

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

LARISSA PERNOMIAN

Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -  
adrenoceptores em carótida contra-lateral de rato

Ribeirão Preto

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

LARISSA PERNOMIAN

Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -  
adrenoceptores em carótida contra-lateral de rato

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador (a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria de Oliveira

Ribeirão Preto  
2009

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 na Publicação  
Serviço de Documentação  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Pernomian, Larissa

Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida contra-lateral de rato / Larissa Pernomian; orientadora: Ana Maria de Oliveira - Ribeirão Preto, 2009.

169 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Catéter-balão. 2. Carótida contra-lateral. 3.  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores. 4. Ciclooxygenase-2. 5. Ânion superóxido.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Autora:** Larissa Pernomian

**Título:** Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida contra-lateral de rato.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original.*

*Albert Einstein*

*Aos meus pais, Luiz Antônio e Eli, os grandes e inabaláveis pilares de sustentação da nossa família.*

*Ao meu Sol, razão da minha vida. Obrigada por  
existir... Te amo muito e sempre!*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus, por ter me permitido viver com saúde e paz.*

*Aos meus pais, Luiz Antônio e Eli, por todo amor, dedicação, apoio e compreensão infinitos ao longo de toda minha vida.*

*À minha irmã, Laena, pelo leal companheirismo e cumplicidade.*

*Ao meu ex-namorado, Lucas João Braga, por todo apoio e amor dedicados ao longo desses anos.*

*À minha irmã de alma, Mayara Santos Gomes, pela sincera e eterna amizade, polêmicas inesquecíveis e todo apoio profissional.*

*À minha Orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Maria de Oliveira, pela oportunidade de entrar na Academia, pela confiança depositada em mim, e por todos os ensinamentos, que serão válidos por toda a vida.*

*Aos Professores Dr. Fernando Morgan de Aguiar Correa e Dr. André Sampaio Pupo, pela atenção, ensinamentos, críticas e sugestões que contribuíram para enriquecer esse trabalho.*

*À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Leandra Naira Zambelli Ramalho, pela contribuição de cunho inestimável à realização desse trabalho.*

## *Agradecimentos*

*Aos colegas de trabalho, Aline Carvalho Pereira, Bruno Nunes do Vale, Rafaela Pravato Colato e Vânia Cláudia Olivon, pela amizade e apoio profissional .*

*Aos demais amigos do Laboratório de Farmacologia, em especial à Alice Valença Araújo, Andréa Carla Pessini, Bruno Rodrigues Silva, Carolina Baraldi Lemes Araújo e Gerson Jhonatan Rodrigues, pela amizade, paciência, discussões e apoio fundamentais à minha sobrevivência.*

*Às técnicas Mayara Santos Gomes, Mirian Cristina C. de Melo, Juliana Aparecida Vercesi, Flávia Fiacadori Salata e Auristela de Mello Martins , por todo apoio técnico.*

*Às Professoras da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Dra. Lusiane Maria Bendhack, Dra. Glória Emilia Petto de Souza e Dra. Sâmia Joca, pela agradável convivência.*

*Às funcionárias da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Marlene Rodrigues da Silva e Aparecida Rosa da Silva, pela amizade e apoio profissional.*

*Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Sônia Maria Stefanelli, José Waldick Ramon e Fátima Helena Petea, por todo apoio prestado.*

## *Agradecimentos*

*Ao Sr. Reinaldo Fernando Batista, funcionário do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela paciência e cuidado com os animais utilizados neste trabalho.*

*Aos funcionários do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo cuidado no tratamento dos animais.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.*

*Resumo*

PERNOMIAN, L. **Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida contra-lateral de rato.** 2009. 169f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A angioplastia por catéter-balão é um procedimento utilizado para restaurar o fluxo sanguíneo em vasos acometidos por doenças obstrutivas. Em carótida de rato, a passagem do catéter-balão pela luz arterial produz um estresse mecânico que altera a reatividade a agentes vasoconstrictores e a inervação sensorial na artéria contra-lateral à lesão, sugerindo a ocorrência de uma resposta neurocompensatória nesse leito. Esse processo caracteriza-se por um aumento na resposta contrátil à fenilefrina, quatro dias após a lesão vascular, envolvendo a participação do endotélio e de prostanóides derivados da ciclooxigenase-2, o comprometimento na formação de óxido nítrico endotelial e o aumento na produção de ânion superóxido locais. Recentemente, a existência de  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores de relaxamento foi demonstrada funcionalmente, sugerindo a participação desses receptores na modulação da vasoconstricção adrenérgica. Evidências apontam um prejuízo no relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida de ratos hiperhomocisteinêmicos, subjacente ao estresse oxidativo estabelecido nessa condição. Com base nisso, a hipótese do presente estudo é que a lesão por catéter-balão prejudica o relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão, o que poderia estar contribuindo com a hiperreatividade contrátil à fenilefrina observada nesse leito durante esse período. Assim, o projeto teve por objetivo estudar as conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão. A resposta de relaxamento adrenérgico foi estudada pela construção de curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L), sobre a pré-contracção com prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $3 \times 10^{-5}$  mol/L), em anéis de carótida. Em paralelo, procedeu-se com a caracterização funcional dos receptores e mediadores celulares do relaxamento induzido por fenilefrina em carótida de rato, bem como com o estudo da participação do ânion superóxido nessa resposta, sua principal fonte na artéria contra-lateral e as conseqüências da lesão vascular sobre a produção local de ânion superóxido por citometria de fluxo. Os resultados mostram que o relaxamento induzido por fenilefrina, caracterizado como endotélio-dependente e mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores, óxido nítrico endotelial e monofosfato de guanosina cíclico, está abolido em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão. A inibição da enzima ciclooxigenase-2, ou a remoção do ânion superóxido, normalizaram as respostas à fenilefrina em carótida contra-lateral. Em paralelo, foi encontrado que a lesão por catéter-balão aumenta a produção de ânion superóxido no endotélio de artérias contra-laterais, nas quais a fonte do radical é a ciclooxigenase-2. Esse achados permitem concluir que a lesão por catéter-balão leva à perda do relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão, contribuindo com o aumento da resposta contrátil à fenilefrina nesse leito. Os mecanismos subjacentes à abolição dessa resposta na artéria contra-lateral envolvem a participação do ânion superóxido, derivado do metabolismo local da ciclooxigenase-2.

*Palavras-chave:* catéter-balão, carótida contra-lateral,  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores, ciclooxigenase-2, ânion superóxido.

*Abstract*

PERNOMIAN, L. **Consequences of balloon catheter injury on the  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors-induced relaxation in rat contralateral carotid.** 2009. 169f. Thesis (Master degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Balloon catheter angioplasty is a procedure used to treat vascular obstructive disease, restoring blood flow. In rat carotid, the passage of balloon catheter induces a mechanical stress that alters the contralateral artery reactivity to constrictor agents and its sensorial innervation, suggesting the existence of a neurocompensatory response in this vascular bed. This procedure leads to an increase of phenylephrine-induced contraction in contralateral carotid, four days after surgery, involving the participation of the endothelium and cyclooxygenase 2 products, the impairment on endothelial nitric oxide formation and the increase on superoxide production in this artery. The existence of  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors as vasorelaxation mediators has been functionally described, suggesting their participation in inhibitory modulation of adrenergic contraction. Experimental data point to an impairment on the  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors-induced relaxation in hyperhomocysteinemic rat carotid, consequent to the oxidative stress established in this model. Based on this data, the present study has as hypothesis the impairment of the  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors-induced relaxation in contralateral rat carotid, four days after surgery, contributing to the increase of adrenergic contraction in this artery. So, the main objective of this search was to study the consequences of balloon catheter injury on the  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors-induced relaxation in contralateral rat carotid four days after surgery. Adrenergic relaxation was studied by construction of cumulative concentration-response curves to phenylephrine ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L), over pre-contraction with prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $3 \times 10^{-5}$  mol/L), in rings of rat carotid. Functional characterization of the receptors and cellular mediators of this response, the participation of superoxide anion and its main source in contralateral carotid, and the consequences of balloon catheter injury on local superoxide production were also studied. The results show that the  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors-induced relaxation in contralateral rat carotid four days after surgery is abolished. This response is endothelium-dependent, and mediated by nitric oxide derived from endothelial nitric oxide synthase and cyclic guanosine monophosphate. Inhibition of cyclooxygenase 2, as well as the remove of superoxide anion, normalized phenylephrine-induced relaxation and contraction in contralateral rat carotid. Superoxide production in endothelial cells of contralateral carotid is increased, and the main source of superoxide in these cells seems to be cyclooxygenase 2. These data suggest balloon catheter injury induces to the loss of the  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors-induced relaxation in contralateral carotid, contributing to the increase of phenylephrine-induced contraction in this artery, four days after surgery. The cellular mechanisms of this reactivity alteration seems to involve the participation of superoxide, probably derived from cyclooxygenase 2.

*Key words:* balloon catheter, contralateral carotid,  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors, cyclooxygenase 2, superoxide anion.

## *Lista de Abreviaturas e Siglas*

|                                                 |                                                                                                  |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ACh</b>                                      | acetilcolina                                                                                     |
| <b>Ang II</b>                                   | angiotensina II                                                                                  |
| <b>ANOVA</b>                                    | análise de variância                                                                             |
| <b><math>\beta</math>-GA</b>                    | ácido $\beta$ -glicirretínico                                                                    |
| <b>BMY 7378</b>                                 | dihidrocloridrato de 8-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-8-azaspiro[4,5]decano-7,9-diona |
| <b>Ca<sup>++</sup></b>                          | cálcio                                                                                           |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b>                         | cloreto de cálcio                                                                                |
| <b>CGRP</b>                                     | peptídeo relacionado ao gene da calcitonina                                                      |
| <b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b> | glicose                                                                                          |
| <b>COX</b>                                      | ciclooxigenase                                                                                   |
| <b>DHE</b>                                      | dihidroetidina                                                                                   |
| <b>EC<sub>50</sub></b>                          | concentração efetiva de uma droga que produz 50% do efeito máximo                                |
| <b>EDHF</b>                                     | fator hiperpolarizante derivado do endotélio                                                     |
| <b>E<sub>max</sub></b>                          | efeito máximo                                                                                    |
| <b>eNOS</b>                                     | óxido nítrico sintase endotelial                                                                 |
| <b>EROS</b>                                     | espécies reativas derivadas do oxigênio                                                          |
| <b>ET-1</b>                                     | endotelina-1                                                                                     |
| <b>GMPc</b>                                     | monofosfato de guanosina cíclica                                                                 |
| <b>GTP</b>                                      | trifosfato de guanosina                                                                          |
| <b>HE</b>                                       | hematoxilina/eosina                                                                              |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>               | peróxido de hidrogênio                                                                           |
| <b>5-HT</b>                                     | serotonina                                                                                       |
| <b>IC<sub>100</sub></b>                         | concentração efetiva de um inibidor que inibe 100% do efeito do agonista                         |
| <b>IF</b>                                       | intensidade de fluorescência                                                                     |
| <b>iNOS</b>                                     | óxido nítrico sintase induzida                                                                   |
| <b>IP<sub>3</sub></b>                           | trifosfato de inositol                                                                           |
| <b>K<sup>+</sup></b>                            | potássio                                                                                         |
| <b>KCl</b>                                      | cloreto de potássio                                                                              |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>             | hipofosfito de potássio                                                                          |
| <b>L-NAME</b>                                   | N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina metil ester                                                     |
| <b>L-NNA</b>                                    | N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina                                                                 |
| <b>LPS</b>                                      | lipopolissacarídeo                                                                               |

|                                      |                                                                              |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <b>M<sub>3</sub></b>                 | receptor muscarínio do tipo 3                                                |
| <b>MgSO<sub>4</sub></b>              | sulfato de magnésio                                                          |
| <b>NA</b>                            | noradrenalina                                                                |
| <b>NaCl</b>                          | cloreto de sódio                                                             |
| <b>NADPH</b>                         | nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido                          |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b>             | bicarbonato de sódio                                                         |
| <b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> | hipofosfito de sódio                                                         |
| <b>7-NI</b>                          | 7-nitroindazol                                                               |
| <b>nNOS</b>                          | óxido nítrico sintase neuronal                                               |
| <b>NO</b>                            | óxido nítrico                                                                |
| <b>NO<sup>-</sup></b>                | ânion nitroxil                                                               |
| <b>NOS</b>                           | óxido nítrico sintase                                                        |
| <b>NPS</b>                           | nitroprussiato de sódio                                                      |
| <b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>     | ânion superóxido                                                             |
| <b>ODQ</b>                           | 1 <i>H</i> -[1,2,4]-oxadiazolo [4,3- <i>a</i> ] quinoxalin-1-ona             |
| <b>pD<sub>2</sub></b>                | antilogaritmo da concentração de uma droga que induz metade do efeito máximo |
| <b>PEG</b>                           | polietilenoglicol                                                            |
| <b>Phe</b>                           | fenilefrina                                                                  |
| <b>PGF<sub>2α</sub></b>              | prostaglandina F <sub>2α</sub>                                               |
| <b>PGG<sub>2</sub></b>               | prostaglandina G <sub>2</sub>                                                |
| <b>PGH<sub>2</sub></b>               | prostaglandina H <sub>2</sub>                                                |
| <b>PGI<sub>2</sub></b>               | prostaciclina                                                                |
| <b>PGIS</b>                          | prostaciclina sintetase                                                      |
| <b>PLA<sub>2</sub></b>               | fosfolipase A <sub>2</sub>                                                   |
| <b>Pz</b>                            | prazosin                                                                     |
| <b>SOD</b>                           | superóxido-dismutase                                                         |
| <b>SP</b>                            | substância P                                                                 |
| <b>TEA</b>                           | tetraetilamônio                                                              |
| <b>TXA<sub>2</sub></b>               | tromboxano A <sub>2</sub>                                                    |

## *Sumário*

|                                                                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introdução .....</b>                                                                                                  | <b>22</b> |
| 1.1. Estado da arte.....                                                                                                    | 23        |
| 1.2. Revisão da literatura .....                                                                                            | 26        |
| <b>2. Objetivos .....</b>                                                                                                   | <b>36</b> |
| <b>3. Materiais e Métodos.....</b>                                                                                          | <b>39</b> |
| 3.1. Animais.....                                                                                                           | 40        |
| 3.2. Preparação do modelo de lesão vascular .....                                                                           | 40        |
| 3.3. Divisão dos grupos experimentais .....                                                                                 | 41        |
| 3.4. Histologia.....                                                                                                        | 41        |
| 3.5. Estudos funcionais de reatividade vascular .....                                                                       | 41        |
| 3.5.1. Protocolos experimentais .....                                                                                       | 43        |
| 3.5.1.1. Conseqüências da lesão por catéter-balão na contração induzida por Phe .....                                       | 43        |
| 3.5.1.2. Participação do endotélio na contração induzida por Phe em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão ..... | 43        |
| 3.5.1.3. Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre a contração induzida por KCl.....                                   | 43        |
| 3.5.1.4. Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento induzido por ACh.....                                 | 43        |
| 3.5.1.5. Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento induzido por Phe .....                                | 44        |
| 3.5.1.6. Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio (NPS).....       | 44        |
| 3.5.1.7. Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento induzido por Phe em aorta .....                       | 45        |
| 3.5.1.8. Caracterização dos receptores mediadores do relaxamento induzido por Phe .....                                     | 45        |
| 3.5.1.9. Participação do endotélio no relaxamento induzido por Phe .....                                                    | 46        |

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5.1.10. Participação de GAP-junctions no relaxamento induzido por Phe.....                             | 46        |
| 3.5.1.11. Participação do NO no relaxamento induzido por Phe.....                                        | 46        |
| 3.5.1.12. Participação de monofosfato de guanosina cíclico (GMP'c) no relaxamento induzido por Phe ..... | 47        |
| 3.5.1.13. Participação de canais para potássio (K <sup>+</sup> ) no relaxamento induzido por Phe .....   | 47        |
| 3.5.1.14. Participação de produtos derivados da COX no relaxamento induzido por Phe .....                | 48        |
| 3.5.1.15. Participação do ânion O <sub>2</sub> <sup>-</sup> no relaxamento induzido por Phe .....        | 48        |
| 3.5.1.16. Participação de produtos derivados da NADPH oxidase no relaxamento induzido por Phe .....      | 49        |
| 3.5.1.17. Participação de produtos derivados da COX-2 na contração induzida por Phe .....                | 49        |
| 3.5.1.18. Participação do ânion O <sub>2</sub> <sup>-</sup> na contração induzida por Phe.....           | 49        |
| 3.5.2. Análise de dados .....                                                                            | 50        |
| 3.6. Citometria de fluxo .....                                                                           | 50        |
| 3.6.1. Isolamento de células endoteliais.....                                                            | 50        |
| 3.6.2. Quantificação de espécies reativas derivadas de oxigênio (EROS).....                              | 51        |
| 3.6.2.1. Conseqüências da lesão por catéter-balão na produção de EROS..                                  | 51        |
| 3.6.2.2. Conseqüências da lesão por catéter-balão na produção de ânion O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ..... | 52        |
| 3.6.2.3. Participação da COX-2 na produção de EROS.....                                                  | 52        |
| 3.6.3. Análise estatística.....                                                                          | 52        |
| <b>4. Resultados .....</b>                                                                               | <b>53</b> |
| 4.1. Morfologia das artérias carótidas .....                                                             | 54        |
| 4.2. Morfometria das artérias carótidas .....                                                            | 55        |
| 4.3. Conseqüências da lesão por catéter-balão na contração induzida por Phe .....                        | 57        |

|                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.4. Participação do endotélio na contração induzida por Phe em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão ..... | 59  |
| 4.5. Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre a contração induzida por KCl.....                                   | 62  |
| 4.6. Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento induzido por ACh.....                                 | 64  |
| 4.7. Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento induzido por Phe.....                                 | 67  |
| 4.8. Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio (NPS) .....      | 69  |
| 4.9. Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento induzido por Phe em aorta.....                        | 71  |
| 4.10. Caracterização dos receptores mediadores do relaxamento induzido por Phe.....                                     | 75  |
| 4.11. Participação do endotélio no relaxamento induzido por Phe.....                                                    | 78  |
| 4.12. Participação de GAP-junctions no relaxamento induzido por Phe.....                                                | 80  |
| 4.13. Participação do NO no relaxamento induzido por Phe.....                                                           | 82  |
| 4.14. Participação de GMP'c no relaxamento induzido por Phe.....                                                        | 85  |
| 4.15. Participação de canais para K <sup>+</sup> no relaxamento induzido por Phe.....                                   | 87  |
| 4.16. Participação de produtos derivados da COX no relaxamento induzido por Phe.....                                    | 89  |
| 4.17. Participação do ânion O <sub>2</sub> <sup>-</sup> no relaxamento induzido por Phe.....                            | 93  |
| 4.18. Participação de produtos derivados da NADPH oxidase no relaxamento induzido por Phe .....                         | 97  |
| 4.19. Participação de produtos derivados da COX-2 na contração induzida por Phe.....                                    | 100 |
| 4.20. Participação do ânion O <sub>2</sub> <sup>-</sup> na contração induzida por Phe .....                             | 103 |
| 4.21. Conseqüências da lesão por catéter-balão na produção de EROS.....                                                 | 107 |
| 4.22. Conseqüências da lesão por catéter-balão na produção de ânion O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....                   | 109 |
| 4.23. Participação da COX-2 na produção de EROS.....                                                                    | 111 |

|                                         |            |
|-----------------------------------------|------------|
| <b>5. Discussão .....</b>               | <b>114</b> |
| <b>6. Conclusões .....</b>              | <b>138</b> |
| <b>Referências bibliográficas .....</b> | <b>140</b> |
| <b>Apêndices .....</b>                  | <b>151</b> |

## ***1- Introdução***

## **1.1 - Estado da Arte**

Doenças cardiovasculares são as principais causas de morte nos Estados Unidos, Europa e grande parte da Ásia (ROSS, 1999). Essa realidade também atinge países em desenvolvimento, como Brasil, Venezuela e Colômbia, onde os índices de mortalidade por doenças cardiovasculares chegam a atingir 20 a 35% do total (HERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 1998). As doenças relacionadas a alterações na estrutura da parede dos vasos sanguíneos são a maior causa de morte por problemas cardiovasculares (FRUCHART & DURIEZ, 2001; IP et al., 1990).

O comprometimento vascular através da obstrução da parede do vaso e o impedimento ao fluxo sanguíneo é uma das complicações decorrentes das doenças cardiovasculares como a aterosclerose (ROSS, 1999).

A angioplastia por cateter-balão tem sido amplamente utilizada em intervenções cirúrgicas com o objetivo de desobstruir os vasos e restaurar o fluxo sanguíneo (GRECH, 1993). A principal limitação desse procedimento é a restenose vascular, que ocorre devido à formação da camada neointima (CLOWES et al., 1983). Esse processo é decorrente da liberação de componentes humorais tais como a angiotensina II (Ang II) e endotelina-1 (ET-1) que participam no processo de formação da neointima resultante da lesão por cateter-balão em carótida de rato (FERNANDEZ-ALFONSO et al, 1997; DOUGLAS et al., 1994).

O processo de restenose é uma resposta adaptativa da parede arterial à injúria mecânica, caracterizada pela migração e proliferação de células musculares lisas, deposição de matrix extracelular e remodelamento vascular, que pode levar a uma nova obstrução do lúmen arterial (COSTA et al., 2005).

A lesão por cateter-balão tem sido experimentalmente utilizada para estudar o processo de restenose (FERNS et al., 1992). Entretanto, a lesão vascular induzida por cateter-balão pode promover alterações em sítios distantes da lesão.

MILNER et al. (1997) observaram que um dia após a lesão por cateter-balão em carótida esquerda de rato, a densidade de terminais nervosos contendo substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) estava reduzida. Em paralelo, nesse mesmo tempo, foi observado um aumento da inervação contendo esses peptídeos na artéria contra-lateral à lesão. Esse aumento foi transitório, visto que 28 dias após a cirurgia, os níveis de neuropeptídeos não foram diferentes do grupo controle. Esses dados sugerem que a lesão vascular induzida por cateter-balão promove uma resposta neurocompensatória na artéria carótida contra-lateral à lesão.

ACCORSI-MENDONÇA et al. (2004) observaram também que a lesão por cateter-balão altera a reatividade da artéria contra-lateral. Os autores relatam um aumento na contração máxima induzida por fenilefrina (Phe), quatro e sete dias após a lesão, e à Ang II, 15 e 30 dias após a lesão. A contração máxima induzida por esses agonistas estava reduzida na artéria ipsi-lateral, sugerindo uma resposta compensatória à lesão vascular refletida na reatividade da artéria contra-lateral. Essa resposta independe de fatores humorais, visto que a reatividade a esses agonistas não foi alterada em artéria aorta de animais operados.

OLIVON (2006) demonstrou um comprometimento na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), acompanhada pelo aumento na produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ), em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão por cateter-balão, sugerindo o estabelecimento de estresse oxidativo nesse leito.

De ANDRADE et al. (2006) demonstraram que o efeito relaxante induzido por Phe em carótida de rato, mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores, está prejudicado no modelo de hiperhomocisteinemia, atribuído à redução da biodisponibilidade local de NO como resultado

do estresse oxidativo estabelecido pela condição. Paralelamente, esses autores ainda observaram um aumento na resposta de contração induzida por Phe em carótida de rato hiperhomocisteinêmico, sugerindo que o vasorelaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores parece ser um importante modulador negativo sobre a vasoconstrição adrenérgica (De ANDRADE et al., 2006).

Os dados fornecidos por ACCORSI-MENDONÇA et al. (2004), OLIVON (2006) e De ANDRADE et al. (2006) permitem construir a hipótese de que a lesão por catéter-balão prejudique o relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão vascular, em função do estresse oxidativo estabelecido nesse modelo. O prejuízo no relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores poderia estar contribuindo com o aumento da resposta contrátil à Phe, observada em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão vascular por catéter-balão.

A importância do estudo das conseqüências da lesão por catéter-balão sobre as respostas vasculares à fenilefrina, bem como dos mecanismos intracelulares subjacentes às alterações de reatividade ao agonista adrenérgico em carótida contra-lateral de rato, é fundamental para a compreensão dos fenômenos não humorais que se processam em sítios distantes da lesão por catéter-balão.

O objetivo do presente trabalho foi estudar as conseqüências da lesão por cateter-balão sobre as respostas de contração e relaxamento induzidas pela fenilefrina em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão, bem como os mecanismos intracelulares subjacentes às alterações de reatividade ao agonista.

## **1.2 - Revisão da Literatura**

No homem, a aterosclerose é um processo patológico que progride lentamente com o envelhecimento, podendo afetar a reatividade e a hemodinâmica de diversos vasos, acarretando em obstrução do fluxo sanguíneo (BRIZZOLARA et al., 1994). Embora a aterosclerose afete principalmente vasos de condutância, várias alterações também ocorrem na microcirculação.

O processo aterosclerótico é caracterizado pela obstrução do vaso em função do crescimento intraluminal dos componentes lipídicos e/ou celulares associados a remodelamento vascular, podendo interferir progressiva ou abruptamente no fluxo sanguíneo (ROSS, 1999). Regiões de curvaturas ou bifurcações dos vasos sanguíneos, onde freqüentemente ocorrem alterações hemodinâmicas, são importantes alvos para o desenvolvimento de lesão vascular e, conseqüentemente, de instalação do processo aterosclerótico (SCHWARTZ et al., 1992). Lesões ateroscleróticas podem levar a conseqüências clínicas como infarto do miocárdio, doenças vasculares cerebrais, gangrena e perda de funções das extremidades, que, por sua vez, podem acarretar em inúmeras seqüelas clínicas (ROSS, 1999).

A parede vascular é um tecido ativo e integrado, composto de componentes celulares (células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos) e não celulares (matriz extracelular). Estímulos fisiológicos ou patológicos podem induzir a aumento, diminuição ou ainda, mudanças na forma desses componentes (TOUYZ & SCHIFFRIN, 2000).

Três camadas, morfológicamente distintas, constituem a parede arterial. A primeira camada, que reveste a superfície interna do vaso sanguíneo, é chamada de camada íntima ou túnica interna. Ela é constituída por uma camada simples e contínua de células endoteliais e por uma lâmina de fibras elásticas interna, responsável pelo limite do lúmen das artérias

(HUSHANG, 1979; ROSS & GLOMSET, 1976). Vários componentes de tecido matricial conectivo extracelular, como colágeno, elastina, fibronectina, laminina e glicosaminoglicanas, estão presentes entre a membrana limitante elástica interna e a camada endotelial. (DAVIES & HAGEN, 1993).

A segunda camada vascular, denominada camada média, é composta de células musculares lisas, orientadas diagonalmente, e envolvidas por colágeno, fibras elásticas e proteoglicanas (HUSANG, 1979). Estas células são responsáveis pela manutenção do tônus muscular, via contração-relaxamento, bem como, pela integridade do vaso por meio da proliferação e síntese de matriz extracelular (CAMPBELL e cols. 1988). Existem dois tipos de células presentes na camada média: células que expressam proteínas responsáveis pela contração do músculo liso ( $\alpha$ -actina e cadeia pesada da miosina), e um outro tipo celular, desprovido de proteínas contráteis (MAJESKY & SCHARTZ, 1990; MAJESKY et al., 1992; HOLIFIELD et al., 1996).

A camada mais externa, conhecida como camada adventícia, é formada principalmente por fibroblastos intercalados por células musculares lisas localizadas entre os feixes de colágeno e envolvidos por proteoglicanas (HUSHANG, 1979). A adventícia é uma camada complexa por ser formada por diferentes células, fibras e terminações nervosas que lhe conferem seu principal papel fisiológico conhecido até o presente momento, a mediação nervosa (RHODIN, 1980).

Em artérias de maior calibre, como aorta, carótida, femoral e coronária, existe um conjunto de microvasos chamado de *vasa vasorum*. O *vasa vasorum* se estende da adventícia até a média, sendo responsável pela nutrição e oxigenação das células da parede vascular (SCOTLAND et al., 2000).

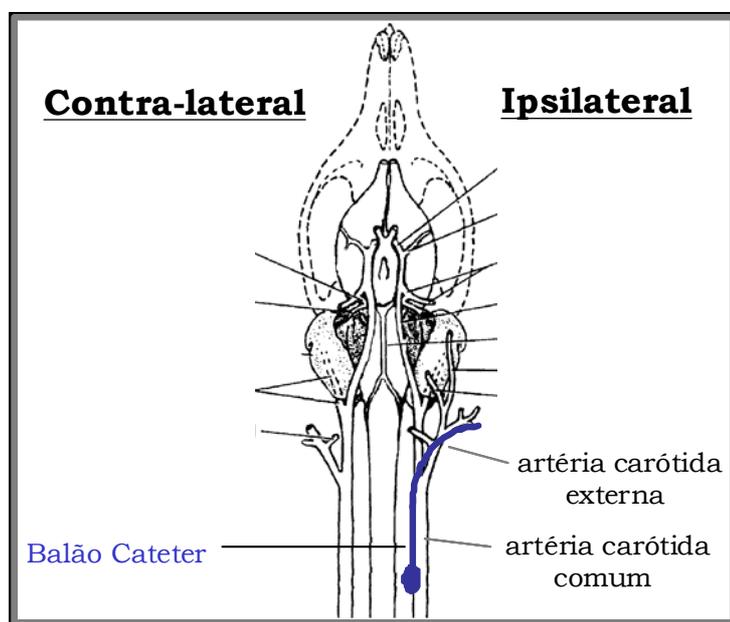
A angioplastia por catéter-balão é amplamente utilizada para tratamento de doenças obstrutivas de vasos periféricos e coronários, para restauração do fluxo sanguíneo (GRECH,

2003). Apesar de muito utilizada, existem controvérsias em relatos dos efeitos positivos e negativos conseqüentes ao balão cateterismo (SCHWARTZ & HENRY, 2002).

O modelo de angioplastia por catéter-balão em carótida de rato tem sido muito estudado para se compreender o processo de estenose por formação da camada neointima, em analogia ao processo de re-estenose clínica, uma importante limitação ao uso do balão-cateterismo, que pode ocorrer após a lesão vascular induzida pelo catéter-balão (FERNS et al., 1992; FAXON et al., 1997). A re-estenose é um processo de obstrução do lúmen do vaso decorrente da formação da camada neointima, que resulta de um processo de reparo tecidual envolvendo apoptose, migração, proliferação e modificação da matrix extracelular, deflagrado pela lesão vascular. A re-estenose resulta da combinação da obstrução do lúmen, formação de placa ateromatosa, proliferação celular, remodelamento vascular e formação de cicatriz na parede do vaso (O'BRIEN et al., 1994; LIBBY & TANAKA, 1997). Estudos relatam a participação de vários mediadores inflamatórios no início da fase inflamatória (O'BRIEN et al., 1994; LIBBY & TANAKA, 1997; GIBBONS & DZAU, 1994), acompanhados de maciça morte das células vasculares ( POLLMAN et al., 1999) e degradação da matriz celular (STRAUSS et al., 1994; RAJAGOPALAN et al., 1996). A fase tardia de estabilização da lesão é regida pela proliferação residual, migração celular (SCHWARTZ, 1997), apoptose (POLLMAN et al., 1999), remodelamento e secreção de matriz extracelular (STRAUSS et al., 1994; FAXON et al., 1997). A migração de células do músculo liso envolve células que vão se proliferar e células que nunca se dividirão, sugerindo que os dois tipos de células são importantes no processo de produção da camada neointima (CLOWES & SCHWARTZ, 1985). A proliferação das células do músculo liso em resposta a lesão endotelial é um processo característico que ocorre nas primeiras semanas após a lesão (CLOWES et al., 1983; ROSS, 1999), não sendo limitada ao sitio da lesão, podendo ocorrer também em regiões adjacentes (FERNS et al., 1992).

Vários modelos experimentais, nos quais a proliferação de células do músculo liso é estimulada, têm sido desenvolvidos para estudar doenças que envolvem a replicação celular excessiva. Dentre eles, o modelo experimental de angioplastia por catéter-balão em carótida de rato tem sido muito utilizado para estudar o processo de formação da camada neoíntima (CLOWES et al., 1983; SCHWARTZ et al., 1985; SCHWARTZ et al., 1995) e compreender as disfunções vasculares originárias da formação dessa camada (CLOWES et al., 1983).

No modelo de angioplastia por catéter-balão, há desnudação endotelial e distensão da parede do vaso através da ação mecânica de um catéter contendo um balão inflável na extremidade (CLOWES et al., 1983). Após a introdução do catéter-balão no lúmen do vaso, e estando ele posicionado na região a ser lesada, o balão é inflado e movimentado, com o objetivo de remover o endotélio (CLOWES et al., 1983).



**Figura 1.** Esquema representativo do procedimento realizado na angioplastia por cateter balão, em artéria carótida de ratos da linhagem Wistar. (Adaptado de Clowes, Reidy e Clowes, 1983).

Como o endotélio regula o tônus vascular, é importante examinar as funções contrátil e relaxante após a desnudação endotelial do vaso durante o balão-cateterismo. Nesse contexto, ANTONACCIO et al. (1994) encontraram, num modelo de angioplastia por catéter-balão em carótida de rato, uma significativa redução na amplitude das contrações máximas induzidas por ET-1, Ang II, noradrenalina (NA), Phe, serotonina (5-HT) e cloreto de potássio (KCl) na artéria carótida lesada (denominada ipsi-lateral), duas semanas após a lesão por catéter-balão, quando comparadas às respostas aos mesmos agentes na artéria carótida contra-lateral à lesão, utilizada como controle. Considerando que as células musculares lisas que migram da média para a íntima, a fim de reparar a lesão endotelial, são convertidas do fenótipo adulto contrátil para o fenótipo neonatal sintético, que contém um menor volume de miosina em comparação às células de fenótipo contrátil (CAMPBELL et al., 1988), os autores atribuíram a hiporresponsividade contrátil da artéria ipsilateral à responsividade contrátil intrínseca alterada das células da neointima, sugerindo que alterações fenotípicas induzidas em proteínas envolvidas na contração seriam responsáveis pela redução na capacidade de contração do músculo liso da artéria lesada frente aos agentes vasoconstritores.

Um pouco mais tarde, MILNER et al. (1997) sugeriram que a lesão por balão-cateterismo promove alterações significativas em sítios distantes da lesão, afetando a estrutura e/ou a função desses leitos vasculares, o que poderia comprometer a utilização de artérias contra-laterais à lesão como controle das artérias ipsilaterais. Num modelo de angioplastia por catéter-balão em carótida de rato, MILNER et al. (1997) observaram uma redução significativa da inervação sensorial na artéria ipsilateral, paralela a um aumento transitório na densidade de nervos sensoriais da artéria contra-lateral, contendo SP e CGRP, um dia após a lesão vascular, não perdurando até o 28º dia do pós-cirúrgico imediato. Conhecendo o efeito proliferativo da SP sobre células musculares lisas vasculares (NILSSON et al., 1985), MILNER et al. (1997) sugeriram que a lesão de nervos sensoriais, com conseqüente liberação

desses neuropeptídeos, poderia contribuir indiretamente com a formação de neointima na artéria ipsilateral após a lesão vascular. Segundo os autores, a lesão dos nervos perivasculares da artéria ipsilateral pode ter sido o estímulo para o aumento no conteúdo de SP e CGRP dos nervos da artéria contra-lateral, refletindo a ocorrência de uma resposta neurocompensatória à lesão vascular nesse leito.

Num modelo de angioplastia por cateter-balão em carótida de rato, BRUIJNS et al. (1998) observaram um efeito proliferativo da infusão de Ang II sobre as células musculares lisas da média da artéria contra-lateral, quatro e 12 semanas após a lesão, inibido após simpatectomia, e não observado na média da artéria ipsilateral. Esses achados sugerem uma replicação diferenciada das células musculares lisas, induzida pela Ang II e mediada pelo sistema nervoso autônomo simpático, na artéria lesada e na contra-lateral.

Os dados fornecidos por MILNER et al. (1997) e BRUIJNS et al. (1998) sugerem que a lesão por cateter-balão altera algumas funções da artéria contra-lateral, comprometendo seu uso como parâmetro controle para as respostas funcionais observadas na artéria lesada. Com base nessas considerações, pesquisadores do nosso laboratório empenharam-se a estudar a reatividade da artéria carótida contra-lateral à lesão vascular induzida em diferentes modelos experimentais, visando verificar se a resposta neurocompensatória deflagrada pela lesão vascular alteraria a reatividade desse leito vascular.

De ANDRADE (2001) demonstrou que o processo de estenose total em carótida de cobaio induziu à redução da contração máxima à Phe nas artérias estenosadas e ao aumento desse parâmetro na artéria contra-lateral à estenose, de maneira tempo-dependente, sugerindo um mecanismo compensatório de reatividade. FUKADA et al. (2004) observaram que a lesão vascular decorrente do implante de anel de silicone em carótida induz ao aumento da resposta contrátil à Phe na artéria contra-lateral quatro e sete dias após o implante.

ACCORSI-MENDONÇA et al. (2004) estudaram a reatividade de carótida de rato contra-lateral à lesão por catéter-balão a agonistas vasoconstrictores, comparando-a com a reatividade de carótidas de animais intactos. Os resultados desse trabalho revelaram um aumento na contração máxima induzida por Phe em artéria contra-lateral, quatro e sete dias após a lesão, e à Ang II, 15 e 30 dias após a lesão, em relação a artérias de animais controle inactos. Segundo os autores, o aumento da reatividade da artéria contra-lateral à Ang II e à Phe não estaria relacionado com fatores humorais, pois não foi observado em aorta. Nesse trabalho, também foi analisado o papel do endotélio e a participação de prostanóides na hiperreatividade à Phe encontrada em carótida contra-lateral quatro dias após a lesão. Os resultados desses experimentos mostraram que a remoção do endotélio não alterou significativamente a amplitude da contração máxima induzida pela Phe na artéria contra-lateral, sugerindo um comprometimento da modulação inibitória do endotélio sobre a vasoconstricção adrenérgica. A inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) levou à redução significativa da amplitude da contração máxima induzida pela Phe na artéria contra-lateral, sugerindo o envolvimento de prostanóides derivados da COX-2 na hiperreatividade contrátil à Phe em carótida contra-lateral quatro dias após a lesão induzida por catéter-balão (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2004).

