Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em

aorta de ratos

Jhuli Keli Angeli

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

(Fisiologia Cardiovascular)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, 2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em

aorta de ratos

Jhuli Keli Angeli

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas-Fisiologia Cardiovascular

Apresentação:

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo- UFES

(Orientador)

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

Prof.^a Dr.^a Ivanita Stefanon- UFES

Coordenador do PPGCF: _____

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, 2009

Oração da serenidade

"Concedei-nos, Senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que não podemos modificar coragem para modificar aquelas que podemos e sabedoria para distinguir umas das outras".

Dedico este trabalho à minha Mãe, ao Kleyser e aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força espiritual, pelo suporte nos momentos difíceis e por todas as pessoas iluminadas que pôs em meu caminho, tornando-o mais claro diante das dificuldades.

A minha família, meu alicerce. A minha Mãe, meu exemplo de determinação, coragem, persistência e acima de tudo de amor e respeito. Aos meus irmãos, amigos e companheiros, que sempre me mostram que a vida quando vivida de maneira mais simples é mais divertida...

Ao Kleyser, pelo apoio, carinho, incentivo e por sempre participar da minha vida. Obrigada por compreender as horas de ausência, e por sempre me acolher em seus braços com palavras de carinho e apoio nas horas de incertezas e angustias.

Ao Dalton (Chefe) pela orientação, sabedoria e dedicação, imprescindíveis para a realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, incentivos, conselhos científicos e pessoais e, acima de tudo, por toda paciência.

A Profa. Dr Ivanita, por todo carinho e atenção, obrigada por sempre estar disposta a nos ajudar. Além disso, obrigada por aceitar fazer parte da banca examinadora deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Diogo por aceitar fazer parte da banca examinadora. E aos seus alunos Emerson André Casali e Cristina Ribas Fürstenau pela realização dos experimentos de bioquímica.

Aos amigos do LEMC pelo apoio, convivência, discussões científicas e também pela amizade: Thaís, Fabiana, Nubia, Jonaina, Eduardo, Edna, Maila, Bruna, Mirian, Alessandra, Priscila, Karina, Rogério e todos.

Ao Eduardo por ter me ensinado a técnica de preparação de aorta e também sempre me ajudar com as soluções de nucleotídeos.

A Thaís pelo companheirismo, conselhos, discussões experimentais e acima de tudo pela amizade construída ao longo desse tempo. Obrigada pelo agradável convívio, minha amiga.

SUMÁRIO

Resumo		.14
Abstract		
1. INTRO	DUÇÃO	.18
1.1.	O Gadolínio	18
1.2.	Nucleosideos trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) e ecto-5' nucleotidase	20
1.3.	Adenosina e o sistema vascular	23
1.4.	O Endotélio Vascular	25
1.4.1	1. Fatores vasoconstrictores derivados do endotélio	27
1.4.2	2. Espécies reativas de oxigênio	30
1.4.3	3. Fatores vasodilatadores derivados do endotélio	32
2.OBJET	IVOS	41
3. MATE	RIAIS E MÉTODOS	43
3.1. Ar	nimais Experimentais	43
3.2. Me	etodologia Empregada para Estudo de Reatividade em Anéis Isolados de Aorta de	
Rato		43
3.2.1	1. Obtenção dos Anéis de Aorta	43
3.3. Pr	otocolos Experimentais para a Realização da Metodologia de Anéis Isolados de Aor	<i>ta.</i> 45
3.3.1	1. Avaliação da Reatividade Vascular ao Cloreto de Potássio (KCl)	45
3.3.2	2 Avaliação da Integridade Funcional do Endotélio	46
3.4. Pr	otocolos Experimentais para este Estudo	47
3.4.1 Vaso	1. Efeito da Administração Aguda de Cloreto de Gadolínio (Gd _, 3μM) sobre a Respos oconstrictora à Fenilefrina	sta 48
3.4.2 Resj	2. Estudo dos Possíveis Fatores Endoteliais Envolvidos no Efeito do Gd (3μM) sobre posta à Fenilefrina na Aorta	• a 48
3.4.3	3. Avaliação Indireta da Produção Basal de Óxido Nítrico	49
3.4.4 na P	4. Papel dos Canais para Potássio sobre a Resposta Contrátil Induzida pela Fenilefri Presença do Cloreto de Gadolínio	i na 50
3.4.5 ATP	5. Análise do Efeito de 8-p-Sulfophenyl Theophylline Hydrate, 8-SPT, na Presença d na Resposta Contrátil à Fenilefrina	' e 50
3.4.6 Cont	δ. Envolvimento da Angiotensina II Local sobre o Efeito de 3μM de Gd na Resposta trátil à Fenilefrina	51
3.4.7 Feni	7. Papel do Cálcio Intracelular e Extracelular sobre a Resposta Contrátil Induzida pel lefrina na Presença do Gd	<i>la</i> 51
3.4.8 Gd	3. Realização de Pré-contrações com Fenilefrina Seguida de Incubações com ATP e	; 52
3.5. Me	etodologia Empregada para Análise Bioquímica	53
3.5.1	1. Medida da capacidade do gadolínio em bloquear as NTPDases	53
3.5.2	2. Análise dos Níveis de Purinas por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)	.54
3.6. Ex	pressão dos Dados e Análise Estatística	55
3.7. Dr	ogas e Reagentes Utilizados	56

4. RESULTADOS	59
4.1. Efeito da Administração Aguda de Cloreto de Gadolínio (Gd _, 3μM) sobre a Resposta Vasoconstrictora à Fenilefrina	59
4.2. Papel do cálcio Intracelular e Extracelular sobre a Resposta Contrátil Induzida pela Fenilefrina na Presença do Gd	61
4.3. Realização de Pré-contrações com Fenilefrina Seguida de Incubações com ATP e Gd	63
4.4. Avaliação Indireta da Produção Basal de Óxido Nítrico	64
4.5. Papel dos Canais para Potássio sobre a Resposta Contrátil Induzida pela Fenilefrina na Presença do Gd	∍ 66
4.6. Medida da capacidade do gadolínio em bloquear as NTPDases	68
4.7. Análise do Efeito de 8-p-Sulfophenyl Theophylline Hydrate, 8-SPT, na Presença de ATI na Resposta Contrátil à Fenilefrina	Р 70
4.8. Análise dos níveis de purinas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)	72
4.9. Envolvimento da Angiotensina II Local sobre o Efeito de 3μM de Gd na Resposta Contrátil à Fenilefrina	74
5. DISCUSSÃO	78
6 – CONCLUSÕES	88
7- PERSPECTIVAS	1
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXO I	1

LISTA DE TABELA

LISTA DE FIGURAS

Figura 4: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular *"in vitro"*. Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems* (modificado Dias, 2007)......45.

Figura 5: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCI e avaliação da integridade funcional do endotélio. **Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCI: A)** Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 gramas); **B)** Adição de KCI (75 mM) ao banho; **C)** Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; **D)** Período de estabilização (30 min); **E)** Adição de KCI (75 mM) ao banho; **F)** Platô da contração induzida pelo KCI (75 mM); **G)** Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; **H)** Período de estabilização (30 min). **Avaliação da integridade funcional do endotélio: I)** Pré-contração com fenilefrina (Fe) 10⁻⁷ M; **J)** Platô da contração induzida pela Fe; **L)** Adição de acetilcolina (ACh) 10⁻⁵ M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (Dias, 2007)......47.

Figura 7: Curva concentração-resposta à fenilefrina (FE) em anéis controles (Ct) e após incubação por 30 min. com gadolínio (Gd). Os resultados são expressos como média +/- EPM. A análise foi realizada através do Teste *t* não pareado para comparações de Rmax e pD₂; *p<0,05 Ct *vs* Gd......60.

Figura 8: Curva concentração resposta à fenilefrina na ausência endotelial (E-). Controle (Ct) e após incubação por 30 min. com gadolínio (Gd). Os resultados são expressos como média +/- EPM. A análise foi realizada através do Teste t não pareado para comparações de Rmax e pD2; p>0,05 Ct vs Gd.......60.

Figura 10: Anéis pré-contraídos com FE (10^{-7} M) e posterior administração de 1mM de ATP provocando relaxamento , antes (ATP) e depois da incubação com gadolínio (ATP + Gd) . Os resultados são expressos como média +/- EPM. A análise foi realizada através do Teste *t* não pareado para comparações; *p<0,05 ATP + Gd *vs* ATP......63.

Figura 11: Curva concentração-resposta à fenilefrina, nas condições Controle (Ct), após incubação por 40 min. com L-NAME, após incubação conjunta gadolínio (Gd) e L-NAME+Gd. Os resultados são expressos como média +/-EPM. A análise estatística foi realizada através ANOVA 1 via seguida de teste Fisher's LSD (Protected t-Tests). pD₂: CT vs L-Name +Gd , CT vs L-Name e L-Name vs L-Name +Gd p > 0.05. R_{max} . CT vs L-NAME e CT vs L-NAME+Gd. *p < 0.05 ; L-NAME vs L-NAME+Gd p > 0.05.....65

Figura 12: Curva concentração resposta à fenilefrina, controle (Ct), após incubação por 30 min. com gadolínio (Gd), após incubação 45 min. com tetraetilamônio (TEA) e após incubação conjunta gadolínio e TEA (TEA+Gd). Os resultados são expressos como média +/- EPM. A análise estatística foi realizada através ANOVA 1 via seguida de teste Fisher's LSD (Protected t-Tests). pD_2 : CT *vs* TEA , CT *vs* TEA+Gd, CT *vs* Gd, TEA *vs* TEA+Gd, TEA *vs* Gd, TEA+Gd *vs* Gd p> 0.05. R_{max}: Gd *vs* TEA, Gd *vs* TEA + Gd, TEA *vs* TEA + Gd p> 0.05; Ct *vs* Gd, Ct *vs* TEA, Ct *vs* TEA + Gd *p < 0.05........67.

Figura 13: Efeito de 75 ou 100 μ M de cloreto de gadolínio sobre a hidrólise do ATP (A) e ADP (B) em preparação de aorta. Resultados são expressos como média +/- EPM dos três experimentos independentes. C, controle (ausência de cloreto de gadolinio). C *vs* atividade enzimática (GdCl₃) p* < 0.05.......69.

Figura 14: Curva concentração resposta à fenilefrina, controle (Ct), após incubação com ATP, 8-SPT e incubação conjunta gadolínio e ATP e 8-SPT. Os resultados são expressos como média +/- EPM. A análise estatística foi realizada através ANOVA 1 via seguida de teste Fisher's LSD (Protected t-Tests). pD₂: CT *vs* ATP, CT *vs* ATP+ 8-SPT, CT *vs* 8-SPT, ATP *vs* ATP+ 8-SPT, ATP *vs* 8-SPT, ATP + 8-SPT, *xs* 8-SPT *p*> 0.05. R_{max} : CT *vs* 8-SPT , ATP *vs* 8-SPT, ATP + 8-SPT *vs* 8-SPT *p*> 0.05; ATP *vs* 8-SPT ; CT *vs* ATP ; CT *vs* 8-SPT *ys* 8-SPT

Figura 15: Curva concentração resposta à fenilefrina, controle (Ct), após incubação por 30 min. com gadolínio (Gd), após incubação com enalapril e após incubação conjunta enalapril+Gd. Os resultados são expressos como média +/- EPM. A análise estatística foi realizada através ANOVA 1 via seguida de teste Fisher's LSD (Protected t-Tests). pD_2 : Ct *vs* Gd, Ct *vs* Enalapril, Ct *vs* Enalapril + Gd, Gd *vs* Enalapril, Gd *vs* Enalapril+Gd, Enalapril *vs* Enalapril + Gd p> 0.05. R_{max}: Ct vs Enalapril, Ct vs Enalapril + Gd, , Enalapril vs Enalapril + Gd p> 0.05; Ct *vs* Gd, , Gd vs Enalapril , Gd vs Enalapril + Gd, *p < 0.05...76.

Figura 16: Curva concentração resposta à fenilefrina, controle (Ct), após incubação por 30 min. com gadolínio (Gd), após incubação Losartan e após incubação conjunta Losartan+Gd. Os resultados são expressos como média +/-EPM. A análise estatística foi realizada através ANOVA 1 via seguida de teste Fisher's LSD (Protected t-Tests). pD_2 : Ct vs Gd, Ct vs Losartan, Ct vs Losartan + Gd, Gd vs Losartan, Gd vs Losartan +Gd, Losartan I vs Losartan + Gd p> 0.05. R_{max} ; Ct vs Losartan, Ct vs Losartan + Gd, S vs Losartan, Ct vs Losartan + Gd, p> 0.05; Ct vs Gd, Gd vs Losartan, Gd vs Losartan + Gd *p < 0.05......76.

RESUMO

Resumo

Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em aorta de ratos

Introdução: O Gadolínio (Gd), na concentração de 3µM, usado *"in vitro"* inibe de forma eficiente a atividade das NTPDases e, dessa maneira, é capaz de bloquear a hidrólise intracelular e extracelular do ATP e ADP. A partir da hidrólise destes nucleotídeos à formação de adenosina, potente vasodilatador. A adenosina é um nuclesídeo endógeno envolvido na modulação de várias funções fisiológicas, incluindo o tônus vascular.

Objetivo: Investigar se o bloqueio da atividade das NTPDases com Gd afeta a reatividade vascular.

Materiais e Métodos: Foram utilizados anéis isolados de aorta de ratos Wistar (250 à 290g). A reatividade vascular foi analisada através de curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE,10⁻¹⁰ a 10⁻⁴ M), na presença de 3µM Gd, 100µM L-NAME, 1mM ATP, 50µM 8-SPT, 5mM TEA, 10µM losartan, 10µM enalapril. A reatividade também foi avaliada na ausência do endotélio vascular. Também foi avaliada a resposta a 1mM de ATP depois da pré-contração com 10⁻⁴ M de FE e o papel do cálcio intracelular e extracelular sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina na presença do Gd. A atividade das NTPDases foi mensurada em preparação de aorta usando Gd (75 e 100 µM). Os níveis de purinas no banho foram quantificados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Os dados estão expressos como média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado o teste-t de Student não pareado e ANOVA 1 via seguido pelo teste de Fisher's LSD (Protected t-test).

Resultados: Gd aumentou a resposta máxima (Rmax., 71.28 ± 2.73 para 101.4 ± 6.40%) e a sensibilidade, pD₂(6.69 ± 0.10 para 10.14 ± 2.41) sendo essa resposta abolida com a retirada do endotélio. A reatividade foi aumentada após incubação com L-NAME. Porém não houve diferença significante entre as curvas L-NAME e L-NAME + Gd e entre as curvas TEA e TEA+Gd. O ATP reduziu o Rmax. (Ct, 70.33 ± 3,64 para ATP, 32.16 ± 7,17 %) mas não alterou o pD₂. A Rmax. foi alterada entre as curvas ATP e ATP+ 8-SPT (32.16 ± 7,17 para 36.98 ± 6.15 %) respectivamente.Os efeitos do grupo enalapril e losartan mostraram resultados semelhantes, sendo a resposta inalterada tanto na pD₂ quanto na Rmax. Entre os grupos estudados (Losartan + Gd vs Gd e Enalapril + Gd vs Gd). A atividade das NTPDases foi inibida com 75 μ M de Gd (hidrólise do ATP) e 100 μ M Gd (hidrólise do ATP e ADP) em homogenato de aorta. Na análise dos níveis de purinas não ocorre aumento significativo de adenosina e ADP. Entretanto os níveis de ATP mostraram-se aumentado comparados aos grupos ATP (291.75 ± 53.75 nmol/ml) e ATP+Gd (666.25± 5.25 nmol/ml).

Conclusões:Os resultados presentes neste trabalho demonstram que em vasos de condutância, como a aorta, o Gd provoca aumento da reatividade vascular à FE,de maneira endotélio dependente. Além disso, comprovou-se a eficiência do Gd como inibidor da NTPDases. Este achado é reforçado pela ação vasodilatadora do ATP está aumentada depois do tratamento com Gd. O efeito vasoconstrictor do Gd não parece estar relacionado nem com o bloqueio da produção de NO, nem com ativação de canais para potássio e nem com inibição da produção de adenosina. Entretanto essa ação de aumento da resposta vascular endotélio dependente, ocasionada pelo uso de 3µM de Gd, envolve estimulação da ECA e dos receptores de angiotensina II, AT1.

ABSTRACT

Abstract

Gadolinium increases the reactivity of rat aortic rings.

Introduction: Gadolinium (Gd) at a concentration of 3 μ M, *"in vitro"*, efficiently inhibits the activity of NTPDases and thus it is able to block the intracellular and extracellular hydrolysis of ATP and ADP. The hydrolysis of these nucleotides geration of adenosine, a potent vasodilator. Adenosine, an endogenous nucleside, involved in the modulation of various physiological functions including vascular tone.

Objective: To investigate whether blocking activity of NTPDases with Gd affects vascular reactivity.

Materials and Methods: We used isolated aortic rings of Wistar rats (250 to 290g). Vascular reactivity was analyzed by concentration-response curves to phenylephrine (PHE 10^{-10} to 10^{-4} M) in the presence of 3µM Gd, 100 µM L-NAME, 1mM ATP, 50µM 8-SPT, 5 mM TEA, 10µM losartan, enalapril 10µM. The reactivity was also assessed in the absence of endothelium. We also analyzed the response to 1 mM ATP after precontraction with 10^{-4} M PHE and the role of intracellular and extracellular calcium on the contractile response induced by phenylephrine in the presence of Gd. The activity of NTPDases was measured in aortic rings 75 µM and 100 µM. Data are presented as mean \pm SEM. For statistical analysis we used Student t-test for unpaired and 1-way ANOVA followed by the Fisher's LSD (Protected t-test).

Results: Gd increased the maximum response (Rmax., 71.28 ± 2.73 to 101.4 ± 6.40%) and sensitivity, pD2 (6.69 ± 0.10 to 10:14 ± 2.41) and this response abolished with the endothelium removal. The reactivity was increased by treatment with L-NAME. But there was no significant difference between the curves L-NAME and L-NAME Gd and between the curves TEA and TEA + Gd. ATP reduced the Rmax. (Ct, 70.33 ± 3.64 for ATP, 32.16 ± 7.17 %) but did not alter pD2. Rmax. changed between the curves wile ATP and ATP 8-SPT (32.16 ± 7.17 to 36.98 ± 6.15 %) respectively. The effects of enalapril and losartan showed similar results, and the response unchanged in both the pD2 and in Rmax. Among the groups (losartan vs. Gd-Gd and Gd vs Enalapril Gd). Activity of NTPDases (hydrolysis of ATP) was inhibited with 75 μ M and 100 μ M Gd (hydrolysis of ATP and ADP) in homogenate of aorta. In the analysis of levels of purine no significant increase in adenosine and ADP occurred. However the levels of ATP were shown to be increased between groups ATP (291.75 ± 53.75) nmoles/mL and ATP+Gd (666.25 ± 5.25)nmoles/mL.

