rat large artery. *Jpn J Physiol* 36:783-794, 1986.

44-Hill, M. A. & Meininger, G. A.: Calcium entry and myogenic phenomena in skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol* 267 (3 pt 2): H1085-192, 1994.

45-Hoque, A.N.; Marczin, N.; Catracas, J.D. & Fuchs, L.C.: Anesthesia with sodium pentobarbital enhances lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction in rats. *Shock* 6 (5): 365-370, 1996.

46-Hundley, W.G., Renaldo, G. J., Levasseur, J. E & Kontos, H.A.: Vasomotion in cerebral microcirculation of awake rabbits. *Am J Physiol* 254: H67-H71, 1988.

47-Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. N. & Chaudhuri, G.: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 84: 9265-9269, 1987.

48-Ignarro, L. J. & Kadowitz, P. J.: The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 25: 171-191, 1985.

49-Intaglietta M.: Vasomotion as normal microvascular activity and a reaction to impaired homeostasis. In Intaglietta, M. (ed): Vasomotion and flow modulation in the microcirculation. Prog Appl Microcirc. Basel, Karger, vol 15 pp. 1-9, 1989.

50-Intaglietta, M.: Arteriolar vasomotion: implications for tissue ischemia. Blood Vessels 28: 1-7, 1991.

51-Jackson, W. F.: Ion channels and vascular tone. Hypertension 35 (1 Pt 2): 173-178, 2000.

52-Jackson, W. F.: Oscillations in active tension in hamster aortas: role of the endothelium. Blood Vessels 25(3):144-56, 1988.

53-Jackson, W. F.: Potassium channels in the peripheral microcirculation. Microcirculation 12:113-127, 2005.

54-Jackson, W. F., Mülsch, A., Busse, R.: Rhythmic smooth muscle activity in hamster aortas is mediated by continuous release of NO from the endothelium. Am J Physiol. 260 (1 Pt 2): H248-53, 1991.

55-Jacobsen, J. C., Aalkjær, C., Nilsson, H., Matchkov, V., Freiberg, J. & Holstein-Rathlou, N. H.: Activation of cGMP-sensitive calcium-dependent chloride channel may cause transition from calcium waves to whole-cell oscillations in smooth muscle cells. Am J Physiol 293:H215-H228, 2007a.

56-Jacobsen, J. C., Aalkjær, C., Nilsson, H., Matchkov, V., Freiberg, J. & Holstein-Rathlou, N. H. A model of smooth muscle cell synchronization in the arterial wall. *Am J Physiol* 293:H229-H237, 2007b.

57-Jiang, J., Thorén, P., Caligiuri, G., Hansson G.K. & Pernow, J. Enhanced phenylephrine-induced rhythmic activity in the atherosclerotic mouse aorta *via* an increase in opening of K_{Ca} channels: relation to K_v channels and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 128: 637-646, 1999.

58-Jones, T. W.: Discovery that the veins of the bats of the bat's wing are endowed with rhythmical contractility and that onward flow of blood is accelerated by each contraction. *Trans R Soc* 142:131-136, 1952.

59-Katz, B.: Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 2: 285-299, 1949.

60-Koenigsberger, M., Sauser, R., Bény, J. L. & Meister, J. J.: Role of endothelium on arterial vasomotion. *Biophys J* 88:3845-3854, 2005.

61-Koenigsberger, M., Sauser, R., Bény, J. L. & Meister J. J.: Effects of arterial wall stress on vasomotion. *Biophys J* 91:1663-1674, 2006.

62-Kukovetz, W. R., Holzmann, S., Wurm, A. & Poch, G.: Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries. *J Cyclic Nucleotide Res* 5:469-476, 1979.

63-Laurindo, F. R. M., Liberman, M. & Leite, P.L.: Substâncias vasodilatadoras produzidas pelo endotélio. In Da Luz, P. L., Laurindo, F. R. M. & Chagas, A. C. P. (eds). Endotélio e doenças cardiovasculares. Atheneu, São Paulo, pp. 33-42, 2005.