OLIVON (2006) também demonstrou um aumento na amplitude da contração máxima induzida pela Phe em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão em rato, quatro dias após a lesão vascular, em relação a artérias de animais controle intactos, corroborando com os resultados de ACCORSI-MENDONÇA et al. (2004). Os resultados desse trabalho também revelaram um comprometimento na biodisponibilidade de NO, acompanhada pelo aumento na produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ), redução na marcação para nitrotirosina (marcador indireto de estresse oxidativo, que detecta o produto da reação de inativação do NO pelo  $O_2^-$ ) e redução na expressão de NO sintase endotelial (eNOS) em carótida contra-lateral,

sugerindo a participação do ânion  $O_2^-$  no comprometimento da formação de NO endotelial, mas não na inativação de NO, em carótida contra-lateral. Esse mecanismo poderia estar contribuindo com o aumento da resposta contrátil da artéria contra-lateral à Phe, quatro dias após a lesão. A autora também observou uma redução da resposta contrátil à Phe na artéria contra-lateral pela inibição seletiva da COX-2, corroborando com os resultados de ACCORSI-MENDONÇA et al. (2004), que sugerem a participação de prostanóides derivados dessa isoforma de COX no aumento da resposta contrátil à Phe na artéria contra-lateral.

Phe induz à vasoconstrição por ativar receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, que exercem papéis extremamente importantes em vários processos fisiológicos, incluindo a contração da musculatura lisa (JAHNICHEN et al., 2004). Contudo, crescentes evidências sugerem a existência de  $\alpha_1$ -adrenoceptores de relaxamento em diferentes artérias, como as artérias braquial e pulmonar isoladas de coelho e rato, respectivamente (ZSCHAUER et al., 1997; BOER et al., 1999), que parecem representar um mecanismo de controle local para a modulação, ao menos parcial, das respostas vasoconstrictoras a aminas simpatomiméticas (FUJIMOTO & ITOH, 1997; FILIPPI et al., 2001).

FILIPPI et al. (2001) demonstraram que Phe, numa faixa de concentrações menor que a necessária para produzir aumento da pressão de perfusão, foi capaz de reduzir a pressão de perfusão em leito mesentérico de rato, sugerindo um efeito relaxante mediado por receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. De fato, o antagonismo em receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos aboliu o efeito hipotensor da Phe nessa preparação, sugerindo que o efeito relaxante induzido pelo agonista  $\alpha_1$ -adrenérgicos é mediado pelo subtipo  $\alpha_{1D}$  dos receptores adrenérgicos. Os resultados desse trabalho mostraram que o vasorelaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor parece ser dependente de endotélio e envolver a participação de NO, pois foi abolido pela remoção endotelial e adição do inibidor de NO sintases L-NAME, respectivamente (FILIPPI et al., 2001).

De ANDRADE et al. (2006) também conseguiram demonstrar um efeito relaxante induzido por Phe em carótida de rato. Nesse trabalho, os autores observaram que o relaxamento induzido por Phe em carótida de rato é endotélio-dependente, mediado por receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos e por NO derivado de eNOS, não envolvendo a participação de prostanóides (De ANDRADE et al., 2006).

Esses achados sugerem que o relaxamento induzido por Phe seja mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores endoteliais. De fato, VINCI et al. (2007) conseguiram demonstrar a presença de  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em cultura de células endoteliais de veia umbilical humana, o que reforça a hipótese de que o relaxamento induzido por Phe em alguns leitos vasculares seja mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores endoteliais.

O vasorelaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores está prejudicado em algumas condições. De ANDRADE et al. (2006) observaram um prejuízo no vasorelaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores, em carótida de rato hiperhomocisteinêmico, atribuído à redução da biodisponibilidade local de NO como resultado do estresse oxidativo estabelecido pela hiperhomocisteinemia. Paralelamente, esses autores ainda observaram um aumento na resposta de contração induzida por Phe em carótida de rato hiperhomocisteinêmico, sugerindo que o vasorelaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores parece ser um importante modulador negativo sobre a vasoconstrição adrenérgica (De ANDRADE et al., 2006).

O tônus vascular é a resultante do equilíbrio entre mecanismos de contração e relaxamento musculares, que se contrapõem e se modulam simultaneamente. Alterações nesses mecanismos refletem-se sobre o tônus vascular como alterações de reatividade. O comprometimento do mecanismo de vasorelaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores poderia contribuir com o aumento da resposta de vasoconstrição adrenérgica, que parece ser modulada, de maneira negativa, por esse mecanismo de relaxamento. Considerando que, em condições de estresse oxidativo, há um comprometimento do vasorelaxamento mediado por

$\alpha_{1D}$ -adrenoceptores, importante para modular a vasoconstricção adrenérgica, os achados de ACCORSI-MENDONÇA et al. (2004), OLIVON (2006) e De ANDRADE et al. (2006) permitem construir a hipótese de que o relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão por catéter-balão, esteja prejudicado, em função do estresse oxidativo estabelecido nesse modelo, o que poderia estar contribuindo com o aumento da resposta contrátil à Phe observada nesse leito, durante esse período.

O presente trabalho teve, portanto, como objetivo central estudar as conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão. A contribuição desse trabalho faz-se evidente no estudo das alterações funcionais que ocorrem em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão, necessário à compreensão dos importantes mecanismos neurocompensatórios envolvidos nesse modelo animal. Por fim, o trabalho se justifica pela relativa falta de conhecimentos sobre o mecanismo de relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores, ainda não estudado no modelo de lesão vascular por catéter-balão em carótida contra-lateral de rato.

## ***2 - Objetivos***

## 2.1 - Objetivo Geral

Estudar as conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão.

## 2.2 - Objetivos Específicos

- Estudar a participação do endotélio no relaxamento induzido por Phe em carótida controle e contra-lateral à lesão.
- Caracterizar os receptores mediadores do relaxamento induzido por Phe em carótida controle e contra-lateral à lesão.
- Estudar a participação de GAP-junctions no relaxamento induzido por Phe em carótida controle e contra-lateral à lesão.
- Estudar participação do NO e das isoformas das NOS no relaxamento induzido por Phe em carótida controle e contra-lateral .
- Estudar a participação do monofosfato de GMP'c no relaxamento induzido por Phe em carótida controle e contra-lateral.
- Estudar a participação de canais para potássio no relaxamento induzido por Phe em carótida controle e contra-lateral.
- Estudar a participação de produtos derivados das isoformas de COX no relaxamento induzido por Phe em carótida controle e contra-lateral.
- Estudar a participação do ânion  $O_2^-$  no relaxamento induzido por Phe em carótida controle e contra-lateral.
- Estudar a participação dos produtos da NADPH oxidase no relaxamento induzido por Phe em carótida controle e contra-lateral.

- Estudar as conseqüências da lesão por catéter-balão sobre a contração induzida por Phe em carótida contra-lateral.
- Estudar a participação do endotélio na contração induzida por Phe em carótida contra-lateral.
- Estudar a participação de produtos derivados da COX-2 na contração induzida por Phe em carótida contra-lateral.
- Estudar a participação do ânion  $O_2^-$  na contração induzida por Phe em carótida contra-lateral.
- Estudar as conseqüências da lesão por catéter-balão na produção de ânion  $O_2^-$  nas células endoteliais de carótida contra-lateral.
- Determinar a principal fonte de ânion  $O_2^-$  em células endoteliais de carótida contra-lateral.

### ***3 - Materiais e Métodos***

### **3.1 - Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos, com aproximadamente 75 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campos de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos com livre acesso a água e alimento, em temperatura constante de 22°C e em ciclo de luz de 12 horas (claro/escuro). O uso de animais no projeto de pesquisa foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (processo nº121/2007).

### **3.2 - Preparo do modelo de lesão vascular**

Os animais foram anestesiados com Ketamina (100mg/kg) e Xylazina (100 mg/Kg), através de administração intraperitoneal. Realizou-se uma incisão longitudinal na linha média cervical anterior de aproximadamente 2 cm, separação por planos até identificação e isolamento das artérias carótidas comum, externa e interna esquerda.

As artérias carótidas comum e interna foram separadas e tracionadas até evitar o refluxo sanguíneo e a ligação da carótida externa, na porção distal a bifurcação carotídea. Posteriormente, realizou-se na carótida externa pequena incisão, pela qual um cateter balão (2F Fogarty) foi introduzido até a luz da carótida comum.

Com o cateter posicionado na luz do vaso, 0,1 ml de solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) foi adicionado ao cateter, inflando o balão na luz arterial e distendendo a parede do vaso. Foram realizados três movimentos de deslocamento de cateter, no sentido longitudinal a partir da bifurcação da carótida, provocando a lesão na maior parte possível do endotélio vascular.

Após a retirada do cateter, a carótida externa foi ligada na porção proximal à bifurcação para evitar o sangramento e os fluxos sanguíneos foram restabelecidos.

Foi administrado oxitetraciclina (400mg/Kg), via subcutânea, após o procedimento.

### **3.3 – Divisão dos grupos experimentais**

Os animais foram divididos em dois grupos, sendo um grupo controle, composto de animais intactos, sem qualquer manipulação cirúrgica, e um grupo operado, composto por animais submetidos ao procedimento cirúrgico de lesão vascular. Foram utilizados animais da mesma idade em ambos os grupos.

### **3.4 – Histologia**

Os segmentos de artérias de animais controle e artérias contra-laterais e ipsilaterais de animais operados (4 dias após a cirurgia) foram removidos e fixados em formol tamponado a 10% durante 24 horas. Esses tecidos foram fixados, desidratados e incluídos em blocos de parafina. Cortes de 4 µm de espessura foram dispostos em lâmina de microscopia. As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração com Hematoxilina/Eosina. Os cortes foram analisados em microscópio Nikon (Japão) com aumento de 40x, e as imagens foram captadas por câmera digital (Coolpix 4500, Roper Scientific, Japão) armazenadas em computador e editadas utilizando o software Adobe Photo Shop 7.0.

### **3.5 – Estudos funcionais da reatividade vascular**

Os animais foram sacrificados 4 dias após a cirurgia em carótida comum esquerda. Através de uma incisão na linha média do pescoço, a artéria carótida contra-lateral à lesão por

catéter-balão foi exposta, nervos e tecidos conjuntivo e adiposo foram removidos, a artéria foi isolada e retirada do animal.

Após o isolamento, a artéria foi cortada em anéis de 4mm e dois ganchos de metal foram inseridos no lúmen da mesma para produzir tensão. No caso de animais controle, foi realizado o mesmo procedimento de remoção da artéria contra-lateral.

Os anéis foram colocados em cubas de órgão isolado (5 mL), nutridos com solução de Krebs (NaCl 118,4 mmol/L; KCl 4,7 mmol/L; CaCl<sub>2</sub> 1,9 mmol/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mmol/L; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mmol/L; NaHCO<sub>3</sub> 25 mmol/L; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11,6 mmol/L; pH 7,4), gaseificada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>), e mantidos à temperatura constante de 37°C.

Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro, a um transdutor para registro de contração isométrica (Tri 201-Letica, Espanha). Os resultados das contrações foram obtidos através de programa de computador (Windaq DataQ) em computador conectado ao transdutor.

Antes do início do protocolo experimental, as preparações permaneceram em repouso sob uma tensão passiva ideal (1g), durante 60 minutos para estabilização. Após o período de estabilização a viabilidade da preparação foi testada com cloreto de potássio (90 mmol/L) e fenilefrina (10<sup>-7</sup> mol/L) até a reprodução da resposta contrátil.

De acordo com o protocolo experimental, o endotélio foi preservado ou removido mecanicamente. Em todos os experimentos a presença do endotélio foi averiguada pela aplicação de 10<sup>-6</sup> mol/L de acetilcolina (ACh), sobre a pré-contração desencadeada pela Phe. Anéis que produziram relaxamento mínimo de 80% do valor da pré-contração inicial foram considerados com endotélio intacto e utilizados nos experimentos. As artérias na possuem tônus basal quando suspensas, *in vitro*, ou seja, sobre as condições normais utilizadas para o ensaio farmacológico, os efeitos relaxantes só podem ser quantificados em vasos isolados pré-contráidos com agentes estimulantes.

### **3.5.1 – Protocolos experimentais**

#### **3.5.1.1 – Conseqüências da lesão por catéter-balão na contração induzida por Phe**

Para verificar se a lesão por catéter-balão altera a resposta contrátil à Phe em carótida contra-lateral, quatro dias após a lesão, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L), em artérias de animais controle e operados, em presença de endotélio.

#### **3.5.1.2 – Participação do endotélio na contração induzida por Phe em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão**

Para determinar a participação do endotélio na contração induzida por Phe em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão, quatro dias após a lesão, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L), em artérias de animais controle e operados, em ausência de endotélio, removido mecanicamente dos anéis.

#### **3.5.1.3 – Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre a contração induzida por KCl**

Para verificar se a lesão por catéter-balão afeta a integridade muscular da artéria contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o agente despolarizante KCl (10 a 120 mmol/L), em artérias de animais controle e operados, em presença de endotélio.

#### **3.5.1.4 – Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento induzido por ACh**

Para verificar se a lesão por catéter-balão altera o relaxamento colinérgico na artéria contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o agonista

muscarínico ACh ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) em artérias de animais controle e operados, em presença de endotélio, após pré-contracção com Phe ( $10^{-7}$  mol/L).

### **3.5.1.5 – Consequências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento induzido por Phe**

Para verificar se a lesão por catéter-balão altera o relaxamento induzido por Phe na artéria contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em artérias de animais controle e operados, na presença de endotélio, após pré-contracção com prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  mol/L). Todos os protocolos de relaxamento induzido por Phe foram conduzidos em presença do antagonista  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico WB 4101 ( $10^{-10}$  mol/L), pré-incubado 30 minutos antes da pré-contracção (De OLIVEIRA et al., 1998), para excluir a participação desses receptores mediadores da contracção adrenérgica, em carótida de rato, durante a estimulação com Phe, o que, teoricamente, facilita a observação e detecção da resposta de relaxamento adrenérgico induzido pelo agonista  $\alpha_1$ -seletivo Phe.

### **3.5.1.6 – Consequências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio (NPS)**

Para verificar se a lesão por catéter-balão afeta os mecanismos musculares de relaxamento na artéria contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o doador de óxido nítrico NPS ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) em artérias de animais controle e operados, em presença de endotélio, após pré-contracção com Phe ( $10^{-7}$  mol/L). O NPS produz um relaxamento endotélio-independente, devido ao mecanismo de liberação do mediador relaxante óxido nítrico a partir de sua estrutura, o que permite avaliar a função muscular relaxante, sem interferência do endotélio.

### **3.5.1.7 – Conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento induzido por Phe em aorta**

Para verificar se a lesão por catéter-balão altera o relaxamento induzido por Phe em outros leitos vasculares, além da carótida contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe ( $10^{-15}$  a  $3 \times 10^{-10}$  mol/L) em aorta de animais controle e operados, na presença de endotélio, após pré-contracção com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \times 10^{-6}$  mol/L) (BONAVENTURA et al., 2007). O relaxamento induzido por Phe em aorta foram conduzidos nas mesmas condições que em carótida, ou seja, em presença do antagonista  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico WB 4101 ( $10^{-10}$  mol/L), pré-incubado 30 minutos antes da pré-contracção (De OLIVEIRA et al., 1998).

### **3.5.1.8 – Caracterização dos receptores mediadores do relaxamento induzido por Phe**

Para determinar o tipo de receptor responsável por mediar o relaxamento induzido por Phe em carótida de rato, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio intacto, na presença de antagonistas seletivos para os tipos de adrenoceptores.

A participação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos no relaxamento induzido por Phe em carótida de rato foi verificada pela adição do antagonista seletivo para  $\alpha_1$ -adrenoceptores prazosin ( $\text{Pz } 10^{-9}$  mol/L), adicionado 20 minutos antes da pré-contracção da preparação. A participação de receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos no relaxamento induzido por Phe em carótida de rato foi verificada pela adição do antagonista seletivo para  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores BMY 7378 (dihidrocloridrato de 8-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-8-azaspiro[4,5]decano-7,9-diona) ( $10^{-8}$  mol/L), adicionado 30 minutos antes da pré-contracção da preparação (GOETZ et al., 1995). Para excluir a participação de  $\alpha_2$ -adrenoceptores no relaxamento induzido por Phe em carótida de rato, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida contra-lateral e de carótida controle, com endotélio intacto, em presença do antagonista seletivo para  $\alpha_2$ -adrenoceptores ioimbina ( $10^{-5}$  mol/L),

adicionado 20 minutos antes da pré-contracção da preparação (BARBIERI et al., 1998). Para excluir a participação de  $\beta$ -adrenoceptores no relaxamento induzido por Phe em carótida de rato, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida contra-lateral e de carótida controle, com endotélio intacto, em presença do antagonista não-seletivo para  $\beta$ -adrenoceptores propranolol ( $10^{-6}$  mol/L), adicionado 30 minutos antes da pré-contracção da preparação (McDONALD et al., 1999).

#### **3.5.1.9 – Participação do endotélio no relaxamento induzido por Phe**

Para verificar a participação do endotélio no mecanismo de vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida contra-lateral e controle, em ausência de endotélio, removido mecanicamente das preparações.

#### **3.5.1.10 – Participação de GAP-junctions no relaxamento induzido por Phe**

Para verificar a participação de GAP-junctions no mecanismo de vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de controle e carótida contra-lateral, com endotélio, em presença do bloqueador de GAP-junctions ácido  $\beta$ -glicirretínico ( $\beta$ -GA,  $10^{-5}$  mol/L) (TAKEDA et al., 2004), adicionado 20 minutos antes da pré-contracção.

#### **3.5.1.11 – Participação do NO no relaxamento induzido por Phe**

Para verificar a participação do NO no mecanismo de vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio intacto, em presença do inibidor não seletivo de NO sintases L-NAME ( $N^G$ -nitro-L-arginina metil éster,  $10^{-4}$  mol/L), adicionado 30 minutos antes da pré-contracção da preparação (REES et al., 1990).

Para verificar a participação das isoformas da NO sintase (NOS) no mecanismo de vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida contra-lateral e controle, com endotélio intacto, em presença do inibidor seletivo de NOS endotelial (NOSe) L-NNA ( $N^G$ -Nitro-L-arginine,  $10^{-4}$  mol/L) (DWYER et al., 1991), do inibidor seletivo de NOS neuronal (nNOS) 7-NI (7-nitroindazol,  $10^{-4}$  mol/L) (De ANDRADE, 2005), e do inibidor de NOS induzida (NOSi) 1400W ( $10^{-7}$  mol/L) (GARVEY et al., 1997), adicionados 30 minutos antes da pré-contracção da preparação.

#### **3.5.1.12 – Participação de monofosfato de guanosina cíclico (GMP'c) no relaxamento induzido por Phe**

Para verificar a participação de GMP'c no mecanismo de vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio, em ausência e presença do inibidor seletivo de guanilato ciclase solúvel de ODQ (1*H*-[1,2,4]-oxadiazolo [4,3-*a*] quinoxalin-1-ona,  $10^{-6}$  mol/L), adicionado 30 minutos antes da pré-contracção (TIRAPELLI et al., 2006).

#### **3.5.1.13 – Participação de canais para potássio ( $K^+$ ) no relaxamento induzido por Phe**

Para verificar a participação de canais para  $K^+$  no mecanismo de vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio, em ausência e presença do bloqueador não-seletivo de canais para  $K^+$  tetraetilamônio (TEA,  $10^{-2}$  mol/L), adicionado 30 minutos antes da pré-contracção (TIRAPELLI et al., 2006).

#### **3.5.1.14 – Participação de produtos derivados da COX no relaxamento induzido por Phe**

Para verificar a participação de produtos derivados da COX no vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio intacto, em presença do inibidor não-seletivo de COX indometacina ( $10^{-5}$  mol/L), adicionado 30 minutos antes da pré-contracção da preparação (FUTAKI et al., 1994).

Para determinar a participação das isoformas da COX no vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio intacto, em presença do inibidor seletivo de COX-1 SC-560 ( $10^{-9}$  mol/L) (OLIVON, 2006) e do inibidor seletivo de COX-2 SC-236 ( $10^{-10}$  mol/L) (OSTROM et al., 2001), adicionados 30 minutos antes da pré-contracção da preparação.

#### **3.5.1.15 – Participação do ânion $O_2^-$ no relaxamento induzido por Phe**

Para verificar a participação do ânion  $O_2^-$  no vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em carótidas controle e contra-lateral, com endotélio intacto, em presença do sequestrador seletivo para ânion  $O_2^-$  tempol (4-hidroxitetrametil-L-piperidina-1-oxil,  $10^{-3}$  mol/L) (ZHENG et al., 2003), adicionado 30 minutos antes da pré-contracção da preparação.

Para verificar a hipótese de participação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), derivado da remoção do ânion superóxido pelo tempol, no relaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em artérias controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio intacto, em presença de tempol ( $10^{-3}$  mol/L) associado ao sequestrador de  $H_2O_2$  PEG-catalase (200 U/mL) (De ANDRADE et al., 2006), adicionados 30 minutos antes da pré-contracção.

### **3.5.1.16 – Participação de produtos derivados da NADPH oxidase no relaxamento induzido por Phe**

Para verificar a participação de produtos da NADPH oxidase no mecanismo de vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio, em ausência e presença do inibidor de NADPH oxidase apocinina ( $10^{-4}$  mol/L) (ZHENG et al., 2003), adicionado 30 minutos antes da pré-contração.

### **3.5.1.17 – Participação de produtos derivados da COX-2 na contração induzida por Phe**

Para verificar a participação de produtos derivados da COX-2 na contração induzida por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio intacto, em presença do inibidor seletivo de COX-2 SC 236 ( $10^{-10}$  mol/L) (OSTROM et al., 2001), adicionado 30 minuto antes do início da curva.

### **3.5.1.18 – Participação do ânion $O_2^-$ na contração induzida por Phe**

Para verificar a participação do ânion  $O_2^-$  na contração induzida por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) em carótidas controle e contra-lateral, com endotélio intacto, em presença do sequestrador seletivo para ânion  $O_2^-$  tempol (4-hidroxitetrametil-L-piperidina-1-oxil,  $10^{-3}$  mol/L), adicionado 30 minuto antes do início da curva.

Para verificar a hipótese de participação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), derivado da remoção do ânion superóxido pelo tempol, na contração induzida por Phe, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) em artérias controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio intacto, em presença de

tempol ( $10^{-3}$  mol/L) associado ao sequestrador de  $H_2O_2$  PEG-catalase (200 U/mL), adicionados 30 minutos antes do início da curva.

### 3.5.2 – Análise de dados

As determinações dos valores de  $E_{max}$  (efeito máximo) e  $EC_{50}$  (concentração do agonista que produz 50% do efeito máximo) foram realizadas utilizando o método de regressão não – linear dos mínimos quadrados utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad software, versão 3.01, 1999). Para análise da potência do agonista, foi utilizado o valor de  $pD_2$  (logaritmo negativo da  $EC_{50}$  da droga), que assume distribuição normal, compatível com manipulações e comparações estatísticas (KENAKIN, 1997). Os valores de  $pD_2$  foram obtidos a partir do valor de  $EC_{50}$  utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad software, versão 3.01, 1999).

Os métodos estatísticos utilizados foram o *teste-t* não pareado, para protocolos envolvendo dois grupos experimentais, ou a Análise de Variância de um fator (*one-way* ANOVA), seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls, para protocolos envolvendo três ou mais grupos experimentais.

## 3.6 – Citometria de fluxo

### 3.6.1 – Isolamento de células endoteliais

O Isolamento das células endoteliais de carótida de rato Wistar foi realizado 30 minutos antes dos experimentos. Carótidas comuns (15 mm) de ratos foram isoladas, cortadas longitudinalmente e mantidas em solução de Hanks completa ( $CaCl_2$  1,6 mmol/L;  $MgSO_4$  1,0 mmol/L; NaCl 145,0 mmol/L; KCl 5,0 mmol/L;  $NaH_2PO_4$  0,5 mmol/L; dextrose 10,0

mmol/L; HEPES 10,0 mmol/L; pH 7,4) (RODRIGUES et al., 2007). Cada *n* foi composto por um *pool* de seis carótidas.

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). A suspensão de células foi centrifugada a 1000 rpm por 5 min e concentrada em 500 mL de Hanks em tubos de poliestireno para citometria.

### **3.6.2 – Quantificação de espécies reativas derivadas de oxigênio (EROS)**

A análise por citometria de fluxo foi realizada em Citômetro de Fluxo (FACS CANTO, BD) com um laser azul a 488 nm e lido com detector C. Para a realização da medida de EROS pela técnica de citometria de fluxo, a suspensão de células, sem qualquer estímulo, foi submetida à leitura, para verificar a emissão de fluorescência basal (Branco). A suspensão de células foi então incubada por 20 min com a sonda fluorescente dihidroetidina (DHE) que reage com espécies reativas de oxigênio para formar o hidroxietídio fluorescente (ZHAO et al., 2003). A seguir, nova leitura da amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DHE no interior das células endoteliais. Foi realizada a aquisição de 10.000 células para cada protocolo realizado. A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando o software DIVA.

#### **3.6.2.1 – Conseqüências da lesão por catéter-balão na produção de EROS**

Para verificar se a lesão por catéter-balão altera a produção de EROS na artéria contra-lateral, foram feitas análises quantitativas de EROS por citometria de fluxo, em células endoteliais removidas de carótidas controle e contra-laterais, em presença da sonda fluorescente para EROS dihidroetidina (DHE).

### 3.6.2.2 – Conseqüências da lesão por catéter-balão na produção de ânion $O_2^-$

Para verificar se a lesão por catéter-balão altera a produção de ânion  $O_2^-$  na artéria contra-lateral, foram feitas análises quantitativas de EROS por citometria de fluxo, em células endoteliais removidas de carótidas controle e contra-laterais, marcadas pela sonda fluorescente para EROS, DHE, em presença do scavenger de ânion  $O_2^-$  tiron (ácido 4,5-dihidroxi-3-benzenodissulfônico dissódico monohidratado,  $10^{-3}$  mol/L) (De ANDRADE et al., 2006), pré-incubado 20 minutos antes da leitura .

### 3.6.2.3 – Participação da COX-2 na produção de EROS

Para determinar a participação da COX-2 na produção de EROS na artéria contra-lateral, foram feitas análises quantitativas de EROS por citometria de fluxo, em células endoteliais removidas de carótidas controle e contra-laterais, marcadas pela sonda fluorescente para EROS, DHE, em presença do inibidor seletivo de COX-2 SC236 ( $10^{-10}$  mol/L) (OSTROM et al., 2001), pré-incubado 30 minutos antes da leitura.

### 3.6.3 – Análise estatística

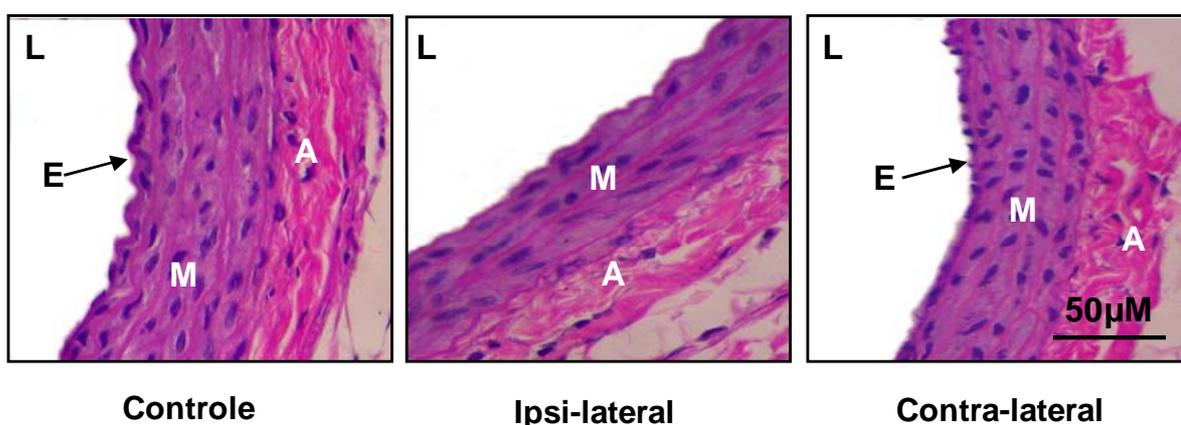
Os resultados estão apresentados como a média das medianas da intensidade de fluorescência (IF) das células carregadas com DHE. A análise estatística foi feita pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.02, 2001). Os métodos estatísticos utilizados foram o teste-t não pareado, para protocolos envolvendo dois grupos experimentais, ou a Análise de Variância de um fator (*one-way* ANOVA), seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls, para protocolos envolvendo três ou mais grupos experimentais.

## ***4 - Resultados***

#### 4.1 - Morfologia das artérias carótidas

A validação do modelo de lesão vascular por catéter-balão foi feita pela análise morfológica de cortes histológicos de carótida ipsi-lateral corados com HE, a fim de verificar a eficácia do procedimento de passagem do catéter-balão no lúmen arterial em promover a remoção do endotélio vascular. Artérias carótidas ipsi- e contra-laterais foram coletadas quatro dias após a lesão por catéter-balão, bem como artérias carótidas de animais controle intactos de mesma idade.

As artérias de animais controle apresentaram uma monocamada de células endoteliais, seguidas de três ou quatro camadas de células musculares lisas, e uma camada adventícia contínua ao tecido conjuntivo frouxo de tecidos adjacentes. As artérias ipsi-laterais, quatro dias após a lesão, apresentaram ausência de camada endotelial, três ou quatro camadas de células de músculo lisa, seguidas pela camada adventícia. As artérias contra-laterais, quatro dias após a lesão, apresentam características morfológicas aparentemente semelhantes àquelas encontradas em artérias provenientes de animais controle (figura 2).

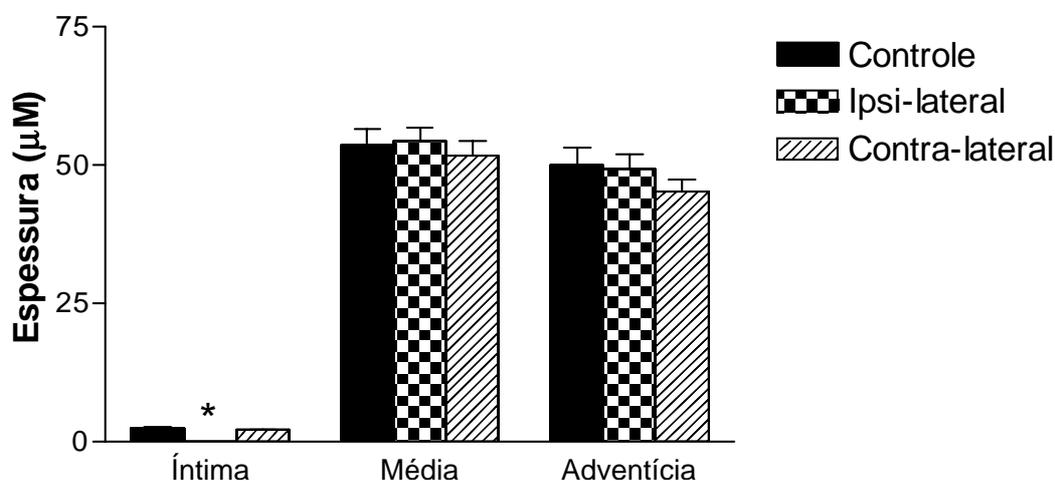


**Figura 2.** Cortes histológicos representativos de artérias carótidas controle, ipsi- e contra-laterais, quatro dias após a lesão por catéter-balão. Coloração: Hematoxilina/Eosina. E: endotélio; M: camada média; A: camada adventícia; L: lúmen. Objetiva 40x.

#### 4.2 - Morfometria das artérias carótidas

Para verificar se a lesão por catéter-balão altera a espessura dos tecidos integrantes da parede vascular, foi realizada análise morfométrica em artérias carótidas controle, ipsi- e contra-lateral, quatro dias após a lesão.

As artérias de controle e contra-lateral não apresentaram diferença significativa entre a espessura de suas camadas íntima ( $2,32 \pm 0,21 \mu\text{M}$  e  $2,00 \pm 0,19 \mu\text{M}$ , respectivamente), média ( $53,71 \pm 2,85 \mu\text{M}$  e  $51,66 \pm 2,73 \mu\text{M}$ , respectivamente) e adventícia ( $50,09 \pm 2,99 \mu\text{M}$  e  $45,26 \pm 2,10 \mu\text{M}$ , respectivamente) (figura 3, tabela 4.1). As artérias ipsi-laterais apresentaram ausência de camada íntima, sem diferença significativa entre suas camadas média ( $54,43 \pm 2,35 \mu\text{M}$ ) e adventícia ( $49,34 \pm 2,52 \mu\text{M}$ ) em relação ao grupo controle (figura 3, tabela 4.1).



**Figura 3.** Análise morfométrica de artérias carótidas controle, ipsi- e contra-laterais, quatro dias após a lesão por catéter-balão. A figura mostra a espessura média das camadas íntima, média e adventícia, de artérias controle, ipsi- e contra-laterais, quatro dias após a lesão. Os dados representam a média ± EPM (n= 5).

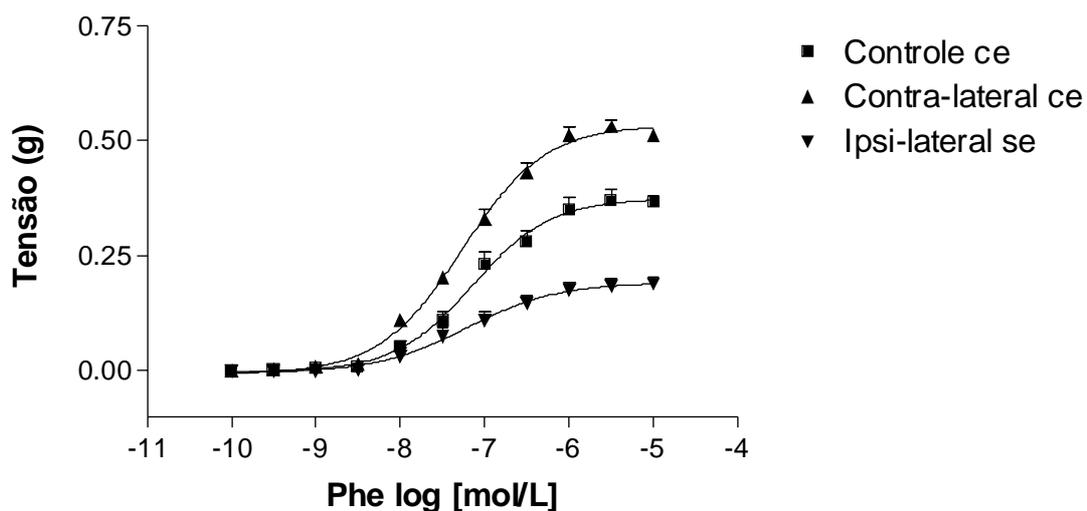
**Tabela 4.1** - Valores da espessura das camadas íntima, média e adventícia de artérias carótidas controle, ipsi- e contra-laterais, quatro dias após a lesão por catéter-balão. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). \* indica diferença significativa ( $P < 0,001$ ) em relação ao grupo controle. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

| <b>Grupos</b>                                | <b>Controle</b>                 | <b>Ipsi-lateral</b>             | <b>Contra-lateral</b>           |
|----------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>Íntima (<math>\mu\text{M}</math>)</b>     | 2,32 $\pm$ 0,21<br>( $n = 5$ )  | 0,0 $\pm$ 0,0*<br>( $n = 5$ )   | 2,0 $\pm$ 0,19<br>( $n = 5$ )   |
| <b>Média (<math>\mu\text{M}</math>)</b>      | 53,71 $\pm$ 2,85<br>( $n = 5$ ) | 54,43 $\pm$ 2,35<br>( $n = 5$ ) | 51,66 $\pm$ 2,73<br>( $n = 5$ ) |
| <b>Adventícia (<math>\mu\text{M}</math>)</b> | 50,09 $\pm$ 2,99<br>( $n = 5$ ) | 49,34 $\pm$ 2,52<br>( $n = 5$ ) | 45,26 $\pm$ 2,10<br>( $n = 5$ ) |

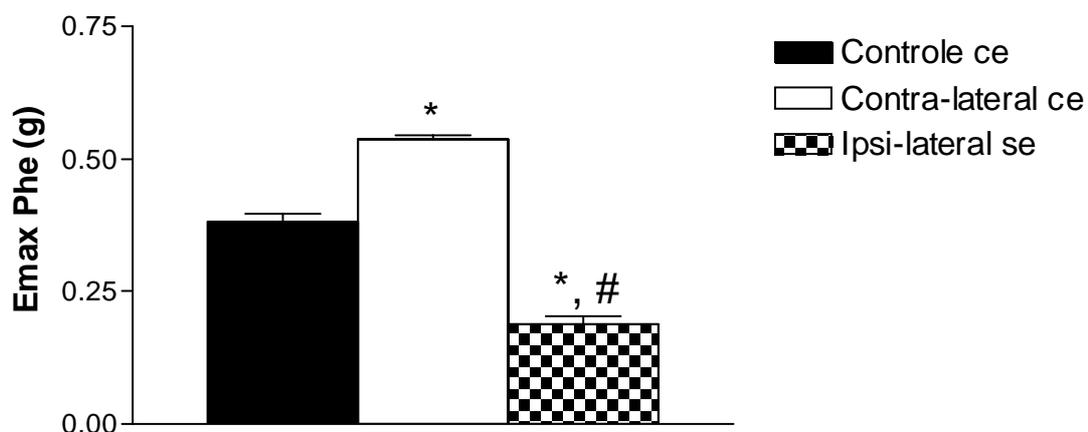
### 4.3 - Conseqüências da lesão por catéter-balão na contração induzida por Phe

Para verificar se a lesão por catéter-balão altera a resposta contrátil à Phe em carótida contra-lateral, quatro dias após a lesão, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L), em artérias de animais controle e operados, em presença de endotélio. Nessa faixa de concentrações ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L), a Phe produz uma contração concentração-dependente em carótida de rato.