Conclusions: Results presented in this work show that in conductance vessels such as aorta, Gd increased vascular reactivity to PHE, being endothelium dependent. Moreover, the study proved the efficiency of Gd as an inhibitor of NTPDases. This finding is reinforced by the vasodilator action of ATP is increased after treatment with Gd. The vasoconstrictor effect of Gd could not be associated with either the blockade of NO production, nor the activation of potassium channels and not in inhibiting the production of adenosine. However this action of increased endothelium-dependent vascular reativity, caused by the use of Gd 3μ M, involves stimulation of ACE and angiotensin II receptor, AT1.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Gadolínio

O Gadolínio (Gd) é um cátion trivalente pertencente à família dos lantanídeos. Na concentração de 10µM, este metal interage bloqueando canais para cálcio sensíveis ao estiramento (SACs), e desse modo, inibe mecanismos fisiológicos (Hamill, *et al.*,1996 ; Morris., 1990 e Sachs., 1988) e fisiopatológicos (Ray *et al.*, 1998). Como exemplos desses mecanismos podem ser destacados, respostas às perturbações mecânicas de volume celular, aumento intracelular de cálcio, proliferação celular, expressão gênica, síntese de RNA, atividade elétrica cardíaca e liberação de fator natriurético atrial (Hamill, *et al.*,1996). Sendo assim, o Gd atuando como inibidor dos SACs é amplamente utilizado como uma ferramenta de estudo para elucidação desses processos fisiológicos e fisiopatológicos (Ray *et al.*,1998).

Estudos recentes mostram que o Gd, quando administrado antes do início da isquemia, ou durante a isquemia, mas antes da reperfusão, possui efeitos cardioprotetores através da atenuação do miocárdio atordoado, sem aumentar a função contrátil normal (Nicolosi *et al.*, 2001, 2004). Os mecanismos envolvidos neste processo são multifatoriais, envolvendo janus quinase 2 (JAK-2), STAT-3, MAPKp42/44 e canais para potássio sensíveis ao ATP. Os efeitos do Gd neste caso estão relacionados com a redução da área de infarto e a interrupção de eventos fisiopatológicos que podem causar disfunção contrátil (Nicolosi *et al.*, 2008).

Atualmente o Gd, é também muito utilizado como um meio de contraste para ressonância magnética, na forma de "gadobenate dimeglumina" (Gd-bopta) sendo considerado um meio de contraste seguro (Klein *et al.*, 2008). Entretanto, assim como ocorre com os radiocontrastes iodados existe uma preocupação com a nefropatia contraste-induzida, visto que, o contraste de gadolínio possui propriedades

semelhantes aos radiocontrastes iodados, como por exemplo, hiperosmolaridade e excreção renal através da filtração glomerular. Adicionalmente, estudos recentes indicam a possibilidade de nefrotoxicidade devido ao uso desse contraste de Gd-bopta (Perazella, 2008).

Além disso, o Gd, usado de maneira complexada como contraste, Gd-DOTA (meglumine gadoterate), Gd-DTPA (dimeglumine gadopentetate), Gd-DTPA-BMA (gadodiamide) e Gd-HP-DO3A (gadoteridol) na concentração de 500 mmol/L pode promover transmetalação com metais ligados a metaloenzimas (Idée et al; 1997). Um desses processos conhecido é a transmetalação com a enzima conversora de angiotensina (ECA), que possui zinco em sua molécula, permitindo a transmetalação com o Gd. Tal mecanismo afeta a atividade dessa enzima, e nas concentrações terapêuticas utilizadas, o Gd inibe a atividade da ECA (Idée *et al*; 2006).

Outro aspecto que deve ser considerado dentre as diversas ações do Gd é seu papel como potente inibidor, na concentração de 3μM, das ecto-nucleosideos trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) em órgão elétrico de peixe *Torpedo marmorata* descrito por Escalada *et al.*, 2004. Essas enzimas são responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos e estão presentes em uma gama de processos fisiológicos que envolvem ATP, ADP, UTP, adenosina e outros nucleotídeos em diferentes sistemas, até então pouco estudados. Assim, o Gd torna-se mais uma vez, na concentração de 3μM, uma boa ferramenta de estudo para diversos mecanismos fisiológicos.

1.2. Nucleosideos trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) e ecto-5'

nucleotidase

NTPDases é um termo comum para designar um grupo de enzimas capazes de promover a hidrólise de nucleotídeos em seus respectivos nucleosídeos. Estas enzimas hidrolisam tanto o ATP como o ADP formando AMP, na presença de íons cálcio e magnésio (Chan *et al.*, 1986; Ziganshin *et al.*, 1994). O AMP é subseqüentemente convertido para adenosina pela ecto-5'-nucleotidase com a liberação de fosfatos orgânicos (Robson *et al.*,2006; Yegutkin G.G., 2008). Essas enzimas surgiram na literatura científica em 1945 quando Meyrhof descreveu enzimas capazes de hidrolisar o ATP em ADP e o ADP em AMP. A partir desse momento, as mesmas foram agrupadas em diversas famílias (Robson *et al.*, 2006) recebendo várias denominações, sendo as mais conhecidas, ATP difosfohidrolases, CD39 e apirases.

As NTPDases são amplamente distribuídas na natureza, sendo caracterizadas em plantas, parasitas, insetos e em vários tecidos e células de mamíferos, como por exemplo em córtex cerebral, linfócitos, células endoteliais e plaquetas (Battastini *et al.*, 1991; Sarkis *et al.*, 1995; Pilla *et al.*, 1996; Wang & Guidotti, 1996; Leal *et al.*, 2005). Nas últimas décadas, principalmente a partir da década de noventa, várias enzimas pertencentes a essa família foram descobertas, clonadas e funcionalmente caracterizadas (Robson *et al.*, 2006).

Estudos sobre a localização e o mecanismo de catálise das NTPDases, bem como as funções do ATP, ADP e AMP no metabolismo, mostram o envolvimento dessas enzimas na regulação dos níveis de nucleotídeos nas células e tecidos (Komoszynski, 1994). O ATP, ADP, adenosina e outros nucleotídeos e nucleosídeos

são encontrados em todos os órgãos e sistemas dos animais, sendo seus efeitos produzidos através de mecanismos intracelulares e extracelulares.

Os nucleotídeos extracelulares são importantes moléculas na regulação de diferentes processos biológicos em diferentes tecidos, incluindo importante neurotransmissão no sistema nervoso central (Ralevic *et al*, 1998 e Burnstock, 2007), efeitos inotrópicos, cronotrópicos e arritimogênicos no miocárdio (Vassort, 2001), regulação nas respostas das células epiteliais (Schwiebert *et al*, 2003 e Bucheimer *et al* 2004), controle da proliferação de células endoteliais, arritmia, hipertrofia cardíaca e apoptose (Ralevic e Burnstock, 2003), entre outros.

Além dessas ações, é importante destacar que o ATP extracelular pode exercer efeitos opostos dependendo de sua concentração e do tipo de receptor onde irá atuar. No sistema vascular, por exemplo, quando liberado como co-transmissor juntamente com a noradrenalina e/ou neuropeptídeo Y nos terminais nervosos perivasculares simpáticos, o ATP, na maioria das vezes, se liga aos receptores P2X (ionotrópico) das células do músculo liso vascular, promovendo vasoconstricção. Entretanto, quando o mesmo é liberado no lúmen dos vasos, por diferentes mecanismo ou estímulos, como ocorre em situações de hipóxia ou estresse de cisalhamento, o ATP, na maioria das vezes, liga-se aos receptores P2Y (metabotrópico) desencadeando vasodilatação através da liberação de NO (Ralevic e Burnstock, 2003; David e Burnstock, 2008; Burnstock, 2008). Quando esses nucleotídeos são liberados, seja dos terminais nervosos ou do lúmen vascular, juntamente com estes são liberadas NTPDases para que ocorra a hidrólise e consegüente inativação dos mesmos (Yegutkin, 2008). Como citadas anteriormente, várias enzimas tem sido descobertas clonadas e caracterizadas como pertencentes a essa grande família.

Atualmente, sabe-se que essas enzimas localizam-se na membrana celular tendo seu sítio ativo voltado para o lado extracelular (Ecto-nucleotidases ou E-nucleotidases) ou intracelular (endo-nucleotidases). Sendo assim, possuem vários subtipos que se diferenciam na localização celular e propriedades funcionais como, por exemplo, a hidrólise dos substratos (Simon *et al*, 2006).

Os subtipos mais importantes são NTPDases 1,2,3,8 que são ectonucleotidases e as NTPDases 4,5,6, 7 que são as endo-nucleotidases. Desses subtipos enzimáticos as NTPDases 1 possuem maior expressão no sistema vascular (Enjyoji K et al., 1999) e hidrolisam tanto ATP quanto ADP com sensibilidade semelhante, sendo portanto as de maior importância nesse sistema. Outro possível subtipo que possui uma pequena expressão nas células musculares lisas, são as NTPDases 2 (Burnstock, 2008) e possuem alta preferência pelo ATP, sendo denominadas também como ecto-ATPases (Zimmermann, 2001 ; Kukulski *et al* 2005). Presumivelmente, as diferenças entre esses subtipos enzimáticos ocorrem no seqüenciamento genético, mas também nas estruturas secundárias, terciárias e quaternárias dessas enzimas caracterizando essas propriedades catalíticas (Heine *et al*, 2001, Grinthal *et al*, 2004).

Juntamente com as ecto-NTPDases, outras enzimas são responsáveis pela inativação desses nucleotídios, como por exemplo, a ecto-5'-nucleotidase que converte o AMP em adenosina e a adenosina desaminase que converte a adenosina em inosina (Yegutkin, 2008), entre outras, até que ocorra a completa hidrólise dos nucleotídeos como representadas na figura abaixo:



Figura 1: Representação da inativação dos nucleotídios na superfície da membrana. A hidrólise dos nucleotídios compreende a cascata que inclui três ectoenzimas as E-NPP, E-NTPDase e ecto-5'-nucleotidase. (Ado) adenosine, (Ino) inosina, (Hyp) hipoxantina. Esta figura possui outros mecanismos de inativação dos nucleotídios para formação de adenosina, porém outros nucleotídios são relatados como substrados para essas enzimas. (Yegutkin, 2008)

1.3. Adenosina e o sistema vascular

A adenosina é um nucleosídeo endógeno envolvido na modulação de várias funções fisiológicas (Shryock & Belardinelli, 1997; Hourani *et al.*, 2001; Bolli, 2007), incluindo o tônus vascular (Ralevic & Burnstock.; 1998; Prentice *et al.*,1997). É liberada tanto em condições fisiológicas quanto fisiopatológicas, tendo suas ações direcionadas para determinados órgãos e tecidos (Pelleg, 1993).

A adenosina, que possui ações vasodilatadoras, pode induzir o relaxamento do vaso, agindo diretamente no músculo liso vascular (Pearl, 1994). Apesar disso, estudos têm demonstrado a existência de receptores para adenosina localizada nas células endoteliais que poderiam estar envolvidos

neste processo (Iwamoto *et al.;* 1994). Além disso, esse nucleosídeo apresenta um importante papel na regulação do fluxo coronariano, sendo essa regulação mediada por receptores acoplados à proteína G_s com subseqüente ativação da adenilato ciclase (Makujiina et al., 1992) e conseqüente vasodilatação. A adenosina também é liberada no espaço extracelular sob condições de hipóxia ou isquemia associada a alterações no suplemento e demanda de oxigênio pelo miocárdio (Pellege, 1993). A importância dessas ações sobre o fluxo e a função vascular pode ser avaliada em várias condições de prejuízo circulatório, como por exemplo, a elevação, de até quatro vezes, da concentração de adenosina no sangue venoso mesentérico após uma breve oclusão arterial (Goto M *et al.*,1996).

A adenosina atua nos receptores purinérgicos do tipo P1, que possui quatro subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Sua expressão e localização diferenciam-se nos tecidos (Marshall e Ray, 2006). Após a interação deste nucleosídeo com seus receptores, os efeitos vasculares podem ser vasodilatadores ou vasoconstrictores, dependendo do subtipo e localização do receptor. Nas artérias coronárias, por exemplo, a vasodilatação é causada primariamente por receptores A_{2A} (Belardinelli *et al.*, 1998). Já o relaxamento produzido na aorta de camundongo é predominantemente via receptor A_{2B} (Talukder *et al*, 2002).

Aparentemente, existe uma co-expressão de receptores de subtipos diferentes tanto nos leitos vasculares da coronária quanto de aorta (Sato *et al.*, 2001), sendo que estes estão localizados no músculo liso e também no endotélio vascular (Martin & Potts, 1994). O mecanismo de ação após a ligação da adenosina aos seus receptores depende da localização destes, sabe-se que esses receptores podem atuar de maneiras diferentes. Por exemplo, os

receptores A_{2A} e A_{2B} nas células musculares lisas são acoplados a proteína Gs estimulando a adenilato ciclase (AC) promovendo vasodilatação, ao contrário, os receptores A_1 e A_3 , também localizados nessas células, estão acoplados a proteína Gi inibindo a AC (Burnstock, 2008). Entretanto, no endotélio vascular os receptores A_1 e A_{2A} , promovem uma vasodilatação indireta através do estímulo à liberação de NO (Hourani *et al.*, 2001; Lynch *et al*, 2005; Marshall e Ray, 2006).

Diante do exposto acima é possível notar a importância da sinalização purinérgica, como um fator extrínseco no controle do fluxo sanguíneo. Além disso, é possível perceber o envolvimento dos produtos de hidrólise dessa via enzimática, nucleotídeos e nucleosideos, no sistema vascular, sendo assim faz-se necessário uma descrição mais pormenorizada das funções endoteliais.

1.4. O Endotélio Vascular

O endotélio vascular, formado por epitélio pavimentoso simples. Durante muito tempo foi considerado uma simples barreira entre o sangue e a camada média do músculo liso vascular. Entretanto, essa monocamada representa um tecido com propriedades sintéticas e metabólicas, podendo atuar como sensor de alterações hemodinâmicas; transmitir sinais que recebe de células e da matriz extracelular; produzir mediadores que interferem com crescimento, atividade, migração e morte de células; manter as alterações adaptativas para a adequação às necessidades circulatórias (Carvalho *et al.*, 2001).

O endotélio possui múltiplas funções, tanto em eventos fisiológicos como fisiopatológicos, respondendo a estímulos físicos e químicos, e liberando fatores vasoconstrictores ou vasodilatadores (Vanhoutte, 2009). Sua principal

função é a manutenção do tônus, controlando a contração e o relaxamento do músculo liso subjacente através da síntese/liberação equilibrada desses fatores que ao atuarem no músculo liso, o relaxam (vasodilatadores) ou o contraem (vasoconstrictores) mantendo assim a homeostasia do sistema. Essa regulação é primordial para manutenção da pressão sanguínea normal e, conseqüentemente, da perfusão tecidual.

Os principais fatores capazes de promover o relaxamento do músculo liso vascular são a prostaciclina (PGI₂) (Moncada *et al.*, 1977), o NO (Furchgott & Zawadski, 1980, Palmer *et al.*, 1987) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Felotou &Vanhoutte, 1988). Já entre os principais fatores que promovem a contração do músculo liso vascular estão a angiotensina II (Kifor & Dzau, 1987), endotelina-1 (Yanagiswa *et al.*, 1988), metabólitos derivados da via do ácido araquidônico, como tromboxano A₂ (TXA₂), prostaglandinas H₂ e $F_{2\alpha}$ (PGH₂ e PGF_{2\alpha}) (Frolich & Forstermann, 1989, Vanhoutte, 1993) e o ânion superóxido (O₂⁻) (Schiffrin, 2001; Maturana *et al.*, 2007).

As células endoteliais, ainda secretam mediadores vasodilatadores em resposta a substâncias liberadas a partir de nervos autônomicos e sensitivos (Acetilcolina, norepinefrina, ATP, substância P), hormônios circulantes (catecolaminas, vasopressina, insulina), derivados da coagulação e produtos plaquetários (serotonina, ADP, trombina), ou autacóides produzidos pelo endotélio e célula do músculo liso vascular (Bradicinina, ADP / ATP / UDP) (Vanhoutte, 1999). Além disso, alterações no "Shear-stress" evidenciam uma vasodilatação dependente do endotélio e de fluxo (Scott-Burden & Vanhoutte, 1993).

1.4.1. Fatores vasoconstrictores derivados do endotélio

Os fatores vasoconstrictores sintetizados a partir do endotélio vascular são classificados basicamente em duas categorias:

Metabólitos do ácido araquidônico (PGH₂, TXA₂ e PGF_{2α});

2) Peptídios vasoativos (endotelina e angiotensina II);

1.4.1.1. Metabólitos do ácido araquidônico (PGH₂, TXA₂ e PGF_{2a})

O ácido araquidônico tem sua origem em fosfolipídios de membrana, sob ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), sendo liberado para o citosol. Uma vez liberado o ácido araquidônico é metabolizado pela enzima ciclooxigenase (COX) resultando na síntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano A₂. Existem duas isoformas da COX, a tipo 1 (COX-1) e tipo 2 (COX-2). A COX-1 é a isoforma constitutiva, expressada pela maioria dos tecidos, sintetiza pequenas quantidades de prostaglandinas (Smith *et al.*, 1996). A COX-2 é a isoforma induzida por estímulos pró-inflamatórios, citocinas, fatores mitogênicos e endotoxinas e tem expressão relacionada principalmente com processos inflamatórios (Wu, 1995; Antman *et al.*, 2005). As isoformas da COX convertem o ácido araquidônico em prostaglandina H₂ (PGH₂).

A prostaglandina G₂ (PGG₂), muito instável, sofre peroxidação dando origem a PGH₂. A PGH₂ atua diretamente em receptores específicos, acoplados a proteína G, na superfície da membrana das células musculares lisas promovendo uma vasoconstricção (Narumija et al., 1999). A PGH₂ é considerada precursora de todos os demais prostanóides, sendo estes vasoconstrictores ou vasodilatadores (Smith *et al.*, 1996).

A PGH₂ sob ação de enzimas específicas é convertida em

prostaglandinas E_2 (PGE₂), prostaglandinas I_2 (PGI₂), prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF_{2 α}) e prostaglandina D_2 (PGD₂) ou tromboxano A_2 (TXA₂) a origina o TXA₂ (Mardini & FitzGerald, 2001). Estes prostanóides atuam em receptores específicos para promoverem seus efeitos vasoconstrictores.

Em condições fisiológicas normais, os efeitos vasoconstrictores desses prostanóides são contrabalanceados pelo efeito vasorelaxante da PGI₂, NO e EDHF. Entretanto em condições, como por exemplo, hipertensão arterial e diabetes existe um aumento na expressão da COX-2 (Vanhoutte *et al.*, 2005) sugerindo um aumento na produção desses prostanóides e um conseqüente desequilíbrio da produção desses fatores.

1.4.1.2. Peptídios vasoativos (endotelina e angiotensina II)

Outro fator vasoconstrictor derivado das células endoteliais e musculares lisas é a endotelina (ET). ET é um polipeptídio vasoconstrictor que apresenta três isoformas conhecidas, a endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3), e exerce seus efeitos no músculo liso vascular através da interação com seus receptores específicos.

Os principais receptores de endotelina são o ET_A, ET_B e ET_C. A ativação desses receptores promove a despolarização da membrana plasmática culminando no aumento intracelular de cálcio e conseqüente contração vascular. A ET-1 é o mais potente vasoconstritor conhecido, tanto em vasos de maior calibre quanto na microcirculação (Tostes *et al.*, 2008; Abassi *et al.*, 2001). No entanto, em células endoteliais, a estimulação dos receptores ET_B induz vasodilatação através da produção de NO e PGI2 (Schiffrin, 2005).

Outra substância vasoconstrictora produzida pelos vasos é a

angiotensina II um octapeptídio derivado da proteína precursora do angiotensinogênio através da ação sequencial de várias enzimas (Álvarez *et al*, 2005). A angiotensina II possui diferentes ações biológicas, sendo suas principais atuações, o sistema renina angiotensina (SRA) (Marks *et al*,1996; Álvarez *et al*, 2004). Além disso, esse octapeptídeo pode ser produzido localmente em órgãos como rins, coração, cérebro, córtex adrenal e vasos sangüíneos (Bader et al., 2001; Lavoie & Sigmund, 2003).