64-Levy, M. N.: A circulação periférica e o seu controle. In: Berne, R. M., Levy, M. N., Koeppen, B. M. & Stanton, B. A.: Fisiologia. Elsevier Editora Ltda. Rio de Janeiro, pp. 399-413, 5ªed., 2004.

65-Lincoln, T. M., Dey, N. & Sellack, H.: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* 91: 1421-1430, 2001.

66-Mauban, J. R. H. & Wier, W. G.: Essential role of EDHF in the initiation and maintenance of adrenergic vasomotion in rat mesenteric arteries. *Am J Physiol* 287: H608-H616, 2004.

67-Mayrovitz, H. N. Tuma, R. F. & Wiedman, M. P.: Relationship between microvascular blood velocity and pressure distribution. *Am J Physiol* 232, H400-H405, 1977.

68-Meyer, J. U., Borgström, P., Lindbom, L. & Intaglietta, M.: Vasomotion patterns in skeletal muscle arterioles during changes in arterial pressure. *Microvasc Res* 35: 193-203, 1988.

69-Moncada, S., Gryglewski, R. J., Bunting, S. & Vane, J. R.: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandins endoperoxides to unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263: 663-665, 1976.

70-Moncada, S. & Higgs, E. A.: The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 147: S193-S201, 2006.

71-Moncada, S., Palmer, R. M. J. & Higgs, E. A. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991.

72-Moncada, S. & Vane, J. R.: Pharmacology and endogeneous roles of prostaglandin endperoxides thromboxane A₂ and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 30 (3): 293-331, 1979.

73-Müller, B., Witt, W. & Mc Donald, F. M.: Iloprost: stable prostacyclin analogue. In Rubanyi GM (ed). Cardiovascular significance of endothelium derived vasoactive factors. Futura Publishing Co.: New York, pp 65-72, 1991.

74-Nilsson, H.: Interactions between membrane potential and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. *Acta Physiol Scand.* 164:559-566, 1998.

75-Nilsson, H. & Aalkjaer, C.: Vasomotion: Mechanisms and physiological importance. *Mol Interv* 3 (2):79-89, 2003.

76-Nishimura, J.: Topics on the Na⁺/ Ca²⁺ exchanger in the vasodilator-induced vasorelaxation. *J Pharmacol Sci* 102:27-31, 2006.

77-Noma, A.: ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 305:147-148, 1983.

78-Okazaki, K., Seki S., Kanaya, N., Hattori, J., Tohse, N. & Namiki, A.: Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in phenylephrine-induced oscillatory vasomotion in rat small mesenteric artery. *Anesthesiology* 98(5):1164-71, 2003.

79-Oude Vrielink, H. H. E., Slaaf, D. W., Tangelder, G. J., Weijmer-Van Velzen, S., Reneman, R. S.: Analysis of vasomotion wave form changes during pressure reduction and adenosine application. *Am J Physiol* 258: H29-H37, 1990.

80-Palmer, R. M., Feirige, A. G. & Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 92: 181-187, 1987.

81-Parkington, H. C., Tare, M., Hammarström, A. K. M., Tonta, M. A. & Coleman, H. A.: The role of endothelium-derived prostacyclin in regulating tone in vascular smooth muscle. In: Vanhoutte, P.M. (eds.) *Endothelium-derived hyperpolarizing factor*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam B.V., Netherlands, 57 – 64, 1996.

82-Peng, H., Matchkov, V., Ivarsen A, Aalkjær C. & Nilsson, H.: Hypothesis for the initiation of vasomotion. *Circ Res* 88: 810-815, 2001.

83-Pfizer, G.: Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol* 91: 497-503, 2001.

84 –Rahman, A., Matchkov, V., Nilsson, H. & Aalkjaer, C.: Effects of cGMP on coordination of vascular smooth muscle cells of rat mesenteric small arteries. *J Vasc Res* 42(4):301-11, 2005.

85-Rossi, M., Carpi, A., Galetta, F., Franzoni, G. & Santoro, G.: The investigation of skin blood flow motion: a new approach to study the microcirculatory impairment in vascular diseases? *Biomed Pharmacother* 60: 437-442, 2006.