Os resultados mostram que a lesão por catéter-balão aumenta significativamente a amplitude da contração máxima induzida por Phe em artérias contra-laterais, com endotélio, quando comparado a artérias de animais controle em presença de endotélio (tabela 4.2). Paralelamente, há redução significativa desse parâmetro em artérias ipsi-laterais, onde o endotélio foi removido pela passagem do cateter-balão, em relação a artérias controle com endotélio (figuras 4 e 5). Os valores de potência ( $pD_2$ ) não sofreram alterações nos diferentes grupos (tabela 4.3).



**Figura 4.** Contração induzida por Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce) e sem endotélio (se). A figura mostra curvas concentração-efeito cumulativas de contração para Phe em carótidas de animais controle, e em artérias contra- e ipsi-laterais de animais submetidos à lesão por catéter-balão, quatro dias após a lesão. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 5).



**Figura 5.** Efeito contrátil da Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce) e sem endotélio (se). A figura mostra o efeito de contração máxima induzida por Phe em carótidas de animais controle, e em artérias contra- e ipsi-laterais de animais submetidos à lesão por catéter-balão, quatro dias após a lesão. Os dados representam a média ± EPM (n= 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação à artéria contra-lateral (ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls).

**Tabela 4.2** - Valores de efeito de contração máxima (Emax) de Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce) e sem endotélio (se). Os dados representam a média ± EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação à artéria contra-lateral. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

| Grupos        |                     |                   |
|---------------|---------------------|-------------------|
| Controle (ce) | Contra-lateral (ce) | Ipsi-lateral (se) |
| 0,38 ± 0,01g  | 0,54 ± 0,01g*       | 0,19 ± 0,01g*#    |

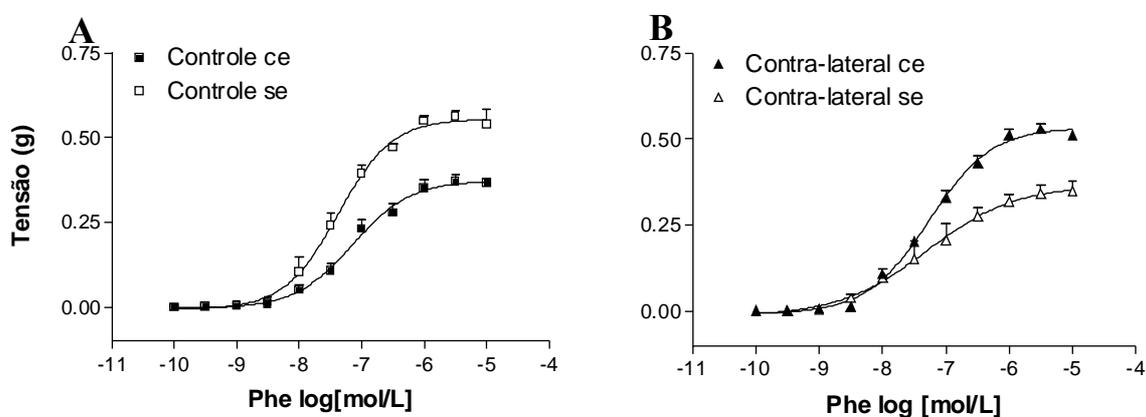
**Tabela 4.3** - Valores de pD<sub>2</sub> (-log EC<sub>50</sub>) de Phe, como agonista vasoconstritor, em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce) e sem endotélio (se). Os dados representam a média ± EPM (n = 5). ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

| Grupos        |                     |                   |
|---------------|---------------------|-------------------|
| Controle (ce) | Contra-lateral (ce) | Ipsi-lateral (se) |
| 7,10 ± 0,12   | 7,25 ± 0,05         | 7,23 ± 0,14       |

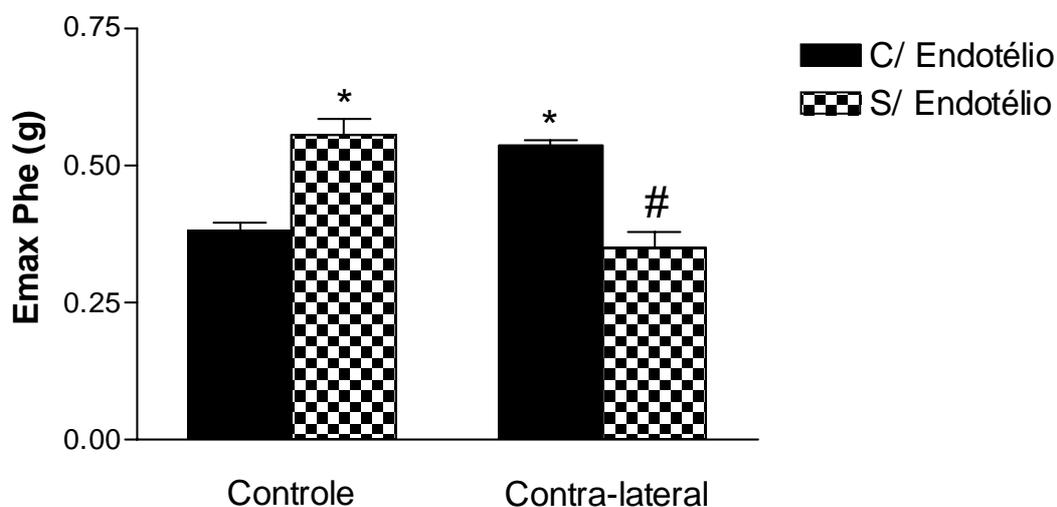
#### 4.4 - Participação do endotélio na contração induzida por Phe em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão

Para determinar a participação do endotélio na contração induzida por Phe em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão, quatro dias após a lesão, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L), em artérias de animais controle e operados, em presença e ausência de endotélio.

A remoção do endotélio aumentou significativamente a amplitude da contração máxima induzida pela Phe em artérias controle (figuras 6a e 7, tabela 4.4), mostrando o papel modulador negativo do endotélio sobre a vasoconstrição adrenérgica. Entretanto, em artérias contra-laterais à lesão, a remoção endotelial reduziu significativamente a amplitude da contração máxima induzida por Phe (figuras 6b e 7, tabela 4.4), sugerindo a participação positiva do endotélio no aumento da resposta de contração adrenérgica nesse leito, e portanto, uma inversão do papel modulador do endotélio sobre a vasoconstrição adrenérgica na artéria contra-lateral. Os valores de potência ( $pD_2$ ) não sofreram alterações nos diferentes grupos (tabela 4.5).



**Figura 6. Contração induzida por Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce) e sem endotélio (se).** A figura mostra curvas concentração-efeito cumulativas de contração para Phe em carótidas de animais controle com e sem endotélio (A), e em artérias contra-laterais de animais submetidos à lesão por catéter-balão, quatro dias após a lesão, com e sem endotélio (B). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 4 - 5).



**Figura 7.** Efeito contrátil da Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce) e sem endotélio (se). A figura mostra o efeito de contração máxima induzida por Phe em carótidas de animais controle e em artérias contra-laterais de animais submetidos à lesão por catéter-balão, quatro dias após a lesão, com e sem endotélio. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 4 - 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação à artéria contra-lateral (ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls).

**Tabela 4.4** - Valores de efeito de contração máxima (Emax) de Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce) e sem endotélio (se). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 4 - 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação à artéria contra-lateral. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

| Grupos         | Emax Phe (g)     |                  |
|----------------|------------------|------------------|
|                | C/ Endotélio     | S/ Endotélio     |
| Controle       | 0,38 $\pm$ 0,01  | 0,56 $\pm$ 0,03* |
| Contra-lateral | 0,54 $\pm$ 0,01* | 0,35 $\pm$ 0,03# |

**Tabela 4.5** - Valores de  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ) de Phe, como agonista vasoconstrictor, em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce) e sem endotélio (se). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 4 - 5). ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

| Grupos         | $pD_2$ Phe ( $-\log EC_{50}$ ) |                 |
|----------------|--------------------------------|-----------------|
|                | C/ Endotélio                   | S/ Endotélio    |
| Controle       | $7,10 \pm 0,12$                | $7,39 \pm 0,08$ |
| Contra-lateral | $7,25 \pm 0,05$                | $7,41 \pm 0,26$ |

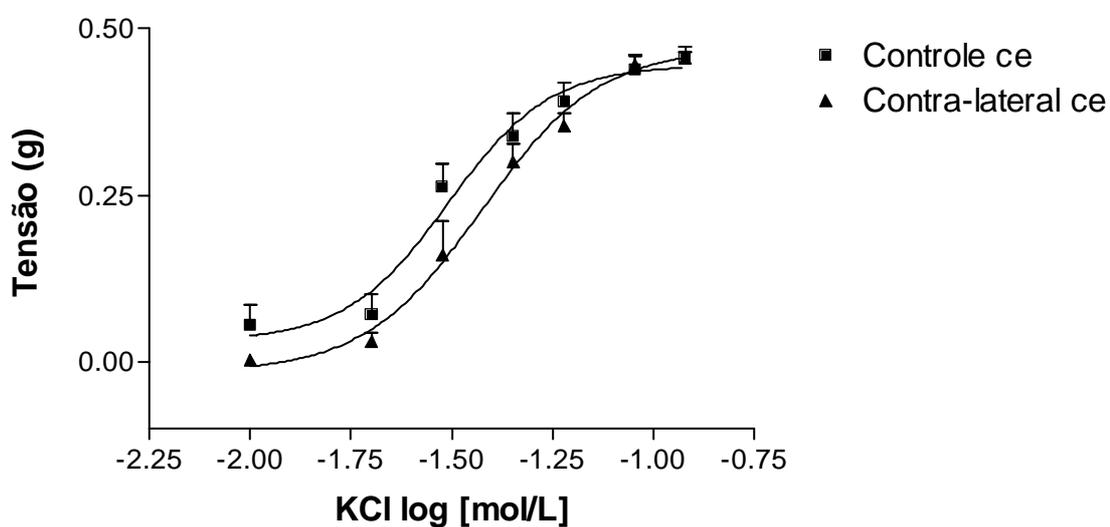
#### **Conclusões Parciais**

- ✓ A lesão por catéter-balão aumenta a resposta contrátil induzida por Phe em carótida contra-lateral com endotélio, quatro dias após a lesão, em relação ao grupo controle.
- ✓ A contração induzida por Phe em carótida contra-lateral é normalizada pela remoção endotelial. Esse dado sugere a participação do endotélio como modulador positivo do aumento da contração máxima induzida por Phe nesse leito. A participação do endotélio poderia estar associada à liberação de substâncias vasoconstritoras e/ou à redução na liberação de substâncias vasodilatadoras.

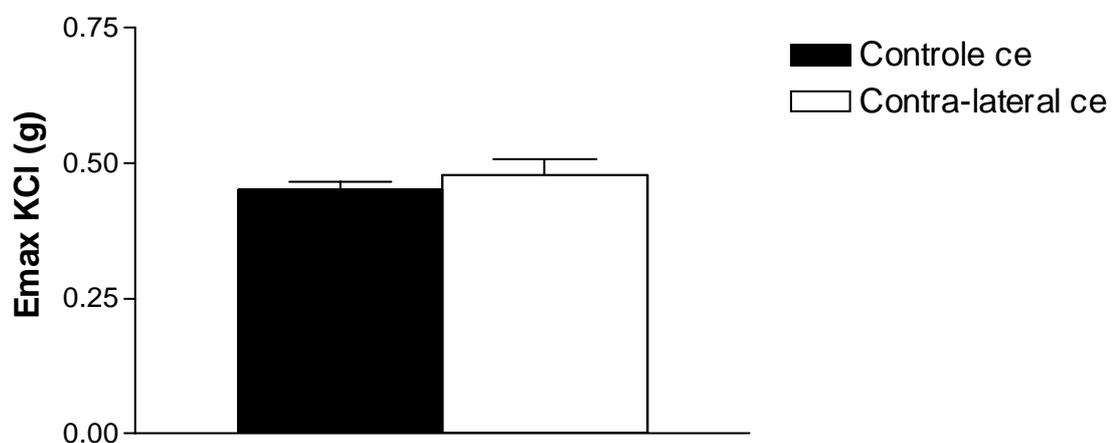
#### 4.5 - Conseqüências da lesão por catéter-balão na contração induzida por KCl

Para verificar se a lesão por catéter-balão afeta a integridade muscular da artéria contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o agente despolarizante KCl (10 a 120 mmol/L), em artérias de animais controle e operados, em presença de endotélio. Nessa faixa de concentrações (10 a 120 mmol/L), o KCl produz uma contração concentração-dependente em carótida de rato, por despolarização.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros de efeito máximo ( $E_{max}$ ) e potência ( $pD_2$ ) para KCl em artérias de animais controle e em artérias contra-laterais à lesão, sugerindo que a integridade da maquinaria contrátil do músculo liso das artérias contra-laterais não foi afetada pela lesão vascular (figuras 8 e 9, tabela 4.6).



**Figura 8.** Contração induzida por KCl em artérias controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce). As figuras representam curvas concentração-efeito cumulativas para KCl (10 - 120 mmol/L), na presença de endotélio. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 4).



**Figura 9.** Efeito contrátil de KCl em artérias controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce). A figura representa de efeito máximo (Emax) para KCl. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 4). Teste *t* não-pareado.

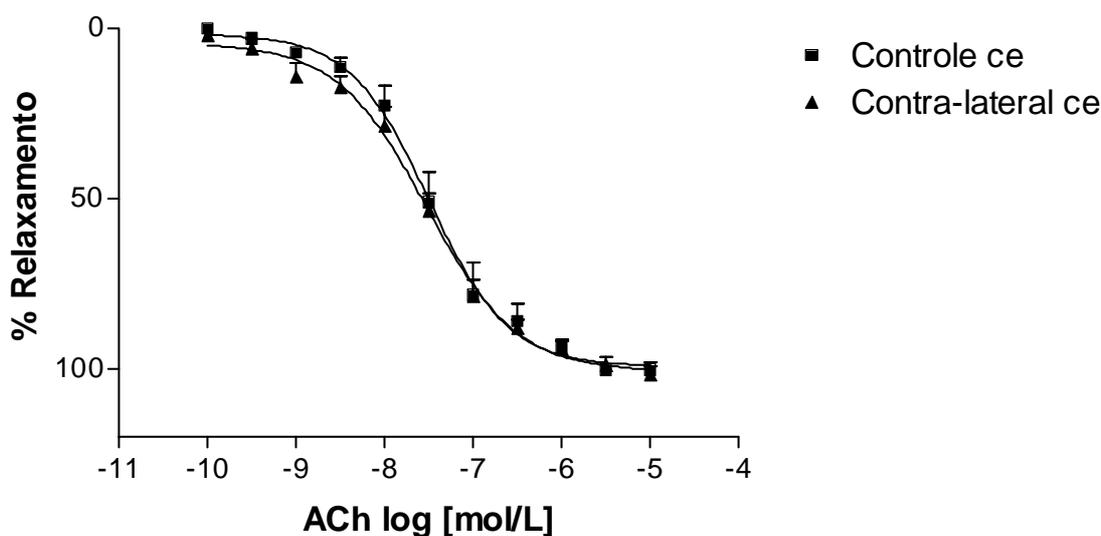
**Tabela 4.6** - Valores de Emax e  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ) de KCl em artérias carótidas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 4). Teste *t* não-pareado.

| Parâmetros                 | Grupos          |                   |
|----------------------------|-----------------|-------------------|
|                            | Controle ce     | Contra-lateral ce |
| Emax (g)                   | 0,45 $\pm$ 0,01 | 0,48 $\pm$ 0,03   |
| $pD_2$ ( $-\log EC_{50}$ ) | 1,50 $\pm$ 0,03 | 1,42 $\pm$ 0,05   |

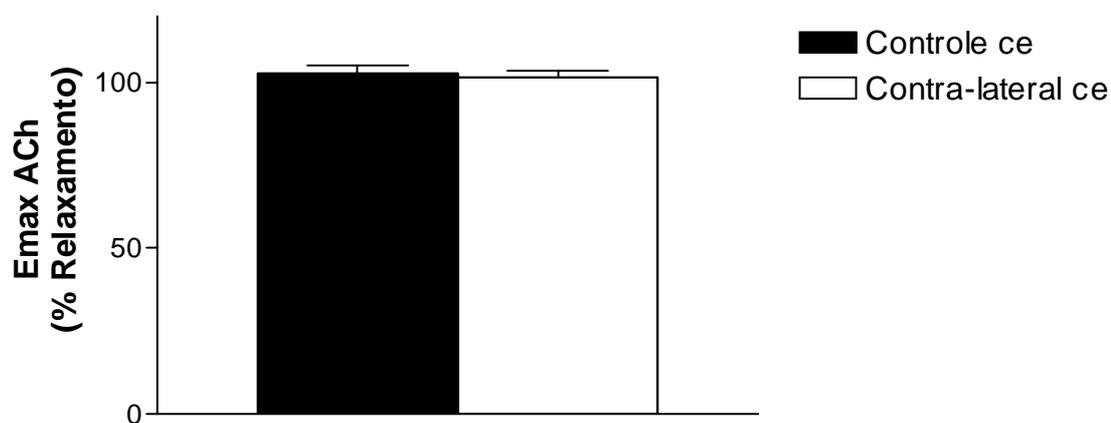
#### 4.6 - Conseqüências da lesão por catéter-balão no relaxamento induzido por ACh

Para verificar se a lesão por catéter-balão altera o relaxamento colinérgico na artéria contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o agonista muscarínico ACh ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) em artérias de animais controle e operados, em presença de endotélio, após pré-contracção com Phe ( $10^{-7}$  mol/L).

Na faixa de concentrações de  $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L, a ACh promoveu relaxamento concentração-dependente em carótidas de animais controle e em artérias contra-laterais de animais operados. Não foram observadas alterações nos valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  do agonista entre as artérias controle e contra-laterais à lesão (figuras 10 e 11, tabela 4.7), sugerindo aparente integridade endotelial na artéria contra-lateral.



**Figura 10. Relaxamento induzido ACh, em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce).** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa para ACh ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5).



**Figura 11.** Efeito relaxante de ACh em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce). A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de ACh. Os dados representam a média ± EPM (n = 5). Teste *t* não-pareado.

**Tabela 4.7** - Valores de Emax e pD<sub>2</sub> (-log EC<sub>50</sub>) de ACh em artérias carótidas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão. Os dados representam a média ± EPM (n = 5). Teste *t* não-pareado.

| Parâmetros                               | Grupos        |                   |
|------------------------------------------|---------------|-------------------|
|                                          | Controle ce   | Contra-lateral ce |
| Emax (%)                                 | 102,65 ± 2,48 | 101,40 ± 2,25     |
| pD <sub>2</sub> (-log EC <sub>50</sub> ) | 7,44 ± 0,15   | 7,50 ± 0,08       |

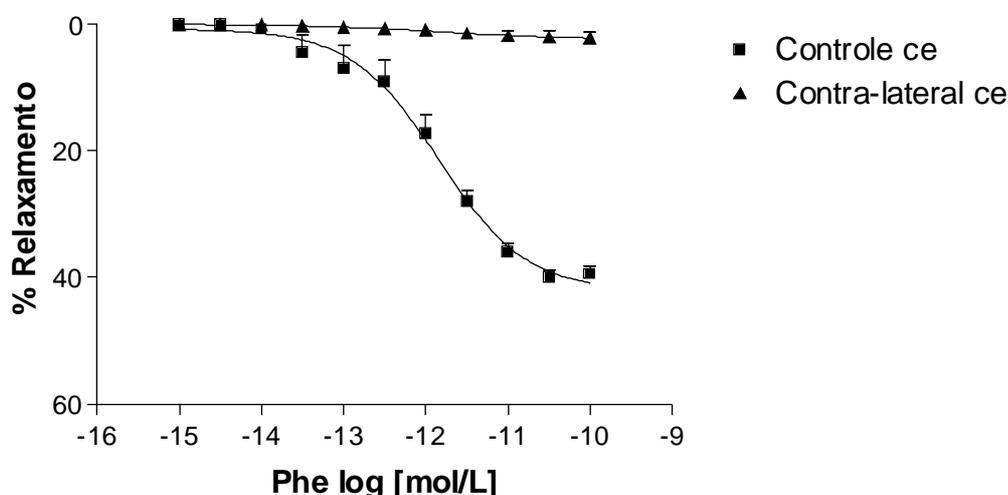
***Conclusões Parciais***

- ✓ A lesão por catéter-balão não altera a integridade da função muscular contrátil em carótida contra-lateral.
  
- ✓ A lesão por catéter-balão não altera, aparentemente, a integridade da função endotelial de relaxamento em carótida contra-lateral

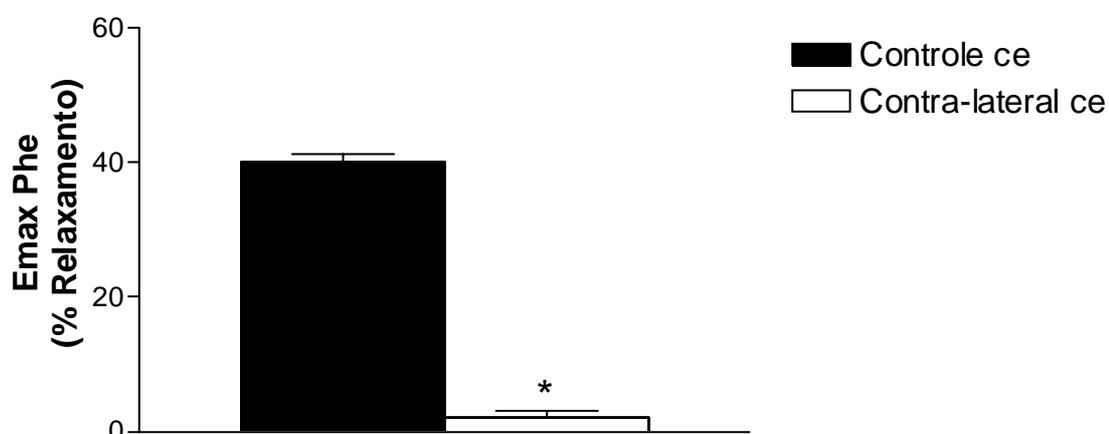
#### 4.7 - Conseqüências da lesão por catéter-balão no relaxamento induzido por Phe

Para verificar se a lesão por catéter-balão altera o relaxamento induzido por Phe na artéria contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em artérias de animais controle e operados, na presença de endotélio, após pré-contracção com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \times 10^{-5}$  mol/L). Todos os protocolos de relaxamento induzido por Phe foram conduzidos em presença do antagonista  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico WB 4101 ( $10^{-10}$  mol/L), pré-incubado 30 minutos antes da pré-contracção, para excluir a participação desses receptores mediadores da contracção adrenérgica, em carótida de rato, durante a estimulação com Phe, o que, teoricamente, facilita a observação e detecção da resposta de relaxamento adrenérgico induzido pelo agonista  $\alpha_1$ -seletivo Phe.

Na faixa de concentrações de  $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L, Phe produziu um relaxamento concentração-dependente em carótida de rato controle, em presença de endotélio, com amplitude máxima de aproximadamente 40% (figuras 12 e 13, tabela 4.8) e  $\text{pD}_2$  em torno de 12 (tabela 4.8). Em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão, em presença de endotélio, o relaxamento induzido por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) está completamente abolido (figuras 12 e 13, tabela 4.8).



**Figura 12.** Relaxamento induzido por Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce). A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ).



**Figura 13.** Efeito relaxante de Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce). A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) em relação ao grupo controle (teste *t* não-pareado).

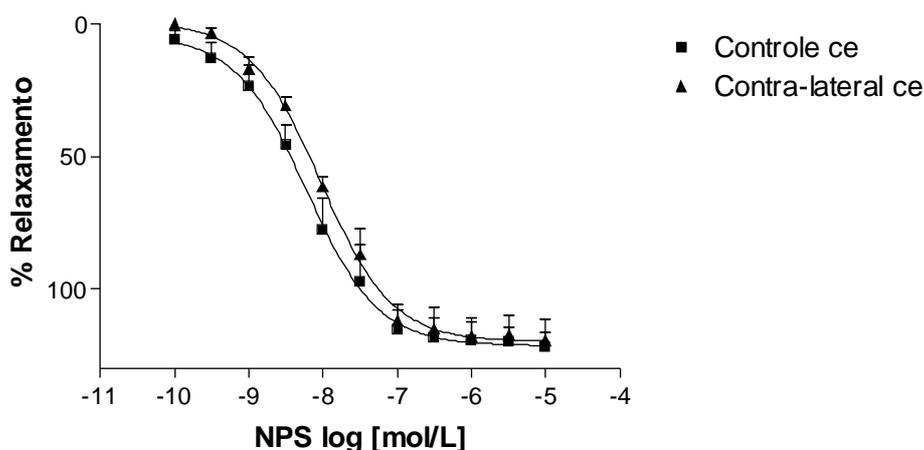
**Tabela 4.8** - Valores de Emax e  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ) de Phe, como agonista vasorelaxante, em artérias carótidas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) em relação ao grupo controle. Teste *t* não-pareado.

| Parâmetros                 | Grupos           |                   |
|----------------------------|------------------|-------------------|
|                            | Controle ce      | Contra-lateral ce |
| Emax (%)                   | 40,06 $\pm$ 1,23 | 2,13 $\pm$ 0,98 * |
| $pD_2$ ( $-\log EC_{50}$ ) | 12,03 $\pm$ 0,28 | _____             |

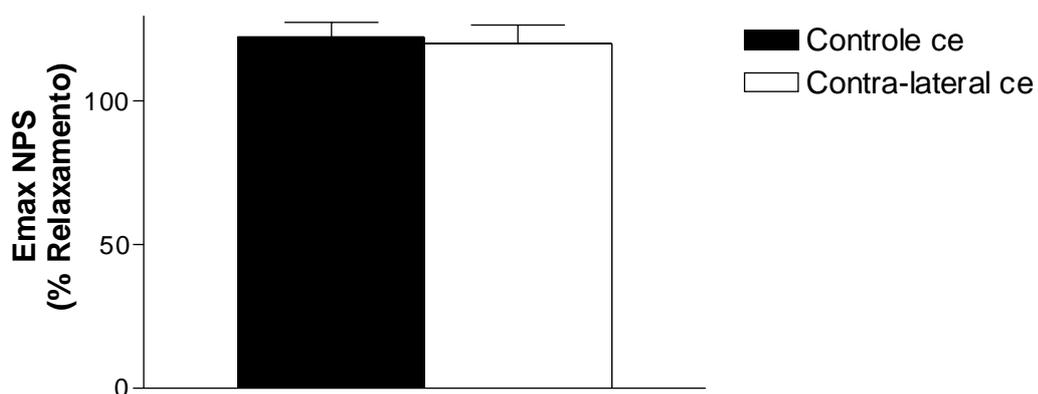
#### 4.8 - Conseqüências da lesão por catéter-balão no relaxamento induzido por NPS

Para verificar se a lesão por catéter-balão afeta os mecanismos musculares de relaxamento na artéria contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o doador de óxido nítrico NPS ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) em anéis de artérias de animais controle e operados, em presença de endotélio, após pré-contracção com Phe ( $10^{-7}$  mol/L). O NPS produz um relaxamento endotélio-independente, devido ao mecanismo de liberação do mediador relaxante óxido nítrico a partir de sua estrutura, o que permite avaliar a função muscular relaxante, sem interferência do endotélio.

Nessa faixa de concentrações ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L), o NPS produziu um relaxamento concentração-dependente em carótidas de animais controle e em artérias contra-laterais de animais operados, na presença de endotélio. Não foram observadas alterações nos valores de  $E_{max}$  ou  $pD_2$  do doador entre as artérias controle e contra-laterais à lesão (figuras 14 e 15, tabela 4.9), sugerindo preservação da integridade dos mecanismos musculares de relaxamento na artéria contra-lateral.



**Figura 14.** Relaxamento induzido por NPS em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce). A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa para NPS ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 4 - 5).



**Figura 15.** Efeito relaxante de NPS em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce). A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de NPS. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 4 - 5). Teste *t* não-pareado.

**Tabela 4.9** - Valores de Emax e  $pD_2$  (-log  $EC_{50}$ ) de NPS em artérias carótidas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 4 - 5). Teste *t* não-pareado.

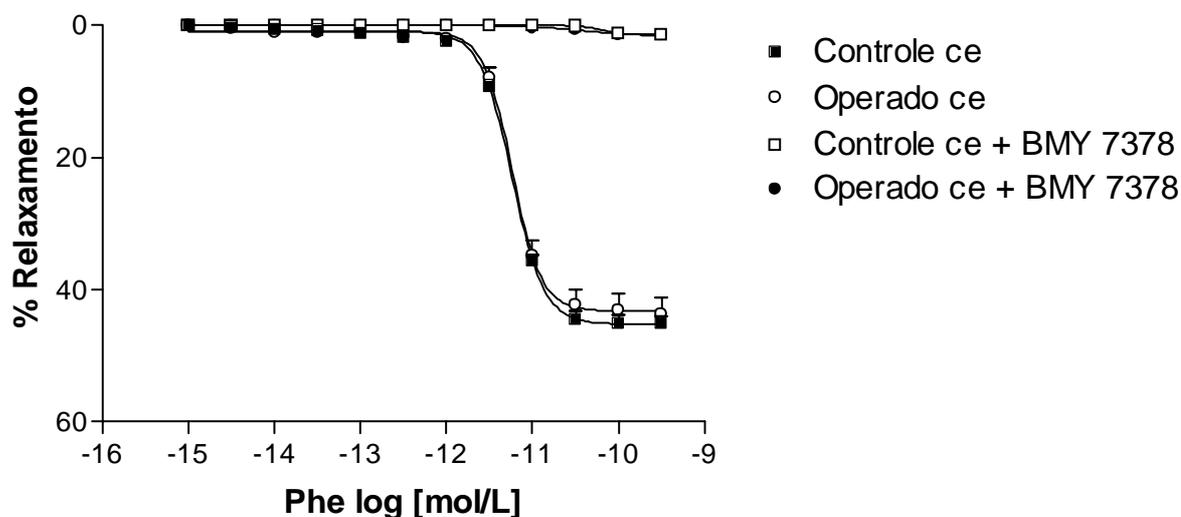
| Parâmetros               | Grupos            |                   |
|--------------------------|-------------------|-------------------|
|                          | Controle ce       | Contra-lateral ce |
| Emax (%)                 | 122,40 $\pm$ 5,27 | 120,03 $\pm$ 6,64 |
| $pD_2$ (-log $EC_{50}$ ) | 8,20 $\pm$ 0,16   | 8,06 $\pm$ 0,06   |

#### 4.9 - Conseqüências da lesão por catéter-balão no relaxamento induzido por Phe em aorta

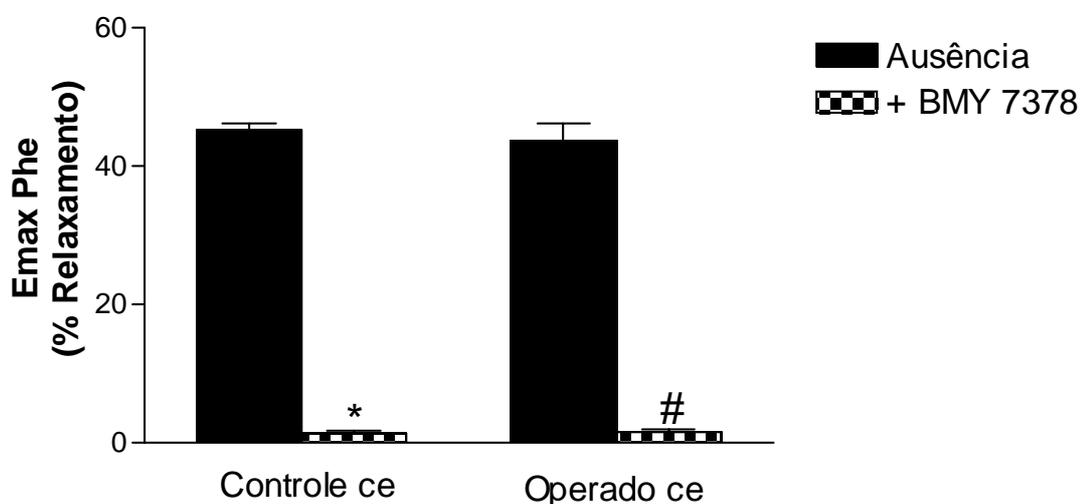
Para verificar se a lesão por catéter-balão altera o relaxamento induzido por Phe em outros leitos vasculares, além da carótida contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe ( $10^{-15}$  a  $3 \times 10^{-10}$  mol/L) em aorta de animais controle e operados, na presença de endotélio, após pré-contracção com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \times 10^{-6}$  mol/L). O relaxamento induzido por Phe em aorta foram conduzidos nas mesmas condições que em carótida, ou seja, em presença do antagonista  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico WB 4101 ( $10^{-10}$  mol/L), pré-incubado 30 minutos antes da pré-contracção.

Na faixa de concentrações de  $10^{-15}$  a  $3 \times 10^{-10}$  mol/L, Phe produziu um relaxamento concentração-dependente em aorta de ratos controle e operados, em presença de endotélio, com amplitude máxima de aproximadamente 45% (figuras 16 e 17, tabela 4.10) e  $\text{pD}_2$  em torno de 11 (tabela 4.10), sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e operado, o que sugere que a lesão por catéter-balão produz alterações de reatividade à Phe leito-dependentes à área de lesão e exclui a participação de fatores humorais como responsáveis por essas alterações.

Para confirmar a participação dos receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos como mediadores do relaxamento induzido por Phe em aorta, o protocolo de relaxamento foi reproduzido em presença do antagonista  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico BMY 7378 ( $10^{-8}$  mol/L), pré-incubado 20 minutos antes da pré-contracção, em aorta de animais controle e operados. Os resultados obtidos a partir desse protocolo mostram que a resposta de relaxamento induzida por Phe em aorta de ratos controle e operados foi completamente abolida em presença do antagonista  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico BMY 7378 (figuras 16 e 17, tabela 4.10), confirmando a participação desses receptores como mediadores dessa resposta nesse leito.



**Figura 16. Relaxamento induzido por Phe em aorta isolada de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de BMY 7378.** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  a  $3 \times 10^{-10}$  mol/L), em ausência ou presença do antagonista  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico BMY 7378 ( $10^{-8}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5).



**Figura 17. Efeito relaxante de Phe em aorta isolada de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de BMY 7378.** A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de Phe, como agonista vasorelaxante, em ausência ou presença do antagonista  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico BMY 7378 ( $10^{-8}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P < 0,001) em relação ao grupo controle sem antagonista. # indica diferença significativa (P < 0,001) em relação ao grupo operado sem antagonista. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

**Tabela 4.10** - Valores de Emax e pD<sub>2</sub> (-log EC<sub>50</sub>) de Phe, como agonista vasorelaxante, em aorta de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão. Os dados representam a média ± EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle sem antagonista. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo operado sem antagonista. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

| Parâmetros                                   | Grupos       |                        |              |                       |
|----------------------------------------------|--------------|------------------------|--------------|-----------------------|
|                                              | Controle ce  | Controle ce + BMY 7378 | Operado ce   | Operado ce + BMY 7378 |
| Emax Phe (%)                                 | 45,13 ± 1,03 | 1,42 ± 0,43            | 43,64 ± 2,52 | 1,49 ± 0,49           |
| pD <sub>2</sub> Phe (-log EC <sub>50</sub> ) | 11,23 ± 0,01 | ————                   | 11,24 ± 0,05 | ————                  |

***Conclusões Parciais***

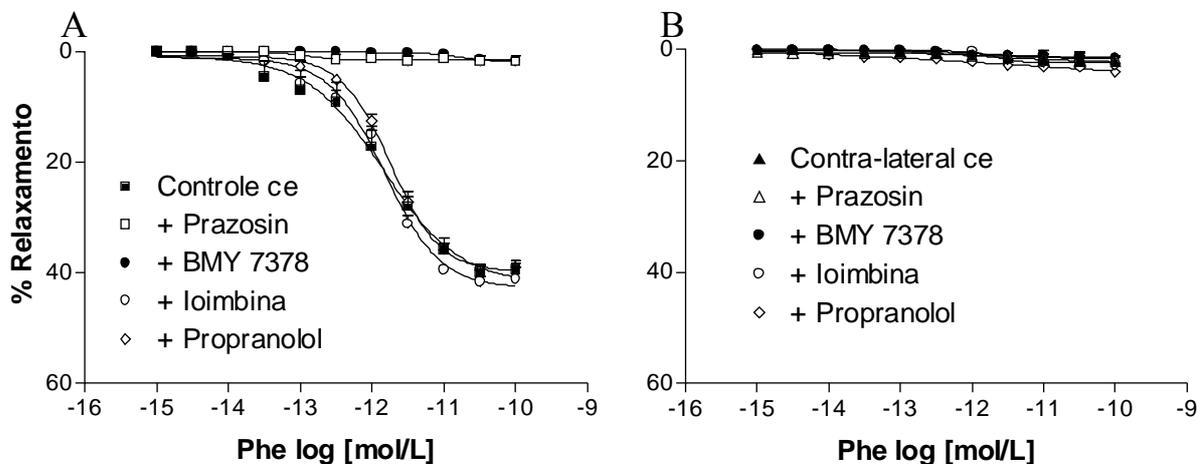
- ✓ A lesão por catéter-balão abole o relaxamento induzido por Phe em carótida contra-lateral, prejudicando esse mecanismo modulador negativo da contração adrenérgica, o que pode estar contribuindo com o aumento da contração máxima induzida por Phe nesse leito.
  
- ✓ A lesão por catéter-balão não altera a integridade da função muscular de relaxamento em carótida contra-lateral.
  
- ✓ A lesão por catéter-balão produz alterações de reatividade à Phe leito-dependentes, sem a participação de mediadores humorais.