A cascata de produção de angiotensina II é de forma cíclica, tendo seu inicio com a pré-pró-renina, peptídio não ativo que se transforma em pró-renina que sob ação da proteólise celular transforma-se em renina. A renina quando liberada age sobre o angiotensinogênio, precursor desta cadeia, que se transforma em angiotensina I. A angiotensina I, que também possui ação vasoconstrictora, sob a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) origina a angiotensina II, um potente vasoconstrictor capaz de estimular a liberação de catecolaminas das terminações nervosas, estimular a secreção de aldosterona, reduzir a diurese e natriurese e promover o crescimento do músculo liso vascular e do músculo cardíaco (Morishita et al., 1992; Yamazaki et al., 1996).

Outro aspecto a ser considerado é que a angiotensina II, através da ação da ECA 2, pode formar angiotensina 1-7 que possui efeitos opostos aos da angiotensina II (Ferreira & Santos, 2005; Sigmund, 2003).

Grande parte das ações exercidas no músculo liso vascular pela angiotensina II são através da estimulação dos receptores AT₁, acoplados a proteína G_s. Estes receptores têm sua expressão e multiplicação nos tecidos que incluem adrenal, rins, coração, pulmões, fígado, testículos, hipófise e

cérebro (Gasparo *et al.*, 2002). Além disso, possuem como principal mecanismo de ação a estimulação da hidrólise de PIP₂ (fosfatidil inositol 4,5bifosfato) pela fosfolipase C (PLC) formando trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ estimula a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático o que resulta na elevação dos níveis deste íon no meio intracelular promovendo a contração do músculo liso vascular. O DAG ativa a PKC que fosforila a bomba de Na⁺/K⁺, o trocador Na⁺/H⁺, Na⁺/Ca⁺⁺, aumentando a concentração de Na⁺ e Ca²⁺ intracelular culminando com vasoconstrição (Touyz & Schiffrin, 2000)

A angiotensina II, também pode atuar nos receptores AT₂ promovendo vasodilatação, estes receptores são expressos especialmente durante o desenvolvimento fetal, e o mecanismo pelo qual exercem suas ações esta relacionado à liberação de NO (Houriuchi *et al*., 1999). Além disso, a resposta à angiotensina II, após atuação nos receptores AT₂, pode estar envolvida na resposta inflamatória renal pela ativação de NFkB (Esteban *et al*., 2004).

Considerando o importante papel desses peptídeos no sistema cardiovascular, o bloqueio da formação da angiotensina II, assim como suas ações, por uso de antagonistas de receptores AT₁ ou inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA), por exemplo, tem sido amplamente usados no campo terapia cardiovascular (Gasparo et al, 2000), e também, de grande importância para elucidação de diferentes mecanismos biológicos.

1.4.2. Espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs), são partículas eletricamente instáveis com grande capacidade reativa. Devido a essa instabilidade, as EROs

são capazes de reagir com qualquer composto, independente de sua natureza química. O oxigênio tem a sua atividade fundamental no metabolismo celular aeróbico. Sendo, portanto, inevitável a formação de EROs pelo organismo. Também existem outras fontes geradoras de EROs como as xantinas oxidases, ciclooxigenases, lipooxigenses, NOS na falta de substratos ou co-fatores e pela NADPH oxidase (NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) (Mueller et al., 2005; Bedard & Krause, 2007; Koh et al., 2009). O adequado equilíbrio entre a geração e a inativação das EROs é necessário. Portanto, são dependentes do balanço entre o sistema oxidante e antioxidante (Soccio et al., 2005; Szasz et al., 2007). A produção de O2⁻ ocorre pela redução de um elétron do oxigênio molécular. O O2⁻ age como um agente oxidante, sendo reduzido a H₂O₂, ou age como agente redutor, doando o seu elétron extra ao NO para formar peroxinitrito (ONOO⁻) (Ellis & Triggle, 2003). Neste caso, haverá uma diminuição da biodisponibilidade de NO endotelial, diminuindo o seu efeito vasorrelaxante, somado ao próprio efeito vasoconstritor do O2-(Auch-Schwelk et al., 1989; Cosentino et al., 1994), além das conseqüências deletérias do ONOO⁻ (Beckman et al., 1994).

Dados na literatura indicam que, em condições patológicas, como na hipertensão arterial, a produção de NO é inalterada, porém sua biodisponibilidade é reduzida devido à inativação oxidativa resultante da excessiva produção de O_2^- na parede vascular (Kojda & Harrison, 1999).

1.4.3. Fatores vasodilatadores derivados do endotélio

1.4.3.1. Óxido Nítrico

Entre os diversos fatores produzidos pelo endotélio vascular, o óxido nítrico merece um papel de destaque. Em 1980, Furchgott e Zawadzki tiveram as primeiras evidências de que era necessária a presença do endotélio para promover o relaxamento de artérias isoladas em resposta à acetilcolina. A partir desse momento concluiu-se, que esse relaxamento dependente do endotélio era devido à liberação de uma substância vasodilatadora derivada do endotélio vascular, à qual denominaram fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Em 1987, Palmer e colaboradores, identificaram o EDRF como sendo o óxido nítrico (NO). O NO é um gás que se difunde facilmente pelas membranas celulares promovendo efeitos vasodilatadores. Além disso, possui ação inibitória sobre a agregação e adesão de plaquetas e leucócitos à superfície vascular e proliferação celular (Kubes *et al.*, 1991, Moncada *et al.*, 1991, Heller *et al.*, 1999).

O NO é sintetizado a partir de um átomo de nitrogênio do terminal da Larginina, o qual é convertido em L-citrulina por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Palmer *et al.*, 1987, Moncada *et al.*, 1991) esta reação tem como co-fatores, a nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (forma reduzida – NADPH), a tetrahidrobiopterina (BH₄), a adenina dinocleotídeo (FAD) e a flavina mononucletídio (FMN) por intermédio da NO – sintase (NOS) (Palmer *et al.*,1987; Angus & Cocks, 1989; Moncada *et al.*, 1991).

Existem três isoformas conhecidas da NOS, a NOS endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a NOS induzível (iNOS) (Forstemann *et al* ., 1994, 1994). A eNOS e nNOS são isoformas constitutivas e dependem da formação do complexo cálcio – calmodulina para serem ativadas (Long & Stone, 1985). Já a

iNOS é expressa principalmente em condições patológicas , como em processos inflamatórios, e sua ativação é independente do aumento das concentrações de cálcio intracelular (Xie *et al* .,1992).

A produção e liberação endotelial do NO, sob condições fisiológicas é estimulada por diversos fatores como: acetilcolina, bradicinina, trombina, ionóforo de cálcio (A23187), substância P, difosfato de adenosina (ADP), agregação plaquetária e também por estímulos físicos, como a força de cisalhamento (*shear stress*) (Palmer et al ., 1987; Moncada et al., 1991; Marin & Rodríguez - Martínez, 1997). Um exemplo é quando a adenosina interage com os receptores endoteliais A₁ e A_{2A} que ativam canais para potássio sensíveis ao ATP e sensíveis ao cálcio respectivamente, permitindo assim um efluxo de potássio hiperpolarizando a célula e reduzindo a entrada de cálcio para o meio intracelular. Este aumento intracelular de cálcio pode estimular diretamente a eNOS a liberar NO ou ainda ativar segundos mensageiros, dependendo do receptor, como a PLA₂, PGI₂ e PKA que, após uma cascata de reações, estimulam a eNOS liberando NO (Ray & Marshall , 2006). Este mecanismo pode ser observado na figura abaixo:



Figura 2: Diagrama mostrando os possíveis mecanismos pelos quais os receptores $A_1 e A_{2A}$ provocam liberação endotelial de NO. Os números em negrito na célula endotelial à esquerda (1-9) e as letras em negrito na célula endotelial à direita (A-G) respectivamente, representam a possível ordem de eventos proposta para os receptores $A_1 e A_{2A}$ estimularem a liberação de NO (Ray & Marshall, 2006).

Uma vez sintetizado, pelas células endoteliais, o NO se difunde rapidamente para o músculo liso vascular e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel que converte o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMP_c) (Carvajal *et al.*, 2000) Este, por sua vez, estimula a quinase dependente de GMP cíclico (PKG) que por diversos mecanismos promove um relaxamento da musculatura lisa vascular (Rapopport & Murod, 1983; Ignarro & Kadowitz, 1985). A PKG ativa canais de K⁺ dependentes de Ca²⁺ que inibem a entrada de Ca²⁺ do conteúdo extracelular pelos canais para cálcio dependentes de voltagem, hiperpolarizando a membrana e promovendo o relaxamento (Lincoln *et al.*, 2001).

A PKG pode atuar na Ca²⁺ATPase da membrana plasmática ativando a saída de cálcio e no retículo sarcoplasmático (SERCA) estimulando sua

recaptação. A PKG fosforila a cadeia leve da miosina (MLCK) inibindo sua atividade e diminuindo a contração muscular lisa vascular (Marin & Rodriguez, 1997; Lincoln et al., 2001). O NO pode ainda ter efeitos diretos sobre os canais para K+ dependentes de Ca²⁺ e também inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) entre outros (Stoclet et al., 1999).

O NO, possui meia-vida curta e pode reagir pode reagir com O_2^- e resultar em perda da sua atividade vasodilatadora (Gryglewski *et al.*, 1986; Rubanyi & Vanhoutte, 1986) pela formação de ONOO⁻ e OH⁻ (Beckman *et al.*,1990; Hui & Padmaja, 1993).

1.4.3.2. Prostaciclina

A prostaglandina H₂ (PGH₂) sob ação da prostaciclina sintase, é convertida em prostaciclina (PGI₂), um eicosanóide com potente ação vasodilatadora. Sua síntese é estimulada por diferentes fatores como, por exemplo, estiramento da parede vascular, acetilcolina, bradicinina, substância P, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e trombina (Gryglewski et al., 1988).

A PGI₂ atua em receptores específicos acoplados a proteína G no músculo liso vascular. A estimulação desses receptores induz a ativação da adenilato ciclase e, consequentemente, ao aumento de AMPc (mono fosfato cíclico de adenosina). Além disso, a PGI₂ também é capaz de estimular a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) no músculo liso vascular. A PKA tem um efeito semelhante à PKG, podendo ativar canais para K⁺ sensíveis ao ATP induzindo hiperpolarização e estimular a saída de Ca²⁺ do citosol inibindo a maquinaria contrátil. Além da função vasodilatadora, possui grande atividade
anti-plaquetária (Parkington et al., 1995; Davidge, 2001).

Outro aspecto é que, como descrito anteriormente à adenosina é capaz, atuando no receptor A1, de liberar NO, sendo importante ressaltar a necessidade da síntese de PGI₂ como segundo mensageiro nesse mecanismo (Ray & Marshall, 2006). Dessa forma, é possível perceber uma interação entre adenosina/PGI₂/NO, como pode já observado na figura 2.

1.4.3.3. Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF)

No final dos anos oitenta, vários estudos revelaram a existência de um terceiro vasodilatador endotelial ao lado do NO e PGI₂. Este fator recebeu a denominação de EDHF (Fator hiperpolarizante derivado do endotélio) devido sua ação estar estreitamente relacionado com a hiperpolarização das células endoteliais. A contribuição de EDHF para a vasodilatação dependente do endotélio é maior nos vasos sanguíneos de resistência do que nas grandes artérias (Urakami-Harasawa *et al.*, 1997). Sua liberação pode ser estimulada por diferentes fatores, em geral, ocorre pelo aumento do cálcio intracelular que após ser liberado, induz vasodilatação por meio da abertura de canais para potássio ativados por cálcio (Félétou & Vanhoutte, 2006). Em sequência, essa hiperpolarização endotelial é transmitida para o músculo liso vascular através do acoplamento elétrico direto das junções mioendoteliais (*gap junctions*) e/ou por liberação de íons K⁺ pelo endotélio ativando canais de K⁺ de larga condutância ou da ativação da bomba de sódio (Na⁺K⁺-ATPase) do músculo liso vascular (Félétou & Vanhoutte, 2006).

Foram detectados quatro tipos de canais para K^+ expressos no músculo liso vascular: os canais para K^+ voltagem dependente (K_V); os canais de K^+ de Introdução

larga condutância ativados por alterações de cálcio intracelular (BK_{Ca}), os canais de K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}) e os canais de K^+ retificador (K_{ir}) (Félétou & Vanhoutte, 2006).

Esses canais contribuem para a manutenção do potencial de membrana, por meio do efluxo de K⁺, o que resulta na hiperpolarização da membrana celular. Esse efeito é seguido do fechamento de canais para Ca²⁺ voltagem dependente e, desta forma, da redução da entrada de Ca²⁺ e consequente vasodilatação (Nelson & Quayle, 1995). Desse modo, a inibição desses canais para K⁺ levam à despolarização da membrana e à vasoconstrição. As substâncias que promovem a hiperpolarização do músculo liso vascular através do estímulo desses canais são: o NO, a PGI₂, a substância P, a bradicinina, o peptídeo natriurético tipo C, o H₂O₂, o potássio, os metabólicos da via do ácido araquidônico-lipoxigenases e da via do ácido araquidônico-citocromo P450 (ácidos epoxieicosatrienóicos, EETs) (Félétou & Vanhoutte, 2006).

A natureza química e os mecanismos de sinalização, pelos quais o EDHF atua ainda são alvos de muitos estudos. No entanto, a hiperpolarização endotelial mediada pelo canal para K⁺ sensível ao Ca²⁺ tem sido sugerida como papel crítico na resposta vasodilatadora exercida pelo EDHF (Grgic *et al.*, 2009). Entre os fatores que podem atuar como EDHF são propostos: o NO, modulando a liberação de EDHF via inibição do citocromo P450 (de Wit *et al.*, 2000), a geração de radicais livres como H₂O₂ (Shimokawa & Matoba, 2004), e a ativação da GC ou do metabolismo do ácido araquidônico causando relaxamento no músculo liso vascular (Barlow *et al.*, 1998; Hayabuchi *et al.*, 1998). Introdução

Em suma, todas as substâncias vasoativas são liberadas, em condições fisiológicas, pelo endotélio vascular de maneira equilibrada, de forma que possam atuar adequadamente sobre o músculo liso vascular e elementos circulantes do sangue, mantendo assim o tônus vascular e a fluidez sangüínea em níveis normais. Em algumas condições como, hipertensão arterial, diabetes mellitus e aterosclerose ocorre um desequilíbrio na produção desses fatores endoteliais (Triggle *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2004) o que pode gerar uma disfunção endotelial. Os mecanismos implicados na disfunção endotelial são multifatoriais e podem ser devidos à diminuição na liberação de NO, prostaciclina e/ou EDHF; a redução da sensibilidade no músculo liso vascular a estas substâncias; a disfunção na via de transdução de sinais dos fatores relaxantes endoteliais; ao aumento da produção de fatores contráteis derivados do endotélio e dentre outras (Carvalho *et al.*, 2001; Maturana *et al.*, 2007).

Diante do exposto, é possível notar que embora existam estudos sobre a importância dos nucleotídeos e nucleosídeos na regulação do tônus vascular, ainda existem muitos mecanismos para serem elucidados, principalmente, os que envolvem os vários subtipos das NTPDases. Além disso, ainda não se conhece com detalhes o papel das E-NTPDases na regulação do tônus vascular e se o sistema E-NTPDases-fosfonucleotidase desempenha algum papel modulador importante nesta regulação.

Outro aspecto considerado é que ao lado desses mecanismos de hidrólise dos nucleotídios, realizado pelas ecto-NTPDases, o gadolínio pode interagir com essas vias metabólicas na hidrólise do ATP e ADP de maneira intracelular e extracelular (Burnstock, 2006), podendo ser usado, de acordo com a concentração, como inibidor da hidrólise dos nucleotídeos (ATP e ADO) via

38

Introdução

NTPDase. Sendo assim, baseando-se no importante papel destes nucleotídeos no sistema vascular, este trabalho teve como foco inicial, o estudo da reatividade vascular após o uso do gadolínio *"in vitro"*, como inibidor das NTPDases, para avaliar o papel dessas enzimas, em especial a produção de adenosina, na manutenção da homeostase vascular em vasos de condutância.

OBJETIVOS

2.OBJETIVOS

De acordo com exposto anteriormente os objetivos desse estudo são:

- Avaliar se o uso do gadolínio *"in vitro"*, como inibidor das NTPDAses, altera a reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta;
- Investigar se o bloqueio da atividade das E-NTPDases, usando gadolínio, provoca redução da produção de adenosina;
- Analisar se a atividade das E-NTPDases mostra-se contínua na regulação do tônus vascular, a semelhança de outros mecanismos como o do óxido nítrico;
- Verificar uma possível interação entre adenosina e o oxido nítrico na regulação do tônus vascular;

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais Experimentais

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos de ambos os sexos da linhagem Wistar (*Rattus novergicus albinus*) adultos, com três meses de idade, normotensos, pesando entre 250-300 gramas. Estes foram cedidos pelo biotério do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Todos os animais foram mantidos em gaiolas, sob condições controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e alimentação.

Os procedimentos executados nesta pesquisa estavam em conformidade com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da EMESCAM-CEUA 004/2007.

3.2. Metodologia Empregada para Estudo de Reatividade em Anéis Isolados de Aorta de Rato

3.2.1. Obtenção dos Anéis de Aorta

Os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (Amental[®]) na dose de 50 mg/kg intraperitoneal e em seguida, eutanaziados e exanguinados. A aorta torácica foi cuidadosamente removida e imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs (composição em mM: NaCl 127; KCl 4.7; NaHCO₃ 18; CaCl₂.2H₂O 2,5 ; KH₂PO₄ 1.17; MgSO₄.7H₂O 1.2; glicose 11 e EDTA 0.01),. A aorta foi então cuidadosamente manipulada para retirada do tecido conectivo e adiposo, e então dividida em 4 - 6 seguimentos cilíndricos com 3.5 - 4 mm de comprimento (Figura 3).

B)





Figura 3: (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo;(B) Após a retirado dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 4-5mm.

Cada anel da artéria foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs aquecida a 36 \pm 0,5 °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), mantendo o pH estável em 7,4 de acordo com método descrito por Marín *et al* (1988).

Para a montagem da preparação experimental dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através no lúmen dos segmentos vasculares, de forma que permanecessem paralelos. Um fio foi fixado à parede da cuba e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor de força (GRASS[®] Force- displacement transducer FT03, Mass) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; CA) e este a um computador (PC Pentium) (Figura 4).



Figura 4: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular "*in vitro*". Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems* (modificado Dias, 2007).

Após a montagem os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0.9 a 1,3 g, reajustada, quando necessário, durante aproximadamente 45 minutos de estabilização.

3.3. Protocolos Experimentais para a Realização da Metodologia de Anéis Isolados de Aorta.

3.3.1. Avaliação da Reatividade Vascular ao Cloreto de Potássio (KCI)

Após o período de estabilização, 45 minutos (Figura 5A), foi administrado ao banho 75 mM KCl para verificação da viabilidade do músculo liso vascular através da atividade contrátil induzida por despolarização (Figura 5B). Após a adição do KCl ao banho aguardou-se um tempo, aproximadamente 5 minutos, para que os anéis atingissem uma variação de um grama de força a partir do valor basal. Estes anéis foram lavados, trocando a solução de Krebs da cuba aproximadamente três vezes, até retornarem a tensão de repouso, (Figura 5C). Assim, os anéis que não obtivessem tal contração eram

descartados.