86-Schubert, R., Serebryakov, V. N., Mewes, H. & Hopp, H. H.: Iloprost dilates rat small arteries: role of K_{ATP} – and K_{Ca} -channel activation by cAMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 272 (3 Pt 2): H1147-H1156, 1997.

87-Schuster, A., Lamboley, M., Grange, C., Oishi, H., Bény, J.L., Stergiopulos, N. & Meister, J. J.: Calcium dynamics and vasomotion in rat mesenteric arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 43: 539-548, 2004.

88-Sell, M., Boldt, W. & Markwardt, F.: Desynchronizing effect of endothelium on intracellular Ca^{2+} concentrations dynamics in vascular smooth muscle cells of rat mesenteric arteries. *Cell Calcium* 32: 105-120, 2002.

89-Siegel, G., Mironneau, J., Schnalke, F., Loirand, G. & Stock, G.: Potassium channel opening and vasorelaxation. *J Vasc Med Biol* 1: 116, 1989.

90-Siegel, G., Stock, G., Schnalke, F. & Litza, B.: In Gryglewski RJ, Stock G (eds). Prostacyclin and its stable analogue iloprost. Springer: Berlin, pp 143-149, 1987.

91-Slaaf, D. W., Tangelder, G. J., Teirlinck, H. C. & Reneman, R. S.: Arteriolar vasomotion and arterial pressure reduction in rabbit tenuissimus muscle. *Microvasc Res* 33:71-80, 1987.

92-Sobey, C.G.: Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 28 – 38, 2001.

93-Somlyo, A. P. & Somlyo A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372: 231-236, 1994.

94-Takenaka, T., Suzuki, H., Okada, H., Hayashi, K., Kanno, Y. & Saruta T.: Mechanosensitive cation channels mediate afferent arteriolar myogenic constriction in isolated rat kidney. *J Physiol* 511: 245-253, 1998.

95-Tuma, R. F. & Wiedman, M. P.: The microcirculation of the bat wing coracobrachialis muscle. *Bibl Anat* 20: 542-546, 1981.

96-Ungvari, Z. & Koller, A.: NO released to flow reduces myogenic tone of skeletal muscle arterioles by decreasing smooth muscle Ca^{2+} sensitivity. *J Appl Physiol* 91: 522-527, 2001.

97-Ursino, M., Cavalcanti, S., Bertuglia, S. & Coluantonio, A.: Theoretical analysis of complex oscillations in multibranched microvascular networks. *Microvascular Research* 51: 229-249, 1996.

98-Vanhoutte, P.M.: Endothelial control of vasomotor function – from health to coronary disease. *Circ J* 67: 572 – 575, 2003.

99-Verbeuren, T. J., Vallez, M. O., Lavielle, G. & Bouskela, E.: Activation of thromboxane receptors and the induction of vasomotion in the hamster cheek pouch microcirculation. *Br J Pharmacol* 122: 859-866, 1997.

100-Whittaker, N., Bunting, S., Salmon, J. Moncada S., Vane, J. R., Johnson, R. A., Morton, D. R., Kinner, J. H., Gorman, R. R., Mc Guire, J. C. & Sun, F. F.: The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin). *Prostaglandins* 12(6):915-928, 1976.

101-Wiernesperger, N. F. & Bouskela, E.: Microcirculation in insulin resistance and diabetes: more than just a complication. *Diabetes Metab* 29: 6S77-6S87, 2003.

102-Wilson, A. J., Jabr, R. I. & Clapp, L. H.: Calcium modulation of vascular smooth muscle ATP-sensitive K⁺ channels: role of protein phosphatase-2B. *Circ Res* 87(11):1019-1025, 2000.

103-Wise, H. & Jones, R. L.: Focus on prostacyclin and its novel mimetics. *Trends Pharmacol Sci* 17(1):17-21, 1996.

104-Yashiro, Y. & Duling, B. R.: Participation of intracellular Ca²⁺ stores in arteriolar conducted responses. *Am J Physiol* 285: H63-H73, 2003.

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](#)