#### 4.10 - Caracterização dos receptores mediadores do relaxamento induzido por Phe

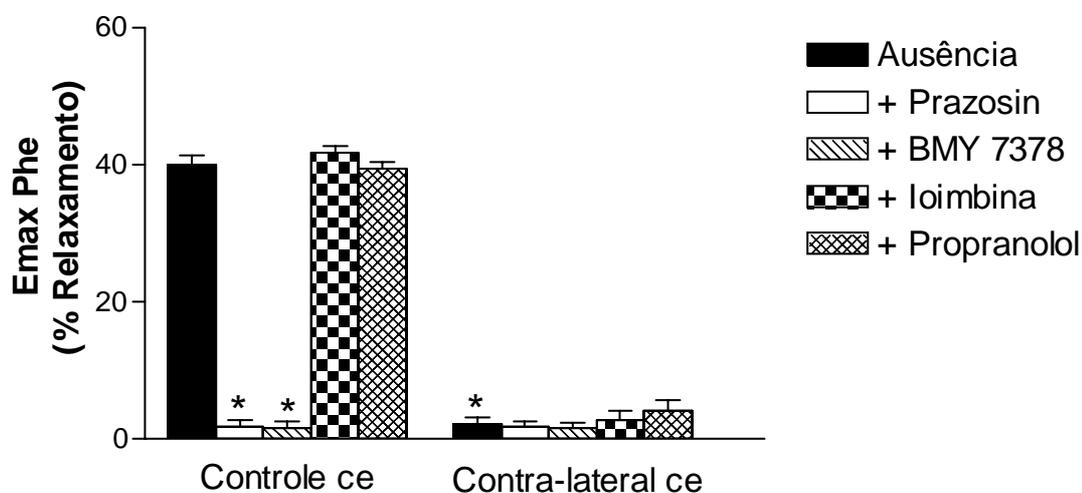
Para determinar o tipo de receptor responsável por mediar o relaxamento induzido por Phe em carótida de rato, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio intacto, na presença de antagonistas seletivos para os tipos de adrenoceptores.

Em presença do antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosin (Pz,  $10^{-5}$  mol/L), a resposta de relaxamento induzida por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em carótidas de animais controle, com endotélio, foi completamente abolida (figuras 18a e 19). A adição do antagonista  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico seletivo BMY 7378 ( $10^{-8}$  mol/L) também aboliu a resposta de relaxamento induzida por Phe em artérias controle com endotélio (figuras 18a e 19). Em presença do antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico ioimbina ( $10^{-5}$  mol/L), não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de  $E_{max}$  (figuras 18a e 19, tabela 4.11) e  $pD_2$  (tabela 4.12) para as artérias controle com endotélio, em relação à ausência do antagonista. Em presença do antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol ( $10^{-6}$  mol/L), não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de  $E_{max}$  (figuras 18a e 19, tabela 4.11) e  $pD_2$  (tabela 4.12) para as artérias controle com endotélio, em relação à ausência do antagonista. Esses dados sugerem a participação dos receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos como mediadores do relaxamento induzido por Phe em carótida de rato controle.

Para as artérias contra-laterais com endotélio, a adição de Pz ( $10^{-5}$  mol/L), BMY 7378 ( $10^{-8}$  mol/L), ioimbina ( $10^{-5}$  mol/L) ou propranolol ( $10^{-6}$  mol/L) não alterou a resposta à Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L), que já se encontrava abolida em ausência dos antagonistas (figuras 18b e 19, tabela 4.11), excluindo a participação dos receptores adrenérgicos na abolição dessa resposta.



**Figura 18.** Caracterização dos receptores mediadores do efeito relaxante de Phe em carótidas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce). A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em ausência e presença dos antagonistas adrenérgicos Pz, BMY 7378, ioimbina ou propranolol, em carótida controle (A) e contra-lateral (B). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5).



**Figura 19.** Caracterização dos receptores mediadores do efeito relaxante de Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce). A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de Phe, como agonista vasoelaxante, em ausência e presença dos antagonistas adrenérgicos Pz, BMY 7378, ioimbina ou propranolol. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa ( $P < 0,001$ ) em relação ao grupo controle com endotélio, em ausência de antagonista. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

**Tabela 4.11** - Valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de antagonistas adrenérgicos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle em ausência de antagonista. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

| <b>Grupos</b>        |                    |                          |
|----------------------|--------------------|--------------------------|
|                      | <b>Controle ce</b> | <b>Contra-lateral ce</b> |
| <b>Ausência</b>      | 40,06 $\pm$ 1,23%  | 2,13 $\pm$ 0,98%*        |
| <b>+ Pz</b>          | 1,71 $\pm$ 1,05%*  | 1,81 $\pm$ 0,83%         |
| <b>+ BMY 7378</b>    | 1,64 $\pm$ 0,82%*  | 1,58 $\pm$ 0,87%         |
| <b>+ Ioimbina</b>    | 41,73 $\pm$ 1,02%  | 2,72 $\pm$ 1,48%         |
| <b>+ Propranolol</b> | 39,49 $\pm$ 0,89%  | 4,08 $\pm$ 1,65%         |

**Tabela 4.12** - Valores de pD<sub>2</sub> (-log EC<sub>50</sub>) de Phe como agonista vasorelaxante em artérias carótidas de animais controle, com endotélio, em ausência e presença de ioimbina ou propranolol. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

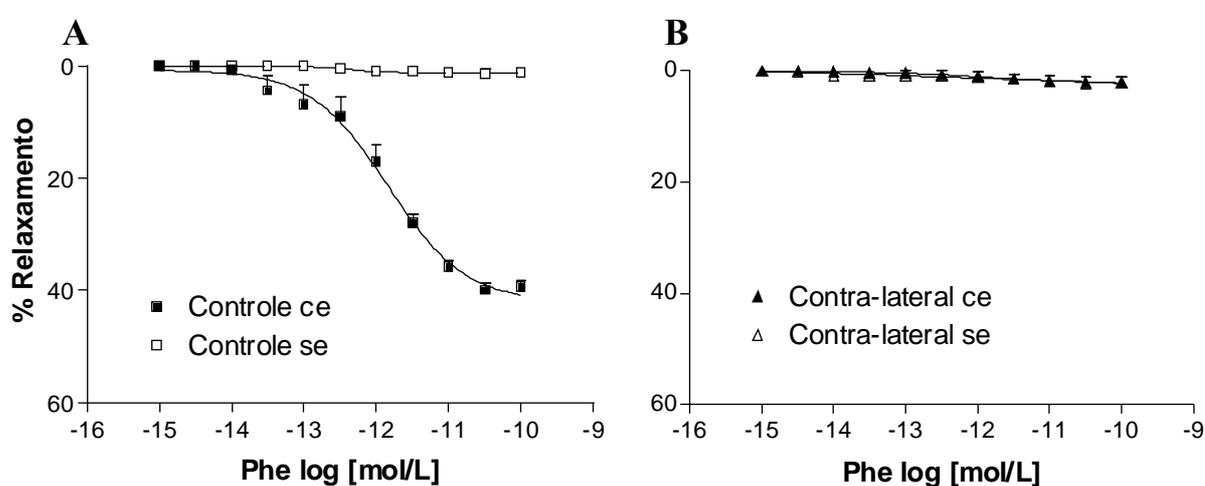
| <b>Grupos</b>      |                               |                                  |
|--------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| <b>Controle ce</b> | <b>Controle ce + Ioimbina</b> | <b>Controle ce + Propranolol</b> |
| 12,03 $\pm$ 0,29   | 11,83 $\pm$ 0,06              | 11,73 $\pm$ 0,07                 |

#### 4.11 - Participação do endotélio no relaxamento induzido por Phe

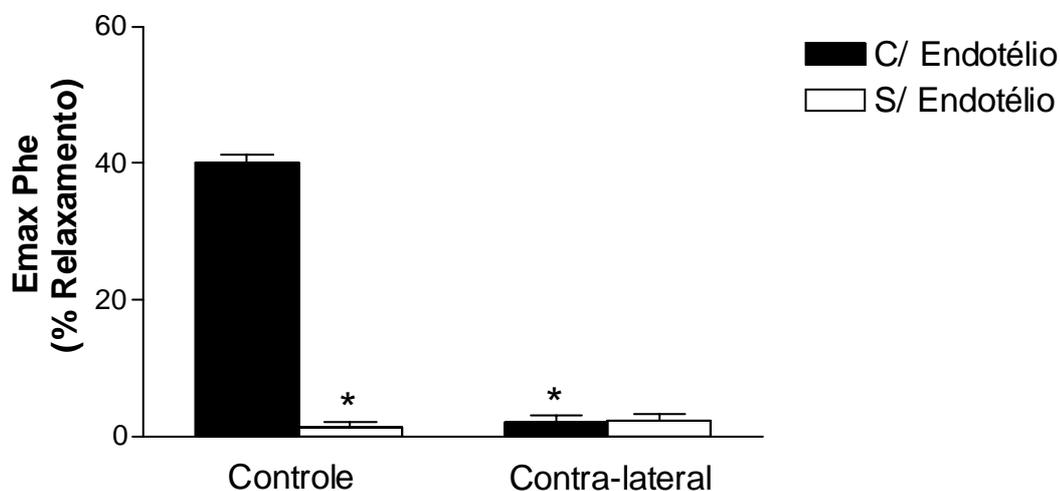
Para verificar a participação do endotélio no mecanismo de vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida contra-lateral e controle, em ausência de endotélio.

A remoção mecânica do endotélio de carótidas de animais controle aboliu a o relaxamento induzido pela Phe na faixa de concentrações de  $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L (figuras 19a e 20, tabela 13), sugerindo que essa resposta é endotélio-dependente.

Em artérias contra-laterais à lesão por catéter-balão, a remoção do endotélio não alterou o perfil de resposta induzida por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L), que já se encontrava abolida em presença de endotélio (figuras 20b e 21, tabela 4.13), excluindo a participação do endotélio na abolição dessa resposta.



**Figura 20. Relaxamento induzido por Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce) e sem endotélio (se).** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em carótida controle (A) e contra-lateral (B). Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ).



**Figura 21.** Efeito relaxante de Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce) e sem endotélio (se). A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle com endotélio. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

**Tabela 4.13** - Valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce) e sem endotélio (se). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

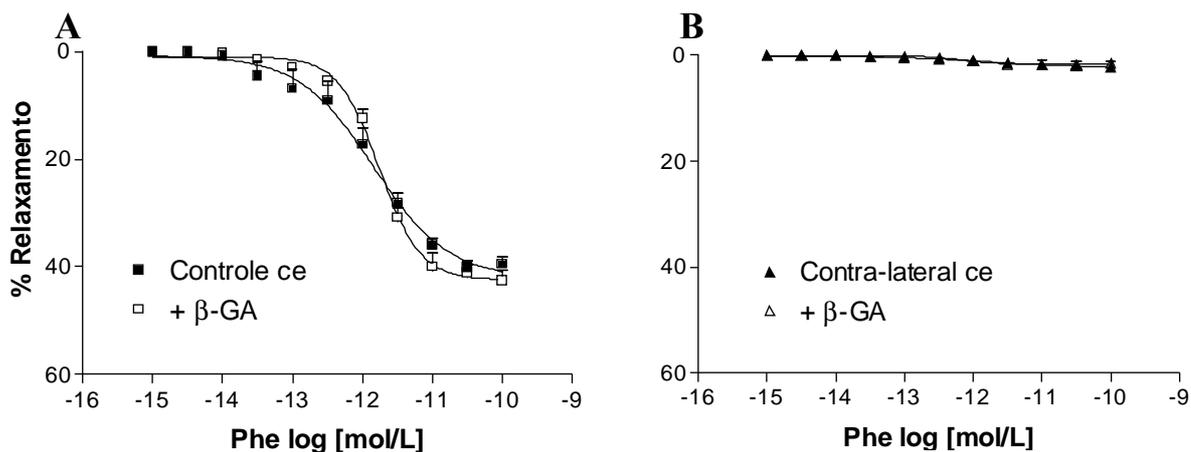
|                       | Grupos            |                   |
|-----------------------|-------------------|-------------------|
|                       | C/ Endotélio      | S/ Endotélio      |
| <b>Controle</b>       | 40,06 $\pm$ 1,23% | 1,27 $\pm$ 0,78%* |
| <b>Contra-lateral</b> | 2,13 $\pm$ 0,98%* | 2,22 $\pm$ 1,10%  |

#### 4.12 - Participação de GAP-junctions no relaxamento induzido por Phe

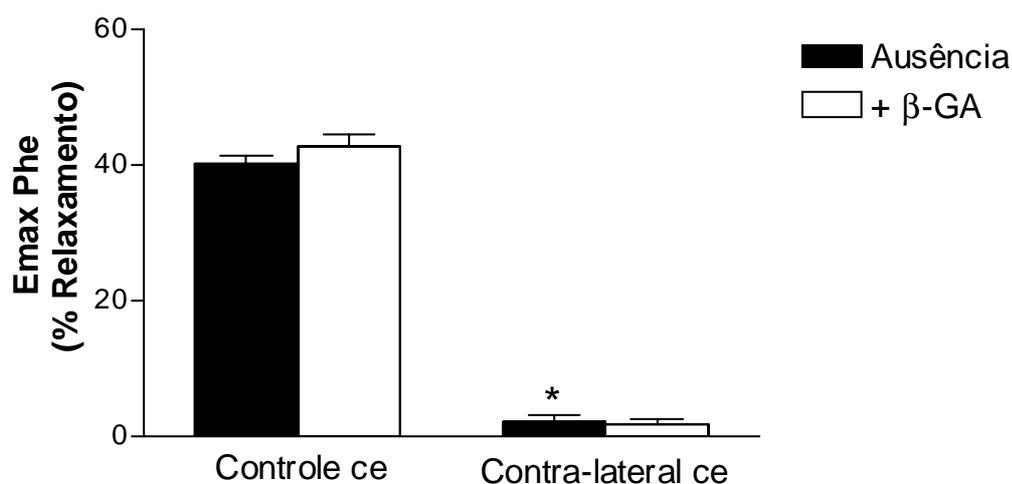
Para verificar a participação de GAP-junctions no mecanismo de vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de controle e carótida contra-lateral, com endotélio, em ausência e presença do bloqueador de GAP-junctions ácido  $\beta$ -glicirretínico ( $\beta$ -GA,  $10^{-5}$  mol/L).

Em presença de  $\beta$ -GA, o relaxamento induzido por Phe em carótida de animais controle, com endotélio, não foi alterado em relação aos parâmetros de  $E_{max}$  (figuras 22a e 23) e  $pD_2$  (tabela 4.14), o que exclui a participação de GAP-junctions no mecanismo de relaxamento induzido por Phe nesse leito.

Em artérias contra-laterais com endotélio, a presença de  $\beta$ -GA não alterou o perfil de resposta induzida por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L), que já se encontrava abolida em ausência do bloqueador (figuras 22b e 23, tabela 4.14), excluindo a participação de GAP-junctions na abolição dessa resposta.



**Figura 22. Relaxamento induzido por Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de  $\beta$ -GA.** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em carótida controle (A) e contra-lateral (B). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5).



**Figura 23.** Efeito relaxante de Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de β-GA. A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante. Os dados representam a média ± EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle sem o bloqueador. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

**Tabela 4.14** - Valores de Emax e pD<sub>2</sub> (-log EC<sub>50</sub>) de Phe, como agonista vasorelaxante, em carótida de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio, em ausência e presença de β-GA. Os dados representam a média ± EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle sem bloqueador. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls (estatística de Emax), Teste *t* não-pareado (estatística de pD<sub>2</sub>).

| Parâmetros                                   | Grupos       |                    |                   |                          |
|----------------------------------------------|--------------|--------------------|-------------------|--------------------------|
|                                              | Controle ce  | Controle ce + β-GA | Contra-lateral ce | Contra-lateral ce + β-GA |
| Emax Phe (%)                                 | 40,05 ± 1,23 | 42,69 ± 1,66       | 2,13 ± 0,98       | 1,78 ± 0,79              |
| pD <sub>2</sub> Phe (-log EC <sub>50</sub> ) | 12,03 ± 0,28 | 11,76 ± 0,06       | —————             | —————                    |

#### 4.13 - Participação do NO no relaxamento induzido por Phe

Para verificar a participação do NO no mecanismo de vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio intacto, em presença do inibidor não seletivo de NO sintases L-NAME ( $N^G$ -nitro-L-arginina metil éster,  $10^{-4}$  mol/L), adicionado 30 minutos antes da pré-contracção da preparação. Para verificar a participação das isoformas da NO sintase (NOS) no mecanismo de vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida contra-lateral e controle, com endotélio intacto, em presença do inibidor seletivo de NOS endotelial (NOSe) L-NNA ( $N^G$ -Nitro-L-arginine,  $10^{-4}$  mol/L), do inibidor seletivo de NOS neuronal (nNOS) 7-NI (7-nitroindazol,  $10^{-4}$  mol/L), e do inibidor de NOS induzida (NOSi) 1400W ( $10^{-7}$  mol/L), adicionados 30 minutos antes da pré-contracção da preparação.

Em presença do inibidor não-seletivo para NOS L-NAME ( $10^{-4}$  mol/L), a resposta de relaxamento induzida por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em artérias de animais controle, com endotélio, foi completamente abolida (figuras 24a e 25). A adição do inibidor seletivo de eNOS L-NNA ( $10^{-4}$  mol/L) também aboliu completamente o relaxamento induzido por Phe em artérias de animais controle, com endotélio (figuras 24a e 25, tabela 4.15). Em presença dos inibidores seletivos para nNOS, 7-NI ( $10^{-4}$  mol/L), ou para iNOS, 1400W ( $10^{-7}$  mol/L), não foram observadas diferenças significativas nos valores e  $E_{max}$  (figuras 24a e 25, tabela 4.15) e  $pD_2$  (tabela 4.16) para Phe em artérias controle com endotélio, em relação aos parâmetros encontrados no grupo controle com endotélio em ausência dos inibidores.

Em artérias contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio, a adição de L-NAME ( $10^{-4}$  mol/L), bem como a adição de L-NNA ( $10^{-4}$  mol/L), 7-NI ( $10^{-4}$  mol/L) ou 1400W ( $10^{-4}$  mol/L), não alterou a resposta induzida por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L), que já se encontrava abolida em ausência dos inibidores (figuras 24b e 25, tabela 4.15), excluindo a participação do NO na abolição dessa resposta.

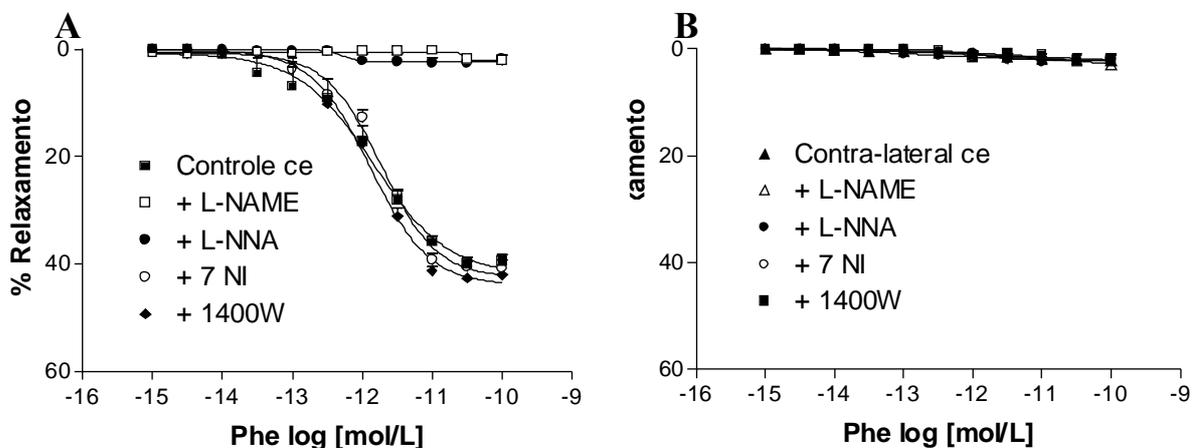


Figura 24. Relaxamento induzido por Phe em carótidas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de inibidores de NOS. A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em carótida controle (A) e contra-lateral (B). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5).

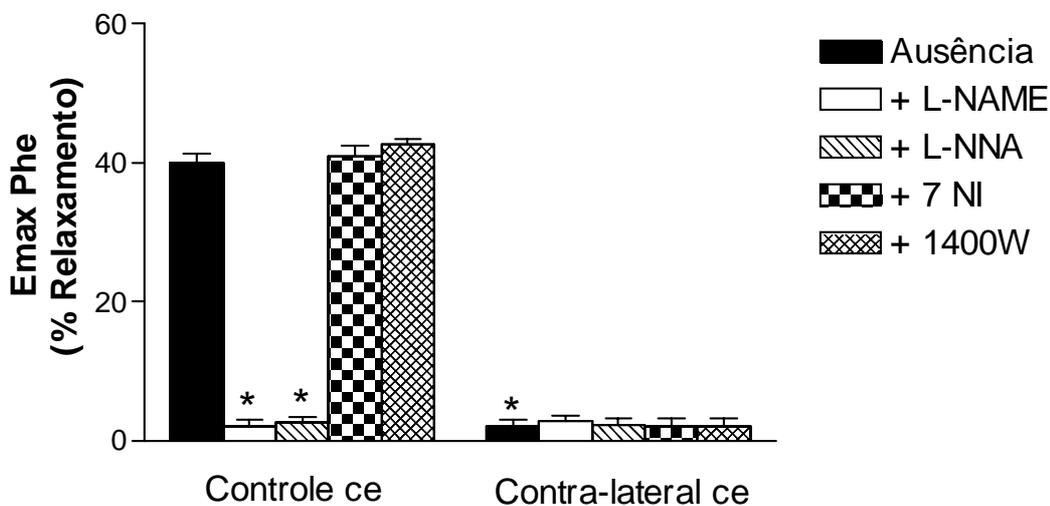


Figura 25. Efeito relaxante de Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de inibidores de NOS. A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P < 0,001) em relação ao grupo controle com endotélio, em ausência de inibidor. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

**Tabela 4.15** - Valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de inibidores de NOS. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle em ausência de inibidor. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

|                 | <b>Grupos</b>      |                          |
|-----------------|--------------------|--------------------------|
|                 | <b>Controle ce</b> | <b>Contra-lateral ce</b> |
| <b>Ausência</b> | 40,06 $\pm$ 1,23%  | 2,13 $\pm$ 0,98%*        |
| <b>+ L-NAME</b> | 2,09 $\pm$ 1,08 %* | 2,91 $\pm$ 0,77%         |
| <b>+ L-NNA</b>  | 2,60 $\pm$ 0,85%*  | 2,28 $\pm$ 0,93%         |
| <b>+ 7-NI</b>   | 40,88 $\pm$ 1,53%  | 2,09 $\pm$ 1,18%         |
| <b>+ 1400W</b>  | 42,63 $\pm$ 0,83%  | 2,09 $\pm$ 1,18%         |

**Tabela 4.16** - Valores de pD<sub>2</sub> (-log EC<sub>50</sub>) de Phe como agonista vasorelaxante em artérias carótidas de animais controle, com endotélio, em ausência e presença de inibidores de NOS. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

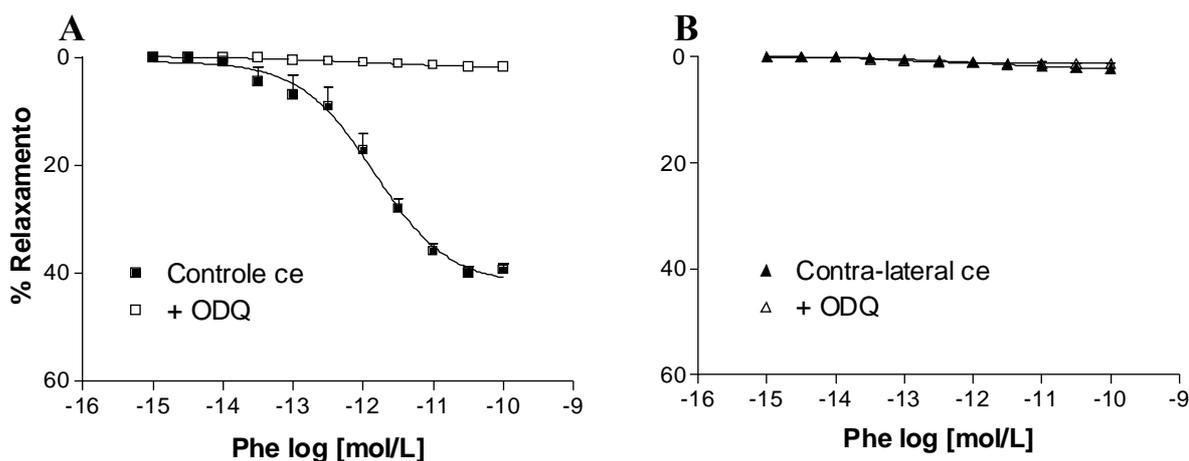
| <b>Grupos</b>              | <b>pD<sub>2</sub> (-log EC<sub>50</sub>)</b> |
|----------------------------|----------------------------------------------|
| <b>Controle ce</b>         | 12,03 $\pm$ 0,28                             |
| <b>Controle ce + 7-NI</b>  | 11,72 $\pm$ 0,05                             |
| <b>Controle ce + 1400W</b> | 11,89 $\pm$ 0,05                             |

#### 4.14 - Participação de GMP'c no relaxamento induzido por Phe

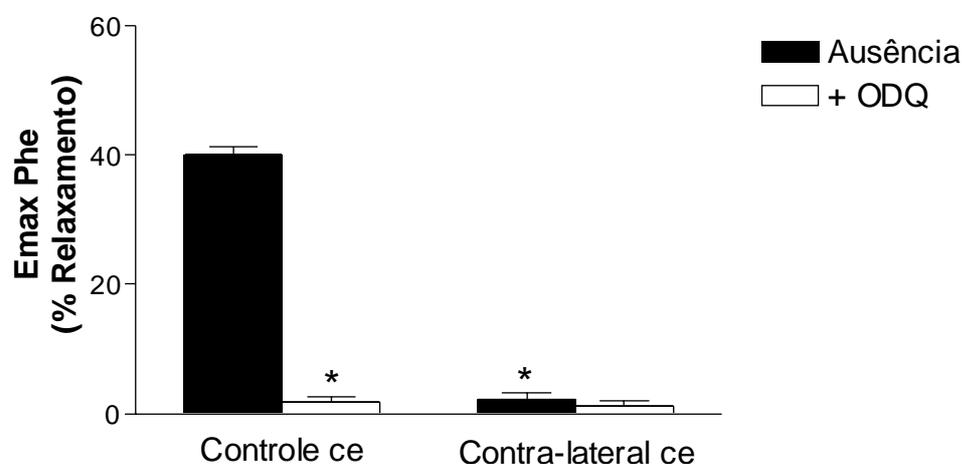
Para verificar a participação de GMP'c no mecanismo de vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio, em ausência e presença do inibidor seletivo de guanilato ciclase solúvel de ODQ (1*H*-[1,2,4]-oxadiazolo [4,3-*a*] quinoxalin-1-ona,  $10^{-6}$  mol/L), adicionado 30 minutos antes da pré-contração.

Em presença de ODQ, o relaxamento induzido por Phe em carótida de animais controle, com endotélio, foi completamente abolido (figuras 26a e 27, tabela 4.17), sugerindo a participação de GMP'c nessa resposta.

Em artérias contra-laterais com endotélio, a presença de ODQ não alterou o perfil de resposta induzida por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L), que já se encontrava abolida em ausência do inibidor (figuras 26b e 27, tabela 4.17), excluindo a participação de GMP'c na abolição dessa resposta.



**Figura 26. Relaxamento induzido por Phe em carótidas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de ODQ.** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em carótida controle (A) e contra-lateral (B). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5).



**Figura 27.** Efeito relaxante de Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de ODQ. A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle com endotélio, em ausência do inibidor. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

**Tabela 4.17** - Valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de ODQ. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle em ausência de inibidor. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

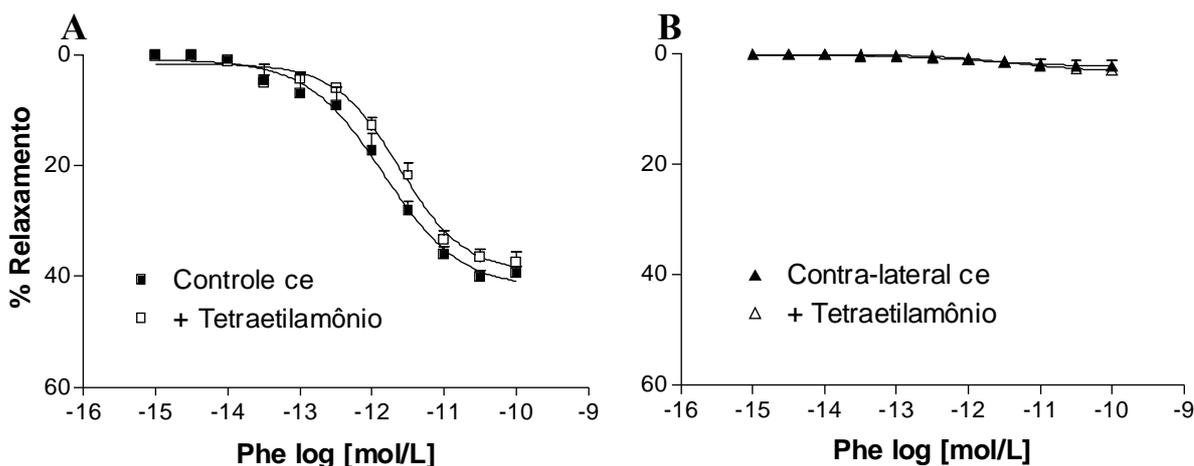
| Grupos            | S/ ODQ           | C/ ODQ           |
|-------------------|------------------|------------------|
| Controle ce       | 40,06 $\pm$ 1,23 | 2,13 $\pm$ 0,98* |
| Contra-lateral ce | 1,79 $\pm$ 0,75* | 1,23 $\pm$ 0,78  |

#### 4.15 - Participação de canais para $K^+$ no relaxamento induzido por Phe

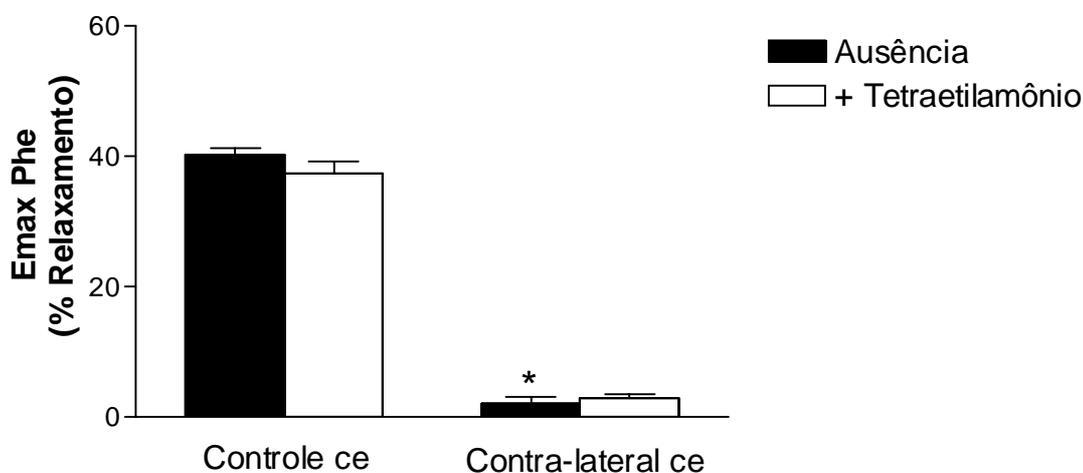
Para verificar a participação de canais para  $K^+$  no mecanismo de vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio, em ausência e presença do bloqueador não-seletivo de canais para  $K^+$  tetraetilamônio (TEA,  $10^{-2}$  mol/L), adicionado 30 minutos antes da pré-contracção.

Em presença de TEA, o relaxamento induzido por Phe em carótida de animais controle, com endotélio, não foi alterado em relação aos parâmetros de  $E_{max}$  (figuras 28a e 29) e  $pD_2$  (tabela 4.18), excluindo a participação de canais para  $K^+$  nessa resposta.

Em artérias contra-laterais com endotélio, a presença de TEA não alterou o perfil de resposta induzida por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L), que já se encontrava abolida em ausência do bloqueador (figuras 28b e 29, tabela 4.18) excluindo a participação de canais para  $K^+$  na abolição dessa resposta.



**Figura 27. Relaxamento induzido por Phe em carótidas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de TEA.** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em carótida controle (A) e contra-lateral (B). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5).



**Figura 28.** Efeito relaxante de Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de TEA. A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle com endotélio, em ausência do bloqueador. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

**Tabela 4.17** - Valores de Emax e pD<sub>2</sub> (-log EC<sub>50</sub>) de Phe, como agonista vasorelaxante, em carótida de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio, em ausência e presença de TEA. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle sem bloqueador. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls (estatística de Emax), Teste t não-pareado (estatística de pD<sub>2</sub>).

| Parâmetros                                   | Grupos           |                   |                   |                         |
|----------------------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|
|                                              | Controle ce      | Controle ce + TEA | Contra-lateral ce | Contra-lateral ce + TEA |
| Emax Phe (%)                                 | 40,05 $\pm$ 1,23 | 37,39 $\pm$ 1,79  | 2,13 $\pm$ 0,98   | 2,87 $\pm$ 0,66         |
| pD <sub>2</sub> Phe (-log EC <sub>50</sub> ) | 12,03 $\pm$ 0,28 | 11,61 $\pm$ 0,04  | —————             | —————                   |

#### 4.16 - Participação de produtos derivados da COX no relaxamento induzido por Phe

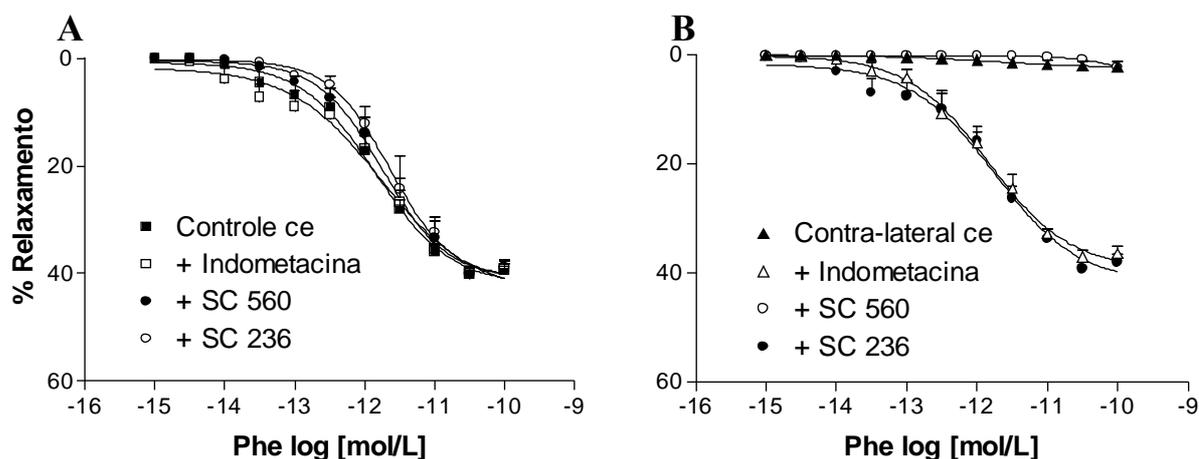
Para verificar a participação de produtos derivados da COX no vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio intacto, em presença do inibidor não-seletivo de ciclooxigenase (COX) indometacina ( $10^{-5}$  mol/L), adicionado 30 minuto antes da pré-contração da preparação.

Para determinar a participação das isoformas da COX no vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio intacto, em presença do inibidor seletivo de COX-1 SC-560 ( $10^{-9}$  mol/L) e do inibidor seletivo de COX-2 SC-236 ( $10^{-10}$  mol/L), adicionados 30 minutos antes da pré-contração da preparação.

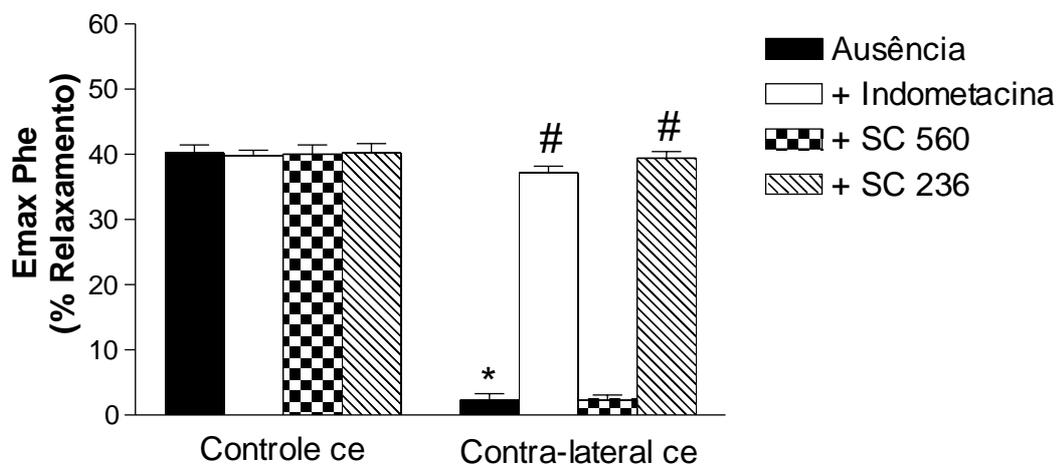
Em presença do inibidor não-seletivo para COX indometacina ( $10^{-5}$  mol/L), não foram observadas alterações significativas nos valores de  $E_{max}$  (figuras 29a e 30, tabela 4.18) e  $pD_2$  (tabela 4.19) para a resposta de relaxamento induzida por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em artérias de animais controle, com endotélio. A adição dos inibidores seletivos de COX-1 SC560 ( $10^{-9}$  mol/L) e COX-2 SC236 ( $10^{-10}$  mol/L) também não alterou o perfil de relaxamento induzido por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em artérias controle com endotélio, nem quanto ao parâmetro de  $E_{max}$  (figuras 29a e 30, tabela 4.18) ou quanto ao parâmetro de  $pD_2$  (tabela 4.19). Esses dados excluem a participação de produtos derivados da COX no relaxamento induzido por Phe em carótida controle.