Após 30 minutos de estabilização (Figura 5D), uma nova adição de KCI (75 mM) ao banho era realizada para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular aferida após 30 minutos da adição, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 5E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados, aproximadamente três vezes, para que atingissem o valor basal (0.9 a 1,3 gramas) e depois de 30 minutos (Figura 5G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

3.3.2 Avaliação da Integridade Funcional do Endotélio

A viabilidade endotelial foi avaliada através da pré-contração com fenilefrina (FE, normalmente uma única dose 10⁻⁷ M), e após a formação de um platô (Figura 5I, J) foi adicionado uma única dose (10⁻⁵ M) de acetilcolina (Figura 5L). A integridade funcional do endotélio foi considerada apenas nos anéis onde a acetilcolina foi capaz de induzir relaxamento igual ou superior a 90% de inibição da contração a fenilefrina. Os anéis que relaxaram menos que 90% do platô foram descartados.

Nos protocolos onde deveria ser avaliada a resposta independente do endotélio vascular. Os anéis foram submetidos a uma remoção mecânica deste com o auxílio de uma haste de aço inoxidável que era inserido na luz do vaso e friccionado à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina 10⁻⁵ M induzir relaxamento, após a pré-contração com fenilefrina.

A figura abaixo é um registro típico que ilustra os protocolos



experimentais acima descritos:

Figura 5: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCI e avaliação da integridade funcional do endotélio. **Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCI: A)** Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 gramas); **B)** Adição de KCI (75 mM) ao banho; **C)** Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; **D)** Período de estabilização (30 min); **E)** Adição de KCI (75 mM) ao banho; **F)** Platô da contração induzida pelo KCI (75 mM); **G)** Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; **H)** Período de estabilização (30 min). **Avaliação da integridade funcional do endotélio: I)** Pré-contração com fenilefrina (Fe) 10⁻⁷ M; **J)** Platô da contração induzida pela Fe; **L)** Adição de acetilcolina (ACh) 10⁻⁵ M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (Dias, 2007).

3.4. Protocolos Experimentais para este Estudo

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio os segmentos vasculares foram novamente lavados, trocando a solução nutridora de Krebs da cuba, para que atingissem o valor basal e depois de 30 minutos de estabilização foi administrado ao banho pequena concentração de cloreto de gadolínio (GdCl₃, 3µM).

Para avaliar o efeito da administração aguda de GdCl₃ a amostra de um mesmo rato (4-5 segmentos vasculares) foi dividida em dois grupos: o grupo

que recebeu o metal (como inibidor enzimático) e o grupo controle, ambos permaneceram por 30 minutos de estabilização e realizada à curva concentração-resposta à fenilefrina (FE)

3.4.1. Efeito da Administração Aguda de Cloreto de Gadolínio (Gd, 3μM) sobre a Resposta Vasoconstrictora à Fenilefrina

O efeito do Gd na reatividade vascular à FE, foi avaliado como percentual de resposta ao KCI 75 mM. Com o intuito de avaliar a modulação endotelial sobre as respostas contráteis à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro (E⁺) e na ausência do endotélio (E⁻). Para isto, realizaram-se curvas concentração-resposta à FE (10⁻¹⁰ a 3x10⁻⁴ M) de maneira cumulativa em ambos os grupos estudados.

3.4.2. Estudo dos Possíveis Fatores Endoteliais Envolvidos no Efeito do Gd (3μΜ) sobre a Resposta à Fenilefrina na Aorta

O Gd (3μM) foi incubado juntamente com fármaco a ser estudado por trinta minutos (L-NAME, TEA, 8-SPT, losartan e enalapril) e logo após, realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10⁻¹⁰ a 3x10⁻⁴ M) como demonstra a figura 6. Simultaneamente a esta incubação foram avaliados anéis incubados apenas com o Gd, com o fármaco e na condição controle (apenas com solução nutridora), na mesma preparação.

Em cada segmento vascular realizou-se apenas uma curva concentração-resposta à FE para evitar o tempo prolongado de experimento que acarretaria prejuízo da preparação.



Figura 6: Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com $GdCl_3$ e/ou fármaco a ser estudado, representado pela seta verde e, depois de trinta minutos a realização da curva concentração-resposta à FE (10^{-10} a $3x10^{-4}$ M).

3.4.3. Avaliação Indireta da Produção Basal de Óxido Nítrico

A produção basal de óxido nítrico (NO) foi avaliada indiretamente pelo aumento, dependente do endotélio, na contração à fenilefrina induzido pelo inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, o L-N ^G-Nitroarginina Metil Éster (L-NAME).

Foi realizada uma incubação com 100 μM de L-NAME, durante 40 minutos, e em seguida, realizada uma curva concentração-resposta à FE. Também foi realizada uma curva concentração resposta à fenilefrina, após a incubação conjunta de L-NAME (100 μM) e cloreto de gadolínio (3μM). O Gd foi adicionado à preparação, após 10min. de incubação com L-NAME e a partir daí permaneciam ambos os fármacos por mais 30 minutos, antes do inicio da curva.

3.4.4. Papel dos Canais para Potássio sobre a Resposta Contrátil Induzida pela Fenilefrina na Presença do Cloreto de Gadolínio

Para avaliar a participação dos canais para potássio na resposta contrátil a FE na presença de cloreto de gadolínio, foi adicionado ao banho 5mM de tetraetilamônio (TEA), 45 minutos de incubação, e em seguida, foi realizada uma curva concentração-resposta à FE. Também foi realizada simultaneamente em outro segmento uma curva concentração resposta à fenilefrina, após a incubação conjunta de TEA (5mM) e Gd 3µM. Após 15 minutas de incubação com o TEA foi acrescentado o Gd totalizando um tempo pré-curva de 45 e 30 minutos respectivamente para o TEA e Gd.

3.4.5. Análise do Efeito de 8-p-Sulfophenyl Theophylline Hydrate, 8-SPT, na Presença de ATP na Resposta Contrátil à Fenilefrina

O 8-SPT é um inibidor não específico dos receptores de adenosina. Com o intuito de avaliar a participação deste vasodilator na regulação do tônus vascular, foi realizado uma curva concentração resposta à FE (10^{-10} a $3x10^{-4}$ M), na presença de 8-SPT (50 µM). Ao mesmo tempo, foi incubado de maneira independente em outros anéis, ATP (1mM), utilizado neste caso com o objetivo de fornecer substrato adequado para via de formação de adenosina, 8-SPT (50 µM) + ATP (1mM).

Para a realização desses protocolos o ATP foi acrescentado 20 minutos antes do inicio da curva. Sendo assim, o tempo pré-curva foi de 30 e 20 minutos respectivamente para o 8-SPT e ATP.

3.4.6. Envolvimento da Angiotensina II Local sobre o Efeito de 3µM de Gd na Resposta Contrátil à Fenilefrina

Buscando esclarecer uma possível participação da via da angiotensina II local no efeito do cloreto de gadolínio sobre a reatividade vascular à fenilefrina, também foi realizada uma curva de concentração resposta à fenilefria $(10^{-10} \text{ a} 3x10^{-4} \text{ M})$, na presença de maleato de enalapril (enalapril,10 µM), um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA), e, simultaneamente, em outra amostra na presença conjunta de enalapril (10 µM) e de Gd (3µM).

Também avaliando um possível envolvimento da angiotensina II, investigou-se a participação da ativação dos receptores AT₁ pela angiotensina II através do bloqueio farmacológico destes receptores com o losartan (10 μ M). Para isso, segui-se o mesmo procedimento: curva de concentração resposta à fenilefrina (10⁻¹⁰ a 3x10⁻⁴M), na presença de losartan (10 μ M), simultaneamente, em outra amostra na presença conjunta de losartan (10 μ M) e de Gd (3 μ M).

Em ambos os protocolos descritos os fármacos permaneceram por um período de 30 minutos de incubação antes da realização das curvas.

3.4.7. Papel do Cálcio Intracelular e Extracelular sobre a Resposta Contrátil Induzida pela Fenilefrina na Presença do Gd

A resposta contrátil do músculo liso vascular mediada pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares, foi avaliada através da contração induzida pela FE em presença de solução livre de cálcio (EGTA 1mM), em aneis controle e na presença de Gd (3µM). Já a resposta contrátil mediada pelo influxo de cálcio do meio extracelular, foi avaliada através da administração de concentrações crescentes de CaCl₂ em preparações incubadas com solução livre de cálcio e na presença de fenilefrina, também em anéis controle e na presença de Gd (3µM).

Para realização desses experimentos, após um período de estabilização de 30-45 minutos, após o teste da viabilidade endotelial, os vasos foram incubados com solução livre de cálcio + EGTA (1mM) por um período de 15 minutos, em seguida foi adicionada 10⁻⁶ M de FE à preparação. A FE induziu uma contração transiente, e, após retornar a tensão basal, sem trocar a solução de Krebs da cuba, foi adicionado ao banho CaCl₂ (0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3mM) de maneira cumulativa.

Para manter a osmolaridade da solução nutridora de Krebs o CaCl₂ omitido, na solução livre de cálcio, foi substituído por igual concentração de cloreto de sódio - NaCl.

3.4.8. Realização de Pré-contrações com Fenilefrina Seguida de Incubações com ATP e Gd

Com a finalidade de obter resultados confirmatórios da inibição enzimática das NTPDases pelo Gd_, 3 μ M, foi realizado após teste para confirmação da presença do endotélio vascular, uma pré-contração com FE (10⁻⁷ M), com subseqüente adição de 1mM de ATP. O mesmo procedimento foi realizado em outro segmento vascular, simultaneamente, porém com uma pré-incubação (30minutos) de GdCl₃, 3 μ M.

3.5. Metodologia Empregada para Análise Bioquímica

3.5.1. Medida da capacidade do gadolínio em bloquear as NTPDases

Com o objetivo de verificar a capacidade do Gd em bloquear a atividade das NTPDases, foi utilizada uma preparação da aorta torácica, como anteriormente descrito por Levitsky et al. (1993) com algumas modificações.

Resumidamente, cerca de 50 mg de tecido aórtico de ratos Wistar foram obtidos, por meio da dissecação da aorta. Adicionalmente, a aorta foi homogeneizada manualmente com um homogeneizador com pistão de teflon (motor-driven Teflon-glass) de 0,7 mL de meio contendo 100 mM KCl, 30 mM Tris-HCl pH 7,4, e 5,0 mM de azida de sódio. Cada homogenato foi transferido para um tubo Eppendorf e centrifugado a 1250 x g por 2 minutos (Centrifuga 5402, Eppendorf). O sobrenadante (S1) foi coletado e o sedimento (P1) foi rehomogeinizado em 0,5 mL do meio de isolamento.

O segundo homogenato foi centrifugado em condições semelhantes, tal como descrito anteriormente, a extração e o procedimento foi repetido mais uma vez. Os sedimentos (P1 a P3) foram descartados, e os sobrenadantes (S1 a S3) foram agrupados e utilizados para uma maior determinação da atividade das NTPDases.

As determinações da atividade das NTPDases na preparação de aorta foram realizadas a 37 °C em meio reacional (contendo: 45 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 2.0 mM CaCl₂, 0.5 mM KCl, 10 mM de glicose + 0.21 M de sacarose, pH 8.0), em um volume final de 200 µL. Cerca de 10 mg de proteína de aorta (medido de acordo com Bradford, 1976), foi acrescentado por tubo e as reações enzimáticas foram iniciadas pela adição de substratos (ATP ou

ADP) em uma concentração final de 2,0 mM.

Cloreto de Gadolínio (Gd) foi adicionado ao meio reacional em uma solução aquosa concentração final de 75 ou 100 μ M e a atividade das NTPDases foi avaliada, na presença e na ausência (grupo controle) de Gd. As reações enzimáticas foram interrompidas após 8.0 min de incubação com ácido tricloroacético (TCA, 5% concentração final). O tempo de incubação e a concentração protéica foram escolhidos de forma a garantir a linearidade das reações enzimáticas. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado foi analisada utilizando um método colorimétrico, como anteriormente descrito por Chan et al.,1986.

Os controles para a correção da hidrólise não-enzimática de substratos foram obtidos por adição de preparações de aorta depois que as reações eram interrompidas com TCA. Todas as amostras foram realizadas em triplicata e a atividade enzimática expressa como nmolPi liberado por minuto por miligramas de proteína.

3.5.2. Análise dos Níveis de Purinas por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

A análise das purinas foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) no meio de reação a que foram submetidos os anéis aórticos em diferentes condições: basal, basal + Gd, basal + FE, ATP 1mM, ATP+FE, ATP+Gd e ATP+Gd+FE.

Foram aplicadas alíquotas de 50 µL a um sistema de HPLC reverso utilizando uma coluna Shimadzu C18 (Shimadzu, Japão) de 25 cm a um comprimento de onda de 260 nm com uma fase móvel contendo dihidrogenofosfato de potássico (KH2PO4 ,60 mM), cloreto de tetrabutilamônio (5 mM), pH 6, em metanol 30%, conforme previamente descrito por Voelter et al. (1980). Os picos de purinas (ATP, ADP, AMP, adenosina e inosina) foram identificados pelos seus tempos de retenção e quantificados por comparação com padrões.

Os resultados estão expressos como a quantidade dos diferentes compostos avaliados por mililitros do meio de reação (nmol/ml).

3.6. Expressão dos Dados e Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média +/- erro padrão da média (EPM). As respostas contráteis à fenilefrina, estão expressas em % de contração ao KCL (75 mM).

Para a determinação dos valores de pD2 (-log. EC50) e reposta máxima (Rmax) à fenilefrina, foi realizado uma análise de regressão não linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta dessa substância, utilizando o programa estatístico GB start.

Os dados foram analisados através ANOVA 1 via seguida do teste Fisher's LSD (Protected t-Tests) e teste "t" de Student não pareado, de acordo com os dados analisados. Os valores de p<0.05 foram considerados estatisticamente significantes. Os resultados do HPLC foram analisados pelo teste de Ducan com nível de significância < 0.05.

Todos os gráfico de reatividade vascular foram criados usando o programa GraphPad Prisma Software (San Diego, CA, U.S.A.).

3.7. Drogas e Reagentes Utilizados

Foram usadas, durante a realização dos experimentos, as seguintes drogas e reagentes:

- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Adenosina (Libbes)
- Ácido etilenodiaminotetracético EDTA (Sigma)
- Ácido tricloroacético TCA (Sigma)
- Ácido etileno-glicol tetraacetico EGTA (Sigma)
- Azida de sódio (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Merck)
- Cloreto de cálcio, diidratado (Merck)
- Cloreto de gadolínio (Sigma)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Difosfato de adenosina- ADP (sigma)
- Fosfato de sódio (Merck)
- Glicose (Reagem)
- L Fenilefrina, hidrocloridrato (Sigma)
- L-N ^G-Nitroarginina Metil Éster (Sigma)
- Losartan (Sigma)
- Maleato de Enalapril (Sigma)-
- 8-p-Sulfophenyl Theophylline Hydrate, 8-SPT (Sigma)
- Pentobarbital Sódico (Cristália)
- Sacarose (Vetec)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merck)

- Trifosfato de adenosina- ATP (Sigma)
- Tetraetilamônio- TEA (Sigma)
- Tris-HCI (Sigma)

As substâncias aqui utilizadas foram dissolvidas em água destilada, exceto o ATP e ADP que foram solubilizados em água ultra pura (MiliQ) e todas as substâncias estoques foram acondicionadas à temperatura de - 4º C.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da Administração Aguda de Cloreto de Gadolínio (Gd_, 3μM) sobre a Resposta Vasoconstrictora à Fenilefrina

O efeito da administração aguda de Gd foi avaliado, através da curva de reatividade à fenilefrina, em condições controle e na presença do Gd. Como pode ser observado no gráfico da figura 7, o Gd foi capaz de promover um aumento da resposta vasoconstrictora à fenilefrina, de maneira concentração-dependente, quando comparados ao grupo controle (Ct).

Esta resposta foi avaliada na presença do endotélio vascular e, seu aumento foi significante tanto na sensibilidade (pD₂, Ct = 6.69 ± 0.10 ; Gd = 10.14 ± 2.41 , P<0.05) quanto na reposta máxima (R_{max}, Ct= 71.28 ± 2.73 %; Gd= $101.4 \pm 6.40\%$, P<0.05).

Com o objetivo de verificar a modulação endotelial desta resposta foi realizado o protocolo subseqüente de retirada do endotélio vascular, como pode ser verificado na figura 8. Após a retirada mecânica do endotélio vascular não houve diferença significante na sensibilidade (pD_2 , Ct = 8.471 ± 0.11 ; Gd= 8.178 ± 0.26) e também na reposta máxima (R_{max} , Ct = 132.6 ± 8.60 % ; Gd= 122.4 ± 7.16 %).



Figura 7: Curva concentração-resposta à fenilefrina (FE) em anéis controles (Ct) e após incubação por 30 min. com gadolínio (Gd). Os resultados são expressos como média +/- EPM. A análise foi realizada através do Teste *t* não pareado para comparações de Rmax e pD₂; *p<0,05 Ct *vs* Gd.



Figura 8: Curva concentração resposta à fenilefrina na ausência endotelial (E-). Controle (Ct) e após incubação por 30 min. com gadolínio (Gd). Os resultados são expressos como média +/- EPM. A análise foi realizada através do Teste t não pareado para comparações de Rmax e pD2; p>0,05 Ct vs Gd.

4.2. Papel do cálcio Intracelular e Extracelular sobre a Resposta Contrátil Induzida pela Fenilefrina na Presença do Gd

Com o intuito de investigar uma possível influência do Gd (3µM) sobre os canais para cálcio, os anéis isolados de aorta foram incubados durante 15 min. em solução de Krebs livre de cálcio, em condições controle (Ct) e após incubação com gadolinio (Gd), após esse período foi adicionado fenilefrina (10⁻⁶ M) ao banho. A fenilefrina, na ausência do cálcio extracelular, induziu uma contração transiente em ambas às condições, retornando naturalmente a uma tensão próxima ao basal após alguns minutos. Após um período de estabilização, CaCl₂ (0,25 - 3,00 mM) foi acrescentado de maneira cumulativa à preparação induzindo uma contração concentração - dependente.

A resposta contrátil transiente induzida pela fenilefrina, na qual é resultante da liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares sensíveis ao (Ct= $12.35 \pm 1.42\%$ n=9 ; Gd= $13.16 \pm 1.76\%$ n=9), como pode ser observado na figura 9A . A diferença entre os grupos também não foi significante quando foram adicionadas ao banho concentrações crescentes de cálcio, como pode ser observado na figura 9B (pD₂ : Ct=2,94 ± 0,04 ; Gd= 2,71 ± 0,12) (R_{max}, Ct= $86,32 \pm 7,36\%$; Gd= $88,32 \pm 6,82\%$).

A)

B)



Figura 9: **A**) Reposta contrátil à fenilefrina $(10^{-6}M)$ em aorta de ratos controle (Ct) e após incubação com gadolinio (Gd) incubadas durante 15 min. com solução de Krebs livre de Calcio, n=9 para cada grupo. **B**) Curva de concentração-resposta ao Ca⁺² extracelular em aorta de ratos controle (Ct) e após incubação com Gd. Os resultados são expressos como média +/-EPM. A análise foi realizada através do Teste *t* não pareado para comparações; p>0,05 Ct *vs* Gd.

4.3. Realização de Pré-contrações com Fenilefrina Seguida de Incubações com ATP e Gd

Sabendo que as NTPDases e a ecto-5'-nucleotidase estão na cascata para transformação do ATP em adenosina, foi testada a ação inibitória de Gd com a administração de 1,0 mM ATP que funcionou como substrato para a esta via enzimática. A Figura 10 mostra que, após a incubação com Gd o efeito vasodilatador produzido pelo ATP foi significativamente aumentado quando comparado ao grupo controle (Ct= -33.56 \pm 4.10 %; Gd= -47.46 \pm 4.12 %)



Figura 10: Anéis pré-contraídos com FE (10^{-7} M) e posterior administração de 1mM de ATP provocando relaxamento , antes (ATP) e depois da incubação com gadolínio (ATP + Gd) . Os resultados são expressos como média +/- EPM. A análise foi realizada através do Teste *t* não pareado para comparações; *p<0,05 ATP + Gd *vs* ATP.