Em artérias contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio, a adição de indometacina ( $10^{-5}$  mol/L), normalizou o relaxamento induzido por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) quanto aos parâmetros de  $E_{max}$  (figuras 29b e 30, tabela 4.18) e  $pD_2$  (tabela 4.19), em relação ao grupo controle com endotélio em ausência do inibidor. A adição do inibidor COX-

1 seletivo SC560 ( $10^{-9}$  mol/L) não alterou o perfil de resposta à Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em carótida contra-lateral com endotélio, em relação à ausência do inibidor (figuras 29b e 30, tabela 4.18), mantendo-a abolida. Em presença do inibidor COX-2 seletivo SC236 ( $10^{-10}$  mol/L), o relaxamento induzido por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em carótida contra-lateral com endotélio foi normalizado quanto aos parâmetro de Emax (figuras 29b e 30, tabela 4.18) e  $pD_2$  (tabela 4.19), em relação ao grupo controle com endotélio em ausência do inibidor. Esses achados sugerem a participação de produtos derivados da COX-2 na abolição da resposta de relaxamento induzida por Phe em artéria contra-lateral à lesão por catéter-balão.



**Figura 29. Relaxamento induzido por Phe em carótidas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de inibidores de COX. A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em artéria controle (A) e contra-lateral (B). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5).**



**Figura 30.** Efeito relaxante de Phe em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de inibidores de COX. A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle com endotélio, em ausência de inibidor. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo contra-lateral com endotélio, em ausência de inibidor. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

**Tabela 4.18** - Valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de inibidores de COX. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle com endotélio, em ausência de inibidor. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo contra-lateral com endotélio, em ausência de inibidor. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

|                       | Grupos            |                    |
|-----------------------|-------------------|--------------------|
|                       | Controle ce       | Contra-lateral ce  |
| <b>Ausência</b>       | 40,06 $\pm$ 1,23% | 2,13 $\pm$ 0,98%*  |
| <b>+ Indometacina</b> | 39,75 $\pm$ 0,75% | 37,06 $\pm$ 1,11%# |
| <b>+ SC560</b>        | 39,95 $\pm$ 1,38% | 2,27 $\pm$ 0,66%   |
| <b>+ SC236</b>        | 40,14 $\pm$ 1,36% | 39,27 $\pm$ 1,15%# |

**Tabela 4.19** - Valores de  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ) de Phe como agonista vasorelaxante em artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio, em ausência e presença de inibidores de COX. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

|                     | Grupos           |                   |
|---------------------|------------------|-------------------|
|                     | Controle ce      | Contra-lateral ce |
| <b>Ausência</b>     | 12,03 $\pm$ 0,28 | _____             |
| <b>Indometacina</b> | 12,00 $\pm$ 0,32 | 11,94 $\pm$ 0,15  |
| <b>SC560</b>        | 11,72 $\pm$ 0,17 | _____             |
| <b>SC236</b>        | 11,63 $\pm$ 0,17 | 11,92 $\pm$ 0,28  |

### **Conclusões Parciais**

- ✓ O relaxamento induzido por Phe em carótida de rato é endotélio-dependente e mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores, envolvendo a participação de NO derivado da eNOS e GMP'c.
- ✓ Produtos derivados da COX-2 participam da abolição da resposta de relaxamento induzida por Phe em carótida contra-lateral.

#### 4.17 - Participação do ânion $O_2^-$ no relaxamento induzido por Phe

Para verificar a participação do ânion  $O_2^-$  no vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em carótidas controle e contra-lateral, com endotélio intacto, em presença do sequestrador seletivo para ânion  $O_2^-$  tempol (4-hidroxitetrametil-L-piperidina-1-oxil,  $10^{-3}$  mol/L), adicionado 30 minutos antes da pré-contracção da preparação.

Em presença de tempol ( $10^{-3}$  mol/L), não foram observadas diferenças significativas nos valores de  $E_{max}$  (figuras 31a e 30) e  $pD_2$  (tabela 4.21) para a resposta de relaxamento induzida por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em artérias de animais controle, com endotélio. Esses dados excluem a participação do ânion  $O_2^-$  no relaxamento induzido por Phe em carótida de animal controle.

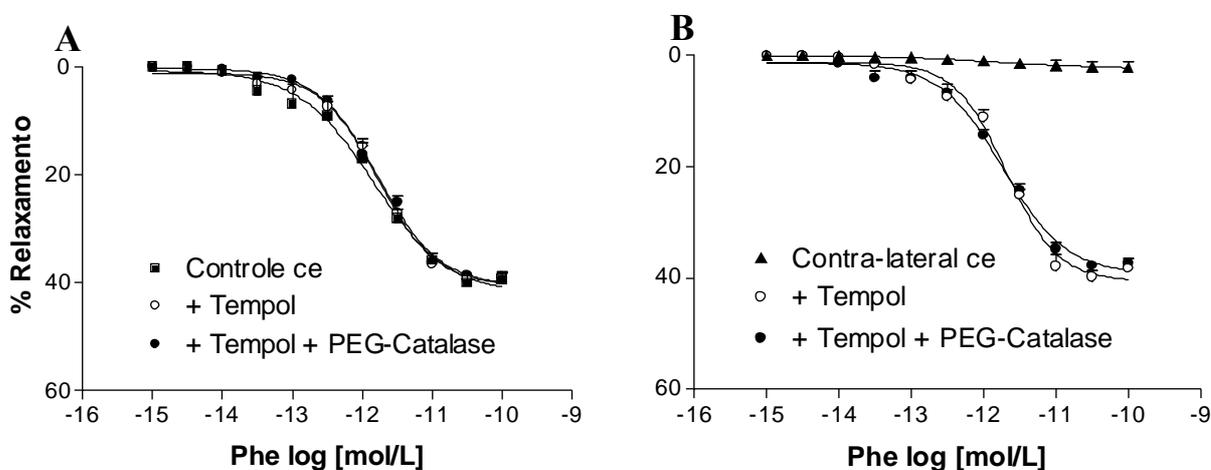
Em artérias contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio, a adição de tempol ( $10^{-3}$  mol/L) normalizou o relaxamento induzido por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) quanto aos parâmetros de  $E_{max}$  (figuras 31b e 32, tabela 4.20) e  $pD_2$  (tabela 4.21), em relação ao grupo controle com endotélio em ausência do sequestrador, sugerindo a participação do ânion  $O_2^-$  na abolição dessa resposta na artéria contra-lateral.

Para verificar a hipótese de participação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), derivado da remoção do ânion superóxido pelo tempol, no relaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em artérias controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio intacto, em presença de tempol ( $10^{-3}$  mol/L) associado ao sequestrador de  $H_2O_2$  PEG-catalase (200 U/mL), adicionados 30 minutos antes da pré-contracção.

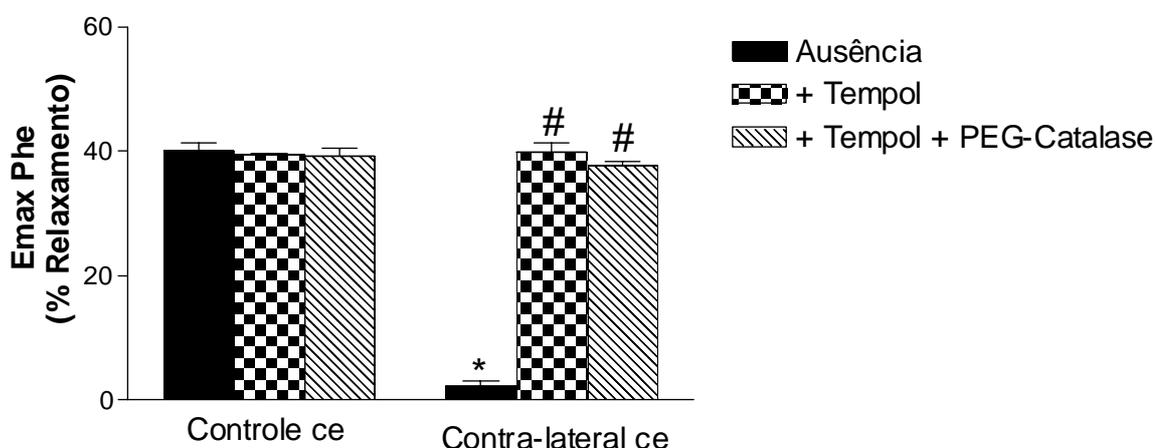
Em presença de tempol associado à PEG-catalase, não foram observadas diferenças significativas nos valores de  $E_{max}$  (figuras 31a e 32, tabela 4.20) e  $pD_2$  (tabela 4.21) para a

resposta de relaxamento induzida por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em artérias de animais controle, com endotélio. O perfil de relaxamento induzido por Phe em presença desses scavengers manteve-se semelhante ao observado em presença de tempol isolado, excluindo a hipótese da participação de  $H_2O_2$  derivado da remoção de  $O_2^-$  por tempol nessa resposta.

Em artérias contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio, a adição de tempol associado à PEG-catalase normalizou o relaxamento induzido por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) quanto aos parâmetros de  $E_{max}$  (figuras 31b e 32, tabela 4.20) e  $pD_2$  (tabela 4.21), em relação ao grupo controle com endotélio em ausência do sequestrador. O perfil da curva de relaxamento induzido por Phe em carótida contra-lateral, na presença desses scavengers, foi muito semelhante ao observado em presença de tempol isolado, excluindo a participação de  $H_2O_2$  derivado da remoção de  $O_2^-$  por tempol nessa resposta.



**Figura 31. Relaxamento induzido por Phe em carótidas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de tempol associado ou não à PEG-catalase.** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em carótida controle (A) e contra-lateral (B). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5).



**Figura 32:** Efeito relaxante de Phe em carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de tempol associado ou não à PEG-catalase. A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle em ausência de tempol. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo contra-lateral em ausência de tempol. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

**Tabela 4.20** - Valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de tempol associado ou não à PEG-catalase. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle com endotélio, em ausência de scavenger. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo contra-lateral com endotélio, em ausência de scavenger. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

|                                | Grupos             |                    |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|
|                                | Controle ce        | Contra-lateral ce  |
| <b>Ausência</b>                | 40,06 $\pm$ 1,23%  | 2,13 $\pm$ 0,98%*  |
| <b>+ Tempol</b>                | 39,45 $\pm$ 0,24 % | 39,91 $\pm$ 1,30%# |
| <b>+ Tempol + PEG-catalase</b> | 39,26 $\pm$ 1,59%  | 37,77 $\pm$ 0,63%# |

**Tabela 4.21** - Valores de  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ) de Phe como agonista vasorelaxante em artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio, em ausência e presença de tempol associado ou não à PEG-catalase. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

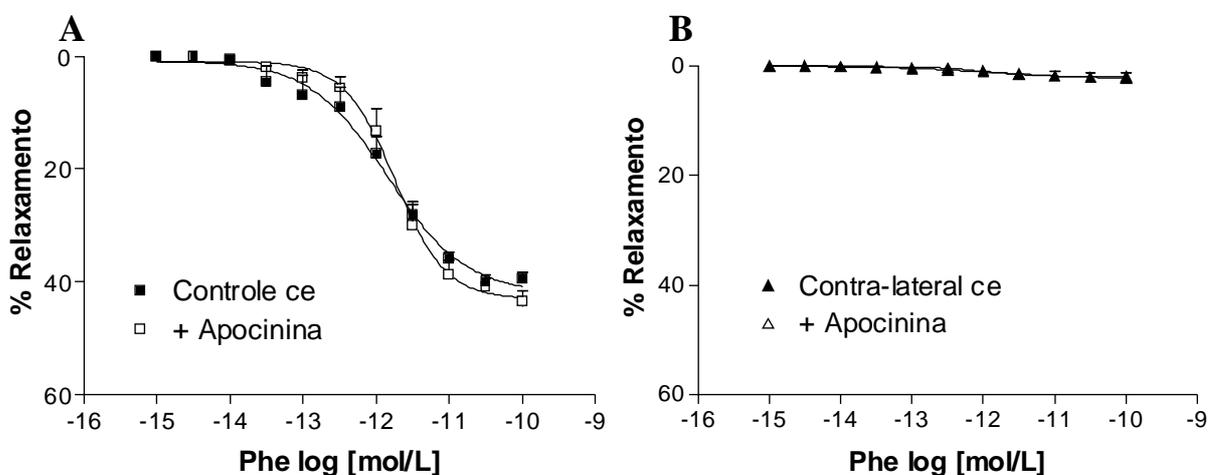
| <b>Grupos</b>                  |                    |                          |
|--------------------------------|--------------------|--------------------------|
|                                | <b>Controle ce</b> | <b>Contra-lateral ce</b> |
| <b>Ausência</b>                | 12,03 $\pm$ 0,28   | _____                    |
| <b>+ Tempol</b>                | 11,77 $\pm$ 0,02   | 11,69 $\pm$ 0,05         |
| <b>+ Tempol + PEG-catalase</b> | 11,77 $\pm$ 0,06   | 11,71 $\pm$ 0,05         |

#### 4.18 - Participação de produtos derivados da NADPH oxidase no relaxamento induzido por Phe

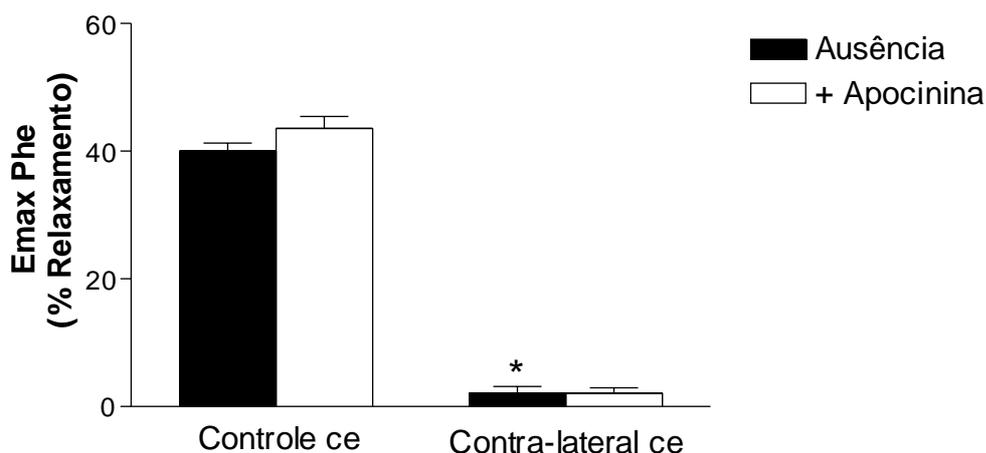
Para verificar a participação de produtos da NADPH oxidase no mecanismo de vasorelaxamento induzido por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio, em ausência e presença do inibidor de NADPH oxidase apocinina ( $10^{-4}$  mol/L), adicionado 30 minutos antes da pré-contracção.

Em presença de apocinina, o relaxamento induzido por Phe em carótida de animais controle, com endotélio, não foi alterado em relação aos parâmetros de  $E_{max}$  (figuras 33a e 34, tabela 4.22) e  $pD_2$  (tabela 4.23), excluindo a participação de produtos da NADPH oxidase nessa resposta.

Em artérias contra-laterais com endotélio, a presença de apocinina não alterou o perfil de resposta induzida por Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L), que já se encontrava abolida em ausência do bloqueador (figuras 33b e 34, tabela 4.22), excluindo a participação dos produtos da NADPH oxidase na abolição dessa resposta.



**Figura 33. Relaxamento induzido por Phe em carótidas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de apocinina.** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) em carótida controle (A) e contra-lateral (B). Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ).



**Figura 34.** Efeito relaxante de Phe em carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de apocinina. A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle em ausência de apocinina. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

**Tabela 4.22** - Valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasorelaxante em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de apocinina. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle com endotélio, em ausência de apocinina. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

|                          | Grupos            |                   |
|--------------------------|-------------------|-------------------|
|                          | S/ Apocinina      | C/ Apocinina      |
| <b>Controle ce</b>       | 40,06 $\pm$ 1,23% | 43,58 $\pm$ 1,84% |
| <b>Contra-lateral ce</b> | 2,13 $\pm$ 0,98%* | 2,06 $\pm$ 0,87%  |

**Tabela 4.23** - Valores de pD<sub>2</sub> (-log EC<sub>50</sub>) de Phe como agonista vasorelaxante em artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio, em ausência e presença de apocinina. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). Teste t não-pareado.

|                          | Grupos           |                  |
|--------------------------|------------------|------------------|
|                          | S/ Apocinina     | C/ Apocinina     |
| <b>Controle ce</b>       | 12,03 $\pm$ 0,28 | 11,75 $\pm$ 0,14 |
| <b>Contra-lateral ce</b> | _____            | _____            |

### ***Conclusões Parciais***

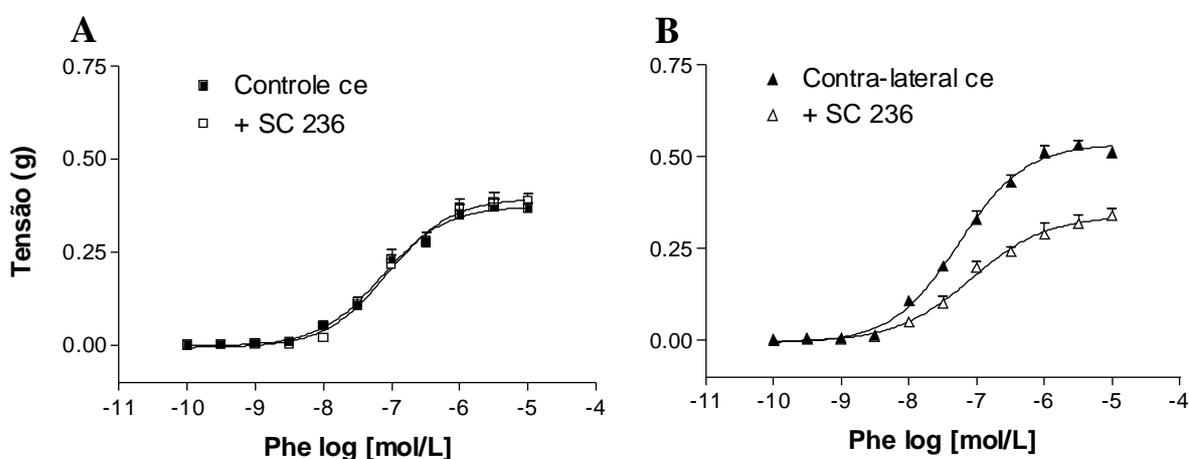
- ✓ O ânion  $O_2^-$  participa da abolição da resposta de relaxamento induzida por Phe em carótida contra-lateral.
  
- ✓ Os produtos derivados da NADPH oxidase não participam da abolição da resposta de relaxamento induzida por Phe em carótida contra-lateral, excluindo a participação dessa enzima como fonte do ânion  $O_2^-$  responsável por essa alteração de reatividade.

#### 4.19 – Participação dos produtos derivados da COX-2 na contração induzida por Phe em carótida contra-lateral

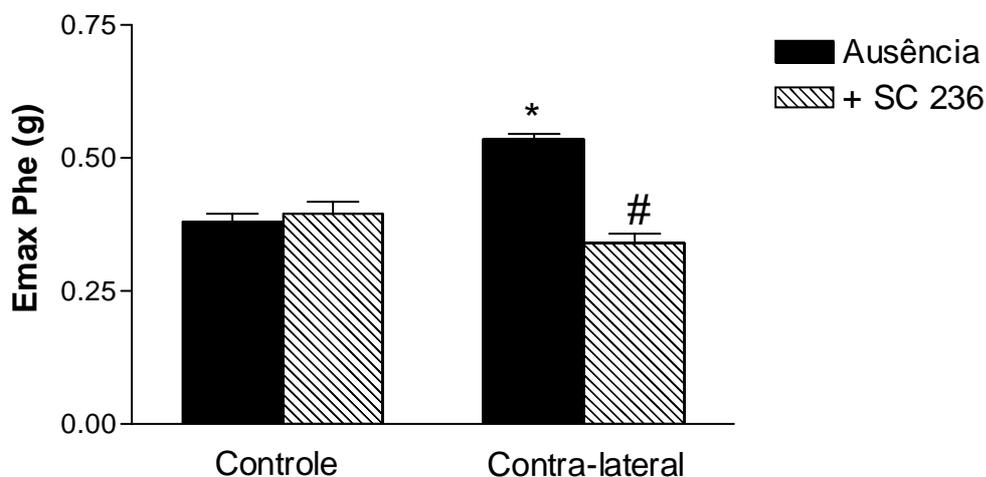
Para verificar a participação de produtos derivados da COX-2 na contração induzida por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, com endotélio intacto, em presença do inibidor seletivo de COX-2 SC 236 ( $10^{-10}$  mol/L), adicionado 30 minutos antes do início da curva.

Os resultados obtidos a partir desse protocolo mostram que, em artéria controle, a adição de SC 236 não alterou o perfil da contração induzida por Phe quanto aos parâmetros de  $E_{max}$  (figuras 35a e 36, tabela 4.24) e  $pD_2$  (tabela 4.25), excluindo a participação dos produtos derivados da COX-2 nessa resposta.

Em carótida contra-lateral, a adição de SC 236 normalizou a contração induzida por Phe, revertendo-a para níveis controle (figuras 35b e 36, tabela 4.24), sem alterar a potência do agonista (tabela 4.25), sugerindo a participação dos produtos derivados da COX-2 no aumento da contração máxima induzida por Phe nesse leito.



**Figura 35.** Contração induzida por Phe em carótidas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de SC 236. A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de contração para Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) em carótida controle (A) e contra-lateral (B). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5).



**Figura 36. Efeito contrátil de Phe em carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de SC 236.** A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasoconstrictor. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). \* indica diferença significativa ( $P < 0,001$ ) em relação ao grupo controle em ausência de SC 236. # indica diferença significativa ( $P < 0,001$ ) em relação ao grupo contra-lateral em ausência de SC 236. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

**Tabela 4.24 - Valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasoconstrictor em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de SC 236.** Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). \* indica diferença significativa ( $P < 0,001$ ) em relação ao grupo controle com endotélio, em ausência de SC 236. # indica diferença significativa ( $P < 0,001$ ) em relação ao grupo contra-lateral em ausência de SC 236. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

|                   | Grupos            |                   |
|-------------------|-------------------|-------------------|
|                   | S/ SC 236         | C/ SC 236         |
| Controle ce       | 0,38 $\pm$ 0,01g  | 0,39 $\pm$ 0,02g  |
| Contra-lateral ce | 0,54 $\pm$ 0,01g* | 0,34 $\pm$ 0,02g# |

**Tabela 4.25** - Valores de  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ) de Phe como agonista vasoconstrictor em artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio, em ausência e presença de SC 236. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

| <b>Grupos</b>            |                  |                  |
|--------------------------|------------------|------------------|
|                          | <b>S/ SC 236</b> | <b>C/ SC 236</b> |
| <b>Controle ce</b>       | 7,10 $\pm$ 0,12  | 7,25 $\pm$ 0,05  |
| <b>Contra-lateral ce</b> | 7,09 $\pm$ 0,08  | 7,03 $\pm$ 0,06  |

#### **4.20 - Participação do ânion $O_2^-$ na contração induzida por Phe em carótida contra-lateral**

Para verificar a participação do ânion  $O_2^-$  na contração induzida por Phe, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) em carótidas controle e contra-lateral, com endotélio intacto, em presença do sequestrador seletivo para ânion  $O_2^-$  tempol (4-hidroxitetrametil-L-piperidina-1-oxil,  $10^{-3}$  mol/L), adicionado 30 minutos antes do início da curva.

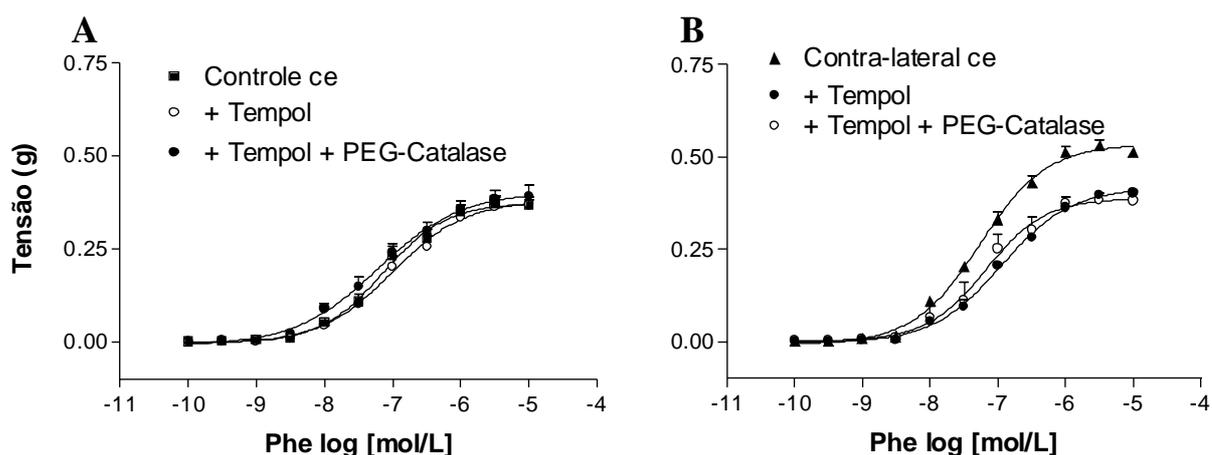
Em presença de tempol ( $10^{-3}$  mol/L), não foram observadas diferenças significativas nos valores de  $E_{max}$  (figuras 37a e 38, tabela 4.26) e  $pD_2$  (tabela 4.27) para a resposta de contração induzida por Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) em artérias de animais controle, com endotélio. Esses dados excluem a participação do ânion  $O_2^-$  na contração induzida por Phe em carótida de animal controle.

Em artérias contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio, a adição de tempol ( $10^{-3}$  mol/L) normalizou a contração induzida por Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) quanto ao parâmetro de  $E_{max}$  (figuras 37b e 38, tabela 4.26), sem alterar o  $pD_2$  do agonista (tabela 4.27), em relação ao grupo controle com endotélio em ausência do sequestrador, sugerindo a participação do ânion  $O_2^-$  no aumento da contração máxima induzida por Phe na artéria contra-lateral.

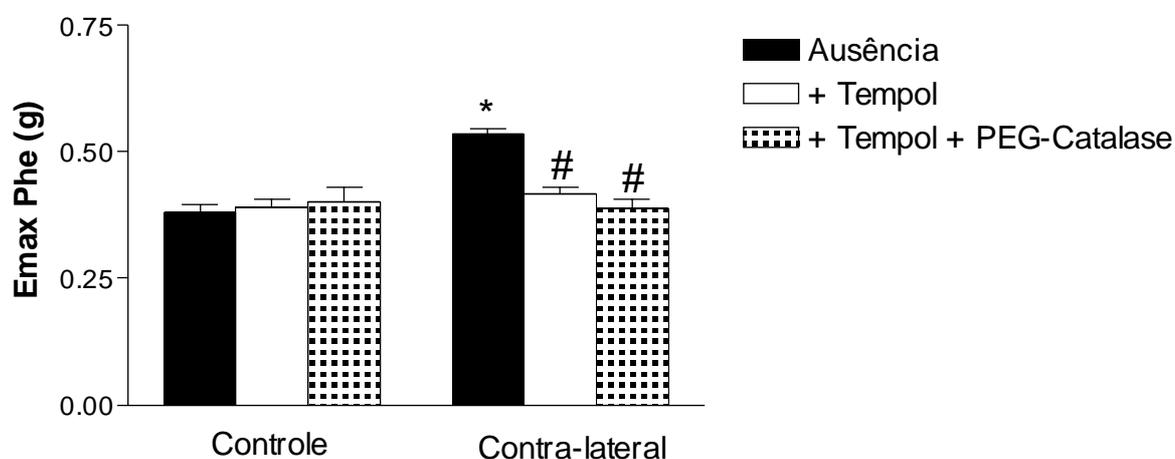
Para verificar a hipótese de participação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), derivado da remoção do ânion superóxido pelo tempol, na contração induzida por Phe, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) em artérias controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio intacto, em presença de tempol ( $10^{-3}$  mol/L) associado ao sequestrador de  $H_2O_2$  PEG-catalase (200 U/mL), adicionados 30 minutos antes do início da curva.

Em presença de tempol associado à PEG-catalase, não foram observadas diferenças significativas nos valores de  $E_{max}$  (figuras 37a e 38, tabela 4.26) e  $pD_2$  (tabela 4.27) para a resposta de contração induzida por Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) em artérias de animais controle, com endotélio. O perfil de contração induzida por Phe em presença desses scavengers manteve-se semelhante ao observado em presença de tempol isolado, excluindo a hipótese da participação de  $H_2O_2$  derivado da remoção de  $O_2^-$  por tempol nessa resposta.

Em artérias contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio, a adição de tempol associado à PEG-catalase normalizou a contração induzida por Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) quanto ao parâmetro de  $E_{max}$  (figuras 37b e 38, tabela 4.26), sem alterar o  $pD_2$  do agonista (tabela 4.27), em relação ao grupo controle com endotélio em ausência do sequestrador. O perfil da curva de contração induzida por Phe em carótida contra-lateral, na presença desses scavengers, foi muito semelhante ao observado em presença de tempol isolado, excluindo a participação de  $H_2O_2$  derivado da remoção de  $O_2^-$  por tempol na normalização da resposta contrátil à Phe nesse leito.



**Figura 37.** Contração induzida por Phe em carótidas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de tempol associado ou não à PEG-catalase. A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de contração para Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) em carótida controle (A) e contra-lateral (B). Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ).



**Figura 38.** Efeito contrátil de Phe em carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de tempol associado ou não à PEG-catalase. A figura representa os valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasoconstrictor. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle em ausência de tempol. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo contra-lateral em ausência de tempol. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

**Tabela 4.26** - Valores de efeito máximo (Emax) de Phe como agonista vasoconstrictor em artérias carótidas isoladas de animais controle e submetidos à lesão por catéter-balão, com endotélio (ce), em ausência e presença de tempol associado ou não à PEG-catalase. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle com endotélio, em ausência de scavenger. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo contra-lateral com endotélio, em ausência de scavenger. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

|                                | Grupos           |                   |
|--------------------------------|------------------|-------------------|
|                                | Controle ce      | Contra-lateral ce |
| <b>Ausência</b>                | 0,38 $\pm$ 0,01g | 0,54 $\pm$ 0,01g* |
| <b>+ Tempol</b>                | 0,39 $\pm$ 0,01g | 0,42 $\pm$ 0,01g# |
| <b>+ Tempol + PEG-catalase</b> | 0,40 $\pm$ 0,03g | 0,39 $\pm$ 0,02g# |

**Tabela 4.27** - Valores de  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ) de Phe como agonista vasoconstrictor em artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio, em ausência e presença de tempol associado ou não à PEG-catalase. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

|                                | Grupos          |                   |
|--------------------------------|-----------------|-------------------|
|                                | Controle ce     | Contra-lateral ce |
| <b>Ausência</b>                | 7,10 $\pm$ 0,12 | 7,25 $\pm$ 0,05   |
| <b>+ Tempol</b>                | 6,91 $\pm$ 0,19 | 6,95 $\pm$ 0,05   |
| <b>+ Tempol + PEG-catalase</b> | 7,22 $\pm$ 0,08 | 7,16 $\pm$ 0,21   |

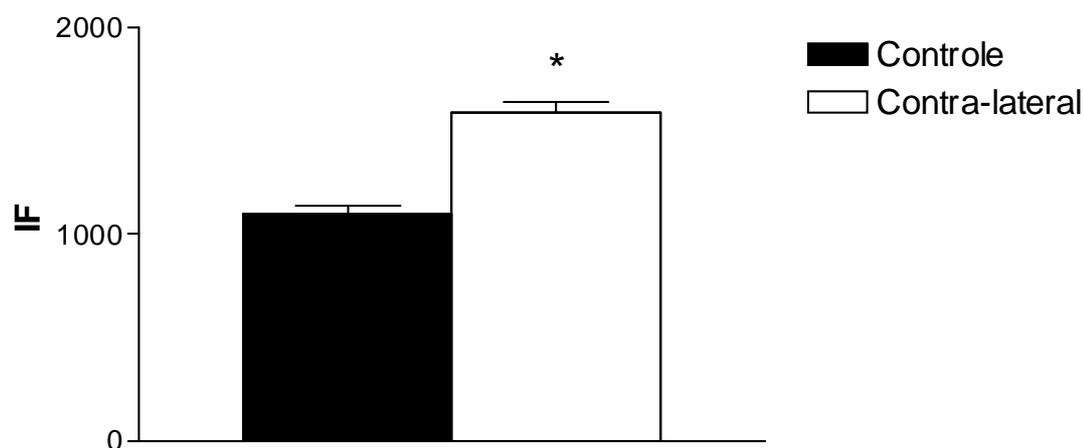
### *Conclusões Parciais*

- ✓ Os produtos derivados da COX-2 participam do aumento da contração máxima induzida por Phe em carótida contra-lateral.
- ✓ O ânion  $O_2^-$  também participa da hiperreatividade contrátil à Phe em carótida contra-lateral.

#### 4.21 - Conseqüências da lesão por catéter-balão na produção de EROS

Para verificar se a lesão por catéter-balão altera a produção de EROS na artéria contra-lateral, foram feitas análises quantitativas de EROS por citometria de fluxo, em células endoteliais removidas de carótidas controle e contra-laterais, em presença da sonda fluorescente não-seletiva para EROS dihidroetidina (DHE).

Os resultados obtidos a partir desse protocolo revelam um aumento na quantidade de EROS detectada em células endoteliais de carótida contra-lateral, em relação à artéria controle (figura 39, tabela 4.28), sugerindo que a lesão por catéter-balão estabelece um estresse oxidativo na artéria contra-lateral.



**Figura 39. Quantificação de EROS em células endoteliais de artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão.** A figura representa os a intensidade de fluorescência (IF) emitida pelas células marcadas com DHE. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle. Teste *t* não-pareado.

**Tabela 4.28** - Quantificação de ROS em células endoteliais de artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão. Os dados representam a média  $\pm$  EPM da intensidade de fluorescência emitida pelas células marcadas com DHE (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle. Teste *t* não-pareado.

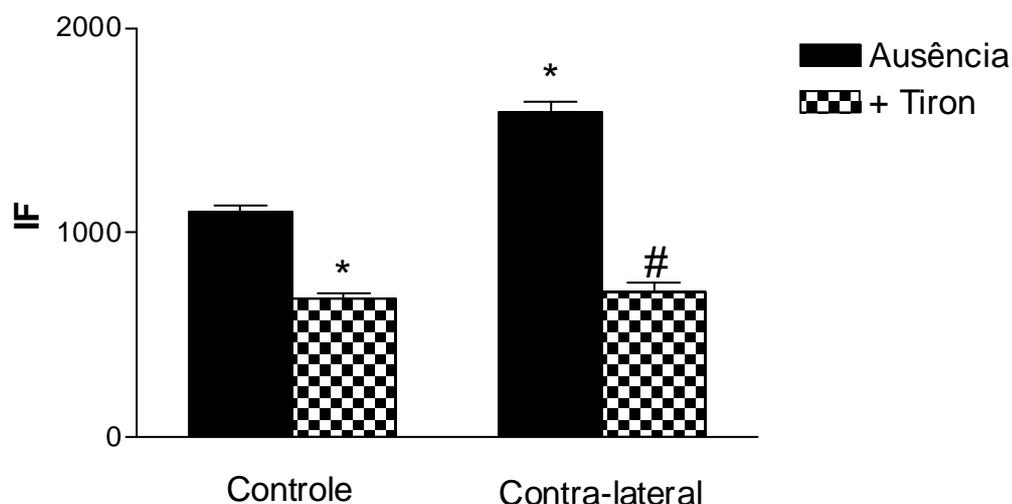
| Parâmetro                          | Grupos            |                    |
|------------------------------------|-------------------|--------------------|
|                                    | Controle          | Contra-lateral     |
| Intensidade de Fluorescência (DHE) | 1100,8 $\pm$ 34,6 | 1588,4 $\pm$ 49,2* |

#### 4.22 - Conseqüências da lesão por catéter-balão na produção de ânion $O_2^-$

Para verificar se a lesão por catéter-balão altera a produção de ânion  $O_2^-$  na artéria contra-lateral, foram feitas análises quantitativas de EROS por citometria de fluxo, em células endoteliais removidas de carótidas controle e contra-laterais, marcadas pela sonda fluorescente não-seletiva para EROS dihidroetidina (DHE), em presença do scavenger de ânion  $O_2^-$  tiron (ácido 4,5-dihidroxi-3-benzenodissulfônico dissódico monohidratado,  $10^{-3}$  mol/L), pré-incubado 20 minutos antes da leitura .

Os resultados obtidos a partir desse protocolo mostram que, em presença de tiron, houve uma redução significativa da intensidade de fluorescência emitida pelas células endoteliais de artérias controle (figura 40, tabela 4.29), sugerindo a presença de uma quantidade basal de ânion  $O_2^-$  nessas células.

Em células endoteliais provenientes de artérias contra-laterais, a adição de tiron reduziu significativamente a intensidade de fluorescência emitida, revertendo o aumento de fluorescência, detectado em ausência do scavenger, para próximo dos níveis do grupo controle em presença do scavenger (figura 40, tabela 4.29). Esses dados sugerem que a lesão por catéter-balão aumenta a produção de ânion  $O_2^-$  em células endoteliais da artéria contra-lateral.