4.4. Avaliação Indireta da Produção Basal de Óxido Nítrico

Supondo que a resposta vascular aumentada provocada pelo Gd seria devido à inibição de vasodilatadores ou liberação de vasoconstrictores endoteliais, foi investigada primeiramente a influência do óxido nítrico (NO) nessa resposta. Para isto utilizou-se de 100 µM L-NAME, como pode ser observado na figura 11.

Após realização das curvas concentração-resposta à fenilefrina, como esperado, a curva na presença de L-NAME, apresentou aumento significativo da resposta máxima quando comparado ao grupo controle (R_{max} : Ct= 76.20 ± 4.761%; L-NAME= 143.61 ± 6.26%) apresentando-se semelhança estatística quando comparado a sensibilidade (pD_2 : Ct= 6.41 ± 0.17; L-NAME= 6.99 ± 0.23). O mesmo aconteceu quando se comparou o grupo controle ao grupo que foi realizada a curva após incubação conjunta de L-NAME + Gd, ou seja, não houve diferença significativa na sensibilidade (pD_2 : Ct= 6.41 ± 0.17; L-NAME + Gd= 7.13 ± 0.15) e houve um aumento significativo na resposta máxima (R_{max} : Ct= 76.20 ± 4.761%; L-NAME + Gd= 142.88 ± 7.32%).

Entretanto, a curva realizada no grupo após incubação conjunta de L-NAME + Gd não alterou a resposta vascular quando comparada com a curva L-NAME de maneira significante (pD₂: L-NAME= 6.99 ± 0.23 ; L-NAME +Gd= 7.13 ± 0.15 ; R_{max}: L-NAME= 143.61 ± 6.26%; L-NAME + Gd= 142.88 ± 7.32%).



Figura 11: Curva concentração-resposta à fenilefrina, nas condições Controle (Ct), após incubação por 40 min. com L-NAME, após incubação conjunta gadolínio (Gd) e L-NAME+Gd. Os resultados são expressos como média +/- EPM. A análise estatística foi realizada através ANOVA 1 via seguida de teste Fisher's LSD (Protected t-Tests). pD₂: CT vs L-Name +Gd , CT vs L-Name e L-Name vs L-Name +Gd p > 0.05. R_{max} . CT vs L-NAME e CT vs L-NAME vs L-NAME+Gd p > 0.05.

4.5. Papel dos Canais para Potássio sobre a Resposta Contrátil Induzida pela Fenilefrina na Presença do Gd

Com o intuito de verificar uma possível participação dos canais para potássio na resposta contrátil à fenilefrina na presença de gadolínio, realizou-se uma curva concentração-resposta após a incubação conjunta de tetraetilamônio, TEA (5mM), e Gd (3µM).

Novamente, foram realizadas simultaneamente curvas controle (Ct), após incubação de Gd e após incubação com TEA. Não houve diferença estatística na sensibilidade entre os grupos estudados (pD₂, Ct= 6,58 ± 0,19 ; TEA= 6,88 ± 0,19 ; TEA+Gd 7,13 ± 0,23 ; Gd 6,59 ± 0,08). Entretanto, conforme já demonstrado, quando analisado a resposta máxima ocorreu aumento após incubação com Gd quando comparado ao grupo controle (R_{max}., Ct= 73,55 ± 3,60% ; Gd= 100,72 ± 10,84%). Novamente, assim esperado, ocorreu aumento significativo da resposta máxima após incubação com o TEA quando comparado ao grupo controle (R_{max}., Ct= 73,55 ± 3,60% ; TEA= 131,22 ± 12,76%).

Contudo, não houve diferença significativa na resposta máxima entre os grupos TEA e TEA+Gd (R_{max} ., TEA= 131,22 ± 12,76% ; TEA+Gd = 129,67 ± 13,96%). Os resultados descritos podem ser observados na figura 12.



Figura 12: Curva concentração resposta à fenilefrina, controle (Ct), após incubação por 30 min. com gadolínio (Gd), após incubação 45 min. com tetraetilamônio (TEA) e após incubação conjunta gadolínio e TEA (TEA+Gd). Os resultados são expressos como média +/- EPM. A análise estatística foi realizada através ANOVA 1 via seguida de teste Fisher's LSD (Protected t-Tests). pD₂: CT *vs* TEA, CT *vs* TEA+Gd, CT *vs* Gd, TEA *vs* TEA+Gd, TEA *vs* Gd, TEA+Gd *vs* Gd, TEA+Gd, CT *vs* Gd, TEA +Gd, CT *vs* Gd, CT *vs* Gd, Ct *vs* Gd, Ct *vs* TEA, Ct *vs* TEA, Gd *vs* TEA + Gd, TEA *vs* TEA + Gd *p*> 0.05; Ct *vs* Gd, Ct *vs* TEA, Ct *vs* TEA + Gd **p* < 0.05.

4.6. Medida da capacidade do gadolínio em bloquear as NTPDases

A análise bioquímica foi utilizada com intuito de demonstrar a capacidade do gadolínio em bloquear a atividade das NTPDases. Para isso, realizou-se esta análise em tecido aórtico como descrito anteriormente. As figuras 13A e 13B mostram que a atividade da NTPDases foi inibida por 75 μ M de Gd (hidrólise do ATP, 13A) e 100 μ M de Gd (tanto a hidrólise do ATP e ADP, 13B) no homogeneizado de tecido aórtico.

A)



B)



Figura 13: Efeito de 75 ou 100 μ M de cloreto de gadolínio sobre a hidrólise do ATP (A) e ADP (B) em preparação de aorta. Resultados são expressos como média +/- EPM dos três experimentos independentes. C, controle (ausência de cloreto de gadolinio). C *vs* atividade enzimática (GdCl₃) p* < 0.05.

4.7. Análise do Efeito de 8-p-Sulfophenyl Theophylline Hydrate, 8-SPT, na Presença de ATP na Resposta Contrátil à Fenilefrina

Buscando investigar uma possível participação da adenosina formada através da via enzimática da NTPDase e da Ecto-5'-nucleotidase na resposta vasoconstrictora exercida pelo Gd após a inibição da mesma, foram realizadas novamente curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença de ATP (1mM), vasodilatador e substrato para esta via enzimática , 8-SPT (50 μM) inibidor para todos os tipos de receptores de adenosina e a incubação conjunta 8-SPT + ATP.

Como pode ser demonstrado na figura 14 não houve diferença significante na sensibilidade entre os grupos estudados (pD₂:Ct= 6,30±0,19 ; ATP= 6,02±0,20 ; ATP+ 8-SPT= 5,89± 0,22 ; 8-SPT= 6,11±0,17). Entretanto, o ATP e o ATP + 8-SPT reduziram significativamente a resposta máxima quando comparados ao grupo controle e, mantiveram-se semelhantes entre si (R_{max} :Ct= 70.33 ± 3.64% ; ATP= 32.16 ± 7.17 %; ATP + 8-SPT= 36.98 ± 6.15%) . O ATP também foi capaz de diminuir a resposta máxima, quando comparado ao grupo 8-SPT (R_{max} : ATP= 32.16 ± 7.17% e 8-SPT= 58.17 ± 7.15%). A R_{max} também apresentou similaridade entre os grupos controle e 8-SPT (R_{max} :Ct= 70.33 ± 3.64% e 8-SPT= 58.17 ± 7.15%).



Figura 14: Curva concentração resposta à fenilefrina, controle (Ct), após incubação com ATP, 8-SPT e incubação conjunta gadolínio e ATP e 8-SPT. Os resultados são expressos como média +/- EPM. A análise estatística foi realizada através ANOVA 1 via seguida de teste Fisher's LSD (Protected t-Tests). pD₂: CT *vs* ATP, CT *vs* ATP+ 8-SPT, CT *vs* 8-SPT, ATP *vs* ATP+ 8-SPT, ATP *vs* 8-SPT, ATP+ 8-SPT, ATP+ 8-SPT, ATP+ 8-SPT *vs* 8-SPT p> 0.05. R_{max}: CT *vs* 8-SPT , ATP+ 8-SPT *vs* 8-SPT *ys* 8-SPT ; CT *vs* ATP+ 8-SPT, ATP+ 8-SPT *vs* 8-SPT *ys* 8-SPT
4.8. Análise dos níveis de purinas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

A análise das purinas, visando a quantificação dos produtos da hidrólise da via das NTPDases, foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) no meio de reação a que foram submetidos os anéis aórticos em diferentes condições: controle (Ct), Ct + Gd, ATP , ATP+Gd. Foi realizada também, a análise dos mesmos grupos após estimulação com fenilefrina.

Na tabela 1, em (A), análises dos metabólitos na ausência de fenilefrina, em (B) análises dos metabólitos após estimulação com fenilefrina. Os resultados foram expressos (em nmoles / mL) como média ± EPM.

Como podem ser observadas em ambas as tabelas não ocorreu aumento significativo dos metabólitos, AMP, ADO, INO entre os grupos estudados. Entretanto ocorreu aumento significativo do ATP no grupo que recebeu incubação de 1mM de ATP, quando comparado ao grupo controle, sendo esta resposta ainda maior no grupo que recebeu 1mM de ATP e Gd. Já o ADP, apresentou-se aumentado no grupo ATP e inalterado no grupo ATP+Gd quando comparados ao grupo controle. Essas respostas mostraramse semelhante em ambas as condições, (A) e (B).

	ATP	ADP	AMP	ADO	INO
СТ	0	$\textbf{8.5} \pm \textbf{4.5}$	$\textbf{3.25} \pm \textbf{1.0}$	$\textbf{1.75} \pm \textbf{0.5}$	0
CT + Gd	$\textbf{1.75} \pm \textbf{0.25}$	$\textbf{4.25} \pm \textbf{1.00}$	$\textbf{2.95} \pm \textbf{0.73}$	$1.50 \pm \textbf{0.75}$	0
ATP	$\textbf{291.75} \pm \textbf{53.75}$	$\textbf{20.25} \pm \textbf{2.25}$	$\textbf{3.0} \pm \textbf{0.5}$	$\textbf{1.25} \pm \textbf{1.0}$	$\textbf{1.0} \pm \textbf{0.75}$
ATP + Gd	666.25± 5.25*	$\textbf{4.0} \pm \textbf{7.25}^{\textbf{*}}$	$\textbf{3.5} \pm \textbf{1.75}$	$\textbf{1.0} \pm \textbf{0}$	$\textbf{2.5} \pm \textbf{1.5}$

B)

	ATP	ADP	AMP	ADO	INO
СТ	0	4.25 ± 0.25	2.75 ± 1.25	1.0 ± 0.25	0
ATP	355 ± 17.75	27.25 ± 7.5	2.0 ± 2.0	1.25 ± 0.75	1.75 ± 0.75
ATP+ Gd	598.8 ± 58.25 *	3.5 ± 0 *	3.5 ± 1.0	1.25 ± 0.75	1 ± 0.25

Tabela 1: ATP- trifosfato de adenosina, ADP- difosfato de adenosina, AMP-monofosfato de adenosina, ADO-adenosina, INO- inosina. Em (A), análises dos metabólitos na ausência de fenilefrina, em (B) análises dos metabólitos após estimulação com fenilefrina, Os resultados expressos (em nmoles / mL) como média \pm EPM. * P<0.05 ATP vs ATP + Gd.

4.9. Envolvimento da Angiotensina II Local sobre o Efeito de 3μM de Gd na Resposta Contrátil à Fenilefrina

Após a análise do efeito do inibidor não seletivo para os receptores de adenosina, 8-SPT, sugeriu-se uma possível participação da angiotensina II local no efeito do cloreto de gadolínio sobre a reatividade vascular à fenilefrina.

Para investigar esta possível participação foram realizadas curvas concentração- resposta à fenilefria na presença de enalapril (10 μ M, inibidor da enzima conversora de angiotensina) e, simultaneamente, em outra amostra a presença conjunta de enalapril (10 μ M) + Gd (3 μ M). Outro estudo realizado, também na tentativa de investigar o envolvimento da Angiotensina II local, foi o bloqueio farmacológico dos receptores de angiotensina II AT₁ através do losartan (10 μ M) seguindo o mesmo procedimento.

Os efeitos observados com o uso do enalapril, mostrado na figura 15, indicam similaridade na sensibilidade dos grupos estudados (pD_2 : Ct=6,58± 0,19; Gd= 6,59±0,08 ; enalapril= 6,45±0,15 ; enalapril + Gd= 6,51±0,10). Da mesma maneira a resposta máxima mostrou-se sem alterações entre os grupos controle, enalapril e enalapril + Gd (73.55±3.60% ; 69.70±6.24% ; 70.28±8.15%) respectivamente, mostrando-se aumentada no grupo gadolinio (Gd, 100.72 ± 10.84%) quando comparadas a estes mesmos grupos.

Como podem ser observados na figura 16, os resultados encontrados com a incubação com losartan são semelhantes aos encontrados com a incubação com enalapril, ou seja, não houve diferença significante na sensibilidade dos entre os grupos estudados (pD₂: Ct=6,58 \pm 0,19 ; Gd= 6,59 \pm 0,08 ; losartan= 6,46 \pm 0,08 ; losartan + Gd= 6,63 \pm 0,07). Também, quando analisado a resposta máxima, a mesma mostrou-se semelhante entre os grupos controle, losartan e losartan+Gd (72.94±4.02% ; 63.68±11.35% ; 67.65±8.10%) respectivamente, de forma semelhante ao enalapril a resposta máxima apresentou-se significativamente aumentada no grupo gadolínio (Gd=108.1±15.49%) quando comparada aos grupos controle, losartan e losartan+Gd.



Figura 15: Curva concentração resposta à fenilefrina, controle (Ct), após incubação por 30 min. com gadolínio (Gd), após incubação com enalapril e após incubação conjunta enalapril+Gd. Os resultados são expressos como média +/- EPM. A análise estatística foi realizada através ANOVA 1 via seguida de teste Fisher's LSD (Protected t-Tests). pD_2 : Ct *vs* Gd, Ct *vs* Enalapril, Ct *vs* Enalapril + Gd, Gd *vs* Enalapril, Gd *vs* Enalapril+Gd, Enalapril *vs* Enalapril + Gd p> 0.05. R_{max}:, Ct vs Enalapril, Ct vs Enalapril + Gd, , Enalapril vs Enalapril + Gd p> 0.05; Ct *vs* Gd, Gd vs Enalapril+Gd *p < 0.05.



Figura 16: Curva concentração resposta à fenilefrina, controle (Ct), após incubação por 30 min. com gadolínio (Gd), após incubação Losartan e após incubação conjunta Losartan+Gd. Os resultados são expressos como média +/- EPM. A análise estatística foi realizada através ANOVA 1 via seguida de teste Fisher´s LSD (Protected t-Tests). pD_2 : Ct vs Gd, Ct vs Losartan, Ct vs Losartan + Gd, Gd vs Losartan, Gd vs Losartan +Gd, Losartan + Vs Losartan + Gd p> 0.05. R_{max}:, Ct vs Losartan, Ct vs Losartan, Ct vs Losartan, Gd vs Losartan vs Losartan + Gd p> 0.05; Ct vs Gd, , Gd vs Losartan, Gd vs Losartan + Gd p> 0.05; Ct vs Gd, , Gd vs Losartan, Gd vs Losartan + Gd p> 0.05.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o gadolínio usado, na concentração de 3µM, foi capaz de promover alteração concentração-dependente na reatividade vascular à fenilefrina, sendo esse aumento da resposta vasoconstrictora dependente da presença do endotélio vascular.

A capacidade desse lantanídeo em inibir a via proposta neste estudo, via das NTPDases, foi comprovada pelos resultados obtidos através das précontração com fenilefrina seguida de incubações com ATP e Gd, nas preparações de anéis isolados de aorta e, através da medida da capacidade do gadolínio em bloquear as NTPDases, e em tecido aórtico. Além disso, foi possível demonstrar que o Gd usado, não foi capaz de bloquear os canais para cálcio sensíveis ao estiramento, como ocorre quando esse metal é usado na concentração de 10µM (Hamill, *et al.*,1996 ; Morris., 1990 ; Sachs., 1988 e Ray *et al.*, 1998).

Adicionalmente, os resultados demonstraram que a reatividade vascular à FE foi semelhante entre os grupos Gd + L-NAME e L-NAME sugerindo uma possível interação entre a adenosina e o NO. Entretanto, o 8-SPT não alterou a resposta contrátil à fenilefrina e não foi possível, através da análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), demonstrar um aumento dos níveis de adenosina "in vitro" quando adicionado ATP como substrato enzimático. Em contrapartida, este estudo demonstrou o envolvimento da angiotensina II local sobre o efeito de 3µM de Gd na resposta contrátil à fenilefrina.

Como já mencionado anteriormente, o Gd exerce uma potente ação inibitória sobre as E-NTPDases (Escalada *et al.*, 2004). Esse grupo enzimático, juntamente com a ecto-5'-nucleotidase, forma uma das principais vias de produção de adenosina, no espaço extracelular, através da hidrólise nucleotídios como ATP, ADP. Essas enzimas estão presentes em diversos órgão e tecidos (Burnstock, 2006) e, apesar de existirem muitos estudos referentes às NTPDases, o papel das mesmas na regulação do tônus vascular não foi completamente esclarecido.

Como já é bem demonstrada a liberação de adenosina ocorre tanto em condições fisiológicas quanto patológicas na parede vascular (Pelleg, 1993). Além disso, sabe-se que adenosina é um vasodilatador em vários leitos vasculares (Shryock and Belardinelli, 1997). Sendo assim, considerando que a adenosina pode contribuir para a regulação do tônus vascular (Ralevic & Burnstock.; 1998; Prentice *et al.*,1997) o efeito esperado através do bloqueio da formação de adenosina, pela inibição da atividade das NTPDases, deveria ser o aumento na reatividade vascular .

De acordo com nossos achados, na presença do endotélio, o Gd adicionado 30 minutos antes da curva de concentração resposta a fenilefrina, aumentou a reatividade vascular, deslocando a curva à esquerda, esse dado corrobora com a hipótese de que a formação de adenosina pode ser um mecanismo operacional na regulação do tônus vascular.

Atualmente sabe-se que a adenosina atua nos receptores purinérgicos do tipo P1, que possui quatro subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, e que a expressão e localização desses receptores diferenciam-se nos tecidos (Marshall e Ray, 2006). Além disso, a interação deste nucleosídeo com seus receptores podem

ser vasodilatadores ou vasoconstrictores, dependendo do subtipo e localização do receptor. Entretanto, no endotélio vascular os receptores A₁ e A_{2A}, promovem uma vasodilatação indireta através do estímulo à liberação de NO (Hourani *et al.*, 2001; Lynch *et al*, 2005; Marshall e Ray, 2006).

Uma vez que, a resposta vascular ao Gd mostrou-se aumentada na presença do endotélio vascular, foi possível avaliar a dependência endotelial dessa resposta realizando um estudo na ausência do endotélio vascular. Como resultado, quando foi retirado mecanicamente o endotélio vascular, o Gd não provocou efeitos na curva de concentração resposta à FE sugerindo, que o mecanismo que induz o aumento da reatividade vascular é dependente do endotélio.