**Figura 40. Quantificação de ânion  $O_2^-$  em células endoteliais de artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão.** A figura representa os a intensidade de fluorescência (IF) emitida pelas células marcadas com DHE, em ausência e presença de tiron. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle sem tiron. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo contra-lateral sem tiron. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

**Tabela 4.29 - Quantificação de EROS em células endoteliais de artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão.** Os dados representam a média  $\pm$  EPM da intensidade de fluorescência emitida pelas células marcadas com DHE, em ausência e presença de tiron (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle sem tiron. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo contra-lateral sem tiron. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

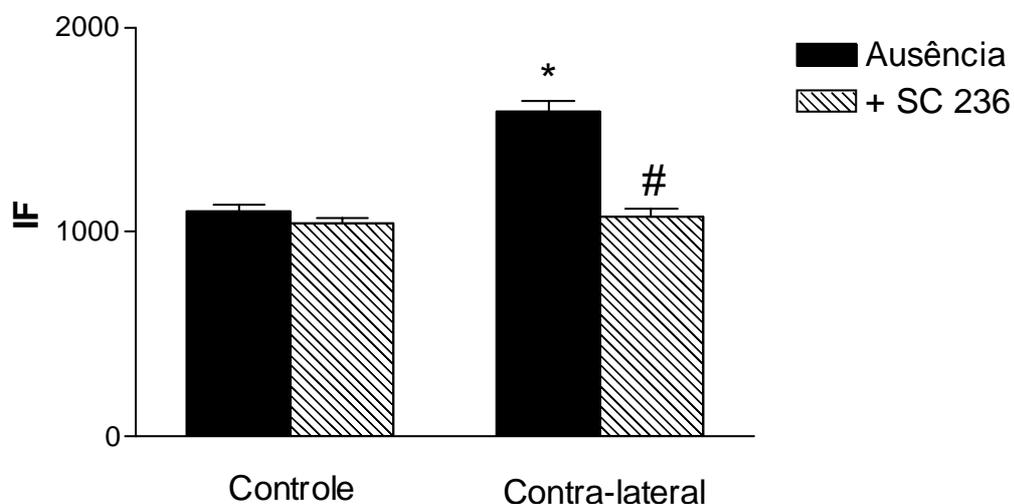
| Grupos         | S/ Tiron           | C/ Tiron          |
|----------------|--------------------|-------------------|
| Controle       | 1100,8 $\pm$ 34,6  | 679,8 $\pm$ 24,2* |
| Contra-lateral | 1588,4 $\pm$ 49,2* | 713,0 $\pm$ 42,4# |

#### 4.23 - Participação da COX-2 na produção de EROS

Para determinar a participação da COX-2 na produção de EROS na artéria contra-lateral, foram feitas análises quantitativas de EROS por citometria de fluxo, em células endoteliais removidas de carótidas controle e contra-laterais, marcadas pela sonda fluorescente não-seletiva para EROS dihidroetidina (DHE), em presença do inibidor seletivo de COX-2 SC 236 ( $10^{-10}$  mol/L), pré-incubado 30 minutos antes da leitura.

Os resultados obtidos a partir desse protocolo mostram que, em presença de SC 236, não houve alteração na intensidade de fluorescência emitida pelas células endoteliais de artérias controle (figura 41, tabela 4.30), excluindo a participação da COX-2 na produção de EROS nessas células.

Em células endoteliais provenientes de artérias contra-laterais, a adição de SC 236 reduziu significativamente a intensidade de fluorescência emitida, revertendo o aumento de fluorescência, detectado em ausência do inibidor, para próximo dos níveis do grupo controle em ausência do inibidor (figura 41, tabela 4.30). Esses dados sugerem que a COX-2 participa da produção de EROS em células endoteliais da artéria contra-lateral, que se encontra aumentada em relação à artéria controle.



**Figura 41. Quantificação de EROS em células endoteliais de artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão.** A figura representa os a intensidade de fluorescência (IF) emitida pelas células marcadas com DHE, em ausência e presença de SC 236. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle sem SC 236. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo contra-lateral sem SC 236. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

**Tabela 4.30 - Quantificação de EROS em células endoteliais de artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão.** Os dados representam a média  $\pm$  EPM da intensidade de fluorescência emitida pelas células marcadas com DHE, em ausência e presença de SC 236 (n = 5). \* indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo controle sem SC 236. # indica diferença significativa (P<0,001) em relação ao grupo contra-lateral sem 236. ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

| Grupos         | S/ SC 236          | C/ SC 236          |
|----------------|--------------------|--------------------|
| Controle       | 1100,8 $\pm$ 34,6  | 1041,2 $\pm$ 29,6  |
| Contra-lateral | 1588,4 $\pm$ 49,2* | 1076,8 $\pm$ 34,8# |

***Conclusões Parciais***

- ✓ A lesão por catéter-balão estabelece um estresse oxidativo em carótida contralateral, com aumento na produção de ânion  $O_2^-$ .
  
- ✓ O ânion  $O_2^-$  produzido na artéria contralateral é derivado da COX-2.

## ***5 - Discussão***

O presente trabalho teve por objetivo central estudar as conseqüências da lesão por catéter-balão sobre o relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão. Os parâmetros farmacológicos analisados para atingir esse objetivo foram os valores de  $E_{max}$  e de  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ) do agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico Phe obtidos por regressão não-linear das curvas concentração-efeito cumulativas realizadas para o agonista. O parâmetro de  $E_{max}$  foi utilizado para analisar as variações do efeito máximo induzido pela Phe sobre as preparações de carótida, enquanto que o parâmetro de  $pD_2$  foi utilizado para avaliar as variações na potência da Phe sobre essas preparações.

O modelo de lesão por catéter-balão em carótida de rato tem sido muito estudado para se compreender o processo de estenose por formação da camada neointima, em analogia ao processo de re-estenose clínica, uma importante limitação ao uso do balão-cateterismo, que pode ocorrer após a lesão vascular induzida pelo catéter-balão (FERNS et al., 1992; FAXON et al., 1997).

Vários modelos experimentais, nos quais a proliferação de células do músculo liso é estimulada, têm sido desenvolvidos para estudar doenças que envolvem a replicação celular excessiva. Dentre eles, o modelo experimental de angioplastia por catéter-balão em carótida de rato tem sido muito utilizado para estudar o processo de formação da camada neointima (CLOWES et al., 1983; SCHWARTZ et al., 1985; SCHWARTZ et al., 1995) e compreender as disfunções vasculares originárias da formação dessa camada, que envolve a proliferação de células musculares lisas (CLOWES et al., 1983).

No modelo de lesão vascular por catéter-balão, há desnudação endotelial e distensão da parede do vaso através da ação mecânica de um catéter contendo um balão inflável na extremidade (CLOWES et al., 1983). Considerando que o endotélio regula o tônus vascular, vários pesquisadores passaram a estudar as funções contrátil e relaxante após a desnudação endotelial do vaso durante o balão-cateterismo. Nesse contexto, ANTONACCIO et al. (1994)

encontraram, num modelo de angioplastia por catéter-balão em carótida de rato, uma significativa redução na amplitude das contrações máximas induzidas por diversos agentes vasoconstrictores, duas semanas após a lesão, quando comparadas às respostas aos mesmos agentes na artéria carótida contra-lateral à lesão, utilizada como controle.

Entretanto, MILNER et al. (1997) demonstraram a ocorrência de uma resposta neurocompensatória à lesão por catéter-balão em carótida contra-lateral, caracterizada por aumento transitório na densidade de nervos contendo neuropeptídeos sensoriais pró-inflamatórios nesse leito, não observado em artérias de animais controle intactos. Esses dados passam a sugerir que a lesão por catéter-balão promove alterações significativas na artéria contra-lateral, o que poderia comprometer seu uso como parâmetro controle das artérias ipsilaterais.

Com base nessas considerações, ACCORSI-MENDONÇA et al. (2004) encontraram um aumento na contração máxima induzida por Phe em carótida contra-lateral, quatro e sete dias após a lesão, em relação a artérias de animais controle intactos, que parece envolver a participação do endotélio e de prostanóides derivados da COX-2. Corroborando com os resultados obtidos por ACCORSI-MENDONÇA et al. (2004), OLIVON (2006) também encontrou um aumento na contração máxima induzida por Phe em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão em rato, quatro dias após a lesão, em relação a artérias de animais controle intactos, envolvendo a participação do endotélio e de prostanóides derivados da COX-2 nessa resposta. Em paralelo, OLIVON (2006) também encontrou redução na biodisponibilidade de NO, aumento na produção de ânion  $O_2^-$ , redução na marcação de estresse oxidativo por inativação de NO, e redução na expressão de eNOS em carótida contra-lateral, quatro dias após a lesão, sugerindo a participação do ânion  $O_2^-$  no comprometimento da formação de NO endotelial desse leito, o que poderia estar contribuindo com o aumento da resposta contrátil à Phe observado.

O tônus vascular é a resultante do equilíbrio entre mecanismos de contração e relaxamento musculares, que se contrapõem e se modulam simultaneamente. Alterações nesses mecanismos refletem-se sobre o tônus vascular como alterações de reatividade. Phe induz à vasoconstrição por ativar receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, que exercem papéis extremamente importantes em vários processos fisiológicos, incluindo a contração da musculatura lisa (JAHNICHEN et al., 2004). Contudo, crescentes evidências sugerem a existência de  $\alpha_1$ -adrenoceptores de relaxamento em diferentes artérias, como as artérias braquial e pulmonar isoladas de coelho e rato, respectivamente (ZSCHAUER et al., 1997; BOER et al., 1999), que parecem representar um mecanismo de controle local para a modulação, ao menos parcial, das respostas vasoconstrictoras a aminas simpatomiméticas (FUJIMOTO & ITOH, 1997; FILIPPI et al., 2001).

FILIPPI et al. (2001) demonstraram que Phe produz um efeito relaxante em leito mesentérico de rato, numa faixa de concentrações menor que a necessária para produzir contração, que parece ser endotélio-dependente, e mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores e NO. De ANDRADE et al. (2006) também conseguiram demonstrar um relaxamento endotélio-dependente induzido por Phe em carótida de rato, mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores e por NO derivado de eNOS, sem a participação de prostanóides. Esses achados sugerem que o relaxamento induzido por Phe seja mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores endoteliais.

De fato, VINCI et al. (2007) conseguiram demonstrar a presença de  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em cultura de células endoteliais de veia umbilical humana, o que reforça a hipótese de que o relaxamento induzido por Phe em alguns leitos vasculares seja mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores endoteliais.

O relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores está prejudicado em carótida de rato hiperhomocisteinêmico, devido à redução na biodisponibilidade local de NO como resultado do estresse oxidativo estabelecido no modelo de hiperhomocisteinemia (De ANDRADE et al.,

2006). Paralelamente, há um aumento na resposta de contração induzida por Phe em carótida de rato hiperhomocisteinêmico, sugerindo que o vasorelaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores parece ser um importante modulador negativo sobre a vasoconstrição adrenérgica (De ANDRADE et al., 2006).

Esses achados permitiram construir a hipótese de que o relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão por catéter-balão, esteja alterado, em função do estresse oxidativo estabelecido nesse modelo, o que poderia estar contribuindo com o aumento da resposta contrátil à Phe observada nesse leito, durante esse período.

No presente estudo, foi encontrado um aumento significativo na amplitude da contração máxima induzida por Phe em carótida contra-lateral de rato, em presença de endotélio, quatro dias após a lesão por catéter-balão, em relação a artérias de animais controle intactos, sem alteração significativa no parâmetro de  $pD_2$  para o agonista, corroborando com os resultados obtidos por ACCORSI-MENONÇA et al. (2004) e OLIVON (2006). Paralelamente, a contração máxima induzida por Phe na artéria ipsilateral, desprovida de endotélio, está significativamente reduzida em relação a artérias controle, quatro dias após a lesão, sem alteração de  $pD_2$ , também em concordância com os resultados de ACCORSI-MENONÇA et al. (2004) e OLIVON (2006). Esses achados sugerem que a lesão por catéter-balão induz a alterações funcionais compensatórias na artéria contra-lateral à lesão, comprometendo seu uso como parâmetro controle das respostas observadas na artéria ipsilateral.

A remoção do endotélio da artéria contra-lateral normalizou a contração induzida por Phe, em concordância com os achados de OLIVON (2006), sugerindo a participação do endotélio nessa alteração de reatividade. Em carótida de animal controle, a remoção endotelial induz ao aumento da contração máxima induzida por Phe, sugerindo o papel modulador

negativo do endotélio sobre a vasoconstricção adrenérgica, como proposto por HYNES et al. (1988) e GREENBERG et al. (1989). Entretanto, em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão, a remoção endotelial reduziu a amplitude da contração máxima induzida pela Phe, aumentada em presença de endotélio, sugerindo uma inversão do papel do endotélio como modulador da contração adrenérgica nesse leito, onde parece atuar como modulador positivo da hiperreatividade contrátil à Phe. Esses achados sugerem que as alterações funcionais observadas em artéria contra-lateral sejam subjacentes a problemas no endotélio desse leito.

Tem sido descrito que curvas concentração-efeito para o agente despolarizante KCl avaliam a função contrátil da musculatura lisa vascular (BRIZZOLARA et al., 1994; ENGLISH et al., 2000). Com a finalidade de verificar se a lesão por catéter-balão altera a função contrátil da artéria contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para o KCl em carótidas controle e contra-laterais, em presença de endotélio, quatro dias após a lesão. Os resultados obtidos mostram que não há diferença estatisticamente significativa nos parâmetros de contração máxima e potência do agente despolarizante entre artérias controle e contra-laterais, sugerindo que a integridade da maquinaria contrátil da artéria contra-lateral está preservada após a lesão. Esses achados ainda sugerem que o aumento da resposta contrátil à Phe em artéria contra-lateral não decorre de alterações na capacidade contrátil dessa artéria, mas parecem ser agonista- e receptor-específicas.

A integridade endotelial da artéria contra-lateral à lesão foi funcionalmente analisada pela construção de curvas concentração-efeito cumulativas para a ACh, que produz um vasorelaxamento endotélio-dependente pela ativação de receptores muscarínicos do tipo 3 ( $M_3$ ) presentes nas células endoteliais (MONCADA & HIGGS, 1995). Os resultados obtidos sugerem que a integridade endotelial na artéria contra-lateral está preservada, pois o perfil de relaxamento induzido por ACh foi semelhante em artérias controle e contra-laterais à lesão

por catéter-balão, em presença de endotélio, sem alterações significativas nos parâmetros de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para o agonista.

Para verificar se a lesão por catéter-balão altera morfológicamente a integridade muscular e endotelial em artérias ipsilaterais e contra-laterais à lesão, procedeu-se com análise morfológica dessas artérias, pelo método coloração de rotina HE (hematoxilina/eosina). Os resultados obtidos sugerem que a lesão por catéter-balão não altera a integridade morfológica muscular e endotelial da artéria contra-lateral, pois não foram observadas diferenças para com os tecidos de artérias controle. Em paralelo, a análise morfométrica não revelou diferença significativa entre as camadas íntima, média e adventícia das artérias carótidas controle e contra-lateral, excluindo a hipótese de que as alterações de reatividade na artéria contra-lateral à lesão por catéter-balão, observadas quatro dias após a lesão, sejam decorrentes de alterações morfométricas nos tecidos vasculares. Esses dados corroboram com os achados relativos à reatividade da artéria contra-lateral ao KCl e à ACh, confirmando a manutenção da integridade muscular e endotelial nesse leito. Já na artéria lesada, a passagem do catéter-balão levou à remoção endotelial, mantendo a artéria desprovida de endotélio até o quarto dia após a lesão, sem formação da camada neoíntima e alterações na camada média.

O presente estudo teve como hipótese central o prejuízo do relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão, quatro dias após a lesão.

A resposta de relaxamento induzido por Phe em carótida de rato foi produzida sobre a pré-contração com o agente constritor não-adrenérgico  $PGF_{2\alpha}$ , para não interferir com a ativação de receptores adrenérgicos, potencialmente ativados pelo agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico Phe. Antes da pré-contração, as preparações foram incubadas com o antagonista  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico WB 4101 (De OLIVEIRA et al., 1998), para excluir a participação desses receptores na resposta desencadeada pela Phe. Esse procedimento foi necessário porque, em

carótida de rato, ocorre uma população de receptores  $\alpha_{1A}$ - e  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos musculares funcionais, mediadores da contração adrenérgica (De OLIVEIRA et al., 1998), de maneira que, durante a estimulação da preparação com Phe, os receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos seriam ativados pelo agonista, o que poderia desencadear uma contração detectável e mascarar ou dificultar a detecção do efeito relaxante da Phe. Além disso, a faixa de concentrações da Phe, utilizada para produzir relaxamento ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L), foi muito menor que a necessária para produzir contração ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L), o que evita a produção de respostas de contração mensuráveis.

Os resultados relativos à resposta de relaxamento adrenérgico, encontrados no presente trabalho, confirmam a hipótese central do projeto: a lesão por catéter-balão aboliu completamente a resposta de relaxamento induzida por Phe em carótida contra-lateral de rato, em presença de endotélio, quatro dias após a lesão, tempo em que também foi observado um aumento na contração máxima induzida por Phe na artéria contra-lateral com endotélio, em relação a artérias controle. Esse achado permite inferir que a abolição da resposta de relaxamento adrenérgico esteja contribuindo com o aumento da contração adrenérgica observada em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão, quatro dias após a lesão, considerando que o relaxamento induzido por Phe representa um mecanismo de controle local envolvido na modulação das respostas vasoconstrictoras de amina simpatomiméticas (FILIPPI et al., 2001). As alterações de reatividade na artéria contra-lateral permitem sugerir que a lesão por catéter-balão deflagra mecanismos compensatórios nesse leito, em concordância com as idéias de neurocompensação propostas por MILNER et al. (1997).

A abolição do relaxamento adrenérgico na artéria contra-lateral com endotélio, quatro dias após a lesão por catéter-balão, poderia ser decorrente de alterações na integridade da função de relaxamento dessa artéria, ou nos mecanismos celulares e moleculares mediadores dessa resposta, induzidas pela lesão vascular. A integridade da função de

relaxamento de uma preparação vascular pode ser verificada por meio de curvas concentração-efeito cumulativas para doadores de NO, que produzem um relaxamento endotélio-independente, e portanto, dependem apenas da integridade dos mecanismos de relaxamento da musculatura lisa vascular (WANSTALL et al., 2000). Diante dessas considerações, a integridade da função de relaxamento da artéria contra-lateral foi verificada por meio de curvas concentração-efeito cumulativas para o doador de NO NPS, em presença de endotélio. Os resultados obtidos sugerem que a integridade da função de relaxamento da artéria contra-lateral com endotélio está preservada, quatro dias após a lesão por catéter-balão, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para o doador. Esse achado sugere que os mecanismos subjacentes à abolição do relaxamento adrenérgico em carótida contra-lateral, quatro dias após a lesão por catéter-balão, sejam decorrentes de alterações receptor- e agonista-específicas, nos mediadores celulares dessa resposta.

Com a finalidade de verificar se a lesão por catéter-balão altera a resposta de relaxamento induzida por Phe em outros leitos que não a artéria contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas de relaxamento para Phe em aorta de animais operados. Os resultados obtidos a partir desses protocolos mostram que a lesão por catéter-balão não altera o relaxamento induzido por Phe em aorta, o que exclui a hipótese de que essas alterações funcionais envolvam a participação de fatores humorais, mas sugere que elas sejam leito-dependentes, reforçando a hipótese da ocorrência de um processo neurocompensatório na artéria contra-lateral à lesão, anteriormente proposto por MILNER et al. (1997). Esses achados corroboram com os resultados obtidos por ACCORSI-MENDONÇA et al. (2004), que não encontraram alteração na contração induzida por Phe em aorta de ratos submetidos à lesão por catéter-balão, quatro dias após a lesão.

Para determinar o tipo de receptor responsável por mediar a resposta de relaxamento induzida por Phe em carótida de rato, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe em presença de antagonistas seletivos para os receptores adrenérgicos. Os resultados obtidos mostram que o relaxamento induzido por Phe em carótida de rato controle é mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores, uma vez que os antagonistas seletivos para os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, prazosin, e  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos, BMY 7378, aboliram essa resposta.

Tem sido descrito que os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos mediam o vasorelaxamento adrenérgico em algumas preparações, via fatores relaxantes derivados do endotélio (COCKS & ANGUS, 1983; VANHOUTTE, 2001). Para excluir a hipótese da participação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos como mediadores do relaxamento induzido por Phe em carótida de rato, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe em presença do antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico ioimbina. Os resultados obtidos nesses experimentos mostram que o relaxamento induzido por Phe não foi alterado, quanto aos parâmetros de  $E_{max}$  e  $pD_2$  do agonista, em relação à ausência do antagonista, sugerindo que os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos não participam dessa resposta.

Tem sido descrito que os receptores  $\beta$ -adrenérgicos mediam o vasorelaxamento adrenérgico em algumas preparações, via produção de NO (VINCI et al., 2007). Para excluir a hipótese da participação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos como mediadores do relaxamento induzido por Phe em carótida de rato, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe em presença do antagonista  $\beta$ -adrenérgico não-seletivo propranolol. Os resultados obtidos nesses experimentos mostram que o relaxamento induzido por Phe não foi alterado, quanto aos parâmetros de  $E_{max}$  e  $pD_2$  do agonista, em relação à ausência do antagonista, sugerindo que os receptores  $\beta$ -adrenérgicos não participam dessa resposta.

Os resultados referentes à caracterização de receptores mediadores do relaxamento induzido por Phe em carótida de rato confirmam a seletividade do agonista em receptores  $\alpha_1$ -

adrenérgicos, que poderia ser perdida diante de elevadas concentrações da droga (KENAKIN, 1997), fator descartado, uma vez que os protocolos de relaxamento com Phe foram conduzidos com baixas concentrações do agonista.

Em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão, quatro dias após a lesão, a resposta de relaxamento induzido por Phe está abolida, e por isso, seria teoricamente desnecessária a caracterização dos receptores mediadores dessa resposta, inexistente nesse leito. Entretanto, não se pode ignorar que a lesão por catéter-balão produz alterações funcionais na artéria contra-lateral. Essas alterações podem estar incluindo alterações na ativação de receptores pela Phe, que por sua vez, poderiam participar da abolição da resposta de relaxamento adrenérgico na artéria contra-lateral. Essa hipótese justifica a caracterização de receptores mediadores da resposta de relaxamento adrenérgico na artéria contra-lateral com endotélio, pela construção de curvas concentração-efeito cumulativas para Phe em presença de antagonistas seletivos para os receptores adrenérgicos. Os resultados obtidos com esses experimentos mostram que a resposta de relaxamento adrenérgico manteve-se abolida na artéria contra-lateral, em presença de qualquer um dos antagonistas adrenérgicos, excluindo a participação desses receptores nessa alteração de reatividade.

Tem sido descrito que o vasorelaxamento induzido por Phe e mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores é endotélio-dependente (FILIPPI et al., 2001; De ANDRADE et al., 2006). Para verificar a participação do endotélio vascular na resposta de relaxamento induzido por Phe em carótida de rato controle, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe em ausência de endotélio. Os resultados obtidos a partir desse experimento mostram que o relaxamento adrenérgico em carótida de rato está abolido em ausência de endotélio, sugerindo que essa resposta é completamente endotélio-dependente, corroborando com os resultados de De ANDRADE et al. (2006).

Estudos prévios mostram que o endotélio participa da hiperreatividade contrátil à Phe em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão (de ACCORSI-MENONÇA et al., 2004; OLIVON, 2006). Nesse estudo, observou-se que a resposta de relaxamento adrenérgico é endotélio-dependente e está abolida em carótida contra-lateral em presença de endotélio, o que sugere que a lesão por catéter-balão altera os fatores endoteliais responsáveis por essa resposta no leito contra-lateral. Para verificar a participação do endotélio na abolição da resposta de relaxamento induzida por Phe em carótida contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe, em ausência de endotélio. Os resultados obtidos a partir desse experimento excluem a participação do endotélio nessa alteração de reatividade, uma vez que a resposta de relaxamento adrenérgico se manteve abolida em ausência de endotélio na artéria contra-lateral.

As células endoteliais e musculares lisas vasculares comunicam-se entre si por meio de junções celulares mio-endoteliais do tipo GAP (GUPTA et al., 2008). Por essas junções, podem passar alguns mediadores celulares do músculo para o endotélio, e vice-versa, como cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) entre outros (GUPTA et al., 2008). Sabe-se que a Phe ativa a mobilização de  $\text{Ca}^{++}$  no interior de células musculares lisas, por induzir a formação de  $\text{IP}_3$  (JAHNICHEN et al., 2004), o que permite construir a hipótese de que a Phe, na faixa de concentrações utilizada para produzir o relaxamento ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L), estaria induzindo à formação de  $\text{IP}_3$  e ao aumento de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular no músculo, insuficiente para produzir uma contração mensurável, mas suficiente para produzir uma corrente de  $\text{IP}_3$  ou  $\text{Ca}^{++}$ , que passaria do músculo para o endotélio, induzindo ao aumento de  $\text{Ca}^{++}$  nas células endoteliais e à conseqüente formação do fator relaxante NO, que produziria o relaxamento mensurável. Para verificar a hipótese da participação de GAP-junctions no relaxamento induzido por Phe em carótida de rato, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas de relaxamento para Phe em artérias controle e contra-laterais, em presença do bloqueador de GAP-junctions

ácido  $\beta$ -glicirretínico ( $\beta$ -GA). Os resultados referentes a esses experimentos mostram que o bloqueio de GAP-junctions não alterou a resposta à Phe nas artérias controle e contra-laterais, excluindo a participação dessas junções no relaxamento adrenérgico em artéria controle, e na abolição dessa resposta em artéria contra-lateral.

Um dos principais mediadores celulares do vasorelaxamento endotélio-dependente induzido por vários agonistas corresponde ao óxido nítrico (NO) (PALMER et al., 1987; IGNARRO et al., 1987), anteriormente descrito como fator relaxante derivado do endotélio (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). A biossíntese do NO ocorre a partir do aminoácido L-arginina, por reações enzimáticas catalisadas por uma das três isoformas de NO sintases (NOS) (DAWSON & SNYDER, 1994): as NOS endoteliais (*e*NOS), as NOS neuronais (*n*NOS) ou as NOS induzidas (*i*NOS) (GARCIA & STEIN, 2006). As *e*NOS, originalmente isoladas de células endoteliais de aorta bovina (POLLOCK et al., 1991), são isoformas constitutivamente expressas em baixos níveis nas células endoteliais, ativadas rapidamente por um aumento no cálcio citoplasmático em presença da proteína calmodulina (GARCIA & STEIN, 2006). As *n*NOS, originalmente isoladas do cérebro (BREDT & SNYDER, 1990), são encontradas constitutivamente em várias células, incluindo células endoteliais e neurônios (GRIFFITH & STUEHR, 1995), também rapidamente ativadas pelo aumento dos níveis de cálcio citoplasmático em presença de calmodulina (GARCIA & STEIN, 2006). Já as *i*NOS, expressas em várias células após horas de exposição a citocinas e/ou produtos microbianos (HIBBS et al., 1987; STUEHR & MARLETTA, 1987) e isoladas de macrófagos (HEVEL et al., 1991), são isoformas com expressão induzida pela ativação de macrófagos por citocinas (interferon gama, fator de necrose tumoral alfa) ou outros agentes, independente da elevação de cálcio citoplasmático para sua ativação (GARCIA & STEIN, 2006).

A participação do NO como mediador celular de uma resposta funcional a um dado agonista, numa determinada preparação, pode ser verificada por meio da inibição, seletiva ou

não, das NOS responsáveis pela produção do gás nesse sistema biológico. FILIPPI et al. (2001) demonstraram que o efeito relaxante induzido por Phe em leito mesentérico de rato é mediado por NO, uma vez que a inibição não-seletiva de NOS aboliu essa resposta. De maneira semelhante, De ANDRADE (2005) observaram que o relaxamento induzido por Phe em carótida de rato Wistar também é mediada por NO, derivado de *e*NOS, uma vez que a inibição seletiva dessa isoforma aboliu completamente essa resposta.

Para verificar a participação do NO no relaxamento induzido por Phe em carótida de rato, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe em presença do inibidor não-seletivo de NOS L-NAME. Os resultados obtidos a partir desses experimentos mostram que a resposta de relaxamento induzida por Phe é mediada por NO, uma vez que a inibição não-seletiva da NOS aboliu completamente essa resposta, corroborando com os dados obtidos por De ANDRADE et al. (2006).

Para determinar o tipo de isoforma de NOS responsável pela produção de NO durante o relaxamento induzido por Phe em carótida de rato, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe em presença de inibidores seletivos de *e*NOS (L-NNA), *n*NOS (7-NI) e *i*NOS (1400W). Os resultados obtidos a partir desses experimentos mostram que a isoforma responsável pela produção de NO durante o relaxamento induzido por Phe é a *e*NOS, uma vez que apenas a inibição seletiva dessa isoforma aboliu completamente essa resposta, corroborando com os dados obtidos por De ANDRADE (2005).

Os experimentos anteriormente descritos revelaram que o mediador celular do relaxamento induzido por Phe em carótida de rato é o NO, e que essa resposta está abolida na artéria contra-lateral, sugerindo um comprometimento na biodisponibilidade de NO nesse leito. De fato, estudos prévios em nosso laboratório mostraram que a lesão por catéter-balão reduz a biodisponibilidade de NO na artéria contra-lateral, quatro dias após a lesão (OLIVON, 2006). Entretanto, a função do NO poderia estar alterada pela lesão por catéter-balão, na

artéria contra-lateral. Para verificar a participação do NO no relaxamento induzido por Phe em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe em presença de inibidores seletivos e não-seletivos de NOS. A inibição não-seletiva, bem como a inibição seletiva das isoformas de NOS, não alterou a resposta à Phe em carótida contra-lateral, que se manteve abolida em presença dos inibidores, sugerindo um comprometimento na biodisponibilidade de NO nesse leito. Esses dados corroboram com os achados obtidos por OLIVON (2006), relativos à redução da biodisponibilidade de NO na artéria contra-lateral.

O NO é um gás diatômico não-carregado, com uma meia-vida de alguns segundos em baixas concentrações nos tecidos (THOMAS et al., 2001), que se difunde através da bicamada lipídica das células endotélias para as células musculares adjacentes, onde se complexa com e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, que converte trifosfato de guanosina (GTP) em GMP'c, responsável por ativar proteínas quinases GMP'c-dependentes, canais iônicos GMP'c-regulados e/ou várias famílias de fosfodiesterases (CARY et al., 2006). A ativação da via de sinalização NO/GMP'c é responsável pelo relaxamento da musculatura lisa vascular (GARCIA & STEIN, 2006).

Para verificar a participação do GMP'c como mediador intracelular do mecanismo de relaxamento induzido por Phe em carótida de rato, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas de relaxamento para Phe em presença do inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel ODQ. O ODQ, ao inibir a guanilato ciclase solúvel, impede a conversão de GTP em GMP'c, inibindo os efeitos celulares mediados pelo nucleotídeo. Os resultados obtidos a partir desses protocolos mostram que o relaxamento induzido por Phe em carótida de rato controle foi completamente abolida em presença de ODQ, sugerindo a participação do GMP'c como mediador dessa resposta.

Para verificar a participação do GMP'c na abolição da resposta de relaxamento induzido por Phe em carótida contra-lateral, os protocolos com ODQ foram reproduzidos em carótida contra-lateral. Os resultados referentes a esses experimentos mostram que, em presença de ODQ, a resposta de relaxamento adrenérgico continua abolida, excluindo a participação do GMP'c nessa alteração funcional.

O relaxamento da musculatura lisa vascular também pode apresentar como mediador celular o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), que atua independentemente da via NO-GMP'c, ativando canais para  $K^+$ , com conseqüente hiperpolarização das células musculares lisas vasculares, e inibindo canais para  $Ca^{++}$  voltagem-dependentes, o que leva ao relaxamento (FÉLÉTOU & VanHOUTTE, 2001).

Além do EDHF, algumas formas do NO também podem ativar canais para  $K^+$ , hiperpolarizando a musculatura lisa vascular e levando ao relaxamento. A forma de radical livre do NO ( $NO^\bullet$ ), formado por oxidação do NO catalisada pela superóxido dismutase, ativa diretamente canais para  $K^+$  (BOLOTINA et al., 1994). O ânion nitroxil ( $NO^-$ ), formado pela redução do NO, ativa canais para  $K^+$  voltagem-dependentes (COSTA et al., 2003). Diante dessas considerações, é importante verificar a participação de canais para  $K^+$  no relaxamento induzido por Phe em carótida de rato. Para tanto, os protocolos de relaxamento adrenérgico foram conduzidos em presença do bloqueador não seletivo para canais para  $K^+$  TEA. Os resultados obtidos a partir desses protocolos mostram que o relaxamento induzido por Phe em carótida de rato controle não é alterado em presença de TEA, excluindo a participação de canais para  $K^+$  nessa resposta.

Para verificar a participação dos canais para  $K^+$  na abolição do relaxamento adrenérgico em carótida contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas de relaxamento para Phe em presença de TEA, em artérias contra-laterais. Os resultados desses experimentos mostram que a adição de TEA não alterou a resposta à Phe em

carótida contra-lateral, que já se encontrava abolida, excluindo a participação de canais para  $K^+$  nessa alteração de reatividade.

O endotélio vascular libera diversos fatores vasoativos, além do NO, incluindo prostaciclina ( $PGI_2$ ) (MONCADA et al., 1976), prostanóides derivados da atividade de COXs, com efeito vasodilatador (MITCHELL et al., 2008). A COX ocorre em duas isoformas nos tecidos biológicos: COX-1, de expressão constitutiva em células endoteliais sadias, e COX-2, de expressão induzida em condições inflamatórias e/ou por moléculas associadas a patógenos (MITCHELL & WARNER, 2006). A síntese de  $PGI_2$  inicia-se com a liberação de ácido araquidônico por ação enzimática da fosfolipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ) sobre lipídios de membrana (MITCHELL & WARNER, 1999), cuja ativação é cálcio-dependente (MITCHELL & WARNER, 2006). Uma vez liberado, o ácido araquidônico é oxidado à prostaglandina  $G_2$  ( $PGG_2$ ), posteriormente peroxidada à prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ) por ação de ciclooxigenases (MITCHELL et al., 2008).  $PGH_2$  é o substrato para ação da prostaciclina sintetase (PGIS), que forma  $PGI_2$  (MITCHELL et al., 2008). Células endoteliais são ricas em COX-1 e PGIS, razão pela qual quando a  $PLA_2$  é ativada, as  $PGI_2$  são os metabólitos predominantes (MITCHELL et al., 2008).

FILIPPI et al. (2001) demonstraram que o efeito relaxante induzido por Phe em leito mesentérico de rato envolve a mobilização de cálcio de reservas intracelulares sensível ao  $IP_3$ , sugerindo um aumento de cálcio citoplasmático nas células endoteliais durante a estimulação com Phe. Como a ativação de  $PLA_2$  é cálcio-dependente (MITCHELL & WARNER, 2006), poderia estar ocorrendo a produção de  $PGI_2$  durante o relaxamento induzido por Phe em carótida de rato. Para verificar a hipótese da participação de prostanóides no relaxamento induzido por Phe em carótida de rato, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe em presença do inibidor não-seletivo de COX indometacina, bem como em presença dos inibidores seletivos de COX-1 (SC560) e COX-2 (SC236). Os resultados

obtidos a partir desse experimento mostram que a resposta de relaxamento induzida por Phe em carótida de rato não foi alterada pela inibição seletiva e não-seletiva de COX, sugerindo a não participação de prostanóides nessa resposta. Esses dados corroboram com os achados de FILIPPI et al. (2001), que não encontraram a participação de prostanóides no efeito relaxante induzido por Phe em leito mesentérico de rato, e de De ANDRADE et al. (2006), que também não observaram a participação desses eicosanóides no relaxamento induzido por Phe em carótida de rato.

Além das PGI<sub>2</sub>, existem prostanóides com função vasoconstrictora, como tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (CHENG et al., 2002), que poderiam estar sendo liberados pelo endotélio da artéria contra-lateral, e assim, contribuindo com a abolição do relaxamento induzido por Phe nesse leito. De fato, a inibição seletiva da COX-2 normalizou a contração máxima induzida por Phe em carótida contra-lateral, quatro dias após a lesão por catéter-balão, sugerindo a participação dos produtos derivados das reações catalisadas por essa enzima na hiperreatividade contrátil à Phe, encontrada nesse leito (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2004; OLIVON, 2006). Com base nessas considerações, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe em carótida contra-lateral de rato, em presença de inibidores seletivos e não-seletivos de COX, para verificar a participação dos produtos das reações catalisadas por essas enzimas na abolição do relaxamento induzido por Phe nesse leito. Os resultados obtidos a partir desses experimentos mostram que a inibição seletiva da COX-2 normalizou o relaxamento induzido por Phe em carótida contra-lateral de rato, quatro dias após a lesão por catéter-balão, sugerindo a participação de prostanóides e/ou de outros produtos liberados durante as reações catalisadas pela COX-2 na abolição dessa resposta.

Em condições inflamatórias, como no modelo de lesão vascular por catéter-balão (ROSS, 1999), ocorre indução da expressão de COX-2 (FUJIMOTO et al., 2004). Evidências funcionais sugerem a participação de derivados da COX-2 na hiperreatividade contrátil à Phe

em carótida contra-lateral, quatro dias após a lesão por catéter-balão (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2004; OLIVON, 2006). Os resultados funcionais do presente trabalho também sugerem a participação de derivados da COX-2 na abolição do relaxamento adrenérgico em carótida contra-lateral à lesão, reforçando a hipótese da indução da expressão dessa isoforma no modelo de lesão vascular por catéter-balão.

KULKARMI & ARMESTEAD (2002) e XIA et al., (1998) sugerem que num processo inflamatório desencadeado por lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas, a isoforma COX-2 pode participar da formação de ânion  $O_2^-$ . De fato, OLIVON (2006) observou que o tratamento dos animais submetidos à lesão por catéter-balão, com celecoxib (inibidor seletivo de COX-2) reduziu significativamente a produção de ânion  $O_2^-$  na artéria contra-lateral, quatro dias após a lesão, reforçando a hipótese proposta por KULKARMI & ARMESTEAD (2002) e XIA et al., (1998).

O ânion  $O_2^-$  pode reduzir a biodisponibilidade de NO, seja por inativação do radical por reação direta (BECKMAN & KOPPENOL, 1996), seja por induzir ao desacoplamento de NOS, comprometendo a produção de NO (GORREN & MAYER, 2007). Em ambos os casos, uma redução na biodisponibilidade de NO, que atua como um fator vasorelaxante importante na modulação negativa dos processos de contração, poderia acarretar em abolição de respostas de relaxamento dependentes de NO, como o relaxamento induzido por Phe, bem como no aumento da contração adrenérgica. De fato, OLIVON (2006) demonstrou que a lesão por catéter-balão reduz a biodisponibilidade de NO na artéria contra-lateral por comprometer a formação de NO, paralelamente ao estabelecimento de estresse oxidativo nesse leito, com aumento de ânion  $O_2^-$  e redução na expressão de NOS. Esses dados permitem construir a hipótese de que o ânion  $O_2^-$  participe da abolição do relaxamento induzido por Phe em carótida contra-lateral.

Com base nessas considerações, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe em presença do seqüestrador seletivo para  $O_2^-$  tempol (Zheng et al., 2003), em artérias controle e contra-laterais à lesão, em presença de endotélio, para verificar a participação do ânion  $O_2^-$  no relaxamento induzido por Phe. Os resultados obtidos a partir desses experimentos mostram que a remoção de ânion  $O_2^-$  normalizou o relaxamento induzido por Phe em carótida contra-lateral, sugerindo a participação dessa espécie reativa na abolição do relaxamento adrenérgico nesse leito.

O tempol é um mimético da superóxido-dismutase (SOD), com atividade antioxidante devido à sua capacidade de dismutar moléculas de ânion  $O_2^-$  por reação direta com o radical ou com seu derivado  $\bullet OOH$  (CHEN et al., 2003). Em altas concentrações, o tempol reage com o radical  $\bullet OOH$ , produzindo  $H_2O_2$ , que apresenta atividade vasodilatadora (CHEN et al., 2003). A vasodilatação mediada por  $H_2O_2$  derivado da remoção de ânion  $O_2^-$  por tempol poderia mascarar o efeito antioxidante do tempol, por remoção de  $O_2^-$ , na normalização da resposta de relaxamento adrenérgico em artéria contra-lateral. Com base nessas considerações, é importante verificar a hipótese de formação de  $H_2O_2$  e sua participação na normalização do relaxamento adrenérgico em carótida contra-lateral. Para tanto, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas de relaxamento para Phe em carótida controle e contra-lateral, em presença de tempol associado com o scavenger de  $H_2O_2$  PEG-catalase. A catalase associada ao polietilenoglicol (PEG) é capaz de permear as membranas celulares e remover o  $H_2O_2$  intracelular (De ANDRADE et al., 2006). Os resultados obtidos a partir desses experimentos mostram que a associação do tempol à PEG-catalase não alterou o perfil de relaxamento induzido por Phe, nem em artérias controle ou em artérias contra-laterais, excluindo a participação do  $H_2O_2$  na normalização do relaxamento adrenérgico por remoção de ânion  $O_2^-$  em artéria contra-lateral. Esses dados ainda permitem inferir que, na concentração utilizada, o tempol não está induzindo à formação de  $H_2O_2$ , ou

que o  $H_2O_2$  formado pela remoção de  $O_2^-$  por tempol pode estar sendo efetivamente removido por ação das catalases endógenas das preparações.

Como o relaxamento mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores parece ser um mecanismo modulador negativo da contração adrenérgica, que se encontra aumentada em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão, é importante verificar se os mediadores que participam da abolição dessa resposta de relaxamento na artéria contra-lateral também estão envolvidos na hiperreatividade contrátil à Phe encontrada nesse leito. A participação dos mesmos mediadores nas alterações funcionais de contração e relaxamento induzidos por Phe em artéria contra-lateral reforçam a hipótese de que a contração adrenérgica está aumentada nesse leito como conseqüência da perda do mecanismo de relaxamento adrenérgico, como modulador negativo da contração adrenérgica.

Com base nessas considerações, foram conduzidos protocolos de contração induzida por Phe, em artéria contra-lateral, na presença de inibidores dos mediadores que participam da abolição da resposta de relaxamento adrenérgico nesse leito, a saber, dos produtos derivados da COX-2 e do ânion  $O_2^-$ .

Para verificar a participação de prostanóides derivados da COX-2 no aumento da contração máxima induzida por Phe em carótida contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas de contração para Phe em presença do inibidor seletivo de COX-2 SC236, em artéria contra-lateral. Os resultados obtidos a partir desses experimentos mostram uma normalização da contração induzida por Phe em carótida contra-lateral, na presença de SC236, corroborando com os resultados de OLIVON (2006) e ACCORSI-MENDONÇA et al. (2004), e sugerindo a participação de produtos derivados da COX-2 na hiperreatividade contrátil à Phe encontrada nesse leito.

Para verificar a participação do ânion no aumento da contração induzida por Phe em carótida contra-lateral, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas de

contração para Phe, em artérias controle e contra-laterais, em presença do scavenger de ânion  $O_2^-$  tempol, associado ou não à PEG-catalase. Os resultados obtidos a partir desses experimentos mostram que, em presença de tempol, a contração induzida por Phe em artéria contra-lateral foi normalizada, sugerindo a participação do ânion  $O_2^-$  na hiperreatividade contrátil à Phe encontrada nesse leito. Em presença de PEG-catalase associada ao tempol, a contração induzida por Phe, tanto em artérias controle, quanto em artérias contra-laterais, manteve o mesmo perfil observado em presença de tempol isolado, excluindo a participação de  $H_2O_2$  derivado da remoção de  $O_2^-$  por tempol nessas respostas.

No sistema vascular, a enzima oxidante NADPH oxidase de membrana, corresponde à principal fonte de ânion  $O_2^-$  (ZHENG et al., 2003). Para verificar a participação dos produtos derivados da atividade da NADPH oxidase no relaxamento induzido por Phe em carótida de rato, foram conduzidos protocolos de reatividade à Phe em presença do inibidor de NADPH oxidase apocinina. Os resultados obtidos a partir desses experimentos mostram que, em presença de apocinina, não houve alteração da resposta à Phe, tanto em artérias controle, quanto em artérias contra-laterais, excluindo a participação dos produtos da NADPH oxidase nessas respostas. Esses dados também permitem inferir que, na artéria contra-lateral, a fonte de ânion  $O_2^-$ , que participa da abolição do relaxamento adrenérgico nesse leito, não é a NADPH oxidase.

Os achados relativos à participação da COX-2 e de  $O_2^-$  na abolição da resposta de relaxamento induzido por Phe em carótida contra-lateral são um forte indício de que a fonte de ânion  $O_2^-$  nesse leito seja a COX-2.

Para verificar se a lesão por catéter-balão induz ao estresse oxidativo na artéria contra-lateral, com aumento na produção de EROS nesse leito, foram conduzidos protocolos de citometria de fluxo em células endoteliais de carótida controle e contra-lateral, marcadas com a sonda fluorescente para EROS DHE. Os resultados obtidos a partir desses

experimentos mostram um aumento na marcação para EROS em células endoteliais de carótidas contra-laterais em relação a artérias controle, sugerindo a ocorrência de estresse oxidativo no endotélio da artéria contra-lateral. Esses dados corroboram com os achados de OLIVON (2006).

Para determinar o tipo de ERO presente em artéria contra-lateral, os protocolos de citometria de fluxo com DHE foram conduzidos em presença do mimético de SOD tiron, que remove o ânion  $O_2^-$  por dismutação (De ANDRADE et al., 2006). Em células endoteliais de artérias controle, a adição de tiron reduziu a marcação para EROS, sugerindo a presença de ânion  $O_2^-$  em condições basais. Em células endoteliais de artérias contra-laterais, a adição de tiron reduziu a marcação para EROS ao nível do grupo controle, em presença do scavenger, sugerindo que a ERO presente no endotélio das artérias contra-laterais corresponde ao ânion  $O_2^-$ . Esses achados também corroboram com os resultados prévios, obtidos por OLIVON (2006).

Para verificar se a fonte de ânion  $O_2^-$  no endotélio da artéria contra-lateral é a COX-2, como sugerem as inferências funcionais obtidas, os protocolos de citometria de fluxo com DHE foram conduzidos em presença do inibidor seletivo de COX-2 SC236. Os resultados desses experimento revelam que, em presença do inibidor, a marcação para EROS nas células endoteliais de artérias contra-laterais foi reduzida ao nível do grupo controle, o que sugere que a fonte de EROS no endotélio da artéria contra-lateral seja a COX-2, corroborando com as inferências funcionais e com os resultados prévios obtidos por OLIVON (2006).

Em síntese, os resultados do presente trabalho mostraram que a lesão por catéter-balão acarreta em abolição do relaxamento endotélio-dependente mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores em carótida contra-lateral, quatro dias após a lesão, indicando a participação de produtos derivados da COX-2 e do ânion  $O_2^-$  na abolição dessa resposta. Os resultados ainda sugerem que o ânion  $O_2^-$ , cuja produção está aumentada na artéria contra-lateral, seja

derivado do metabolismo da COX-2 nesse leito. A perda do mecanismo de relaxamento adrenérgico pode estar contribuindo com o aumento da contração adrenérgica encontrada na artéria contra-lateral, quatro dias após a lesão. De fato, os resultados anteriormente descritos também apontam a participação de produtos derivados da COX-2 e do ânion  $O_2^-$  no aumento da resposta contrátil à Phe em artéria contra-lateral, quatro dias após a lesão por catéter-balão, reforçando a hipótese da modulação negativa do mecanismo de relaxamento adrenérgico sobre a contração adrenérgica nesse leito.

Em paralelo, os resultados do presente trabalho também permitiram caracterizar o relaxamento induzido por Phe em carótida de rato, mostrando que essa resposta é endotélio-dependente, mediada por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores, e envolvendo a participação de NO derivado da eNOS e de GMP'c.

A contribuição do presente trabalho faz-se evidente no estudo das alterações funcionais que ocorrem em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão, necessário à compreensão dos mecanismos neurocompensatórios envolvidos nesse modelo animal.

## ***6 - Conclusões***

- ✓ A lesão por catéter-balão aumenta a amplitude da contração máxima induzida por Phe em carótida contra-lateral, quatro dias após a lesão.
- ✓ O endotélio, bem como produtos derivados da COX-2 e o ânion  $O_2^-$  participam dessa hiperreatividade contrátil à Phe em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão.
- ✓ A lesão por catéter-balão abole a resposta de relaxamento induzida por Phe em carótida contra-lateral, quatro dias após a lesão.
- ✓ O relaxamento induzido por Phe em carótida de rato é endotélio-dependente, e mediado por  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores, NO derivado da eNOS e GMP'c.
- ✓ Produtos derivados da COX-2 e o ânion  $O_2^-$  participam dessa abolição da resposta de relaxamento adrenérgico em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão.
- ✓ A lesão por catéter-balão estabelece um estresse oxidativo nas células endoteliais de carótida contra-lateral, quatro dias após a lesão, com aumento na produção de ânion  $O_2^-$ , que parece ser derivado do metabolismo da COX-2 nesse leito.
- ✓ A perda da resposta de relaxamento adrenérgico na artéria contra-lateral à lesão por catéter-balão pode estar contribuindo com o aumento da contração adrenérgica observada nesse leito, quatro dias após a lesão.

## *Referências Bibliográficas*

ACCORSI-MENDONÇA, D.; CORRÊA, F.M.A.; PAIVA, T.B.; De SOUZA, H.P.; LAURINDO, F.M.R.; De OLIVEIRA, A.M. The balloon catheter induces an increase in contralateral carotid artery reactivity to angiotensin II and phenylephrine. **Br J Pharmacol**, 142, 79-88, 2004.

ANTONACCIO, M.J.; NORMANDIN, D.; FERRER, P. Reduced contractile function after balloon denudation of rat carotid arteries. **Eur J Pharmacol**, 256, 17-21, 1994.

BARBIERI, A.; SANTAGOSTINO-BARBONE, M.G.; ZONTA, F.; LUCHELLI, A. Pharmacological characterization of alpha-adrenoceptors that mediate contraction in splenic artery strips from the pig. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 357, 654-661, 1998.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. **Am J Physiol**, 271, C1424-C1437, 1996.

BOER, C.; SCHEFFER, G.J.; De LANGE, J.J.; WESTERHOF, N.; SIPKEMA, P. Alpha 1-adrenoceptor stimulation induces nitric oxide release in rat pulmonary arteries. **J Vasc Res**, 36, 79-81, 1999.

BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 368, 850-853, 1994.

BONAVENTURA, D.; De LIMA, R.G.; VERCESI, J.A.; Da SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascul Pharmacol**, 46, 215-222, 2007.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci USA**, 87, 682-685, 1990.

BRIZZOLARA, A.L.; STEWART-LEE, A.; BURNSTOCK, G. Responses of rabbit basilar arteries to vasoconstrictor and vasodilator agents: The effects of atherosclerosis, age and sex. **J Vasc Res**, 31, 106-113, 1994.

BRUIJNS, R.H.; Van KLEEF, E.M.; SMITS, J.F.; De MEY, J.G.; DAEMEN, M.J. Effects of chemical sympathectomy on angiotensin II-induced neointimal growth in the balloon-injured rat carotid artery. **J Vasc Res**, 35, 124-33, 1998.

CAMPBELL, G.R.; CAMPBELL, J.H.; MANDERSON, J.A.; HERRIGAN, S.; RENNICK, R.E. Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell. **Arch Pathol Lab Med**, 112, 977-986, 1988.

CARY, S.P.L.; WINGER, J.A.; DERBYSHIRE, E.R.; MARLETTA, M.A. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. **Trends Biochem Sci**, 31, 231-239, 2006.

CHEN, Y-F.; COWLEY JUNIOR, A.W.; ZOU, A-P. Increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> counteracts the vasodilator and natriuretic effects of superoxide dismutation by tempol in renal medulla. **Am J Physiol**, 285, R827-R833, 2003.

CHENG, Y.; AUSTIN, S.C.; ROCCA, B.; KOLLER, B.H.; COFFMAN, T.M.; GROSSER, T.; LAWSON, J.A.; FITZGERALD, G.A. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A<sub>2</sub>. **Sci**, 296, 539-541, 2002.

CLOWES, A.W.; REIDY, M.A.; CLOWES, M.M. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: smooth muscle growth in the absence of endothelium. **Lab Invest**, 49, 327-333, 1983.

CLOWES, A.W.; SCHWARTZ, S.M. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. **Circ Res**, 56, 139-145, 1985.

COCKS, T.M.; ANGUS, J.A. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. **Nature**, 305, 627-630, 1983.

COSTA, G.; LABADIA, A.; TRIGUERO, D.; JIMENEZ, E.; GARCIA-PASCUAL, A. Nitrgic relaxation in urethral smooth muscle: involvement of potassium channels and alternative redox forms of NO. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 364, 516-523, 2001.

DAVIES, M.G.; HAGEN, P.O. The vascular endothelium. A new horizon. **Ann Surg**, 218 (5), 593-609, 1993.

DAWSON, T.M.; SNYDER, S.H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J Neurosci**, 14, 5147-5159, 1994.

De ANDRADE, C.R. **Conseqüência temporal da estenose total da carótida esquerda na reatividade das artérias carótidas e basilar de *Cavia aperea* (Cobaio)**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

De ANDRADE, C.R. **Conseqüências da homocisteinemia sobre o sistema endotelina em carótida de ratos: da expressão de receptores à reatividade vascular.** Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

De ANDRADE, C.R.; FUKADA, S.Y.; OLIVON, V.C.; De GODOY, M.A.F.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N.; CUNHA, F.Q.; De SOUZA, H.P.; LAURINDO, F.R.M.; De OLIVEIRA, A.M. Alpha 1D-adrenoceptor-induced relaxation on rat carotid artery is impaired during the endothelial dysfunction evoked in the early stages of hyperhomocysteinemia. **Eur J Pharmacol**, 543, 83-91, 2006.

De OLIVEIRA, A.M.; CAMPOS-MELLO, C.; LEITÃO, M.C.; CORRÊA, F.M.A. Maturation and aging-related differences in responsiveness of rat aorta and carotid arteries to alpha 1-adrenoceptor stimulation. **Pharmacology**, 57, 305-313, 1998.

DWYER, M.A.; BREDET, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide synthase: irreversible inhibition by L-NG-nitroarginine in brain in vitro and in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, 176, 1136-1141, 1991.

ENGLISH, K.M.; JONES, R.D.; JONES, T.H.; MORICE, A.H.; CHANNER, K.S. Aging reduces the responsiveness of coronary arteries from male Wistar rats to the vasodilatory action of testosterone. **Clin Sci (Lond)**, 99, 77-82, 2000.

FAXON, D.P.; COATS, W.; CURRIER, J. Remodeling of coronary artery after vascular injury. **Progr Cardiovasc Dis**, 40, 129-140, 1997.

FÉLÉTOU, M.; VanHOUTTE, P.M. Activation of vascular smooth muscle K<sup>+</sup> channels by endothelium-derived factors. In: ARCHER, S.L.; RUSTH, N.J. *eds. Potassium channels in cardiovascular biology*. New York, NY: Keuwer Academic/Plenum, 2001, 691-714.

FERNS, G.A.A.; STEWART-LEE, A.L.; ANGGARD, E.E. Arterial response to mechanical injury: ballon catheter de-endothelialization. **Atherosclerosis**, 92, 89-104, 1992.

FILIPPI, S.; PARENTI, A.; DONNINI, S.; GRANGER, H.J.; FAZZINI, A.; LEDDA, F. Alpha (1D)-adrenoceptors cause endothelium-dependent vasodilatation in the rat mesenteric vascular bed. **J Pharmacol Exp Ther**, 296, 869-875, 2001.

FRUCHART, J.C.; DURIEZ, P. Fundamental data on atherosclerosis. **Ann Endocrinol**, 62(1 Pt 2), 93-100, 2001.

FUJIMOTO, S.; ITOH, T. The role of nitric oxide and nitric oxide-independent relaxing factor in contraction and relaxation of rabbit blood vessels. **Eur J Pharmacol**, 330, 177-184, 1997.

FUJIMOTO, Y.; UNO, E.; SAKUMA, S. Effects of reactive oxygen and nitrogen species on cyclooxygenase-1 and -2 activities. **Prostaglandin, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 71, 335-340, 2004.

FUKADA, S.Y.; CORRÊA, F.M.A.; RAMALHO, L.N.; MIZUSAKI, C.I.; De OLIVEIRA, A.M. Perivascular injury leads to a reduction in vascular reactivity of the collared and to an enhancement on contralateral carotid artery of rats. **Cardiovasc Pathol**, 13, 251-259, 2004.

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.

FUTAKI, N.; TAKAHASHI, S.; YOKOYAMA, M.; ARAI, I.; HIGUCHI, S.; OTOMO, S. NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. **Prostaglandins**, 47, 55-59, 1994.

GARCIA, X.; STEIN, F. Nitric oxide. **Semin Pediatric Infect Dis**, 17, 55-57, 2006.

GARVEY, E.P.; OPLINGER, J.A.; FURFINE, E.S.; KIFF, R.J.; LASZLO, F.; WHITTLE, B.J.; KNOWLES, R.G. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. **J Biol Chem**, 272, 4959-4963, 1997.

GIBBONS, G.H.; DZAU, V.P. The emerging concept of vascular remodeling. **N Engl J Med**, 330, 1431-1438, 1994.

GRIFFITH, O.W.; STUEHR, D.J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. **Annu Rev Physiol**, 57, 707-734, 1995.

GOETZ, A.S.; KING, H.K.; WARD, S.D.C.; TRUE, T.A.; RIMELE, T.J.; SAUSSY JUNIOR, D.L. BMY 7378 is a selective antagonist of the D subtype of  $\alpha_1$ -adrenoceptors. **Eur J Pharmacol**, 272, 301-303, 1995.

GORREN, A.C.F.; MAYER, B. Nitric-oxide synthase: a cytochrome P450 family foster child. **Biochem Biophys Acta**, 1770, 432-445, 2007.

GRECH, E.D. ABC of interventional cardiology: percutaneous coronary intervention. II: the procedure. **BMJ**, 326, 1137-1140, 2003.

GREENBERG, S.; DIECKE, F.P.J.; PEEVY, K.; TANAKA, T.P. The endothelium modulates adrenergic neurotransmission to canine pulmonary arteries and veins. **Eur J Pharmacol**, 162, 67-80, 1989.

GUPTA, P.K.; SUBRAMANI, J.; LEO, M.D.; SIKARWAR, A.S.; PARIDA, S.; PRAKASH, V.R.; MISHRA, S.K. Role of voltage-dependent potassium channels and myo-endothelial gap-junctions in 4-aminopyridine-induced inhibition of acetylcholine relaxation in rat carotid artery. **Eur J Pharmacol**, 591, 171-176, 2008.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, R.; ARMAS-PADILLA, M.C.; ARMAS-HERNANDEZ, M.J.; VELASCO, M. The prevalence of hypertension and the state of cardiovascular health in Venezuela and surrounding nations. **Ethn Dis**, 8, 398-405, 1998.

HEVEL, J.M.; WHITE, K.A.; MARLETTA, M.A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. **J Biol Chem**, 266, 22789-22791, 1991.

HIBBS JUNIOR, J.B.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, 235, 473-476, 1987.

HIRANO, K.; HIRANO, M.; KANAIDE, H. Enhancement by captopril of bradykinin-induced calcium transients in cultured endothelial cells of the bovine aorta. **Eur J Pharmacol**, 15, 133 -137, 1993.

HOLIFIELD, B.; HELGASON, T.; JAMELKA, S.; TAYLOR, A.; NAVRAN, S.; ALLEN, J.; SEIDEL, C. Differentiated vascular myocytes: are they involved in neointimal formation? **J Clin Invest**, 97, 814-825, 1996.

HUSHANG, J. Development of carotid plaque. **Am J Surg**, 138, 224-227, 1979.

HYNES, M.R.; DANG, H.; DUCKLES, S.P. Contractile responses to adrenergic nerve stimulation are enhanced with removal of endothelium in rat caudal artery. **Life Sci**, 42, 357, 1988.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 84, 9265-9269, 1987.

IP, J.H.; FUSTER, V.; BADIMON, J.; TAUBMAN, M.B.; CHESEBRO, J.H. Syndromes of accelerated atherosclerosis. Role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. **J Am Coll Cardiol**, 15, 1667-1687, 1990.

JAHNICHEN, S.; ELTZE, M.; PERTZ, H.H. Evidence that alpha (1 B)-adrenoceptors are involved in noradrenaline-induced contractions of rat tail artery. **Eur J Pharmacol**, 488, 157-167, 2004.

KENAKIN, T.P. Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction. **Efficacy Lippincott-Raven**, ed. 3, 289-330, 1997.

KULKARNI, M.; ARMSTEAD, W.M. Relationship between NOC/oFQ, dynorphin, and COX-2 activation in impaired NMDA cerebrovasodilation after brain injury. **J Neurotrauma**, 19, 965-973, 2002.

LIBBY, P.; TANAKA, H. The molecular basis of restenosis. **Progr Cardiovasc Dis**, 40, 97-106, 1997.

MacDONAL, A.; McLEAN, M.; MacAULAV, L.; SHAW, A.M. Effects of propranolol and L-NAME on beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat carotid artery. **J Auton Pharmacol**, 19, 145-149, 1999.

MAJESKY, M.W.; SCHWARTZ, S.M. Smooth muscle diversity in arterial wound repair. **Toxicol Phatol**, 18,4, 554-559, 1990.

MAJESKY, M.W.; GIACHELLI, C.M.; REIDY, M.A.; SCHWARTZ, S.M. Rat carotid neointimal smooth muscle cells reexpress a developmentally regulated mRNA phenotype during repair of arterial injury. **Circ Res**, 71, 759-768, 1992.

MILNER, P.; CROWE, R.; LOESCH, A.; ANGLIN, S.; BURNSTOCK, G.; MCEWAN, J.R. Neurocompensatory responses to ballon-catheter-induced injury of the carotid artery. **J Vasc Res**, 34, 31-34, 1997.

MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. **Br J Pharmacol**, 128, 1121-1132, 1999.

MITCHELL, J.A.; LUCAS, R.; VOJNOVIC, I.; HASAN, K.; PEPPER J.R.; WARNER, T.D. Stronger inhibition by nonsteroid anti-inflammatory drugs of cyclooxygenase-1 in endothelial cells than platelets offers an explanation for increased risk of thrombotic events. **FASEB J**, 20, 2468-2475, 2006.

MITCHELL, J.A.; ALI, F.; BAILEY, L.; MORENO, L.; HARRINGTON, L.S. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. **Exp Physiol**, 93, 141-147, 2008.

MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J.R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, 263, 663-665, 1976.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB J.**, 9, 1319-1330, 1995.

MURAMATSU, I., OHMURA, T., KIGOSHI, S., OSHITA, M. Pharmacological subclassification of alpha 1-adrenoceptors in vascular smooth muscle. **Br J Pharmacol.**, 99, 197-201, 1990.

NILSSON, J.; VON EULER, A.M.; DALSGAARD, C.J. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. **Nature**, 315, 61-63, 1985.

O'BRIEN, E.R.; SCHWARTZ, S.M. Update on the biology and clinical study of restenosis. **Trends Cardiovasc Med**, 4, 349-356, 1994.

OLIVON, V.C. **Mecanismos celulares envolvidos no aumento da reatividade vascular para fenilefrina (Phe) na artéria contra-lateral após lesão por balão cateterismo.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

OSTROM, R.S.; GREGORIAN, C.; DRENAN, R.M.; GABOT, K.; RANA, B.K.; INSEL, P.A. Key role for constitutive cyclooxygenase-2 of MDCK cells in basal signaling and response to released ATP. **Am J Physiol Cell Physiol**, 281, C524-C531, 2001.

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327, 524-526, 1987.

POLLMAN, M.J.; HALL, J.L.; GIBBONS, G.H. Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype. **Circ Res**, 84, 113-121, 1999.

POLLOCK, J.S.; FORSTERMANN, U.; MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D.; SCHMIDT, H.H.; NAKANE, M.; MURAD, F. Purification and characterization of particulate

endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, 88, 10480-10484, 1991.

RAJAGOPALAN, S.; MENG, X.P.; RAMASAMY, S.; HARRISON, D.G.; GALIS, Z.S. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. **J Clin Invest**, 98, 2572-2579, 1996.

REES, D.D.; PALMER, R.M.; SCHULZ, R.; HODSON, H.F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br J Pharmacol**, 101, 746-752, 1990.

RODRIGUES, G.J.; LUNARDI, C.N.; LIMA, R.G.; SANTOS, C.X.; LAURINDO, F.R.M.; Da SILVA, R.S.; BENDACK, L.M. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**, 18, 176-183, 2008.

ROSS, R.; GLOMEST, J.A. The pathogenesis of atherosclerosis. **New Eng J Med**, 295, 369-377, 1976.

ROSS R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. **N Engl J Med**, 340, 115-126, 1999.

SCHILD, H.O. pA, a new scale for measurement of drug antagonism. **Br J Pharmacol**, 2, 189-206, 1997

SCHWARTZ, S.M.; REIDY, M.A.; CLOWES, A. Kinetics of atherosclerosis: a stem cell model. **Ann NY Acad Sci**, 454, 292-304, 1985.

SCHWARTZ, R.S.; HOLMES JUNIOR, D.R.; TOPOL, E.J. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. **J Am Coll Cardiol**, 20, 1284-1293, 1992.

SCHWARTZ, S.M.; DE BLOIS, D.; O'BRIEN, E.R.M. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. **Circ Res**, 77, 445-465, 1995.

SCHWARTZ, S.M. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. **J Clin Invest**, 99, 2814-2817, 1997.

SCHWARTZ, R.S.; HENRY, T.D. Pathophysiology of coronary artery restenosis. **Rev Cardiovasc Med**, 3, S4-S9, 2002.

SCOTLAND, R.S.; VALLANCE, P.J.; AHUWALIA, A. Endogenous factors involved in regulation of tone of arterial vasa vasorum: implications for conduit vessel physiology. **Cardiovasc Res**, 46, 403-411, 2000.

STRAUSS, B.H.; CHISHOLM, R.J.; KEELEY, F.W.; GOTLIEB, A.I.; LOGAN, R.A.; ARMSTRONG, P.W. Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. **Cir Res**, 75, 650-658, 1994.

STUEHR, D.J.; MARLETTA, M.A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon-gamma. **J Immunol**, 139, 518-525, 1987.

TAKEDA, Y.; WARD, S.M.; SANDERS, K.M.; KOH, S.D. Effects of the gap-junction blocker glycyrrhetic acid on gastrointestinal smooth muscle cells. **Am J Physiol**, 288, G832-G841, 2005.

THOMAS, D.D.; LIU, X.; KANTROW, S. P.; LANCASTER JUNIOR, J. R. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98, 355-360, 2001.

TIRAPELLI, C.R.; CASOLARI, D.A.; MONTEZANO, A.C.; YOGI, A.; TOSTES, R.C.; LEGROS, E.; D'ÓRLEANS-JUSTE, P.; LANCHOTE, V.L.; UYEMURA, S.A.; De OLIVEIRA, A.M. Ethanol consumption enhances endothelin-1-induced contraction in the isolated rat carotid. **J Pharmacol Exper Ther**, 16, 318-327, 2006.

TOUYZ, R.; SCHFFRIN, E.L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **Pharmacol Rev**, 52, 639-672, 2000.

VANHOUTTE, P.M. Endothelial adrenoceptors. **J Cardiovasc Pharmacol**, 38, 796-808, 2001.

VINCI, M.C.; BELLIK, L.; FILIPPI, S.; LEDDA, F.; PARENTI, A. Trophic effects induced by  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors on endothelial cells are potentiated by hypoxia. **Am J Physiol**, 293, H2140-H2147, 2007.

WANSTALL, J.C.; GAMBINO, A.; JEFFERY, T.K.; LOVREN, F.; TRIGGLE, C.R. Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide gas and nitroxyl ion. **Proc Aust Soc Clin Exp Pharmacol Toxicol**, 8, 130, 2000.

XIA, Y.; ROMAN, L.D.; MASTERS, B.S.; ZWEIER, J.L. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. **J Biol Chem**, 273, 22635-22639, 1998.

ZHAO, H.; KALIVENDI, S.; ZHANG, H.; JOSEPH, J.; NITHIPATIKON, K.; VASQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B. Superoxide reacts with hydroethidine but forms fluorescent product that is distinctly different from ethidium: implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. **Free Rad Biol Med**, 34, 1359-1368, 2003.

ZHENG, J-S.; YANG, X-Q.; LOOKINGLAND, K.J.; FINK, G.D.; HESSLINGER, C.; KAPATOS, G.; KOVESDI, I.; CHEN, A.F. Gene transfer of human guanosine -5'-triphosphate cyclohydrolase I restores vascular tetrahydrobiopterin level and endothelial function in low rennin hypertension. **Circulation**, 108, 1238-1245, 2003.

ZSCHAUER, A.O.; SIELCZAK, M.W.; SMITH, D.A.; WANNER, A. Norepinephrine-induced contraction of isolated rabbit bronchial artery: role of alpha 1- and alpha2-adrenoceptor activation. **J Appl Physiol**, 82, 1918-1925, 1997.

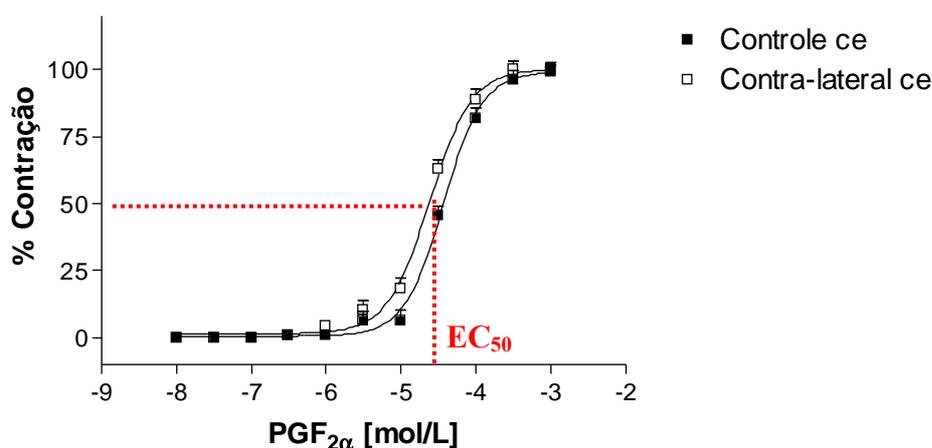
*Apêndices*

**APÊNDICE A – Determinação da EC<sub>50</sub> de PGF<sub>2α</sub> em carótida de rato**

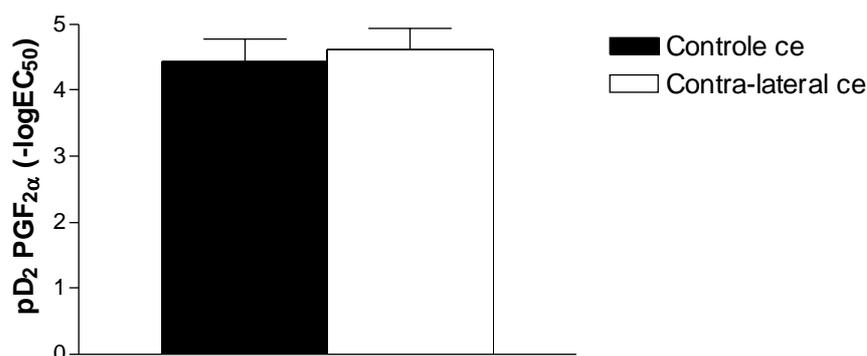
A PGF<sub>2α</sub> foi utilizada nos protocolos experimentais do presente estudo como agente pré-constrictor não-adrenérgico, necessário para a construção das curvas de relaxamento induzido por Phe em anéis de carótida de rato. Obedecendo aos princípios clássicos de Farmacologia, a concentração utilizada do agente pré-constrictor foi sua EC<sub>50</sub>, por ser bastante precisa (KENAKIN, 1997). Logo, foi necessário determinar a EC<sub>50</sub> da PGF<sub>2α</sub> em carótida de rato controle e em carótida contra-lateral, antes da execução dos protocolos de reatividade à Phe.

Para determinar a EC<sub>50</sub> desse agente, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para PGF<sub>2α</sub> (10<sup>-8</sup> – 10<sup>-3</sup> mol/L) em anéis de carótidas controle e contra-lateral, em presença de endotélio. Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism (GraphPad software, versão 3.01, 1999), utilizando o método de regressão não – linear dos mínimos quadrados. O método estatístico utilizado para comparação entre os grupos foi o *teste-t* não pareado.

Os resultados mostram que a EC<sub>50</sub> da PGF<sub>2α</sub> em artérias carótidas controle e contra-lateral de ratos com 75 dias de idade é de aproximadamente 3x10<sup>-5</sup>mol/L (apêndices 1A, 2A e 3A), sem diferença significativa entre os grupos. Portanto, a concentração utilizada de como pré-constrictor do relaxamento adrenérgico foi de 3x10<sup>-5</sup>mol/L.



**Apêndice 1A. Contração induzida por PGF<sub>2α</sub> em carótida controle e contra-lateral com endotélio (ce).** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de contração para PGF<sub>2α</sub> (10<sup>-8</sup> a 10<sup>-3</sup> mol/L) em carótida controle e contra-lateral. Os dados representam a média ± EPM (n = 5).



**Apêndice 2A. Potência de PGF<sub>2α</sub> em carótida controle e contra-lateral com endotélio (ce).** A figura representa os valores de pD<sub>2</sub> (-logEC<sub>50</sub>) de PGF<sub>2α</sub> como agonista vasoconstritor. Os dados representam a média ± EPM (n = 5). *Teste-t* não pareado.

| Grupos                                      |                            |                            |
|---------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                                             | Controle ce                | Contra-lateral ce          |
| <b>EC<sub>50</sub> (mol/L)</b>              | 10 <sup>-4,43</sup> ± 0,35 | 10 <sup>-4,62</sup> ± 0,33 |
| <b>pD<sub>2</sub> (-logEC<sub>50</sub>)</b> | 4,43 ± 0,35                | 4,62 ± 0,33                |

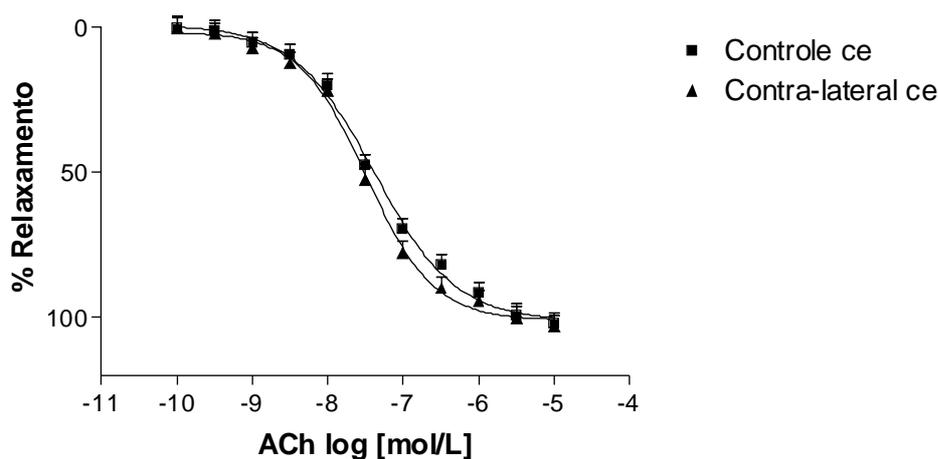
**Apêndice 3A.** Valores de EC<sub>50</sub> e pD<sub>2</sub> (-log EC<sub>50</sub>) de PGF<sub>2α</sub> como agonista vasoconstritor em artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio. Os dados representam a média ± EPM (n = 5). *Teste-t* não pareado.