Escalada *et al.*, 2004 demonstrou a efetividade do Gd como inibidor das NTPDases em *torpedo marmorata*. Para confirmar a interação metabólica desse metal com via de hidrólise do ATP, neste estudo, avaliou-se o relaxamento dos anéis de aorta com a adição de ATP, substrato para via de formação da adenosina, antes e depois da incubação com Gd.

O efeito vasodilatador causado pela adição de ATP foi significantemente aumentado após a incubação com Gd. Assim, é possível inferir que, após a adição de Gd ao banho, a degradação do ATP mostra-se reduzida, reforçando, desta forma, a eficiência do Gd em bloquear a atividade das NTPDases em nível endotelial. Além disso, para verificar a atividade das NTPDases em aorta, foi realizado um estudo bioquímico em homogenato de aorta na presença e ausência do Gd. Como resultado foram obtidos dados semelhantes aos demais estudos da literatura que tem registrado a capacidade desse metal em diminuir a hidrólise dos nucleotídios (Escalada *et al.*, 2004; Buffon *et al.*, 2007; Rücker

et al., 2008).

Neste estudo, portanto foi observada a capacidade desse metal em inibir a hidrólise do ATP usando 75 µM, e a hidrólise de ambos nucleotídios ATP e ADP utilizando, 100 µM Gd e sendo assim, mais uma vez demonstrada a capacidade do gadolinio em inibir a via de formação de adenosina através da inibição da hidrólise dos nucleotídios, podendo causar alterações na reatividade vascular.

Apesar de o gadolínio ter-se mostrado eficiente no bloqueio da atividade das enzimas de hidrólise do ATP e ADP, sabe-se que o mesmo não é seletivo para essas vias e, dependendo da concentração, pode interagir com outros sistemas no organismo. Por exemplo, na concentração de 10µM, o gadolínio, bloqueia canais para cálcio sensíveis ao estiramento (SACs) e desse modo inibe processos mecanosensitivos (Hamill, *et al.*,1996 ; Morris., 1990 e Sachs., 1988). Então, foi avaliado papel do cálcio intracelular e extracelular sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina na presença do Gd e como ocorreu aumento da contração do músculo liso vascular pode ser sugerido que não houve bloqueio de canais para cálcio na presença do Gd.

Outro aspecto considerado é a possível liberação endotelial de NO provocada pela adenosina, como sugerido por Ray e Marshall, 2006. Considerando esse aspecto, pesquisou-se a dependência entre a ação vasodilatadora da adenosina, formada a partir da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase e a liberação de óxido nítrico. Sendo assim, para esclarecer a questão, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina, após incubação com L-NAME e L-NAME+Gd.

Como resultado esperado, o L-NAME, aumentou a reatividade vascular

à fenilefrina, de forma similar ao que ocorre com a retirada do endotélio. Entretanto, a incubação com L-NAME+Gd não alterou as resposta vasculares, quando comparados a ação isolada do L-NAME. Este achado responde a hipótese levantada sugerindo que a alteração na reatividade vascular causada pelo gadolínio é dependente do endotélio vascular, mas independente do NO.

Visto que, o efeito do aumento da resposta vascular, provocado pelo Gd, não estava relacionado com inibição da liberação de NO, buscou-se avaliar o papel dos canais para potássio sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina na presença do Gd, pois como já descrito na literatura, sabe-se da importância desses canais, em especial os canais para potássio sensíveis ao cálcio (Vanhoutte et al , 2008), na liberação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio vascular. Como mostra nossos resultados, as alterações na reatividade vascular causada pelo gadolínio não mostrou interação com os canais para potássio.

Como o objetivo do trabalho era investigar a liberação de adenosina na regulação do tônus vascular em condições fisiológicas, investigou-se uma possível participação da adenosina formada pela via enzimática da NTPDase e da Ecto-5'-nucleotidase na resposta vasoconstrictora exercida pelo Gd após a inibição dos receptores da mesma. Para isso, foi feita a análise do efeito de 8-p-Sulfophenyl Theophylline Hydrate, 8-SPT, na presença de ATP na resposta contrátil à fenilefrina. Este resultado demonstrou que apesar de o ATP ser um vasodilatador, na concentração usada, o bloqueio dos receptores de adenosina com o 8-SPT impedindo sua ação, não alterou a resposta vascular à fenilefrina.

Diante desses resultados, para esclarecer está última questão, foi realizado experimento para a quantificação dos nucleotídios ATP, ADP e

adenosina através da HPLC. Surpreendentemente, como mostra a tabela 1, após a adição de ATP, como substrato para via, não ocorreu alterações na concentração nem de ADP nem na de adenosina.

Entretanto, quando foi adicionado ao banho ATP, como substrato e Gd como inibidor, somente a concentração do ATP foi alterada em relação a situação controle. Além disso, é importante ressaltar que quando foi usado somente o inibidor para a via, Gd, mesmo na ausência do substrato, ocorreu um aumento significativo na concentração do ATP, sugerindo uma possível modulação extracelular do ATP quando utilizamos o gadolínio.

Este achado mostra a efetividade desse metal, nessa concentração, em inibir a hidrólise do ATP. Porém, indica que ao contrário do esperado a formação de adenosina via NTPDase, provavelmente não é um mecanismo operante em condições fisiológicas de um rato normotenso pois, mesmo fornecendo o substrato para a via enzimática não ocorreu a formação de adenosina. Sendo assim, é possível concluir que apesar de o Gd mostrar-se um eficiente inibidor da via de formação de adenosina, o aumento da reatividade vascular à fenilefrina provocado por este metal não foi devido a não formação de adenosina.

Outro aspecto a ser analisado é o aumento da concentração de ATP após inibição da NTPDase. Este aumento pode ser explicado pela redução da hidrólise do ATP depois da incubação com Gd. O dado deste estudo que corrobora com o resultado do HPLC é o mostrado através da realização de précontrações com fenilefrina seguida de incubações com ATP e Gd, onde foi possível observado um aumento da resposta vasodilatadora provocada pelo ATP após a incubação com o Gd.

Com base nos resultados até aqui apresentados é possível perceber que respondemos a pergunta da hipótese do estudo, ou seja, a adenosina não é formada a partir da hidrólise dos nucleotídeos via NTPDases e, aparentemente não participa da regulação do tônus vascular em condições fisiológicas de um rato normotenso. Porém, é possível notar que a reatividade vascular a fenilefrina foi alterada com o uso do gadolínio e, ainda que, esse aumento não esta relacionado com a inibição dos canais para potássio e nem com a inibição da liberação de NO.

Como descrito anteriormente o Gd é um metal pertencente a família dos lantanídeos, sendo, de acordo com sua concentração, considerado tóxico ao homem. Existem vários estudos na literatura, em especial do nosso laboratório, que relata as alterações cardiovasculares causada pelos metais pesado, chumbo e mercúrio, em diferentes concentrações.

Estudos recentes mostram que a exposição do mercúrio em concentrações nanomolares altera a função cardíaca. Além disso, o uso de concentrações variadas de mercúrio, em modelos de animais, induz alteração no tônus vascular. Os efeitos agudos do mercúrio incluem a vasodilatação em artérias aorta e pulmonar quando expostas a concentrações milimolares (Golpon *et al.*, 2003). No entanto, estudos demonstraram que, em doses menores (0,5-10µM e 6 nM), o mercúrio induz a vasoconstrição em artérias caudais de ratos (da Cunha *et al.*, 2000; Wiggers *et al*, 2008a).

Partes destes efeitos são mediadas pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, de prostanóides da via ciclooxigenase e da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) (da Cunha *et al.*, 2000;

Wiggers et al, 2008a). Efeitos semelhantes são descritos para o chumbo.

Diante desses dados na literatura, levantou-se a hipótese de que o gadolinio, assim como o chumbo e mercúrio poderia ser o responsável pelo efeito vasoconstrictor encontrado neste trabalho. Adicionalmente, estudos anteriores mostram que o gadolínio pode afetar a atividade da ECA através da transmetalação com zinco (Corot et al., 1998).

Assim, para iniciar o estudo da hipótese sugerida, foi utilizado losartan como antagonista para o receptor de angiotensina II, AT1, e o enalapril como bloqueador da enzima conversora de angiotensinogênio, ECA. Ambos os efeitos desses fármacos, na reatividade vascular, foram avaliados de maneira isolada e conjunta com o gadolinio. Como pode ser observado nos resultados o losartan e o enalapril administrados isoladamente não alteraram as respostas vasculares à fenilefrina, porém quando adicionados juntamente com o Gd reduzem o aumento da reatividade vascular causada pelo Gd, a níveis da condição controle. Sendo assim, este achado esclarece o mecanismo pelo qual o gadolínio produziu aumento da reatividade vascular, ou seja, o aumento na resposta contrátil à fenilefrina induzida pelo Gd, provavelmente depende do aumento da produção de angitensina II e estimulação dos receptores AT1.

Embora os resultados obtidos neste estudo tenham negado a hipótese inicial proposta para este trabalho, foi possível esclarecer que o gadolínio, até então usado com o intuito de inibir a via das NTPDases, mesmo nessa concentração que é considerada baixa, pode exercer alterações cardiovasculares semelhantes ao chumbo e ao mercúrio em ratos. Porém este trabalho foi o primeiro a demonstrar essas alterações vasculares causadas pelo

gadolínio.

CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

Através desse estudo foi possível demonstrar que:

- O gadolínio promove aumento da reatividade vascular à fenilefrina, de maneira dependente do endotélio vascular.

O Gd, na concentração de 3 μM, é um inibidor eficiente das NTPDases, inibindo dessa forma a hidrólise do ATP e ADP e ainda, após a inibição desse grupo enzimático o nucleotídeo de maior acúmulo no sistema vascular é o ATP.
Na concentração usada para esse estudo este metal não bloqueia canais para cálcio sensíveis ao estiramento (SACs).

 Ao contrário do esperado, a adenosina produzida pela hidrólise dos nucleotídeos através da NTPDases e 5'-nucleotidase, não parece ser um sistema operante envolvido na regulação do tônus vascular em animais normotensos.

- O efeito vasoconstrictor do Gd não parece estar relacionado nem com o bloqueio da produção de NO e nem com ativação de canais para potássio.

 Através deste estudo é possível sugerir que essa ação de aumento da resposta vascular endotélio dependente, ocasionada pelo uso de 3µM de Gd, envolve estimulação da ECA e estimulação dos receptores AT1 da angiotensina II.

PERSPECTIVAS

Perspectivas

7- PERSPECTIVAS

A realização deste trabalho abriu um novo campo de estudo para o gadolínio. Essa pesquisa demonstrou que além dos vários efeitos já descritos para este metal (cardioproteção, meio de contraste e inibidor das NTPDases), ele também pode atuar alterando respostas cardiovasculares de maneira semelhante ao mercúrio e chumbo. A partir daí, várias pesquisas podem ser realizadas, como por exemplo:

o estudo mais detalhado da influência deste metal sobre o sistema renina-angiotensina;

- a influência na formação das espécies reativas de oxigênio;

- a liberação de prostanóides vasoconstrictores através da via da ciclooxigenase, entre outros.

Outro caminho é continuar o estudo dos efeitos dos nucleotídeos e nucleosídeos nas respostas vasculares. Visto que, aparentemente a adenosina, produzida via NTPDases e ecto-5'-nucleotidase, não possui o efeito regulador do tônus vascular esperado em ratos normotensos e saudáveis, pode-se avaliar essa regulação em animais hipertensos ou ainda após o infarto agudo do miocárdio. Outros trabalhos já demonstram a importância dessas enzimas nestes casos.

Além disso, como demonstrado após inibir a via de hidrólise do ATP e ADP pelas NTPDases o nucleotídeo de maior acumulo é o ATP. Sendo assim, o uso de inibidores específicos para os receptores purinérgicos onde o ATP é capaz de atuar, pode esclarecer a importância deste nucleotídeo, nessa via enzimática, para o sistema cardiovascular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abebe W and Mustafa SJ. A1 adenosine receptor-mediated Ins(1,4,5) P3 genaration in allergic rabbit airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* 275: L990-L997;1998.

Álvarez Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaices M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J. Hypertens.* 23: 767-777; 2005.

Angus JA, Cocks TM. Endothelium. Derived relaxing factor. *Pharmacol.Ther.* 41: 303-351; 1989.

Antman EM, DeMets D, Loscalzo J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation* 112: 759-770; 2005.

Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Contractions to oxygen-derived free radical are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 13: 859-864; 1989.

Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue reninangiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med.* 79: 76-102; 2001. Battastini AMO, Rocha JBT, Barcelos CK, Dias R, Sarkis JJ. F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neuroch. Res.* 16: 1303-1310; 1991.

Barlow RS, White RE. Hydrogen peroxidase relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *Am J Physiol*. 275, 1283-1289; 1998.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 1620-16244; 1990.

Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. Oxicidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 40: 229-240; 1994.

Belardinelli L, Shryock JC , Snowdy S, Zhang Y, Monopoli A, Lozza G, Onginini E, Olsson RA , and Dennis DM. The A_{2A} adenosine receptor mediates coronary vasodilatation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284: 1066-1073; 1998.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87: 245-313; 2007.

Böhmer AE, Pochmann D, Sarkis JJ. In vitro effect on nucleotide hydrolysis by blood serum from adult. *Chem. Biol. Interact.* 25: 159-164; 2006.

Bolli R. Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292: 19–27; 2007.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Bioch.* 72: 248-254; 1976.

Bucheimer RE, Linden J. Purinergic regulation of epithelial transport. *J. Physiol*. 23: 311–321; 2004.

Burnstock G. Dual control of vascular tone and remodeling by ATP released from nerves and endothelial cells. *Pharmacol.Reports.* 60: 12-20; 2008.

Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev.* 58: 58-86; 2006.

Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87: 659–797; 2007. Burnstock G. & Erlinge D. P2 receptors in cardiovascular regulaton and disease. *Purinergic Signal.* 4: 1-20; 2008.

Caldwell RA, Clemo HF and Baumgarten CM. Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical considerations. *Am J Physiol Cell Physiol.* 275: 619-621; 1998.

Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-media Ted smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol*. 184: 409-420; 2000.

Carvalho MH, Nigro D, Lemos VS, Tostes RCA, Fortes ZB. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev. Bras. Hipertens.* 8: 76-88; 2001.

Chan K, Delfert D, Junger KD, A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPaseactivity. *Anal. Biochem.* 157: 375-380; 1986.

Colman RW. Aggregin: a platelet ADP receptor that mediates activation. *J. FASEB.* 4 1425-1435; 1990.

Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension*. 23: 229-235; 1994.

Cunha FN, de Assis GPS, Silva CEC, Stefanon I, Pinto VD, Vassallo DV. Effects of mercury on the contractile activity of the right ventricular myocardium. *Arch Environ Contam Toxicol.* 41: 374-380; 2001.

Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res.* 89: 650-660; 2001.

De Wit C, Bolz SS, Pohl U. Interaction of endothelial autacoides in microvascular control. Z Kardiol. 89: 113-116; 2000.

Escalada A, Navarro P, Ros E, Aleu J, Solsona C, Martín-Satué M. Gadolinium Inhibition of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity in *Torpedo* Electric Organ. *Neurochem Res.* 29: 1711–1714; 2004.

Ellis A, Triggle CR. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol.* 81: 1013–1028; 2003.

Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflamatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol.* 15: 1514-1529;2004.

Feletou, M; Vanhoutte, PM. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. *J Physiol Pharmacol.* 50: 525-534;1999.

Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291: 985-1002; 2006.

Ferreira AJ, Santos RAS. Cardiovascular actions of angiotensin- (1-7). *Braz J Med Biol Res.* 38: 499-507; 2005.

Forstemann U, Nakane M, tracey WR, Pollock JS. Isorms of nitric-oxide syntase: purification and regulation. Methods Enzymol. 233: 10-15; 1994.

Forstemann U, Closs El, Pollock JS, Nakane M, Schawarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide syntase isozymes. Characterization, purification,molecular cloning,and functions. *Hypertension.* 23: 1121-1131; 1994.

Frassetto SS, Schetinger MR, Schierholt R, Webber A, Bonan CD, Wyse AT, Dias RD, Netto CA, Sarkis JJ. Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naive and preconditioned rats. *Braz J. Med Biol Res.* 33: 1369-1377; 2000.

Frölich JC, Förstermann U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistence. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 19: 211-215; 1989.

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

Golpon HA, Puchner A, Barth P, Welte T, Wichert PV, Feddersen CO. Nitric oxide-dependent vasorelaxation and endothelial cell damage caused by mercury chloride. *Toxicology.* 192: 179-188; 2003.

Goto M, VanBavel E, Giezeman MJMM: Vasodilatory effect of pulsatile pressure on coronary resistence vessels, *Circ Res.* 79: 1039-1045; 1996.

Grgic I, Kaistha BP, Köhler R. Endothelial Ca (2+) - activated K (+) channels in normal and impared EDHF-dilator response- relevance to cardiovascular patologies and drug discovery. *Br J Pharmacol*. 157: 509-526; 2009.

Grinthal A, Guidotti G. Dynamic motions of CD39 transmembrane domains regulate and are regulated by the enzymatic active site. *Biochemistry.* 43: 13849-13858; 2004.

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superóxide anion is involved in the breakdown of endothelium- derived vascular relaxing factor. Nature. 320: 454-456; 1986.

Hamill OP and McBride DW. The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol. Rev.* 48: 231-252; 1996.

Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, Kuroda Y. Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca2+- activated K+ channel. *Heart Vessels*. 13: 9-17; 1998.

Heine P, Braun N, Sévigny J. The C-terminal cysteine-rich region dictates specific catalytic properties in chimeras of the ecto-nucleotidases NTPDase1 and NTPDase2. *Eur. J. Biochem.* 262: 102–107; 2001.

Heller R, Polack T, Grabner K, tell V. Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. *Atherosclerosis*. 144: 49-57; 1999.

Hourani SMO, Boon K, Fooks HM, Prentice DJ. Role of cyclic nucleotides in vasodilations of the rat thoracic aorta induced by adenosine analogues. *Br.J. Pharmacol.* 133: 833-840; 2001.

Houriuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent Progress in Angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* 33: 613-621; 1999.

Hui RE and Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. Free Radic Res Commun. 18: 195-199; 1993.

Idée J.M, Berthommier C., Goulas V, Corot C., Santus R., Hermine C., Schaefer M. & Bonnemain B. Haemodynamic effects of macrocyclic and linear gadolinium chelates in rats: role of calcium and transmetallation. *Biometals.* 11: 113-23; 1998.

Idée JM, Port M, Raynal I, Schaefer M, Le Greneur S, Corot C. Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review. *Fundam Clin Pharmacol.* 20: 563–576; 2006.

Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 25: 171-191; 1985.

Iwamoto T, Umemura S, Toya Y, Uchibori T, Kogi K, Takagi N, Ishii M. Identification of adenosine A2 receptor-cAMP system in human aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 15: 905-910; 1994.

Katuzic ZS, Schugel J, Consentino F, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contraction to oxygen-derived free radicals in the canine basilar artery. *Am J Physiol*. 264: 859-864; 1993.

Kettlun AM, Leyton M, Valenzuela MA, Mancilla M, traversa-Cori A. Identification and subcellular localization of two isoenzymes of apyrase from Solanum tuberosum. *Phytochemistry.* 31: 1889- 1894; 1992.

Kifor I, Dzau VJ, Endothelial rennin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res.* 60: 422-428; 1987.

Kitakaze M, Hori M, Sato H, Takashima S, Inoue M, Kitabatake A, Kamada T. Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs. *Circ. Res.* 69: 1402-1408; 1991.

Koh KK, Oh PC, Quon MJ. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? *Cardiovasc Res.* 81: 649-59; 2009.

Kojda G, Harrison D. Interations between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 43: 562-71; 1999.

Komoszynski MA. Apyrases-enymes involved in the control of nucleotides level in cells and tissues. *Adv. Biochem*. 40: 174-180; 1994.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 4651-4655; 1991.

Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sévigny J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDase 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal.* 1: 193–204; 2005.

Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: Overview of the renin-angiotensin system an endocrine and paracrine system . *Endocrinology*. 144: 2179-2183; 2003.

Levistky DO, Clergue M, Lambert F, Souponitskaya MV, Le Jemtel TH, Lecarpentier Y, Lompré AM,. Sarcoplasmic reticulum calcium transport and Ca²⁺-ATPase gene expression in thoracic and abdominal aortas of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J. of Biol. Chem.* 268: 8325-8331; 1993.

Leal D, Streher C, Neu T, Bittencourt F, Leal C, Silva J, Morsch V, Schetinger M. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ectodiphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta*. 18: 9-15; 2005.

Long CJ, Stone TW. The release of endothelium-derived relaxant factor is calcium dependent. *Blood Vessels*. 22: 205-208; 1985.

Lynch FM, Austin C, Heagerty AM and Izzard AS. Adenosine and hypoxic dilatation of rat coronary small arteries : roles of the ATP-sensitive potassium channel ,endothelium, and nitric oxide. *Am J Physiol heart Circ Physiol.* 290: 1145-1150; 2006.

Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Signal Transduction in Smooth Muscle. Inveted Review. CGMP- dependent protein kinase signalling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression . *J Appl Physiol.* 91: 1421-1430; 2001.

Marala RB and Mustafa SJ. Adenosine A₁ receptor-induced upregulation of protein Kinase C: role of pertussis toxin-sensitive g protein(s). *Am J Physiol heart Circ Physiol.* 269: 11619-1624; 1995.

Mardini IA, FitzGerald GA. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a growing class of anti-inflammatory drugs. *Mol Interv.* 1: 30-38; 2001.

Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Nitric oxide, oxygen - derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol*. 15: 279-307; 1997.

Marín J, Sánchez-Ferrer, CF; Salaices, M. Effects of ouabain on isolated cerebral and femoral arteries of the cat: a functional and biochemical study. *Br J Pharmacol.* 93: 43-52; 1988.

Martin PL & Potts AA: The endothelium of the rat renal artery plays an obligatory role in A₂ adenosine receptor-mediated relaxation induced by 5'-N-ethycarboxamidoadenosine and N⁶ – cyclopentyladenosine. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 270: 893-899; 1994.

Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics*. 62: 77-86; 2007.

Melo LG, Gnecchi M, Pachori AS, Kong D, Wang K, Liu X, Pratt RE, Dzau VJ. Endothelium-targeted gene and cell-based therapies for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 10: 1761-1774; 2004.

Meyerhof O. New investigations on enzymatic glycolysis and phosphorylation. 1948. *Experientia*. 15: 105-119; 1994.

Moncada S, Hermen AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Tromb. Res.* 11: 323-344; 1977.

Moncada S, Palmer RMJ, Higges EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142; 1991.

Morishita R, Higaki J, Miyazaki M, Ogihara T. Possible role of the vascular renin-angiotensin system in hypertension and vascular in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension.* 19: 62-67; 1992.

Morris CE. Mechanosensitive ion channels. J. Membr. Biol. 113: 93-107; 1990.

Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2005.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptor: structure, properties, and fuction *Physiol. Rev.* 70: 272-273; 1999.

Nicolosi AC, Kwok CS, Contney SJ, Olinger GN, Bosnjak ZJ. Gadolinium prevents stretch-mediated contractile dysfunction in isolated papillary muscles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280: 1122–1128; 2001.

Nicolosi AC, Kwok CS, Bosnjak ZJ. Antagonists of stretch-activated ion channels restore contractile function in hamster dilated cardiomyopathy. *J Heart Lung Transplant.* 23: 1003-1007; 2004.

Nicolosi AC, Strande JL, Hsu A, Fu X, Su J, Gross GJ, Baker JE. Gadolinium limits myocardial infarction in the rat: Dose–response, temporal relations and mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 44: 345–351; 2008.

Ng KF, Leung SW, Man RY, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor mediated relaxations in pig coronary arteries do not involve Gi/o proteins. *Acta Pharmacol. Sin.* 29: 1419-1424; 2008.

Ohlstein EH and Nichols AJ. Rabbit polymorphonuclear neutrophils elicit endothelium-dependent contration in vascular smooth muscle. *Circ. Res.* 65: 917-924; 1989.

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

Pearl RG. Adenosine induces pulmonary vasodilation in the perfused rabbit lung via na adenosine A₂ receptors. *Anesth. Analg.* 79: 46-51; 1994.

Perazella MA. Gadolinium-contrast toxicity in patients with kidney disease: nephrotoxicity and nephrogenic systemic fibrosis. *Curr Drug Saf.* 3: 67-75; 2008.

Pilla C, Emanuelli T, Battastini AMO, Dias RD, Sarkis JJ. ATP diphosphohydrolase (APIRASE, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. *Platelets.* 7: 225-230; 1996.

Prentice DJ, Payne SL, Hourani SMO. Activation of two sites by adenosine receptor agonists to cause relaxation in rat isolated mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol* 122: 1509- 1515; 1997.

Ralevic V, Burnstock G. Involvement of purinergic in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect*. 16: 133-140 ; 2003.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 50: 413-492; 1998.

Rapopport RM, Murod F. Agonist – induced endothelium-dependent relaxation in the aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.* 52: 353-357; 1983.

Ray CJ, Marshall JM. The cellular mechanisms by which adenosine evokes release of nitric oxide from rat aortic endothelium. *J. Physiol.* 570: 85-96; 2006.

Robson CS, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* 2: 409-30; 2006.

Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *J.of Cardiovasc. Pharmacol.* 22: 1-14; 1993.
Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiviness of vascular smooth muscle. *Am J of Physiol.* 250: 815-821; 1986.

Sachs F. Mechanical transduction in biological systems. *Crit Rev Biomed Eng* 16: 141-169; 1988.

Sarkis JJ, Battastini AMO, Oliveira EM, Frassetto SS, Dias RD. ATP-Diphosphohydrolase: an overview. *Journal Brazil Associated and Advanced*. 47: 131-136; 1995.

Sato A, Miutra H, Liu Y and Guterman D. Differential regulation of the human coronary arterioles by adenosine receptor subtypes *(Abstract). Circ 104,* Supp II: 287, 2001.

Schiffrin EL. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 38: 3-6; 2001.

Schiffrin EL. Vascular endotélio in hypertension. *Vasc Pharmacol*. 43: 19-29; 2005.

Schwiebert EM, Zsembery A. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1615(1-2): 7–32; 2003.

Scott-Burden T & Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation*. 87: 51-55; 1993.

Shimokawa H, Matoba T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol Res.* 49: 543-549; 2004.

Shryock JC, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am. J. Cardiol.* 79: 2-10; 1997.

Stoclet JC, Muller B, György K, Andriantsiothaina R, Kleschyov AL. The inducible nitric oxide syntase in vascular and cardiac tissue. *Eur. J. Pharmacol.* 375: 139-155; 1999.

Smith J, Farris FF. Methyl mercury pharmacokinetics in man: a reevaluation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 137: 245-52; 1996.

Soccio M, Toniato E, Evangelista V, Carluccio M, De Caterina R. Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *Eur J Clin Invest.* 35: 305-14; 2005.

Szasz T, Thakali K, Fink GD, Watts SW.A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 232: 27-37; 2007.

Talukder H, Morrison R and Mustafa SJ. Comparison of the vascular effects of adenosine in isolated mouse heart and aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282: 49 – 57; 2002.

Tostes RC, Fortes ZB, Callera GE, Montezano AC, Touyz RM, Webb RC, Carvalho MH. Endothelin, sex and hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 114: 85-97; 2008.

Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 52: 639-672; 2000.

Triggle CR, Hollenberg M, Anderson TJ, Ding H, Jiang Y, Ceroni L, Wiehler WB, Ng ES, Ellis A, Andrews K, McGuire JJ, Pannirselvam M. The endothelium in health and disease--a target for therapeutic intervention. *J Smooth Muscle Res.* 39: 249-67; 2003.

Urakami-Harasawa L, Shimokava H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin. Invest.* 100: 2793-2799; 1997.

Valenzuela MA, Lopez J, Depix M, Mancilla M, Kettlun AM, Catalan L, Chiang M, Garrido J, Traversa- Cori A. Comparative subcelllular distribuition of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. *Comp. Biochem. Physiol.* 93B: 911-919; 1989.

Vanhoutte PM. Endothelial Dysfunction. The first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ. J.* 73: 595 – 601; 2009.

Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Brit. J. of Pharmacol.* 144: 449–458; 2005.

Vanhoutte PM. Other endothelium-derived vasoactive factores. *Circulation*. 87 (Suppl V): V9-V7; 1993.

Vanhoutte PM. How to assess endothelial function in human blood vessels. *J. of Hypertens.* 17: 1047-1058; 1999.

Vassort G. Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium, *Physiol. Rev.* 81: 767–806; 2001.

Voelter W, Zech K, Arnold P, Ludwig G. Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography. *J. Chromatogr*.199: 345–354; 1980.

Wang TF, Guidotti G. CD39 is an ecto- (Ca 2+, Mg2+)- apyrase. *J. of Biol. Chem.* 271: 9898-9901; 1996.

Wiggers GA, Stefanon I, Padilha AS, Peçanha FM, Vassallo DV. Oliveira EM. Low nanomolar concentration of Mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. *Comp. Biochem. and* Physiol. Part C. 147: 252-260; 2008.

Wu KK. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol*. 33: 179-207; 1995.

Yanagisawa M, Kurihara S, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Goto, Masaki KT. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular cells. *Nature*. 322: 411-4; 1988.

Yamazaki T, Komuro I, Shiojima I, Yazaki Y. The renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy. *Heart*, 76: 01- 24; 1996.

Yegutkin GG. Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*. 1783(5):673-94; 2008.

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

Ziganshin AU, Hoyle C, Burnstock G. Ecto-enzime and metabolism of extracellular ATP. *Drug Dev. Res.* 32: 134-146; 1994.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res.* 52: 44–56; 2001.

ANEXOS

ANEXO I

Gadolinium increases the reactivity of rat aortic rings

^{1*}Jhuli Keli Angeli, ^{3#}Denise Barbosa Ramos, ^{3,4}Emerson André Casali, ³Diogo Onofre Gomes de Souza, ³João José Freitas Sarkis, ^{1,2}Dalton Valentim Vassallo and ³Cristina Ribas Fürstenau.

¹Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil.

²Escola de Ensino Superior da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, EMESCAM, Vitória, ES, Brazil.

³Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Laboratório de Fisiologia e Nutrição Experimental, Centro Universitário Metodista do

IPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Msc. Cristina Ribas Fürstenau Basso

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Bioquímica

Rua Ramiro Barcelos, 2600 - ANEXO

CEP 90035-003

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone number: ++ 55 (51) 3308 5555

FAX number: ++ 55 (51) 3308 5540

E-mail: cristinafurstenau@terra.com.br

Abstract

Gadolinium (Gd) blocks intracellular and extracellular ATP hydrolysis. We investigated whether the blockade of E-NTPDase activity with Gd affects vascular reactivity and evaluated pressor responses to phenylephrine (PHE). Experiments were performed before and after treatment of aortic rings with 3 µM gadolinium chloride, and doseresponse curves to PHE $(10^{-10} \text{ to } 10^{-4} \text{ M})$ were measured in the presence and absence of endothelium. The effects of 1.0 mM ATP after pre-contractions with 10⁻⁴ M PHE; the effects of Gd in rings with endothelium pre-contracted with 10^{-4} M PHE after 100 μ M L-NAME treatment. Gd increased the maximum response (E_{max}) and the sensitivity (pD₂) to PHE. ATP administration reduced tension, but the ATP relaxing effect increased after Gd treatment. Endothelial damage eliminated the Gd effect. However, the increased pressor response to PHE after L-NAME treatment in the presence of endothelium was not altered after Gd administration. Measurement of ATP metabolisation to ADP and adenosine showed that Gd treatment increased extracellular ATP concentration and reduced ADP formation, but adenosine concentration was unaffected. Results suggest that Gd, although modulating extracellular ATP, increased vascular reactivity to PHE independently of adenosine production. This hypothesis is fact reinforced by the increased ATP vasodilation after E-NTPDase activity reduction. The increased reactivity to PHE is endothelium- mediated and involves increased stimulation of angiotensin II AT1 receptors. These findings suggest that in aorta, the increased reactivity to PHE by Gd action does not depend on the reduction of E-NTPDase activity and adenosine production; rather, it is endothelium-dependent, involving an increased stimulation of ACE and angiotensin II AT1 receptors.

Key words: Gadolinium chloride, E-NTPDase, adenosine, vascular reactivity.

1 Introduction

Gadolinium (Gd) is a trivalent lanthanide cation that blocks stretch calcium channels (Caldwell et al., 1998) and attenuates post-ischemic myocardial stunning (Nicolosi et al., 2008). It is currently used as a magnetic resonance contrast medium, <u>gadobenate dimeglumine</u> (Gd-bopta) (Klein et al., 2008), but concern for contrast-induced nephropathy has been reported (Perazella, 2008). Additionally, Gd interacts with pathways involved in intracellular and extracellular ATP hydrolysis (Burnstock, 2006). Escalada et al. (2004) showed that 3µM of Gd has a potent inhibitory action on ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-E-NTPDase) activity from the electric organ of *Torpedo marmorata*.

Extracellular nucleotides are important molecules involved in the regulation of different biological processes in distinct tissues. However, extracellular ATP exhibits opposite effects depending on the concentration as well as the cell and the receptor in which it acts. In the vasculature, ATP is released as a neurotransmitter from sympathetic nerves and binds to P2X receptors of smooth muscle cells, producing vasoconstriction. When released from endothelial cells, as in hypoxic conditions, ATP binds to P2Y receptors and initiates vasodilation (Ralevic and Burnstock, 2003). This nucleotide also exerts other effects on the vasculature, controlling smooth muscle and endothelial cell cell proliferation, arrhythmias, cardiac hypertrophy and apoptosis (Ralevic and Burnstock, 2003).

The action of extracellular nucleotides is terminated by a subset of enzymes called ectonucleotidases. Among those, the E-E-NTPDase family seems to be the most important. E-NTPDase1 is the major ectonucleotidase expressed in the vasculature (Enjyoji K et al., 1999), and its activity limits platelet activation by ADP hydrolysis (Robson et al., 1997). E-NTPDase2, another ectonucleotidase in the vasculature, prefers

nucleotide triphosphates to nucleoside diphosphates and activates platelets by converting ATP to ADP, a platelet agonist. Thus, E-NTPDase1 is dominantly expressed by endothelial and vascular smooth muscle cells, while E-NTPDase2 is predominantly associated with the adventitial surfaces (Sévigny et al., 2002). Together with E-E-NTPDases, ecto-5′-nucleotidase is also responsible for the end of nucleotide signalling by converting AMP to adenosine (Schetinger et al., 2000).

A previous report showed that Gd, used as a chelate solution, also affects the activity of the angiotensin converting enzyme (ACE) via a transmetallation effect with zinc (Corot et al., 1998). This enzyme is a metallopeptidase that changes angiotensin I into angiotensin II, and the possibility of a transmetallation effect is likely due to the presence of zinc in its structure. Angiotensin II has different biological actions and is considered to be the major effector of the renin-angiotensin system (RAS) (Kifor and Dzau, 1987). Angiotensin II acts mainly through the AT₁ receptor that is expressed in multiple tissues, including adrenal, kidney, heart, aorta, lungs, liver, testis, pituitary gland and brain. When binding to the AT₁ receptor, angiotensin II promotes vasoconstriction and pressor effects, also causing thrombosis, inflammation and vascular and myocardial hypertrophy (Touyz and Berry, 2002). Considering the important role of angiotensin II in the vasculature, both the blockade of its formation as well as its actions have clinical relevance. The present study was undertaken to investigate whether Gd might alter vascular reactivity with its action taking place at the endothelial level.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals

L-phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride, L-NAME (N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride), enalaprilate and gadolinium chloride were purchased from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.), and sodium pentobarbital was bought from Fontoveter (São Paulo, SP, BR). These drugs were dissolved in distilled water. All other reagents were also of analytical grade.

2.2 Animals

Wistar rats of both sexes (260–300 g, N=30) were used in the present study. The care and use of laboratory animals were in accordance with NIH guidelines. All rats had free access to tap water and were fed with rat chow *ad libitum*. All experiments were conducted in compliance with the guidelines for biomedical research as stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology and approved by the Ethics Committee (CEUA-EMESCAM).

2.3 Tissue bath studies

Animals were anesthetised with sodium pentobarbital (35 mg/kg, i.p.) and killed by exsanguination. A section of the thoracic aorta was removed and placed in cold, oxygenated Krebs–Henseleit bicarbonate buffer (KHB). The buffer consisted of (in mM, final concentrations): 131 NaCl, 4.7 KCl, 11.9 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂.2H₂O, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄.7H₂O, 11 glucose and 0.01 EDTA, at 36.5 °C, and it was gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ to maintain the pH at 7.4. The aorta was cleaned of fat and connective tissue and cut into rings of 4-5 mm in length. Four to five rings were obtained from each aorta. Rings were mounted between parallel wires in tissue baths of

5 mL volume. Rings were stretched to an optimal resting tension of 1.0 g. Isometric tension was recorded by using an isometric force displacement transducer (GRASS[®] FT03, RI, U.S.A.) connected to a data acquisition system (MP100 Biopac Systems, Inc; CA, U.S.A.).

2.4 Experimental protocols

After 30-45 minutes of equilibration, each aortic ring was exposed twice to 75 mM KCl to assess its maximum contractility. Each ring was sequentially washed, re-equilibrated and allowed to relax to baseline. Thirty minutes later, the rings were contracted with 10^{-7} M phenylephrine (PHE), and 10^{-5} M acetylcholine (ACh) was added to assess the integrity of the endothelium. A relaxation equal to or greater than 90% was considered as demonstration of the functional integrity of the endothelium. After thirty minutes, cumulative concentration–response curves were generated for PHE (10^{-10} to $3x10^{-4}$ M). In other experiments, the phenylephrine concentration–response curve was constructed in endothelium-denuded rings. The endothelium was removed by gently rubbing the intimal surface with a stainless steel rod. The effectiveness of endothelium removal was confirmed by absence of the relaxation induced by 10^{-5} M ACh in aortas pre-contracted with PHE.

After stabilisation and completion of the endothelial integrity test, a concentrationresponse curve to PHE (ranging from 10^{-10} to $3x10^{-4}$ M) was performed both before and after thirty minutes of incubation with 3 μ M Gd. The ability of Gd in reducing ATP/ADP metabolism by E-NTPDase inhibition was checked using pre-contractions with 10-7 M PHE followed by the addition of 1.0 mM ATP. The amount of relaxation was measured before and after incubation with Gd. To verify if the adenosine production and involvement of NO are endotheliumdependent, cumulative concentration–response curves were generated for PHE (10^{-10} to $3x10^{-4}$ M) under control conditions after 100 μ M L-NAME, incubation with 100 μ M L-NAME and Gd administration. Also, to test whether Gd affects the generation of angiotensin II, AT1 receptors were blocked by 10 μ M losartan, and ACE activity was blocked by 10 μ M enalaprilate.