**APÊNDICE B – Verificação da resposta de relaxamento induzido por ACh  
sobre pré-contração com PGF<sub>2α</sub>**

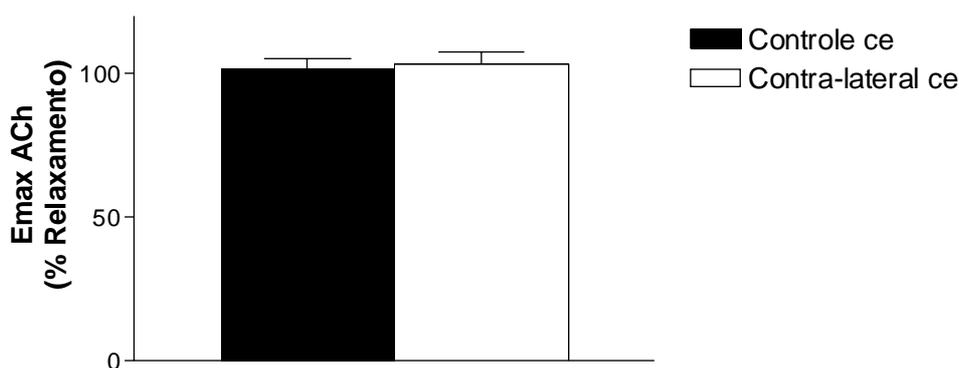
Os experimentos realizados nesse estudo revelaram que o relaxamento induzido por Phe em carótida contra-lateral à lesão por catéter-balão, quatro dias após a cirurgia, está abolido, enquanto que o relaxamento induzido pelo agonista muscarínico ACh está preservado nesse leito. Entretanto, o agente pré-constrictor utilizado no relaxamento adrenérgico (PGF<sub>2α</sub>) foi diferente daquele utilizado no relaxamento colinérgico (Phe). Portanto, para verificar se o tipo de agente pré-constrictor determina as alterações de relaxamento observadas com Phe em artéria contra-lateral, foi verificada a reatividade de anéis de carótida controle e contra-lateral à ACh sobre pré-contração com PGF<sub>2α</sub>.

Para tanto, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para ACh ( $10^{10}$  à  $10^{-5}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, em presença de endotélio, sobre pré-contração com PGF<sub>2α</sub> ( $3 \times 10^{-5}$  mol/L). Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism (GraphPad software, versão 3.01, 1999), utilizando o método de regressão não – linear dos mínimos quadrados. O método estatístico utilizado para comparação entre os grupos foi o *teste-t* não pareado.

Os resultados mostram que, mesmo sobre pré-contração com PGF<sub>2α</sub>, o relaxamento induzido por ACh está preservado, quanto aos parâmetros de E<sub>max</sub> (apêndices 1B e 2B) e pD<sub>2</sub> (apêndice 3B) do agonista, em artéria contra-lateral, excluindo a hipótese de que o agente pré-constrictor PGF<sub>2α</sub> seria responsável pela alteração da resposta de relaxamento induzido por Phe observada nesse leito.



**Apêndice 1B.** Relaxamento induzido por ACh sobre pré-contracção com PGF<sub>2α</sub> em carótida controle e contra-lateral com endotélio (ce). A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para ACh (10<sup>-10</sup> a 10<sup>-5</sup> mol/L) sobre pré-contracção com PGF<sub>2α</sub> (3 x 10<sup>-5</sup> mol/L) em carótida controle e contra-lateral. Os dados representam a média ± EPM (n = 5).



**Apêndice 2B.** Efeito relaxante máximo de ACh sobre pré-contracção com PGF<sub>2α</sub> em carótida controle e contra-lateral com endotélio (ce). A figura representa os valores de Emax de ACh sobre pré-contracção com PGF<sub>2α</sub> (3 x 10<sup>-5</sup> mol/L). Os dados representam a média ± EPM (n = 5). *Teste-t* não pareado.

|                                                 | Grupos        |                   |
|-------------------------------------------------|---------------|-------------------|
|                                                 | Controle ce   | Contra-lateral ce |
| <b>Emax ACh (%)</b>                             | 101,40 ± 3,71 | 103,48 ± 3,89     |
| <b>pD<sub>2</sub> ACh (-logEC<sub>50</sub>)</b> | 7,38 ± 0,69   | 7,49 ± 0,57       |

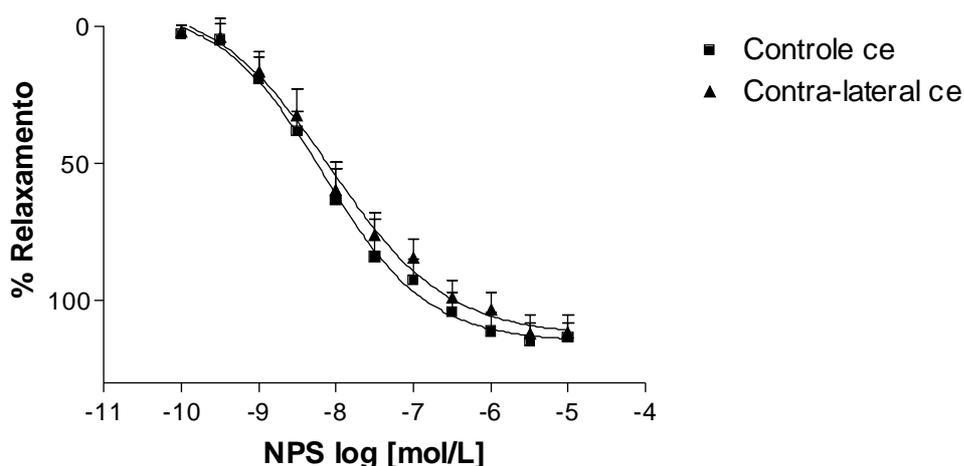
**Apêndice 3B.** Valores de Emax e pD<sub>2</sub> (-log EC<sub>50</sub>) de ACh sobre pré-contracção com PGF<sub>2α</sub> em artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio. Os dados representam a média ± EPM (n = 5). *Teste-t* não pareado.

**APÊNDICE C – Verificação da resposta de relaxamento induzido por NPS  
sobre pré-contração com PGF<sub>2α</sub>**

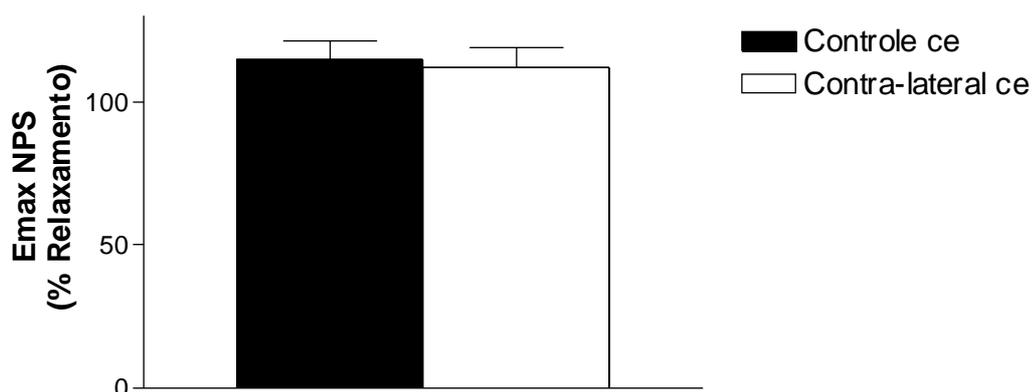
Assim como para ACh, o agente pré-constrictor utilizado no relaxamento adrenérgico (PGF<sub>2α</sub>) foi diferente daquele utilizado no relaxamento induzido por NPS (Phe), que não está alterado em artéria contra-lateral. O relaxamento induzido por NPS permite verificar se os mecanismos musculares de relaxamento estão preservados, pois ocorre por doação de NO a partir do próprio NPS. Para verificar se o tipo de agente pré-constrictor determina as alterações de relaxamento observadas com Phe em artéria contra-lateral, foi verificada a reatividade de anéis de carótida controle e contra-lateral ao NPS sobre pré-contração com PGF<sub>2α</sub>.

Para tanto, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito para NPS ( $10^{-10}$  à  $10^{-5}$  mol/L) em anéis de carótida controle e contra-lateral, em presença de endotélio, sobre pré-contração com PGF<sub>2α</sub> ( $3 \times 10^{-5}$  mol/L). Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism (GraphPad software, versão 3.01, 1999), utilizando o método de regressão não – linear dos mínimos quadrados. O método estatístico utilizado para comparação entre os grupos foi o *teste-t* não pareado.

Os resultados mostram que, mesmo sobre pré-contração com PGF<sub>2α</sub>, o relaxamento induzido por NPS está preservado, quanto aos parâmetros de E<sub>max</sub> (apêndices 1C e 2C) e pD<sub>2</sub> (apêndice 3C) do agonista, em artéria contra-lateral, excluindo a hipótese de que o agente pré-constrictor PGF<sub>2α</sub> seria responsável pela alteração da resposta de relaxamento induzido por Phe observada nesse leito.



**Apêndice 1C. Relaxamento induzido por NPS sobre pré-contracção com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  em carótida controle e contra-lateral com endotélio (ce).** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para NPS ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) sobre pré-contracção com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \times 10^{-5}$  mol/L) em carótida controle e contra-lateral. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ).



**Apêndice 2C. Efeito relaxante máximo de NPS sobre pré-contracção com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  em carótida controle e contra-lateral com endotélio (ce).** A figura representa os valores de Emax de NPS sobre pré-contracção com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \times 10^{-5}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). *Teste-t* não pareado.

|                                                                       | Grupos            |                   |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                                                       | Controle ce       | Contra-lateral ce |
| <b>Emax NPS (%)</b>                                                   | $115,03 \pm 6,47$ | $112,11 \pm 6,89$ |
| <b><math>\text{pD}_2</math> NPS (-log<math>\text{EC}_{50}</math>)</b> | $8,16 \pm 0,57$   | $8,07 \pm 0,65$   |

**Apêndice 3C. Valores de Emax e  $\text{pD}_2$  (-log  $\text{EC}_{50}$ ) de NPS sobre pré-contracção com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  em artérias carótidas controle e contra-laterais à lesão por catéter-balão, com endotélio.** Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ). *Teste-t* não pareado.

**APÊNDICE D – Determinação do relaxamento induzido por Phe em carótida  
de rato sem exclusão de receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos**

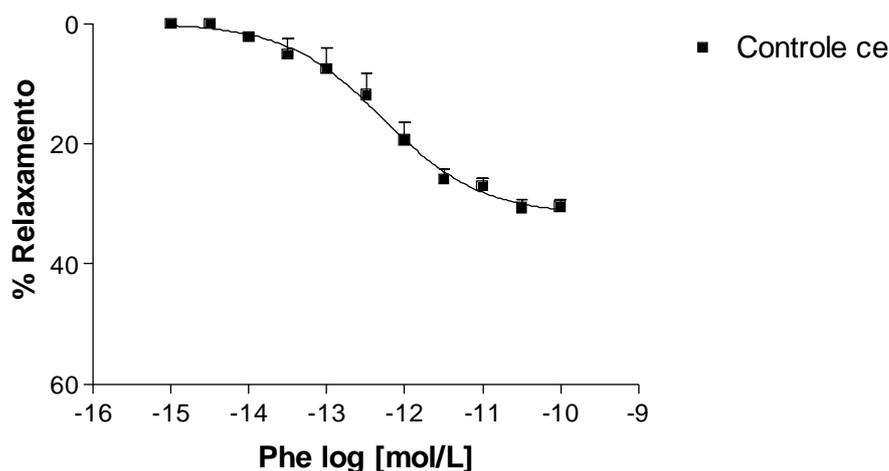
O relaxamento induzido por Phe em carótida de rato foi estudado em presença do antagonista  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico WB 4101, para excluir a participação de receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos nessa resposta. Em carótida de rato, receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos mediam a contração adrenérgica, enquanto que receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos mediam respostas de contração e relaxamento. Excluindo a participação de receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos, teoricamente se tornaria mais fácil observar a resposta de relaxamento adrenérgico, justificando a utilização do antagonista WB 4101 nos protocolos de reatividade à Phe.

É importante salientar que a adição do antagonista WB 4101 não alterou o platô mantido pela  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (30 min) em relação à ausência do antagonista, excluindo a hipótese de que o relaxamento observado seria decorrente do efeito do antagonista sobre a pré-contração induzida por  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

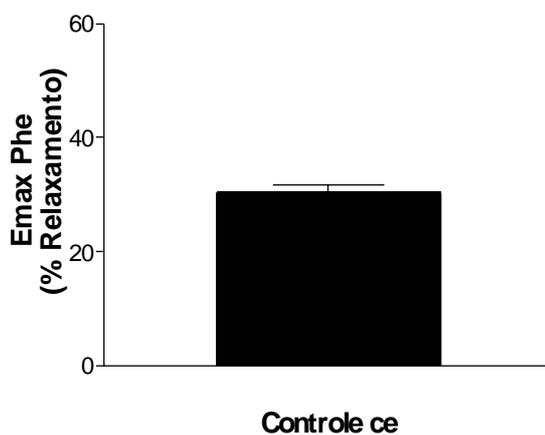
Para verificar se a resposta de relaxamento induzida por Phe em carótida de rato é detectável sem a exclusão de receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe ( $10^{-15}$  à  $10^{-10}$  mol/L) em anéis de carótida controle, com endotélio, sobre pré-contração com  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , em ausência do antagonista WB 4101. Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism (GraphPad software, versão 3.01, 1999), utilizando o método de regressão não – linear dos mínimos quadrados.

Os resultados mostram que, em ausência de WB 4101, Phe, na faixa de concentrações utilizada, produz um relaxamento máximo de cerca de 30% ( $30,43 \pm 1,19\%$ , apêndices 1D e 2D). A amplitude dessa resposta é menor que a observada em presença de WB 4101 (cerca de 40%), o que permite concluir que a utilização do antagonista  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico otimiza o registro, e por conseqüência, o estudo do relaxamento induzido por Phe em carótida

de rato. Há ainda de se considerar a importância biológica dessa resposta como possível moduladora inibitória da contração adrenérgica em condições fisiológicas, onde não existe a exclusão de receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos.



**Apêndice 1D. Relaxamento induzido por Phe em carótida controle com endotélio (ce), em ausência de WB 4101.** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-10}$  mol/L) sobre pré-contracção com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \times 10^{-5}$  mol/L) em carótida controle, em ausência de WB 4101. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ).



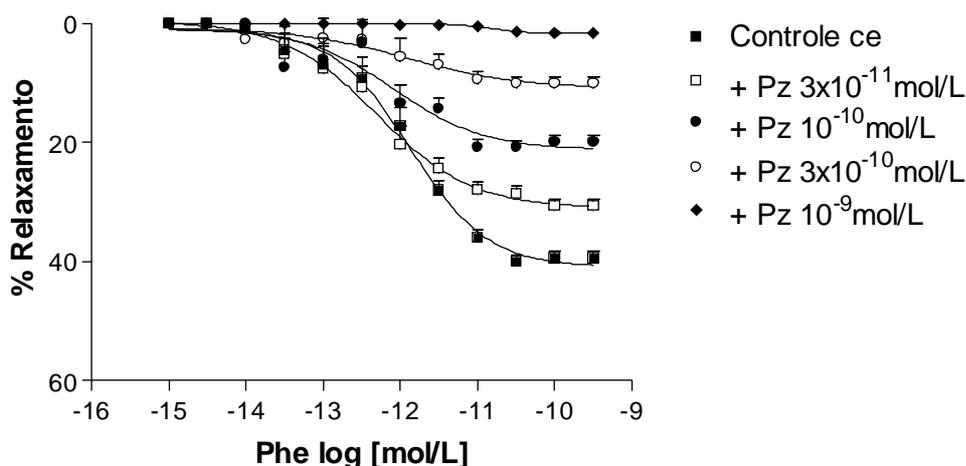
**Apêndice 2D. Efeito relaxante máximo de Phe em carótida controle com endotélio (ce), em ausência de WB 4101.** A figura representa os valores de Emax de Phe. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ).

**APÊNDICE E – Determinação da IC<sub>100</sub> de Pz e BMY 7378 em carótida de rato**

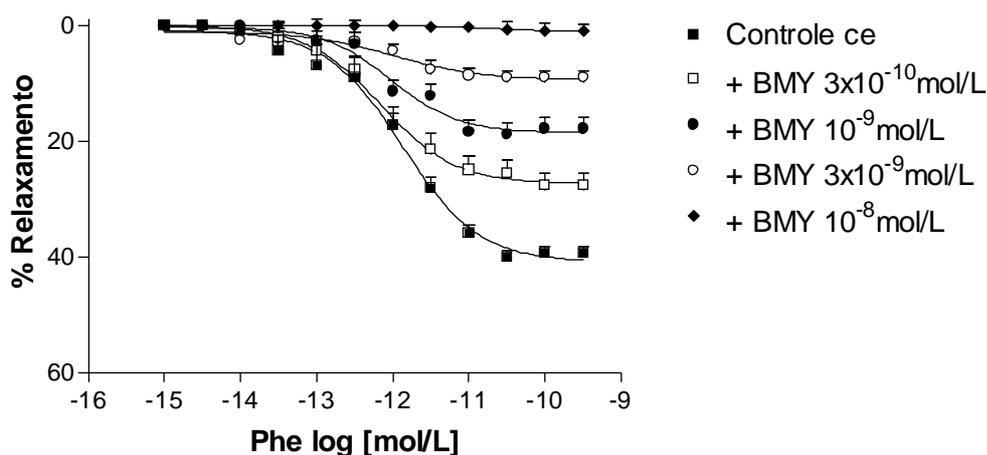
A caracterização funcional dos receptores mediadores da resposta de relaxamento induzida por Phe em carótida de rato foi feita pela utilização de antagonistas adrenérgicos seletivos, dos quais os principais para o estudo em questão foram o antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico Pz e o antagonista  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico BMY 7378. Para demonstrar a participação de receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos no relaxamento induzido por Phe em carótida de rato, foi preciso utilizar a IC<sub>100</sub> dos antagonistas Pz e BMY, que abole completamente a resposta de relaxamento. Portanto, tornou-se necessário determinar a IC<sub>100</sub> desses antagonistas para a resposta de relaxamento adrenérgico.

Para tanto, foram construídas curvas cumulativas concentração-efeito de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  à  $10^{-9}$  mol/L), em presença de concentrações crescentes dos antagonistas Pz ( $3 \times 10^{-11}$  à  $10^{-9}$  mol/L) e BMY ( $3 \times 10^{-10}$  à  $10^{-8}$  mol/L), incubados 20 ou 30 minutos antes da pré-contracção das preparações, respectivamente. As concentrações de Phe foram adicionadas em escala crescente até estabilização da resposta do agonista em presença do antagonista. Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism (GraphPad software, versão 3.01, 1999), utilizando o método de regressão não – linear dos mínimos quadrados.

Os resultados mostram que Pz e BMY, embora reversíveis, produziram um antagonismo não-superável com Phe, abolindo completamente a resposta do agonistas nas concentrações de  $10^{-9}$  e  $10^{-8}$  mol/L (apêndices 1E e 2E), respectivamente. Logo, as concentrações de Pz e BMY utilizadas para caracterizar a participação de  $\alpha_1$ - e  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores no relaxamento induzido por Phe foram  $10^{-9}$  e  $10^{-8}$  mol/L, respectivamente.



**Apêndice 1E. Determinação da  $IC_{100}$  de Pz para o relaxamento induzido por Phe em carótida controle com endotélio (ce).** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-9}$  mol/L) em carótida controle, em ausência e presença de concentrações crescentes de Pz. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5).

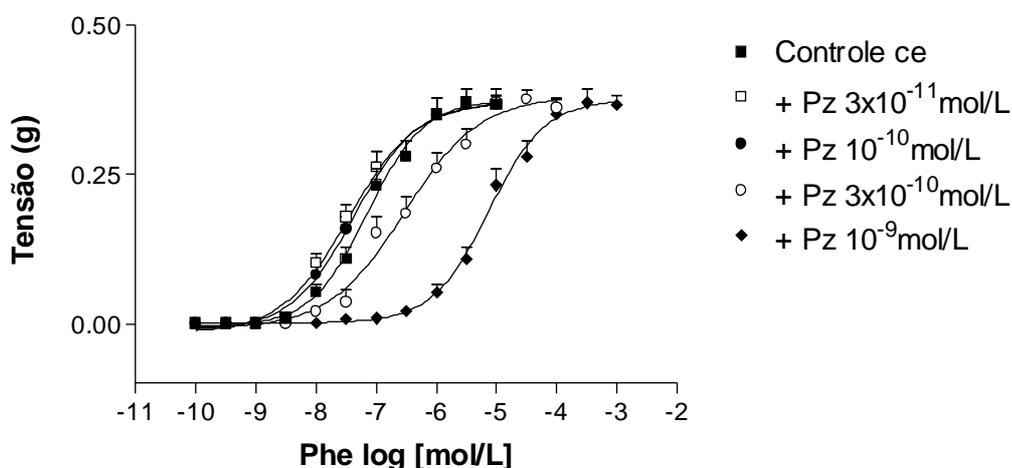


**Apêndice 2E. Determinação da  $IC_{100}$  de BMY para o relaxamento induzido por Phe em carótida controle com endotélio (ce).** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de relaxamento para Phe ( $10^{-15}$  a  $10^{-9}$  mol/L) em carótida controle, em ausência e presença de concentrações crescentes de BMY. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5).

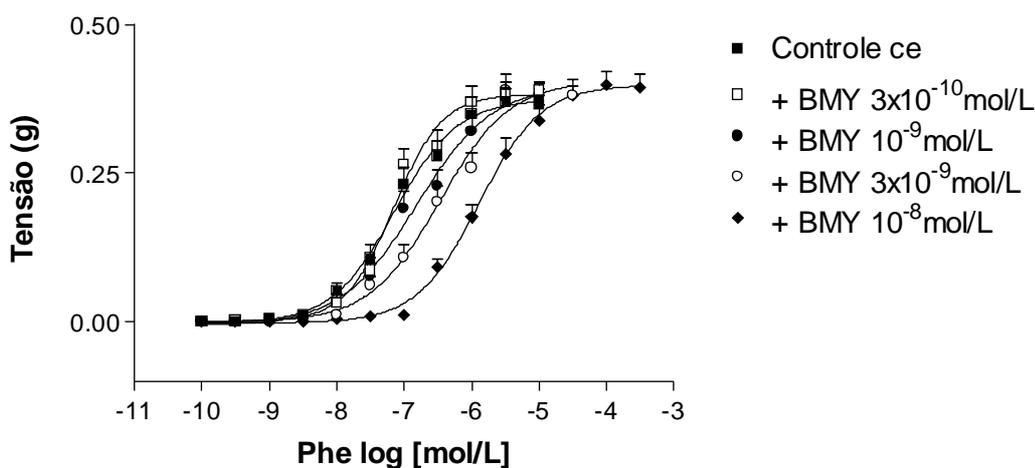
Como os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos também participam da resposta de contração adrenérgica, foram feitos experimentos controle com as mesmas faixas de concentração dos antagonistas Pz ( $3 \times 10^{-11}$  a  $10^{-9}$  mol/L) e BMY ( $3 \times 10^{-10}$  a  $10^{-8}$  mol/L) para a resposta de contração induzida por Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-3}$  mol/L) em carótida de rato.

Os resultados mostram que, diferentemente do tipo de antagonismo observado para a resposta de relaxamento, tanto Pz quanto BMY produziram um antagonismo superável para a

resposta de contração induzida por Phe em carótida de rato (apêndices 3E e 4E). Entretanto, as respectivas  $IC_{100}$  de cada antagonista para a resposta de relaxamento ( $10^{-9}$  mol/L para Pz e  $10^{-8}$  mol/L para BMY) não conseguiram abolir a resposta de contração (apêndices 3E e 4E), sugerindo que os antagonistas apresentam maior potência em receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos envolvidos na resposta de relaxamento.



**Apêndice 3E. Curvas de contração induzida por Phe em carótida controle com endotélio (ce), em presença de concentrações crescentes de Pz.** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de contração para Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-3}$  mol/L) em carótida controle, em ausência e presença de concentrações crescentes de Pz. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ).



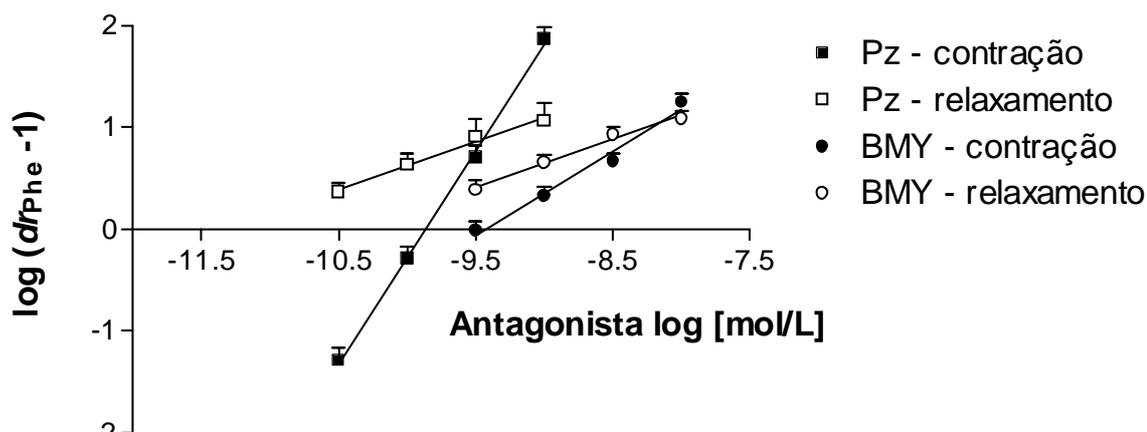
**Apêndice 4E. Curvas de contração induzida por Phe em carótida controle com endotélio (ce), em presença de concentrações crescentes de BMY.** A figura representa a curva concentração-efeito cumulativa de contração para Phe ( $10^{-10}$  a  $10^{-3}$  mol/L) em carótida controle, em ausência e presença de concentrações crescentes de BMY. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ).

A potência de um antagonista é determinada por seu  $pA_2$ , dado como o anti-logaritmo da concentração do antagonista que produz uma dose-ratio ( $dr$ ) igual a 2. A dose-ratio corresponde à razão entre a concentração do agonista que produz determinado efeito em presença do antagonista pela concentração do agonista que produz o mesmo efeito em ausência do antagonista. Portanto, a concentração do antagonista equivalente ao seu  $pA_2$  desloca duas vezes a concentração do agonista para a direita. Quanto maior o valor de  $pA_2$ , maior a potência do antagonista. Para determinar o  $pA_2$  de um antagonista, basta utilizar o método de Schild. Esse método permite plotar o logaritmo da diferença entre a  $dr$  e 1 em função de concentrações crescentes do antagonista em escala logarítmica, produzindo uma reta, cuja interseção no eixo 'X' fornece o valor de  $pA_2$ . A inclinação dessa reta ( $slope$ ) também fornece algumas características do antagonismo: quando o  $slope$  é próximo da unidade, sugere a ocorrência de antagonismo competitivo superável; quando o  $slope$  é menor que a unidade, sugere a ocorrência de cooperativismo negativo; e quando o  $slope$  é maior que a unidade, sugere a ocorrência de cooperativismo positivo.

Para confirmar se a potência dos antagonistas Pz e BMY são diferentes nos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos mediadores das respostas de contração e relaxamento induzidos por Phe em carótida de rato, foi feita a análise de Schild, a partir de dados fornecidos pelas curvas concentração-efeito do agonista em presença de concentrações crescentes dos antagonistas.

Os resultados mostram que, de fato, Pz e BMY exibem maior potência sobre os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos mediadores do relaxamento induzido por Phe do que sobre os que mediam a contração adrenérgica (apêndice 5E). Os valores de  $pA_2$  para Pz foram de  $10,3 \pm 0,72$  ( $n=5$ ) e  $9,8 \pm 0,67$  ( $n=5$ ) para as respostas de relaxamento e contração, respectivamente, enquanto que, para BMY, foram de  $10,3 \pm 0,51$  ( $n=5$ ) e  $9,4 \pm 0,69$  ( $n=5$ ), também para as respostas de relaxamento e contração, respectivamente. Os valores do  $slope$  de cada reta

também foram diferentes entre si: para a resposta de relaxamento, Pz produziu uma reta com *slope* de  $0,47 \pm 0,037$  ( $n=5$ ), e com *slope* de  $2,09 \pm 0,05$  ( $n=5$ ) para a resposta de contração; já o BMY produziu uma reta com *slope* de  $0,42 \pm 0,05$  ( $n=5$ ) para a resposta de relaxamento, e de  $0,89 \pm 0,08$  ( $n=5$ ) para a resposta de contração (apêndice 5E).



**Apêndice 5E. Plot de Schild para Pz e BMY nas respostas de contração e relaxamento induzidas por Phe em carótida controle com endotélio (ce).** A figura representa as regressões lineares obtidas com concentrações crescentes de Pz ( $3 \times 10^{-11}$  à  $10^{-9}$  mol/L) e BMY ( $3 \times 10^{-10}$  à  $10^{-8}$  mol/L). Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ).

A potência de um antagonista é diretamente proporcional à sua afinidade pelo receptor, visto que antagonistas possuem eficácia nula (KENAKIN, 1997). Alterações na potência de um antagonista, portanto, refletem alterações em sua afinidade, o que permite sugerir que os receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos mediadores do relaxamento sejam distintos daqueles que mediam a contração em relação à afinidade apresentada pelos antagonistas Pz e BMY. Parece que esses antagonistas exibem maior afinidade ao receptor de relaxamento do que ao de contração. Essa alteração de afinidade pode estar refletindo alguma alteração estrutural dos receptores de relaxamento em relação aos de contração, considerando que a afinidade de um agente por uma molécula é dada pela estrutura complementar entre ambos, e que os antagonistas se mantêm os mesmos para as respostas de contração e relaxamento.

Em relação à análise de Schild, de todas as respostas estudadas, apenas a contração induzida por Phe em presença de concentrações crescentes de BMY produziu uma reta com *slope* próximo da unidade, sugerindo antagonismo competitivo em  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores de contração. A detecção de uma reta de *slope* diferente da unidade indica a ocorrência de pelo menos uma das seguintes situações: (1) taquifilaxia ao agonista, (2) as interações entre antagonista e receptor não se encontram no estado de equilíbrio, (3) o antagonista interage com seus receptores de maneira irreversível, (4) ocorre agonismo indireto, (5) o efeito corresponde à ativação de uma população heterogênea de receptores, ou (6) o antagonista não é competitivo (SCHILD, 1947).

Sabe-se que Phe não produz taquifilaxia nem agonismo indireto (JAHNICHEN et al., 2004), e que Pz e BMY são antagonistas reversíveis e competitivos (MURAMATSU et al., 1990; GOETZ et al., 1995). O tempo de equilíbrio dos antagonistas também foi respeitado (20min para Pz, MURAMATSU et al., 1990, e 30min para BMY, GOETZ et al., 1995). Portanto, resta a hipótese de que o agonista esteja interagindo com uma população heterogênea de receptores.

De fato, em carótida de rato, os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos ocorrem em dois subtipos:  $\alpha_{1A}$ - e  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores (de OLIVEIRA et al., 1998). Esses subtipos estão presentes na musculatura vascular, enquanto que os  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptores também parecem ocorrer no endotélio (FILIPPI et al., 2001; de ANDRADE et al., 2006; VINCI et al., 2007).

Na resposta de relaxamento induzida por Phe, tanto Pz quanto BMY produziram um antagonismo não-superável, e uma reta com *slope* menor que a unidade na análise de Schild. Quando a inclinação da reta de Schild é menor que um, sugere-se a ocorrência de cooperativismo negativo (KENAKIN, 1997), onde o agonista atua em outro(s) receptor(es), produzindo uma resposta moduladora inibitória da resposta observada pela ativação dos receptores antagonizados.

No caso do Pz, o antagonismo nos receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos, tanto musculares quanto endoteliais, poderia estar deslocando a Phe para os receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos musculares, de onde o agonista deslocaria o antagonista, produzindo contração. Como o antagonista parece ter maior afinidade aos receptores endoteliais, mesmo diante do aumento da concentração do agonista, não haveria deslocamento suficiente do antagonista desses receptores no endotélio, paralelamente a um deslocamento suficiente do agonista para os receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos musculares, e um deslocamento do antagonista dos receptores  $\alpha_{1A}$ - e  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos musculares pelo agonista. Esses eventos, somados, poderiam estar contribuindo com uma elevação na concentração de  $Ca^{++}$  das fibras musculares, pela ativação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos musculares, que por sua vez, poderia estar modulando negativamente e impedindo a observação do relaxamento induzido por Phe, e, então, produzindo um antagonismo não-superável.

Em relação ao BMY, na resposta de relaxamento, o antagonismo nos receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos musculares e endoteliais, poderia estar deslocando a Phe para os receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos musculares, que produzem contração. O aumento da concentração do agonista seria suficiente apenas para deslocar o antagonista dos receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos musculares, para os quais o antagonista parece ter maior afinidade. Tanto o deslocamento do antagonista dos receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos musculares, quanto o deslocamento do agonista para os receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos musculares, produziria elevações significativas na concentração de  $Ca^{++}$  das fibras musculares, modulando negativamente e impedindo a observação do relaxamento induzido por Phe, e, então, produzindo um antagonismo não-superável.

No caso do Pz para a resposta de contração, foi observado um antagonismo superável que produziu uma reta com *slope* maior que a unidade na análise de Schild, sugerindo a ocorrência de cooperativismo positivo (KENAKIN, 1997), onde o agonista pode

estar atuando em outro(s) receptor(es) que produzem uma resposta moduladora positiva da resposta observada pelo agonista sobre o receptor antagonizado. O antagonismo nos receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos endoteliais pelo Pz, que parece ter maior afinidade por esses receptores do que por seus correspondentes musculares, estaria abolindo o efeito modulador negativo do relaxamento adrenérgico sobre a contração adrenérgica, o que por si só, já favorece o cooperativismo positivo. Mesmo diante do antagonismo sobre os receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos musculares, a contração estaria sendo mantida pela ativação dos receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos musculares, dos quais o antagonista estaria sendo deslocado pelo aumento da concentração do agonista, e potencializada pela perda do relaxamento modulador inibitório, o que justificaria a recuperação do efeito máximo de contração pelo aumento da concentração do agonista, mesmo diante do antagonismo dos receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos musculares, que são os principais mediadores da contração adrenérgica em carótida (de OLIVEIRA et al., 1998). O aumento na concentração de Phe poderia ainda estar deslocando o antagonista dos receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos musculares, favorecendo o cooperativismo positivo.

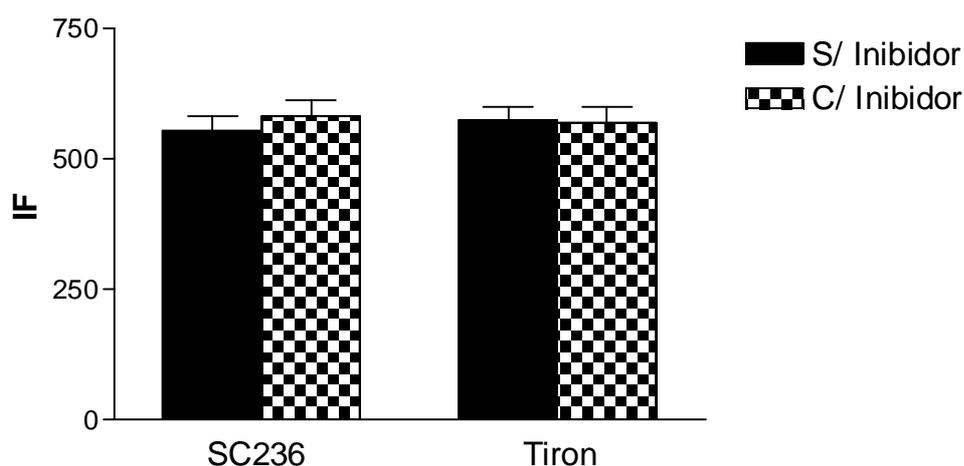
Para o BMY na resposta de contração induzida por Phe em carótida de rato, foi observado um antagonismo superável, que produziu uma reta com *slope* próximo da unidade na análise de Schild, sugerindo a ocorrência de antagonismo competitivo (SCHILD, 1947). Nesse caso, o antagonismo em receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos endoteliais e musculares deslocaria o agonista para os receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos musculares, mantendo a contração. O aumento da concentração do agonista estaria favorecendo o deslocamento do antagonista dos receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos musculares, pelos quais o antagonista parece apresentar menor afinidade do que aos seus correspondentes endoteliais.

## APÊNDICE F – Determinação da intensidade de fluorescência basal de células endoteliais em presença de inibidores e scavengers

A intensidade de fluorescência utilizada nos estudos de citometria de fluxo é a diferença entre a intensidade de fluorescência emitida pelas células marcadas com a sonda fluorescente pela intensidade de fluorescência basal dessas células. Inibidores enzimáticos e scavengers utilizados nesses estudos não podem interferir na intensidade de fluorescência basal das células, para não afetar os resultados com a marcação.

Para verificar se os inibidores e scavengers utilizados nos protocolos de citometria alteram a intensidade de fluorescência basal, foram feitas leituras de células não-marcadas em ausência e presença dessas drogas.

Os resultados mostram que tanto o inibidor seletivo de COX-2 SC236, quanto o scavenger seletivo de ânion  $O_2^-$  tiron (apêndices 1F e 2F), não alteraram a intensidade de fluorescência basal emitida pelas células, possibilitando sua utilização nesses estudos.



**Apêndice 1F. Intensidade de fluorescência basal de células endoteliais de artérias carótidas controle em ausência e presença de inibidores.** A figura representa a intensidade de fluorescência (IF) emitida pelas células não-marcadas, em ausência e presença de SC 236 ou tiron. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

| <b>Grupos</b>   | <b>SC 236</b>  | <b>Tiron</b>   |
|-----------------|----------------|----------------|
| <b>Ausência</b> | 553,33 ± 27,45 | 581,67 ± 30,31 |
| <b>Presença</b> | 572,15 ± 27,45 | 567,23 ± 31,41 |

**Apêndice 2F. Intensidade de fluorescência basal de células endoteliais de artérias carótidas controle em ausência e presença de inibidores.** A tabela representa a intensidade de fluorescência (IF) emitida pelas células não-marcadas, em ausência e presença de SC 236 ou tiron. Os dados representam a média ± EPM (n = 5). ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls

# 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](#)