2.5 Biochemical studies

To verify the ability of gadolinium in blocking E-NTPDase activity, we used a thoracic aorta preparation as previously outlined by Levitsky et al. (1993) with some modifications. Briefly, about 50 mg of thoracic aortas from Wistar rats were dissected out, and the fat and connective tissues were removed using a microscissor. Further, aortas were manually homogenised with a motor-driven Teflon-glass homogeniser in 0.7 mL of medium containing 100 mM KCl, 30 mM Tris-HCl pH 7.4, and 5.0 mM sodium azide. Each homogenate was transferred to an eppendorf tube and centrifuged at 1250 X g for two minutes (Centrifuge 5402, *Eppendorf*). The supernatant (S1) was collected, and the pellet (P1) was rehomogenised in 0.5 mL of the isolation medium. The second homogenate was centrifuged under similar conditions as described before, and the extraction procedure was repeated once more. The pellets (P1 to P3) were discarded, and the supernatants (S1 to S3) were pooled and used for further determination of E-NTPDase activity.

The determinations of E-NTPDase activity in aorta preparations were carried out at 37° C using a reaction mixture containing 45 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 2.0 mM CaCl₂, 0.5 mM KCl, 10 mM glucose + 0.21 M sucrose, pH 8.0, in a final volume of 200 μ L. About 10 μ g of aorta protein (measured according to Bradford, 1976) were added

per tube, and the enzyme reactions were initiated by the addition of substrates (ATP or ADP) in a final concentration of 2.0 mM. Gd was added to the reaction mixture from water solution at a final concentration of 75 or 100 μ M, and E-NTPDase activity was assessed either in the presence or absence (control group) of Gd. The enzyme reactions were stopped after eight minutes of incubation by addition of trichloroacetic acid (TCA, 5% final concentration). Incubation time and protein concentration were chosen in order to ensure the linearity of the enzymatic reactions. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was measured using a colorimetric method as previously described by Chan et al., 1986. Controls to correct for non-enzymatic hydrolysis of substrates were obtained by adding aorta preparations after the reactions had been stopped with TCA. All experiments were performed in triplicate, and enzyme activities are expressed as nmol Pi released per minute per milligram of protein.

The metabolism of nucleotides was also checked by HPLC. As a final experiment, we investigated whether the concentration of the hydrolysis products due to E-NTPDase activity would change in the nutrient solution after addition of 1.0 mM ATP, either in the absence or in the presence of Gd. After incubation with 1mM ATP, the supernatant sample of aortic rings in different conditions (with or without Gd and/or PHE) was collected and centrifuged (14000 $\times g$ for 10 min). Aliquots of 50 µL of each supernatant were applied to a reverse-phase HPLC system using a 25 cm C18 Shimadzu column (Shimadzu, Japan) at 260 nm, with a mobile phase containing 60 mM KH₂PO4, 5.0 mM tetrabutylammonium chloride, pH 6.0, in 30% methanol, according to a method previously described by Voelter et al. (1980). Purine peaks (ATP, ADP, AMP, adenosine and inosine) were identified by their retention times and quantified by comparison with standards. The results are expressed as the amount of purines in nmoles per mL.

2.6 Statistical analysis

All values are expressed as means \pm S.E.M. with the exception of the measured E-NTPDase activity values, which are expressed as means \pm S.D. Contractile responses are expressed as a percentage of the maximum response produced by 75 mM KCl. Relaxation responses to ACh are expressed as the percentage of relaxation of the maximum contractile response. For each concentration-response curve, the maximum effect (E_{max}) and the concentration of agonist that produced 50% of the maximal response (log EC₅₀) were calculated using non-linear regression analysis (GraphPad Prism Software, San Diego, CA). The sensitivity of the agonists is expressed as pD₂ (log EC₅₀). Results were analysed using Student's *t*-test and analysis of variance (ANOVA) followed by a Fisher's *post-hoc* test (GB-STAT, version 4.0, Dynamic Microsystem Inc., Silver Spring, MD). Differences were considered statistically significant if the P value was 0.05 or less.

3 Results

Figure 1 shows that after treatment with Gd for 30 min, there was an increase in the pressor responses to phenylephrine. The concentration-response curves show that E_{max} (Control= 72.33 ± 3.52 %; Gd= 101.35 ± 6.40 %, P< 0.05) and the sensitivity (Control= -6.90 ± 0.16 %; Gd= -10.54 ± 2.81 %, P< 0.05) increased after Gd treatment.

As the E-NTPDase and ecto-5'-nucleotidase cascade metabolises ATP into adenosine, we tested the inhibitory action of Gd with the administration of 1.0 mM ATP. Figure 2 shows that after Gd treatment of cells with intact endothelia, there was an increase in the vasodilatory effect produced by ATP (Ct= -33.56 ± 4.10 %; Gd= -47.46 ± 4.12 %).

To investigate the endothelial dependence of Gd actions, the same protocol was repeated with denuded endothelial rings. Figure 3 shows that after endothelial damage, the leftward displacement of the concentration-response curve to PHE was eliminated. No changes in E_{max} (Ct = 132.6 ± 8.60 %; Gd= 122.4 ± 7.16 %) or pD2 (Ct = 8.471 ± 0.11; Gd= 8.178 ± 0.26) were observed. Since Gd action is dependent on the presence of a functional endothelial layer, and the increased reactivity might result from the inhibition of a vasodilator response or from the stimulation of a vasoconstrictor release, we tested the putative role of nitric oxide (NO) using 100 µM L-NAME. Figure 3 shows that Gd action did not alter L-NAME effects (pD₂: L-NAME= 6.99 ± 0.23; L-NAME + Gd= 7.13 ± 0.15; E_{max} : L-NAME= 143.61 ± 6.26 %; L-NAME + Gd= 142.88 ± 7.32 %).

Moreover, Figure 4 shows that E-NTPDase activity was inhibited by 75 μ M Gd (ATP hydrolysis) and by 100 μ M Gd (both ATP and ADP hydrolysis) in aorta homogenates. Since these findings could result from the blockade of adenosine production, which is a final product of ectonucleotidases action, we investigated whether the concentration of the hydrolysis products derived from E-NTPDase activity would change in the nutrient

solution after adding 1.0 mM ATP, in the absence and presence of Gd. Table 1 shows that after ATP administration, Gd increased the ATP concentration and reduced ADP generation, although the final concentration of adenosine was similar to that in the control condition. Similar results were obtained in the presence of PHE (results not shown). According to these results, the increased vascular reactivity to phenylephrine could not be explained by a reduced adenosine production. Since we previously knew that metals such as mercury stimulate the angiotensin converting enzyme (ACE) activity (Wiggers et al., 2008), we investigated whether Gd could produce a similar effect. Figure 5 shows that Gd action was blocked by both losartan, an AT1 receptor blocker (E_{max} : losartan= 63.68±11.35 %; losartan+Gd= 67.65±8.10 %), and by enalaprilate (E_{max} : Enalaprilate= 69.70±6.24 %; Enalaprilate+Gd 70.28±8.15 %), an ACE inhibitor.

4 Discussion

Results presented here show that Gd, besides blocking ATP and ADP hydrolysis, increased the vascular reactivity to phenylephrine by a mechanism that involves stimulation of angiotensin II AT1 receptors.

Gadolinium is a potent inhibitor of E-NTPDases at a concentration of 3 μ M (Escalada et al., 2004). E-NTPDases and ecto-5'-nucleotidase are membrane-bound enzymes facing the extracellular milieu that are present in several tissues (Burnstock, 2006), and adenosine is the end product of this pathway. However, the role of E-NTPDases in the regulation of vascular tone is not completely understood in detail yet. Once the enzymes that generate adenosine were present in the vessel wall, we performed experiments to investigate if the inhibition of E-NTPDase by Gd could affect the vascular tone.

Considering that adenosine is a vasodilator molecule in several vascular beds (Shryock and Belardinelli, 1997), the blockade of its generation by inhibiting the E-NTPDase activity should increase vascular reactivity. Indeed, our findings showed that in the presence of endothelium, Gd treatment increased the vascular smooth muscle tone and caused an upwards displacement of the concentration-response curves to PHE. The finding that Gd increased the contractile responses to phenylephrine supported the idea that adenosine generation could be an operational mechanism regulating vascular tone.

To test if the Gd action was endothelium-dependent, the same protocol was performed after endothelial removal. Results showed that after endothelial removal, Gd had no effect on concentration-response curves to PHE. This finding suggests that the mechanism inducing the increase of vascular reactivity is endothelium-dependent.

To confirm if the action of Gd interacts with ATP breakdown, we used another protocol to measure the aortic ring relaxation by ATP before and after Gd treatment. Rings were precontracted with PHE, and ATP was added to the bath. The relaxation effect was observed and also enhanced by Gd treatment. Assuming that ATP degradation should be reduced after Gd treatment, an increased relaxation should occur. Our results suggested that Gd was capable of blocking E-NTPDase activity at the endothelial level. The next protocol was performed to assess the E-NTPDase activity in aortic homogenate preparations in the presence or absence of Gd. Several studies have reported the ability of Gd to decrease nucleotide hydrolysis (Escalada et al., 2004; Buffon et al., 2007; Rücker et al., 2008). In the present study, we observed that gadolinium was capable of inhibiting both ATP and ADP hydrolysis. This result reinforced the idea that the effect promoted by Gd regarding vascular reactivity was dependent on the inhibition of ATP breakdown, which reduced adenosine production. Considering that adenosine evokes endothelium release of NO (Ray and Marshall, 2006).

we also performed an experiment to establish whether the vasodilatory action of adenosine resulting from E-NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities was NO dependent. To investigate this issue, concentration-response curves to PHE were created under control conditions as well as after L-NAME or L-NAME+Gd treatments. L-NAME, as expected, increased the reactivity to PHE while L-NAME+Gd treatment did not alter L-NAME effects, similar to results obtained after inducing endothelial damage. These findings suggested that Gd effects were endothelium-dependent but not NO dependent.

To clarify this last issue, we performed experiments to measure ATP breakdown to ADP and adenosine. Surprisingly, as shown in Table 1, ADP formation was reduced by Gd, but adenosine concentration was unaffected. As seen in Table 1, ATP concentration increased after Gd administration, suggesting that Gd might modulate extracellular ATP levels. A putative reason for this finding is that Gd has been proven to be an effective

inhibitor of ATP hydrolysis. The reduction of ATP breakdown explains our results that showed that the vasodilator effect of ATP increased after Gd treatment. However, Gd also inhibits permeable ATP channels in rat hepatocytes and HTC hepatoma cells (Roman et al., 1999), suggesting that ATP transference through the sarcolemma could be affected what might maintain higher extracellular ATP concentration. As expected, ADP formation was reduced by Gd, but adenosine concentration was unaffected. This finding ruled out the idea that Gd was increasing vascular reactivity by reducing adenosine generation.

However, a previous report shows that Gd might affect ACE activity via a transmetallation effect with zinc (Corot et al., 1998), and we recently demonstrated that another metal, mercury, is capable of stimulating ACE (Wiggers et al., 2008). Supposing a similar effect, we used losartan to block angiotensin II AT1 receptors and enalaprilate to block ACE, and both pre-treatments blocked Gd effects on vascular reactivity. This finding clarified the mechanism of increased vascular reactivity produced by Gd, which depends on an increased production of angiotensin II and an enhanced stimulation of AT1 receptors.

In conclusion, our results show that Gd promoted an increase of vascular reactivity to phenylephrine. They did not support the idea that Gd action depends on the reduction of adenosine production by the inhibition of E-NTPDase activity. They also suggest that this action is endothelium-dependent and involves an increased stimulation of ACE and angiotensin II AT1 receptors.

Acknowledgements

This research was supported by grants from CNPq and FAPES/FUNCITEC.

References

Bradford, M.M.,1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utiling the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.

Buffon, A., Ribeiro, V.B., Wink, M.R., Casali, E.A., Sarkis, J.J., 2007. Nucleotide metabolizing ecto-enzymes in Walker 256 tumor cells: molecular identification, kinetic characterization and biochemical properties. Life Sciences 80(10), 950-958.

Burnstock, G., 2006. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. Pharmacological Reviews 58, 58-86.

Caldwell, R.A., Henry, F.C., Baumgarten, C.M., 1998. Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical considerations. American Journal of Physiology - Cell Physiology 275, C619–C621.

Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPaseactivity. Analytical Biochemistry 157, 375-380.

Clare J. Ray CJ, Marshall JM., 2006. The cellular mechanisms by which adenosine evokes release of nitric oxide from rat aortic endothelium. The Journal of Physiology 570: 85-96;

Corot C, Idee JM, Hentsch, Santus R, Mallet C, Goulas V, Bonnemain B, Meyer D., 1998. Structure-activity relationship of macrocyclic and linear gadolinium chelates: investigation of transmetallation effect on the zinc-dependent metallopeptidase angiotensin-converting enzyme. J Magn Reson Imaging, 8: 695-702.

Enjyoji, K., Sévigny, J., Lin, Y., Frenette, P.S., Christie, P.D., Esch, J.S. 2nd., Imai, M., Edelberg, J.M., Rayburn, H., Lech, M., Beeler, D.L., Csizmadia, E., Wagner, D.D., Robson, S.C., Rosenberg, R.D., 1999. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. Nature Medicine 5, 1010-1017.

Escalada, A., Navarro, P., Ros, E., Aleu, J., Solsona, C., Martín-Satué, M., 2004. Gadolinium inhibition of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in *Torpedo* electric organ. Neurochemical Research 29, 1711–1714.

Kifor, I. and Dzau, V.J., 1987. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. Circ. Res. 60, 422-428.

Klein C, Gebker R, Kokocinski T, Dreysse S, Schnackenburg B, Fleck E, Nagel E. 2008. Combined magnetic resonance coronary artery imaging, myocardial perfusion and late gadolinium enhancement in patients with suspected coronary artery disease. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, 10: 45-55.

Levistky, D.O., Clergue, M., Lambert, F., Souponitskaya, M.V., Le Jemtel, T.H., Lecarpentier, Y., Lompré, A.M., 1993. Sarcoplasmic reticulum calcium transport and

Ca²⁺-ATPase gene expression in thoracic and abdominal aortas of normotensive and spontaneously hypertensive rats. Journal of Biological Chemistry 268(11), 8325-8331.

Nicolosi AC, Strande JL, Hsu A, Fu X, Su J, Gross GJ, Baker JE. 2008. Gadolinium limits myocardial infarction in the rat: Dose–response, temporal relations and mechanisms. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 44: 345–351

Perazella MA. Gadolinium-contrast toxicity in patients with kidney disease: nephrotoxicity and nephrogenic systemic fibrosis. <u>Curr Drug Saf.</u> 2008 Jan;3(1):67-75.

Ralevic, V., Burnstock, G., 2003. Involvement of purinergic signalling in cardiovascular disease. Drug News Perspectives 16, 133-140.

Ray CJ, Marshall JM. 2006. The cellular mechanisms by which adenosine evokes release of nitric oxide from rat aortic endothelium. J. Physiol.; 570 (Pt 1): 85-96.

Robson, S.C., Kaczmarek, E., Siegel, J.B., Candinas, D., Koziak, K., Millan, M., Hancock, W.W., Bach, F.H., 1997. Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. Journal of Experimental Medicine 1851, 153-163.

Roman, RM., Feranchak AP, Davison AK, Schwiebert EM, Fitz JG. Evidence for Gd31 inhibition of membrane ATP permeability and purinergic signaling. *Am. J. Physiol. Gastrointest.Liver Physiol.* 277; 40: G1222–G1230, 1999.

Rücker, B., Almeida, M.E., Libermann, T.A., Zerbini, L.F., Wink, M.R., Sarkis, J.J., 2008. E-E-NTPDases and ecto-5'-nucleotidase expression profile in rat heart left ventricle and the extracellular nucleotide hydrolysis by their nerve terminal endings. Life Sciences 82(9-10), 477-486.

Schetinger, M.R., Schierholt, R., Webber, A., Bonan, C.D., Wyse, A.T., Dias, R.D., Netto, C.A., Sarkis, J.J., 2000. Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naive and preconditioned rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 33, 1369-1377.

Sévigny, J., Sundberg, C., Braun, N., Guckelberger, O., Csizmadia, E., Qawi, I., Imai, M., Zimmermann, H., Robson, S.C., 2002. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase1) and E-NTPDase2 have implications for thromboregulation. Blood 99, 2801-2809.

Shryock, J.C., Belardinelli, L., 1997. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. American Journal of Cardiology 79, 2-10.

Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. Braz J Med Biol Res. 2002; 35: 1001-15.

Voelter W, Zech K, Arnold P, Ludwig G. 1980. Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography, J. Chromatogr. 199 :345–354

Wiggers GA, Stefanon I, Padilha AS, Peçanha FM, Vassallo DV, Oliveira EM. Low nanomolar concentration of mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2008;147: 252- 260.

Figure Legends

Figure 1. Concentration-response curves to phenylephrine (PHE) in controls (Ct) and after gadolinium incubation for thirty minutes (Gd). An increased vascular reactivity with intact endothelium (E+) was observed after gadolinium administration. Results represent the mean \pm S.E.M. An increment of maximal response (E_{max}) and sensitivity to PHE also occurs (* P < 0.05).

Figure 2. Percentage of relaxation with 1.0 mM ATP after pre-contraction with phenylephrine (PHE) before (ATP) and after gadolinium incubation (ATP + Gd). An important increase in the percentage of relaxation after gadolinium incubation (*P<0.05) was observed.

Figure 3. Concentration-response curves to phenylephrine (PHE) in controls (Ct), after 100 μ M L-NAME treatment (L-NAME) and after gadolinium + L-NAME incubation for thirty minutes (L-NAME+ Gd); and in controls (CtE-) and after gadolinium incubation for thirty minutes (GdE-) in rings with damaged (E-) endothelium. Results represent the mean ± S.E.M. No changes were observed after Gd treatment in aortic rings with intact endothelium and after L-NAME treatment and with damaged endothelium. Results represent mean ± S.E.M. (* P < 0.05 when comparing Emax of all groups compared to control and pD2 between rings with and without endothelium.) Note that Gd does not alter changes promoted by L-NAME treatment or by endothelial damage.

Figure 4. Effect of 75 or 100 μ M gadolinium chloride on ATP (A) and ADP (B) hydrolysis by aortic rings. Bars represent mean \pm S.D. of three independent

experiments. C, control (with no gadolinium chloride). * indicates significant difference from control enzyme activity for P < 0.05.

Figure 5. Concentration-response curves to phenylephrine (PHE) before and after 3 μ M gadolinium in controls (Ct), after 10 μ M enalaprilate (panel A) or 10 μ M losartan treatment (panel B) in aortic rings with intact endothelium. Results represent mean \pm S.E.M. * E_{max} P < 0.05 - Gd vs. Ct, enalaprilate and losartan, enalaprilate+Gd and losartan+Gd.

Table 1- Effect of 3 μ M gadolinium chloride (Gd) on ATP, ADP and AMP hydrolysis, in nmoles/mL, by aortic rings after 1 mM ATP administration. ADO- adenosine, INO-inosine, CT, control (with no gadolinium chloride)

	ATP	ADP	AMP	ADO	INO
СТ	0	8.5 ± 4.5	3.25 ± 1.0	1.75 ± 0.5	0
CT + Gd	1.75 ± 0.25	4.25 ± 1.00	$2.95 \pm \textbf{0.73}$	$1.50\pm\textbf{0.75}$	0
ATP	291.75 ± 53.75	20.25 ± 2.25	3.0 ± 0.5	1.25 ± 1.0	1.0 ± 0.75
ATP + Gd	666.25± 5.25*	4.0 ± 7.25*	3.5 ± 1.75	1.0 ± 0	2.5 ± 1.5

Results represent mean \pm SEM. * P<0.05 ATP vs. ATP + Gd.





Figure 2



Figure 3



Figure 4





Figura 5





Livros Grátis

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

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 Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo