

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DO ETANOL SOBRE A REATIVIDADE
VASCULAR À ADRENOMEDULINA EM AORTA DE RATOS**

Aluno: Ulisses Vilela Hipólito

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre, pelo
curso de pós-graduação em ciências - Área de
concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Ribeirão Preto
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Hipólito, Ulisses Vilela

Efeito do consumo crônico do etanol sobre a reatividade vasclar à adrenomedulina em aorta de ratos. Ribeirão Preto, 2010.

66 p. : il. ; 30cm

Tese de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Tirapelli, Carlos Renato.

1. Adrenomedulina. 2. Consumo crônico de etanol. 3. Sistema Cardiovascular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ulisses Vilela Hipólito

EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DO ETANOL SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR À ADRENOMEDULINA EM AORTA DE RATOS

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, pelo curso de pós-graduação em ciências - Área de concentração: Farmacologia

A Banca Examinadora do trabalho de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em ____/____/____, considerou:

Aprovado

Reprovado

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“DAS UTOPIAS

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A presença distante das estrelas!

Mario Quintana

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que sempre me deu forças para seguir em minha caminhada.

Dedico a minha mãe Maria pelo amor, carinho e incentivo neste desafio.

Dedico a meu pai Agenor, que mesmo não estando mais entre nós, sempre me apoiou e incentivou em minhas decisões.

Dedico a minha irmã Marcela pelo amor, carinho, amizade e apoio.

Dedico a minha namorada Yamba pelo amor, apoio, carinho, compreensão e companheirismo.

Dedico a todos os meus familiares, por sempre me apoiarem.

Agradecimentos

Ao Prof. Carlos Renato Tirapelli pela amizade, confiança e oportunidade de trabalho.

As Professoras Rita C. Tostes e Daniela Bonaventura, membros da banca avaliadora, pela grande colaboração na confecção final desse trabalho.

A prof^a Cláudia Padovan e seu grupo de pesquisa (Diego, Kelly, Mariana, Natália, Maira) pela amizade, carinho, ótima convivência e colaboração nesse trabalho

A prof^a Daniela Tirapelli e seus alunos (Netão e Paulinho) pela grande disposição com que me receberam e pela colaboração na realização do PCR.

A prof^a Evelin Capellari e ao Marcelo pela disposição em me auxiliar e colaboração na dosagem de nitrato e nitrito.

Ao prof José Eduardo Tanus e sua aluna Anna Laura pela disposição em me auxiliar e colaboração na técnica de zimografia.

A prof^a Vera Lanchote e a Sônia pela disposição em me auxiliar e colaboração na dosagem de etanol.

A prof^a Ana Maria de Oliveira pelo carinho e suporte durante o meu projeto de Iniciação Científica.

A todos os meus amigos da Farmacologia da FCFRP-USP.

A Talita pela amizade e grande ajuda no desenvolvimento do trabalho.

A Juliana pela amizade e grande ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos da república K-ZONA (Lucinei, Marcos, Sidney, Beto, Daniel, Renes, Roberto, Alisson, Valdecir, Diogo, Davi, João Paulo, Lucas e Júnior) pela amizade, alegria e fácil convivência durante o período do mestrado.

A Dona Cida pela amizade e carinho que sempre me tratou.

Aos meus amigos Fausto, Juarez, Cleiton, Marcelo, Wender e Willian, pelo incentivo e ótima convivência.

A FAPESP pelo suporte financeiro no desenvolvimento do trabalho.

Lista de Abreviaturas Siglas e Símbolos

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µmol/L – Micromolar

AKT – Serina Treonina Quinase

AM - Adrenomedulina

AM₂₂₋₅₂ - Adrenomedulina 22-52

AMPc - Monofosfato Cíclico de Adenosina

BSA – Albumina Sérica Bovina

Ca⁺² - Íon Cálcio

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

cDNA – Ácido Desoxirribonucléico Complementar

CGRP - Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina

CGRP₈₋₃₇ - Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina 8-37

CO₂ – Gás Carbônico

CRLR - Receptor Semelhante ao Receptor da Calcitonina

EC₅₀ – Concentração Efetiva de uma Droga que Produz 50% do Efeito Máximo

EDHF – Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

E_{max} – Efeito Máximo

eNOS - Sintase de Óxido Nítrico Endotelial

EPM – Erro Padrão da Média

g – Gramas

GMPc – Monofosfato Cíclico de Guanosina

HCl – Ácido Clorídrico

iAM - Adrenomedulina Imatura

iNOS – Sintase de Óxido Nítrico Induzida

K⁺ - Íon Potássio

KCl – Cloreto de Potássio

KDa – Kilodalton

KH₂PO₄ – Fosfato de Potássio

L – Litro

L-NAME –N^G-Nitro-L-Arginina Metil Éster

mAM - Adrenomedulina Madura

mg – Miligramas

MgSO₄ – Fosfato de Magnésio

mL – Mililitros

mm – Milímetros

mmol/L – Milimolar

mmol – Milimol

MMP-2 - Metaloproteinase

mol – Molar

N – Normal

n – Número

NaCl – Cloreto de Sódio

NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio

NaI – Iodeto de Sódio

NEM – N-etilmaleimida

nNOS – Sintase de Óxido Nítrico Neuronal

NO - Óxido Nítrico

NO₂ – Dióxido de Nitrogênio

NOS - Sintase de Óxido Nítrico

NPS - Nitroprussiato de Sódio

O₂ – Molécula de Oxigênio

O₃ – Ozônio

PBS – Tampão Salina Fosfato

pD₂ – Cologarítmo da EC₅₀

pH – Potencial Hidrogeniônico

PI₃K - Fosfato de Inositol 3 Quinase

PMSF – Fenilmetanosulfonilfluoreto

PRÉ-PRÓ-AM - Pré-Pró-Adrenomedulina

RAMP - Proteína Modificadora da Atividade do Receptor

RNA – Ácido Ribonucléico

RNA_m - Ácido Ribonucléico Mensageiro

RQ PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

Std – Padrão Interno

TEA – Tetraetilamônio

Tris-CaCl₂ – Tris-Cloreto de Cálcio

Tris-HCl – Tris Ácido Clorídrico

V/V - Volume por Volume

Lista de Figuras

Figura 1: Média do peso dos animais do grupo controle e etanol durante o período de tratamento.....	20
Figura 2: Média do consumo líquido dos animais do grupo controle e etanol durante o período de tratamento.....	21
Figura 3: Média do consumo de ração dos animais do grupo controle e etanol durante o período de tratamento.....	22
Figura 4: Efeito do tratamento crônico com etanol por 6 semanas na resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta torácica de rato.....	23
Figura 5: Efeito do tratamento crônico com etanol por 6 semanas na resposta de relaxamento induzida pelo CGRP em anéis de aorta torácica de rato.....	25
Figura 6: Efeito do tratamento crônico com etanol por 6 semanas na resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina em anéis de aorta torácica de rato com endotélio.....	27
Figura 7: Efeito do tratamento crônico com etanol por 6 semanas sobre a resposta de relaxamento induzida pelo NPS em anéis de aorta de rato sem endotélio.....	28
Figura 8: Efeito do tratamento crônico com etanol por 6 semanas sobre as concentrações de nitrato (A) e nitrito (B) em aorta de rato.....	30
Figura 9: Efeito do tratamento crônico com etanol por 6 semanas sobre as concentrações vasculares da pro-MMP-2 e da MMP-2 ativa representadas na forma de gel (A) e na forma de gráfico (B) em aorta de rato.....	32
Figura 10: Efeito do tratamento crônico com etanol por 6 semanas na resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta torácica de rato com endotélio.....	34
Figura11: Efeito do L-NAME, 1400W, 7-nitroimidazol e ODQ sobre a resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta de ratos com endotélio.....	35
Figura12: Efeito da indometacina sobre a resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta de ratos com endotélio.....	36
Figura 13: Efeito do TEA sobre a resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta de ratos com endotélio.....	37
Figura 14: Avaliação do efeito do antagonista AM ₂₂₋₅₂ na resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta de rato com endotélio.....	39
Figura 15: Avaliação do efeito do antagonista CGRP ₈₋₃₇ na resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta de rato com endotélio.....	41
Figura 16: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de RNAm para a pré-pró-AM.....	42

Figura 17: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de RNAm para o CRLR (receptor semelhante ao receptor de calcitonina) e das RAMPs 1, 2 e 3.....44

Figura 18: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de RNAm da eNOS.....45

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores de E_{max} (porcentagem de relaxamento) e pD_2 calculados a partir de curvas concentração-resposta para a AM determinadas em preparações isoladas de aorta torácica com e sem endotélio.....24

Tabela 2: Valores de E_{max} (porcentagem de relaxamento) e pD_2 calculados a partir de curvas concentração-resposta para o CGRP determinadas em preparações isoladas de aorta torácica com e sem endotélio.....26

Tabela 3: Valores de E_{max} (porcentagem de relaxamento) e pD_2 calculados a partir de curvas concentração-resposta para acetilcolina, determinadas em preparações isoladas de aorta torácica com endotélio.....27

Tabela 4: Valores de E_{max} (porcentagem de relaxamento) e pD_2 calculados a partir de curvas concentração-resposta para o NPS determinadas em anéis de aorta sem endotélio.....29

Índice

Resumo	i
Abstract	iii
1. Introdução	1
2. Objetivos	9
3. Materiais e Métodos.....	10
3.1 – Animais.....	10
3.2 – Grupos Experimentais.....	10
3.3 – Medida dos níveis de etanol no sangue.....	11
3.4 – Estudo funcional da reatividade em artérias isoladas.....	11
3.5 – Protocolos experimentais para avaliação do efeito do tratamento com etanol sobre a reatividade da artéria aorta.....	12
3.6– Protocolos experimentais para o estudo dos mecanismos envolvidos no efeito do tratamento com etanol sobre a reatividade da artéria aorta à AM.....	13
3.7 – Protocolos experimentais para avaliação do efeito do tratamento com etanol sobre a expressão gênica dos componentes do sistema AM.....	14
3.8 – Efeito do tratamento crônico com etanol sobre as concentrações de MMP-2 em aorta de ratos.....	16
3.9 – Avaliação do efeito do tratamento com etanol sobre os níveis basais de nitrato e nitrito em aorta de ratos.....	18
3.10 – Diluição das drogas.....	19
3.11 – Análise estatística.....	19
4. Resultados.....	20
4.1 – Medida do peso dos animais durante o tratamento.....	20
4.2 – Medida do consumo líquido dos animais durante o período de tratamento.....	21
4.3 – Medida do consumo de ração dos animais durante o período de tratamento.....	21
4.4 – Medida dos níveis de etanol no sangue	22
4.5 – Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta torácica à adrenomedulina (AM).....	22

4.6 – Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta torácica ao CGRP.....	24
4.7 – Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta torácica à acetilcolina.....	26
4.8 – Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta torácica ao nitroprussiato de sódio (NPS)	28
4.9 – Efeito do tratamento crônico com etanol sobre as concentrações basais de nitrato e nitrito em aorta de ratos	29
4.10 – Efeito do tratamento crônico com etanol sobre as concentrações de MMP-2 em aorta de ratos	31
4.11 – Mecanismos envolvidos no efeito do etanol sobre a resposta de relaxamento à AM em aorta de ratos	33
4.12 – Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de RNAm dos componentes do sistema AM e da enzima eNOS	42
5. Resumo dos resultados.....	46
6. Discussão.....	47
7. Conclusão.....	57
8. Referências Bibliográficas	58

RESUMO

O consumo crônico de etanol leva a alterações significativas das funções cardíacas e circulatórias, figurando como um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Nossos resultados mostram que o relaxamento mediado pela adrenomedulina (AM) é dependente do endotélio e que o tratamento com etanol (solução 20%) por 6 semanas reduziu a resposta de relaxamento do referido peptídeo. O tratamento com etanol não induziu alteração na resposta de relaxamento mediada pelo CGRP, acetilcolina e nitroprussiato de sódio. O tratamento com etanol por 6 semanas não alterou os níveis basais de nitrato e nitrito em aorta de ratos. Também não houve alterações nas concentrações vasculares de metaloproteinase-2 (MMP-2).

O relaxamento induzido pela AM em aorta de rato envolve a produção de NO, ativação da enzima guanilato ciclase e abertura de canais para potássio (K^+). No entanto, o tratamento com etanol não altera o funcionamento dessas vias. O CGRP₈₋₃₇, antagonista do receptor do CGRP, não inibiu a resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta do grupo controle e etanol. Por outro lado, o AM₂₂₋₅₂, antagonista do receptor de AM, inibiu a resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta do grupo controle. Entretanto, em anéis de aorta do grupo etanol o AM₂₂₋₅₂ não foi capaz de inibir a resposta da AM. Evidenciou-se que o tratamento com etanol aumenta os níveis de RNAm para a pré-pró AM e da RAMP 1 mas não interfere na expressão de outros componentes do sistema AM (RAMP 2, RAMP 3 e CLRL) e da enzima eNOS.

Em síntese, os resultados evidenciam que o consumo crônico de etanol reduz a resposta de relaxamento induzida pela AM em aorta de ratos e

aumenta os níveis de RNAm da pré-pró-AM. Portanto, os resultados obtidos confirmam a hipótese do projeto inicial de que o consumo crônico de etanol afeta o sistema AM vascular.

ABSTRACT

Chronic ethanol consumption is associated with cardiovascular dysfunctions independent of other known risk factors. Our findings show that AM-induced relaxation in isolated rat aortic rings is endothelium-dependent. The treatment with ethanol (solution of 20%) for 6 weeks reduced the relaxation induced by AM. On the other hand, CGRP, acetylcholine and sodium nitroprusside-induced relaxation was not altered by the treatment with ethanol. No difference on the basal nitrate and nitrite generation was found after treatment with ethanol. Similarly, chronic ethanol consumption did not alter aortic metalloproteinase-2 (MMP-2) levels.

The relaxation induced by AM involves the activation of the NO-cGMP pathway and the opening of K⁺ channels. These mechanisms were not altered by the treatment with ethanol. CGRP₈₋₃₇ (antagonist of the CGRP receptor) did not affect the relaxation induced by AM in aortic rings from either control or ethanol-treated rats. On the other hand, AM₂₂₋₅₂ (antagonist of the AM receptor) reduced AM-induced relaxation in isolated rat aortic rings from control rats. However, AM₂₂₋₅₂ did not affect AM-induced relaxation in aortic rings from ethanol-treated rats.

Chronic ethanol consumption increased mRNA levels for pre-pro-AM and RAMP 1 in the rat aorta but did not alter other components of the AM system (RAMP 2, RAMP 3 or CRLR). Similarly, no alterations on mRNA levels for eNOS were detected after ethanol consumption.

In summary, the present findings demonstrate that ethanol consumption reduces AM-induced relaxation in rat aortic rings and increases the mRNA levels for pre-pro-AM and RAMP 1.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares matam anualmente 17 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2005). Elas estão entre as principais causas de morte nos Estados Unidos, Europa e grande parte da Ásia (Ross, 1999) Essa realidade atinge também países em desenvolvimento como Brasil, Venezuela e Colômbia, onde as doenças cardiovasculares são responsáveis por 20 a 30% do total de óbitos (Hernandez-Hernandez et al., 1998). A hipertensão, aterosclerose, hipercolesterolemia, diabetes e o tabagismo são considerados importantes agentes que levam a alterações das funções cardiovasculares. Muitos estudos mostram que o consumo crônico de etanol também acarreta alterações significativas das funções cardíaca e circulatória figurando como um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Chan & Sutter, 1983; Ibsen et al., 1985; Pinardi et al., 1992; Marmot, 2001; Reynolds et al., 2003; Puddey & Beilin, 2006). As sérias e extensas conseqüências do alcoolismo na saúde do indivíduo e da comunidade vêm sendo a causa direta do aumento da morbidade e da mortalidade. O aumento marcante do consumo de bebidas alcoólicas em nosso país abrange uma parcela significativa da população (15 a 20%) (De Lima, 1997).

O consumo crônico de etanol afeta vários aspectos da função cardiovascular. Em seres humanos, ele tem sido associado ao aumento da pressão arterial. Nesse sentido, Criqui et al. (1981) descreveram aumento da pressão arterial sistólica e diastólica em homens e mulheres que consomem etanol regularmente. Ibsen et al. (1985) observaram aumento da pressão sangüínea em indivíduos que consomem álcool freqüentemente. Mais

recentemente, a relação entre o consumo crônico de etanol e hipertensão foi novamente estabelecida por Puddey & Beilin, (2006).

Modelos experimentais mostraram que animais que consomem etanol também apresentam aumento da pressão arterial. Ratos tratados com solução de etanol 20% durante 4 semanas apresentaram aumento da pressão sistólica. (Chan & Sutter, 1983; Chan et al., 1985; Strickland & Wooles, 1988). Tirapelli et al. (2007) também observaram aumento da pressão arterial média após a segunda e sexta semana de tratamento com etanol 20%.

Prévios relatos sugerem que o aumento da reatividade vascular para agentes vasoconstritores (Pinardi et al., 1992) ou diminuição no efeito de agentes vasorelaxantes (Kahonen et al., 1999) contribuem para o aumento da pressão arterial associada ao consumo crônico de etanol. Nesse sentido, Pinardi et al. (1992) observaram um aumento da resposta contrátil à fenilefrina em aorta de ratos tratados com solução de etanol 20% durante 18 dias. Aumento da resposta de contração induzida pela fenilefrina também foi descrita em aorta de ratos tratados com etanol por 2 e 6 semanas (Tirapelli et al., 2006a). Também houve aumento na resposta a noradrenalina em aortas de ratos submetidos ao tratamento crônico com etanol (Ladipo et al., 2002). Aumento na resposta à noradrenalina também foi observado em artérias mesentéricas de ratos tratados com solução de etanol 36% durante 18 semanas (Hatton et al., 1992). O tratamento com etanol 20% durante 2, 6 e 10 semanas aumentou a resposta de contração da endotelina-1 em carótidas de rato (Tirapelli et al., 2006b).

Com relação ao efeito de relaxamento Husain et al. (2008) mostraram redução na resposta da acetilcolina em aorta de ratos tratados com etanol 20% durante 12 semanas. Resultados semelhantes foram encontrados por Abou-

Agag et al. (2005) com ratos tratados com solução de etanol 18% durante 8 semanas. O relaxamento da acetilcolina foi reduzido pelo tratamento com etanol em leito mesentérico de rato (Tirapelli et al., 2007). O tratamento com etanol também reduziu o efeito de relaxamento da endotelina-1 e IRL1620, um agonista seletivo dos receptores ET_B em carótidas de rato (Tirapelli et al., 2006b).

No entanto, resultados contraditórios foram observados em relação ao processo de relaxamento vascular após tratamento com etanol. Em animais tratados com etanol observou-se aumento da resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina em aorta de rato (Hatake, et al., 1994). Sahna et al. (2000) não observaram alteração na resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina em aorta de ratos submetidos à administração diária de uma solução de etanol 7,2% por 24 semanas. Resultados semelhantes foram encontrados por Tirapelli et al. (2008a) com uma solução de 20% durante 4 semanas. A grande variabilidade de resposta observada nos diferentes estudos com músculo liso vascular pode estar relacionadas à dose e/ou duração do tratamento com etanol, ou ainda aos diferentes protocolos experimentais utilizados (Sahna et al., 2000, Strickland & Wooles, 1988).

Com relação ao nitroprussiato de sódio (NPS), estudos da literatura têm mostrado que o tratamento com etanol, independente do tempo e da concentração não altera a ação desse agente vasorelaxante (Abou-Agag et al., 2005; Kleinhenz et al., 2008; Tirapelli et al., 2008a)

Relatos da literatura sugerem que o consumo crônico de etanol modifica as funções vasculares em decorrência de alteração do funcionamento do endotélio vascular que é reconhecido como uma importante unidade funcional

envolvida na regulação do tônus vascular. Entre os diferentes fatores de relaxamento e contração produzidos pelo endotélio (Mombouli & Vanhoutte, 1999) está a adrenomedulina (AM), que é um potente peptídeo vasodilatador. Esse peptídeo foi inicialmente isolado de células de feocrocitoma humano (Kitamura et al., 1993). Alguns anos depois foi mostrado que sua expressão foi afetada pela ingestão de etanol (Wang et al., 1999; Tomikawa et al., 1999).

AM é constituída de uma cadeia de 52 resíduos de aminoácidos (Kitamura et al., 1993). Ela é formada a partir da pré-pró-adrenomedulina (pré-pró-AM) que quando clivada forma a (iADM) que é a forma imatura do peptídeo. Em seguida (iADM) sofre uma reação de amidação transformando-se em (mADM) que corresponde à forma madura do peptídeo (Kitamura et al., 1998). Ela está entre os peptídeos da família da calcitonina que inclui, além da AM, a calcitonina, amilina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (α CGRP) e β CGRP. A AM é produzida por vários tecidos como pulmão, coração, rim, estômago e intestino (Asada et al., 1999). Além desses tecidos, as células endoteliais (Sugo et al., 1994) e do músculo liso vascular (Sugo et al., 1995) também produzem e secretam AM. O receptor semelhante ao receptor de calcitonina (CRLR) é o receptor tanto para AM quanto para o CGRP. O que confere especificidade ao receptor são as proteínas modificadoras da atividade do receptor (RAMPS) (Mclatchie et al., 1998). Quando ligado a RAMP 1, o CRLR forma o receptor do CGRP, quando ligado ao RAMP 2 forma o receptor 1 da AM (AM_1) e quando ligado ao RAMP 3 forma o receptor 2 da AM (AM_2) (Poyner et al., 2002). No entanto, relatos da literatura apontam resultados contraditórios quanto ao receptor envolvido no relaxamento vascular induzido pela AM, sendo a resposta ao peptídeo dependente do leito vascular e espécie

estudada. Por exemplo, na artéria da retina de bovinos o relaxamento induzido pela AM é inibido por AM_{22-52} e $CGRP_{8-37}$, antagonistas dos receptores para a AM e CGRP, respectivamente (Boussery et al., 2005). Por outro lado, o relaxamento induzido pela AM foi inibido pelo $CGRP_{8-37}$ mas não pelo AM_{22-52} na artéria ciliar de suínos (Dettmann et al., 2003), artéria coronária de humanos (Hasbak et al., 2003) e aorta de camundongos (Ashton et al., 2000).

Os dois receptores para a AM foram descritos tanto no endotélio como no músculo liso vascular (Fukai et al., 2003). No entanto, os mecanismos celulares envolvidos na resposta de relaxamento induzida pela AM são diversificados e variam de acordo com o leito vascular. Observou-se inicialmente que o efeito vasodilatador da AM era mediado pelo óxido nítrico (NO) produzido pelas células endoteliais (Hirata et al., 1995). Resultados semelhantes foram observados na artéria renal de cachorros (Miura et al., 1995), leito vascular do trem posterior de ratos (Feng et al., 1994) e na artéria da retina de bovinos (Boussery et al., 2005) onde o efeito vasodilatador da AM é dependente do endotélio e mediado pelo NO. No entanto, observou-se em coronária de humanos (Terata et al., 2000) e na artéria ciliar de suínos (Dettmann et al., 2003), que além do NO, os canais para K^+ também participam da vasodilatação induzida pela AM. Por outro lado, Ishizaka et al. (1994) e Okamura et al. (1997) sugeriram que a vasodilatação mediada pela AM é um processo independente do endotélio e que envolve a participação do monofosfato de adenosina (AMPC) e proteína quinase A no músculo liso vascular.

O efeito vasodilatador da AM foi também descrito na aorta de ratos. Nesse tecido, Yoshimoto et al. (1998) observaram que o relaxamento induzido

pela AM é dependente do endotélio e mediado pelo NO. Esse estudo mostrou ainda que a AM induz aumento do influxo de Ca^{2+} nas células endoteliais dessa artéria. Li et al. (2003) verificaram posteriormente que o relaxamento induzido pela AM na aorta de ratos envolve a ativação da enzima NO sintase (NOS) que, de acordo com o estudo de Nishimatsu et al. (2001), é ativada pela fosfato de inositol 3-quinase (PI_3K) Akt dependente. Portanto, na aorta de ratos, o relaxamento induzido pela AM está relacionado a produção de NO endotelial.

A AM exerce ação direta sobre as funções cardiovasculares. Esse peptídeo induz relaxamento vascular (Dettmann et al., 2003; Boussey et al., 2005) e hipotensão quando infundida em ratos (Ishiyama et al., 1993). No entanto, além dos efeitos fisiológicos de controle da função cardiovascular, ela tem ação cardioprotetora. Nesse sentido, Miyashita et al. (2003) mostraram que a AM é capaz de causar regeneração vascular por promover a migração e proliferação de células endoteliais. Outra ação vascular protetora da AM está relacionada à sua capacidade em reduzir a geração de espécies reativas de oxigênio (Yoshimoto et al., 2004). Outro tema que vem sendo alvo de pesquisa é o aumento nos níveis de AM em doenças cardiovasculares. Nesse sentido, Richards et al. (1996) mostraram aumento nos níveis de AM na hipertensão e choque séptico. Também foram registrados níveis elevados de AM em situações de estresse oxidativo (Chun et al., 2000) e hipóxia (Nakayama et al., 1999).

Recentemente foram descritas interações entre o sistema AM e o consumo de etanol. A injeção central de AM reduziu a lesão gástrica produzida pelo etanol em até 72%, sugerindo um papel protetor desse peptídeo (Kaneko et al., 1998). Verificou-se ainda nesse estudo que o efeito protetor da AM

envolve a participação de prostaglandinas e do NO. Wang et al. (1999) verificaram que o tratamento de ratos com etanol induz aumento da expressão da AM e de seus receptores na mucosa gástrica de ratos. Nesse tecido, observou-se um aumento de até 2,5 e 2,7 vezes nos níveis de RNAm para a AM e seus receptores, respectivamente. No entanto, não há dados na literatura descrevendo o efeito do consumo crônico de etanol sobre o sistema AM vascular ou ainda se esse peptídeo desempenha papel protetor nas alterações da reatividade vascular induzidas pelo consumo crônico de etanol.

Além dos efeitos anteriormente descritos, o consumo crônico de etanol também promove modificações morfológicas no sistema vascular que estão associadas à degeneração das fibras de elastina. Partridge et al. (1999) mostraram que na túnica média da artéria aorta de ratos ocorre degradação das fibras de elastina, estando esse processo associado ao aumento da atividade enzimática da metaloproteinase-2 (MMP-2). As MMPs pertencem a uma família de enzimas que inclui mais de 20 membros com estrutura semelhante, mas com diferença na especificidade por substrato e origem celular. Uma característica comum dessas enzimas é sua habilidade para degradar componentes da matrix extracelular, sendo essa ação importante em condições fisiológicas e patofisiológicas (Brinckerhoff & Matrisian, 2002) Dentre essas enzimas as principais no processo de remodelagem vascular são as MMP-2 e MMP-9 (Bendeck et al., 1994; Godin et al., 2000). O aumento da atividade das referidas enzimas no vaso é capaz de causar excessiva degradação de componentes da matriz extracelular, proliferação e migração de células do músculo liso vascular e invasão de monócitos influenciando na formação da camada íntima. (Nagase & Woessner, 1999; Newby, 2006). Essas

alterações provocadas pelas MMPs no vaso podem levar ao aparecimento de doenças cardiovasculares como, por exemplo, a hipertensão (Castro et al., 2009). É importante notar que além da degradação da matriz extracelular a MMP-2 é capaz de degradar a AM em fragmentos que tem uma ação vasorelaxante menor que a AM e um fragmento com ação vasoconstritora (Martínez et al., 2004).

Com base nos estudos acima mencionados, a hipótese do presente estudo é a de que o consumo crônico de etanol promova diminuição na resposta de relaxamento da adrenomedulina e aumente a sua expressão.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar as conseqüências do consumo crônico de etanol sobre o sistema AM vascular pela avaliação da reatividade vascular da artéria aorta à AM; verificar os mecanismos envolvidos na resposta vascular induzida por esse peptídeo.

2.2 Objetivos Específicos

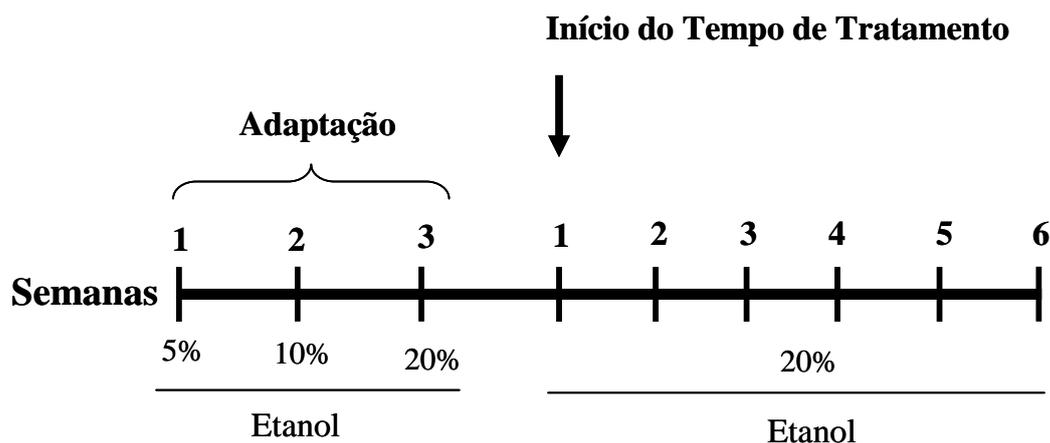
- 1) Comparar o efeito de vasorelaxamento da AM a outros agentes vasorelaxantes.
- 2) Avaliar o efeito do tratamento com etanol sobre as concentrações basais de nitrato e nitrito.
- 3) Avaliar o efeito do tratamento com etanol sobre as concentrações vasculares de MMP-2.
- 4) Avaliar o efeito do tratamento com etanol sobre a expressão dos componentes do sistema AM.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Grupos experimentais

Ratos Wistar adultos, pesando entre 250-300 gramas (g) foram divididos em dois grupos: 1. Controle: animais receberam água “ad libitum” ; 2. Etanol: animais receberam diariamente solução de etanol 20% (v/v) em água. Os animais do grupo etanol passaram por um breve período de adaptação gradativa do consumo de etanol (esquema abaixo). Essa adaptação consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes semanais de 5, 10 e 20%, tendo início a fase experimental após a terceira semana de adaptação (Tirapelli et al., 2006ab; Resstel et al., 2006).



Foram realizadas mensurações semanais do peso dos animais, consumo de ração e de líquido dos dois grupos experimentais. Ao término da 6ª semana do início do tratamento, animais dos dois grupos foram sacrificados e tiveram a aorta retirada para estudos de reatividade vascular e biologia molecular. Todos os procedimentos realizados neste trabalho estão de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto – USP (Protocolo nº 07.1.942.53.5).

3.2 Medida dos níveis de etanol no sangue

O sangue foi coletado da veia cava inferior de animais anestesiados com Cetamina/Xilazina (83/17 mg/kg via i.p), utilizando-se seringas heparinizadas. As amostras foram acondicionadas em tubos contendo o conservador fluoreto de sódio (1 mg/mL de sangue). Em seguida as amostras foram transferidas para frascos contendo cloreto de sódio (1 mg/mL de sangue) e água (1 mL/mL de sangue). Os frascos foram então devidamente lacrados e colocados no Head Space HSS4A (Shimadzu, Japão). Em seguida, as amostras foram injetadas no cromatógrafo GC17A (Shimadzu, Japão). Uma curva padrão de calibração foi realizada previamente onde diferentes concentrações conhecidas de etanol (0,02 – 20 mg/mL) foram adicionadas ao sangue de animais controle. Os resultados foram expressos em mg de etanol / mL de sangue (Tirapelli et al., 2006a).

3.3 Estudo funcional da reatividade em artérias isoladas

Os animais foram sacrificados e segmentos da aorta foram expostos e os nervos adjacentes e tecido conjuntivo removido. Para o estudo da reatividade vascular foram utilizados anéis (5 mm) de aorta torácica. Após a retirada e isolamento das artérias, dois ganchos de metal foram inseridos no lúmen das artérias para produzir tensão. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor isométrico de força, visando detectar modificações do tônus muscular. As modificações de tônus vascular foram registradas através de sistema de aquisição de sinais Power Lab (ADInstruments, Austrália) e processadas pelo software Chart Pro versão 5.0.

O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo 5 mL de solução de Krebs cuja composição foi (em mmol/L): NaCl 118; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; MgSO_4 1,2; NaHCO_3 15; glicose 5,5; CaCl_2 2,5; pH 7,4. Os anéis foram mantidos a uma temperatura constante de 37°C e gaseificados com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2). As preparações de aorta (1,5 g de tensão) permaneceram em repouso durante 60 minutos para estabilização. Em seguida, as artérias foram estimuladas repetidamente com fenilefrina (Sigma Aldrich) (10^{-7} mol/L) até a reprodução da amplitude da resposta contrátil. O endotélio vascular foi preservado ou removido mecanicamente de acordo com o protocolo experimental. A integridade do endotélio foi testada pelo relaxamento produzido pela acetilcolina (Sigma Aldrich) (10^{-6} mol/L) sobre contração mantida estimulada com fenilefrina (10^{-7} mol/L). O endotélio foi considerado íntegro quando o relaxamento provocado pela acetilcolina foi maior que 80%. Para os estudos sem endotélio as artérias que apresentaram algum grau de relaxamento foram descartadas.

3.3.1 Protocolos experimentais dos estudos de reatividade vascular

Curvas concentração-resposta para a AM (10^{-12} - 10^{-7} mol/L, Sigma Aldrich), CGRP (10^{-12} - 10^{-7} mol/L, Sigma Aldrich), acetilcolina (10^{-10} - 10^{-5} mol/L, Sigma Aldrich) ou nitroprussiato de sódio (NPS, 10^{-10} - 10^{-7} mol/L, Sigma Aldrich) foram obtidas em anéis de aorta, pré-contraídos com fenilefrina (10^{-7} mol/L), de animais do grupo controle ou etanol. As curvas para AM e CGRP foram obtidas em preparações com ou sem endotélio. As curvas para acetilcolina e NPS foram obtidas em anéis de aorta com e sem endotélio, respectivamente. A concentração de 10^{-7} mol/L da fenilefrina foi escolhida para induzir pré-contração, pois a amplitude da resposta contrátil produzida por esse agente

vasoativo não apresenta diferença entre os grupos controle e etanol em anéis com endotélio ($0,75 \pm 0,09$ g n=6; $0,77 \pm 0,06$ g n=6, respectivamente) ou sem endotélio ($0,95 \pm 0,06$ g, n=4; $1,12 \pm 0,15$ g, n=4, respectivamente). A resposta induzida pelos agentes vasodilatadores foi expressa como porcentagem de relaxamento relativa à pré- contração com fenilefrina.

A partir dos registros de relaxamento induzido pelos agonistas utilizados, foram plotadas curvas concentração-resposta. A partir dessas curvas, foram determinados os valores de pD_2 que consiste no logaritmo negativo da concentração molar do agonista que promove 50% do efeito máximo (EC_{50}), bem como os respectivos efeitos máximos (E_{max}). As EC_{50} foram calculadas por regressão não-linear, utilizando-se o programa Prism® (GraphPad Software Corporation, EUA).

3.3.2 Protocolos experimentais para o estudo dos mecanismos envolvidos no efeito do tratamento com etanol sobre a reatividade da artéria aorta à AM

Nesse estudo foram utilizados anéis de aorta com endotélio, de animais dos dois grupos experimentais após 6 semanas de tratamento. Nos estudos dos mecanismos envolvidos no efeito do tratamento com etanol sobre a reatividade à AM, utilizou-se o peptídeo na concentração de (10^{-8} mol/L). Essa concentração foi utilizada tendo como base a curva concentração-efeito para a AM na aorta e dados da literatura (Gout et al., 1999,). A administração pontual de AM foi realizada em preparações com endotélio, após incubação por 30 minutos com: AM_{22-52} , (antagonista dos receptores da AM, 3×10^{-8} e 10^{-7} mol/L, Sigma Aldrich), $CGRP_{8-37}$ (antagonista dos receptores CGRP, 10^{-7} e 3×10^{-7} mol/L, Sigma Aldrich), L-NAME (inibidor não seletivo da sintase do óxido nítrico

(NOS), 10^{-4} mol/L, Sigma Aldrich), 7-nitroimidazol (inibidor seletivo da sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS), 10^{-4} mol/L, Sigma Aldrich), 1400W (inibidor seletivo da sintase do óxido nítrico induzida iNOS, 10^{-6} mol/L, Sigma Aldrich), indometacina (inibidor não seletivo das ciclooxigenases, 10^{-5} mol/L, Sigma Aldrich), ODQ (inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, 10^{-6} mol/L, Sigma Aldrich), tetraetilamônio (TEA, inibidor não seletivo dos canais para K^+ , 10^{-3} mol/L, Sigma Aldrich).

3.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RQ-PCR)

3.4.1 Extração do tecido:

Anéis de aorta dos animais dos grupos controle e etanol foram rapidamente isolados em uma placa de petri autoclavada contendo salina estéril. Transferiram-se os tecidos para eppendorfs estéreis de 1,5 mL que foram prontamente congelados em nitrogênio líquido.

3.4.2 Extração do RNA:

Para a extração do RNA, foram adicionados 250µl de PBS + 750 µl de TRIZOL às amostras de aorta, as quais foram lisadas em homogeneizador do tipo Polytron por aproximadamente 3 minutos. Em seguida, procedeu-se a extração do RNA total pelo método de Trizol (Invitrogen), conforme orientações do fabricante.

3.4.3 Síntese de cDNA:

A construção do DNA complementar (cDNA) foi realizada por transcrição reversa através da enzima Superscript II. O cDNA obtido foi então submetido à amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real (RQ-PCR).

3.4.4 Análise dos padrões de expressão gênica:

Foi utilizado o sistema disponível comercialmente *TaqMan Assay-on-demand*, composto por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems) para a análise quantitativa da expressão dos genes selecionados: pré-pró-adrenomedulina (Rn 00562327), receptor para adrenomedulina CRLR (receptor semelhante ao receptor da calcitonina) (Rn 00562334), RAMP1 (proteína que modifica a atividade do receptor) (Rn 01427056), RAMP2 (Rn 00824652), RAMP3 (Rn 00571815), eNOS (Rn 02132634).

A transcrição reversa foi realizada utilizando 1µg de RNA total para cada amostra em 20µL de reação total, com a adição de oligo (dT)₂₀ (Invitrogen, catálogo número 18418-020) e transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen, catálogo número 18064-022) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi diluído em 1:10 e 2,5µL foi utilizado para cada 15µL da reação de PCR em tempo real usando TaqMan Máster Mix (Applied Biosystems).

Todas as reações foram realizadas em duplicata e analisadas no aparelho 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems), e as condições do PCR foram: 1 ciclo de 10 minutos à 95°C, seguido por 40 ciclos à 94°C de 15 segundos e por 1 minuto à 60°C. Os dados foram constantemente coletados durante o PCR e analisados em ABI-7500 SDS (software package). O desvio padrão máximo entre as duplicatas foi de 10%. O RNA total absorvido foi normalizado baseado no valor de Ct para o gene GAPDH (Rn 01775763). A variação de expressão para as amostras foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo que a média do delta Ct de um grupo de 6 amostras de ratos controle foram utilizadas como calibrador.

3.5 Zimografia em gel

3.5.1 Dosagem de proteína pelo método de Bradford

Previamente à zimografia, foi necessário determinar a quantidade de proteína presente em cada amostra. Isto porque as variações protéicas podem interferir nos resultados finais da zimografia. Para isto, foi utilizado o método de Bradford, que consiste em um método colorimétrico e quantitativo.

Inicialmente, as amostras de aorta foram trituradas, homogeneizadas em tampão de extração de proteínas (CaCl₂ 10 mmol/L, Tris 20 mmol/L pH 7.4, Fenantrolina 1mmol/L , fenilmetanosulfonilfluoreto (PMSF) 1mmol/L, N-etilmaleimida (NEM) 1 mmol/L) e incubados por 16 horas na geladeira. Para cada 0,08g de tecido foram acrescentados 150 µL deste tampão. Após este período, os extratos foram centrifugados por 15 minutos, e os sobrenadantes retirados para determinação protéica.

Para construção da curva padrão foi utilizado o BSA nas seguintes concentrações, em mg/mL: 0,085; 0,175; 0,35; 0,70 e 1,4. Todas elas foram preparadas, em água destilada, a partir de uma solução inicial de 8 mg/mL.

O reagente de Bradford foi utilizado para determinar as concentrações de proteína de cada amostra analisada. Ao se ligar as proteínas do tecido, ele adquire uma coloração azul que pode ser quantificada por um espectrofotômetro de luz visível (595 nm). A intensidade da cor varia de acordo com a quantidade de proteína no tecido. Para cada 5 µL da amostra e da curva padrão foi acrescentado 250 µL deste reagente. Pelos valores obtidos após a leitura, em µg/µL, foi possível normalizar a quantidade de proteínas, que foi posteriormente aplicada nos géis de zimografia.

3.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%

As amostras previamente preparadas (SDS 2%, Tris-HCl 125 mmol/L, glicerol 10% e azul de bromofenol 0.001%) foram aplicadas em géis de poliacrilamida 12% e separadas por eletroforese, conforme a técnica de SDS-PAGE.

Após este processo, os géis foram submetidos a dois banhos de Triton X-100 a 2%, para remover o SDS, e colocados em solução Tris-CaCl₂ 50 mmol/L, por 16 horas, a 37°C. Posteriormente, foram fixados e corados em solução Coomassie Blue 0,05% por 4 horas. Para visualização das bandas referentes a pro-MMP e a MMP ativa, os géis foram descorados com metanol a 30% e ácido acético 10%. Observa-se a formação de bandas claras contra o fundo azul escuro do Coomassie (devido à degradação da gelatina incorporada ao gel).

Para cada gel foi utilizado um padrão interno (soro fetal bovino 2%), representado na figura como Std. Por ele, foi possível normalizar as quantidades de proteínas obtidas entre os géis, podendo compará-los entre si. A quantificação das bandas da MMP-2 foi feita usando o sistema Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System-EDAS 290 (Kodak, Rochester, NY). A forma latente e ativa da MMP-2 foi identificada por meio dos seus pesos moleculares 72 e 64, respectivamente.

3.6 Determinação indireta de NO tecidual através de dosagem de nitrato e nitrito

Anéis de aorta dos animais dos grupos controle e etanol foram rapidamente isolados em uma placa de petri autoclavada contendo salina

estéril. Transferiu-se o tecido para eppendorfs estéreis de 1,5 mL que foram prontamente congelados em nitrogênio líquido.

Alíquotas de 100 μ L de amostras de tecido foram desproteinizadas por precipitação utilizando 200 μ L etanol absoluto mantido á 4°C, seguido de agitação e permaneceram por 30 minutos em freezer (-20°C), e em seguida, foram submetidas à centrifugação (4.000 g, 10 min, 25°C) para posterior dosagem.

Para a medida do NO tecidual, foi utilizada a técnica de quimioluminescência NO/ozônio utilizando-se o analisador Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280 (GE Analytical Instruments, Boulder, CO. USA).

Das amostras desproteinizadas, utilizou-se o volume de 5,0 μ L, que foi injetado na câmara de reação do analisador que continha o agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em 1N de HCl à 95°C) quando a intenção era converter o nitrato em NO, e quando a intenção era converter nitrito a NO o agente redutor era (1% de NaI em ácido acético) As conversões eram feitas em quantidades equimolares. O NO é sugado para a câmara de quimioluminescência do analisador, que por sua vez, reage com o ozônio (O₃), formando dióxido de nitrogênio (NO₂). O NO₂ apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície foto-sensível de uma célula fotomultiplicadora. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. A corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico, que corresponde à concentração de nitrato ou nitrito na amostra. A curva padrão para a dosagem de nitrato foi preparada com nitrato de sódio nas concentrações 5, 10, 15, 25, 50 e 100 μ mol/Le para o

nitrito usou-se nitrito de sódio nas mesmas concentrações referidas para o nitrato.

3.7 Diluição das drogas

A Indometacina foi dissolvida em tampão Tris. ODQ e 7-NI foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO). Os demais compostos foram dissolvidos em água destilada. A quantidade de solvente no meio de incubação foi menor que 0,1%. Testes prévios em nosso laboratório empregando somente os solventes mostraram que nessa concentração eles não tiveram efeito sobre as respostas dos agonistas em estudo.

3.8 Análise estatística

Análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni e o teste t de Student foram realizados para detectar possíveis diferenças entre os valores em estudo como indicado nas tabelas e/ou figuras.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o peso corporal, consumo de líquido e ração dos animais.

Foram realizadas mensurações semanais do peso dos animais, consumo de ração e líquido dos dois grupos experimentais. Os pesos dos animais do grupo controle e etanol antes do início do tratamento eram de $276,75 \pm 3$ g (n=48) e $281,02 \pm 4$ g (n=48), respectivamente. Com relação ao ganho de peso semanal, os animais do grupo etanol apresentam redução significativa, em relação ao grupo controle, a partir da 3ª semana de adaptação. Essa redução no ganho de peso dos animais do grupo etanol persistiu até o final do tratamento (Figura 1).

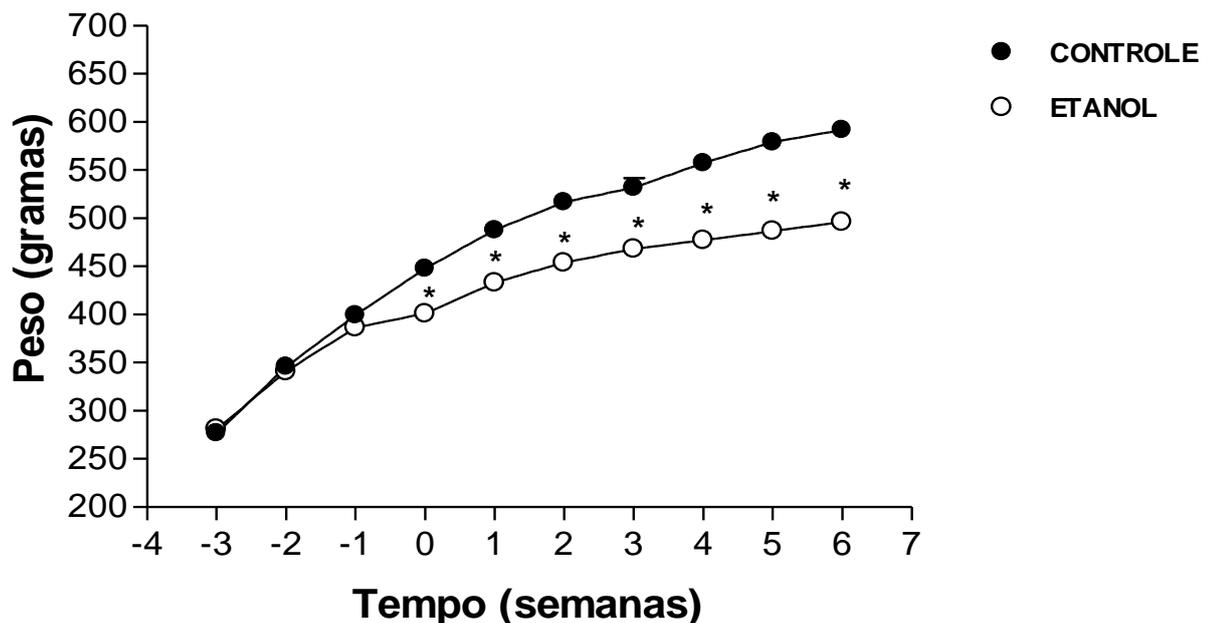


Figura 1: Média do peso dos animais durante o período de tratamento. O peso dos animais (gramas) foi medido semanalmente. Os pontos representam a média + EPM do peso corporal dos animais. Foram utilizados 48 animais. * diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Test t de Student).

O consumo de líquido do grupo etanol foi sempre menor do que o do grupo controle, mostrando-se estatisticamente diferente durante todo o período de tratamento (Figura 2).

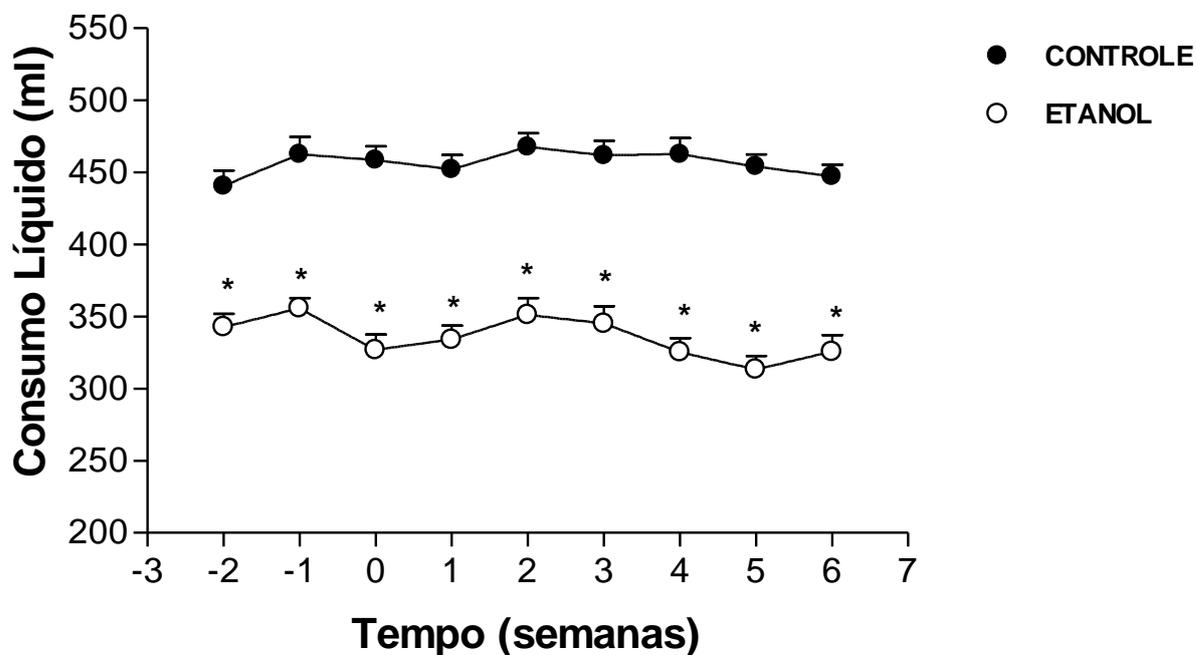


Figura 2: Média do consumo líquido dos animais durante o período de tratamento. O consumo líquido de cada grupo (água, e solução de etanol 20%) foi medido semanalmente e uma estimativa do consumo individual foi realizada dividindo-se o consumo total pelo número de animais em cada caixa (4). Os pontos representam a média + EPM da estimativa do consumo líquido. Foram utilizados 48 animais. * diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Test t de Student).

O consumo de ração do grupo etanol, quando comparado ao grupo controle, se mostra menor a partir da 1ª semana de adaptação e persiste até o fim do tratamento (Figura 3).

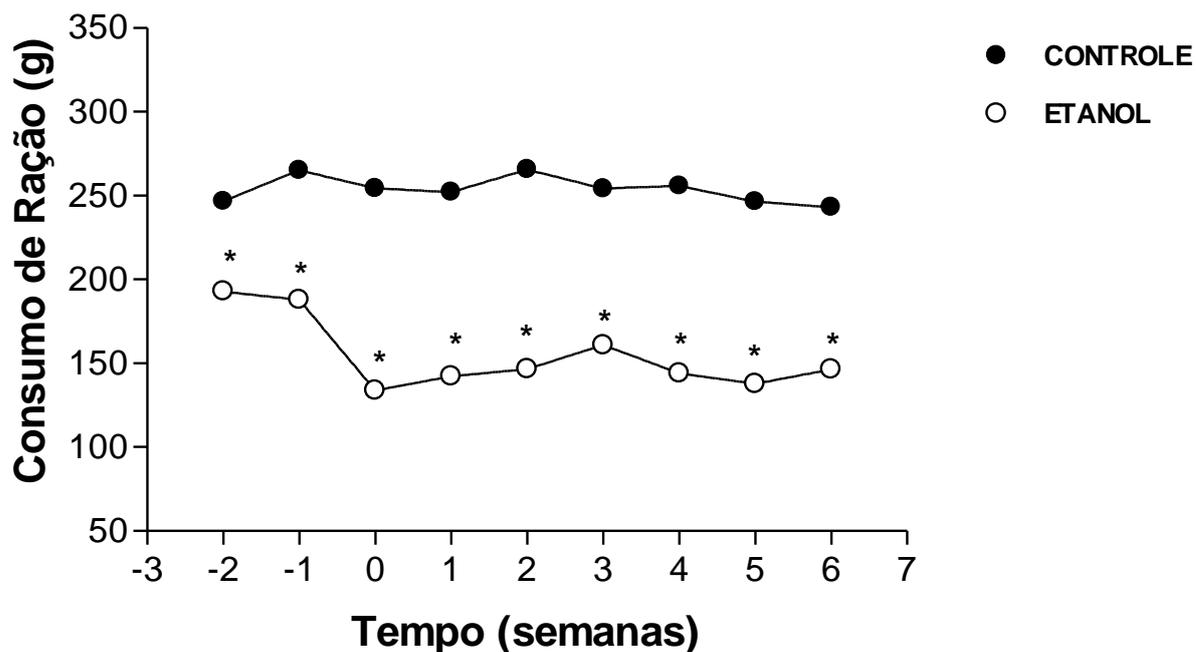


Figura 3: Média do consumo de ração dos animais durante o período de tratamento. O consumo de ração (gramas) foi medido semanalmente e uma estimativa do consumo individual foi realizada dividindo-se o consumo total pelo número de animais em cada caixa (4). Os pontos representam a média + EPM da estimativa do consumo de ração. Foram utilizados 48 animais. * diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Test t de Student).

4.2 Medida dos níveis de etanol no sangue

A quantidade de etanol detectada no sangue dos animais tratados por 6 semanas foi de $1,87 \pm 0,15$ mg/mL ($n=11$). Etanol não foi detectado no sangue de animais do grupo controle.

4.3 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta à AM.

Foram realizadas curvas concentração-resposta para AM com a concentração variando de 10^{-12} a 10^{-7} mol/L. O relaxamento induzido pela AM nos anéis de aorta foi dependente do endotélio tanto em animais do grupo controle como etanol (Figura 4; Tabela 1). Em anéis de aorta com endotélio, o

tratamento com etanol reduziu significativamente os valores de E_{max} (porcentagem de relaxamento) para a AM. Não foram encontradas diferenças nos valores de pD_2 para a AM, entre os grupos, em anéis com endotélio, (Tabela 1).

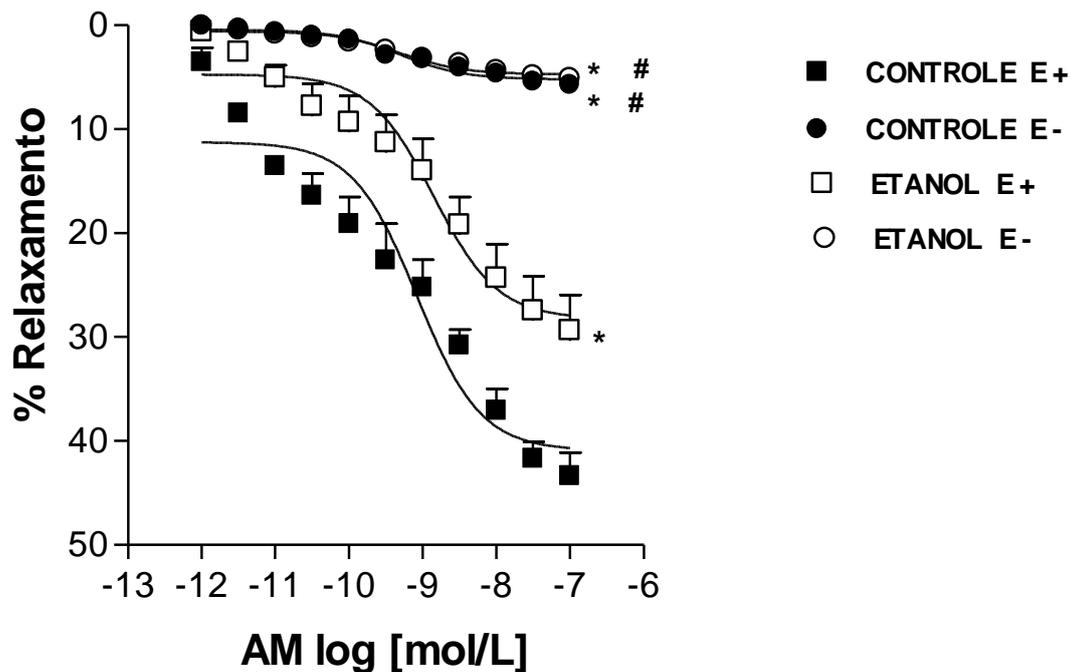


Figura 4: Efeito do tratamento crônico com etanol por 6 semanas na resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta torácica de rato. Curvas concentração-resposta para AM foram obtidas em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) de animais tratados com água (controle) ou solução de etanol 20% (etanol). Os pontos representam a média + EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração de AM. * Diferença significativa em relação ao grupo controle com endotélio. # Diferença significativa em relação ao grupo etanol com endotélio. (ANOVA / pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Tabela 1: Valores de Emax (porcentagem de relaxamento) e pD₂ calculados a partir de curvas concentração-resposta para a AM determinadas em preparações isoladas de aorta torácica com e sem endotélio.

Controle				
Tempo de Tratamento (semanas)	Com Endotélio		Sem Endotélio	
	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂
6	43,40 ± 2,27 (4)	9,68 ± 0,28	5,78 ± 0,39 ^{ab} (4)	—
Etanol				
Tempo de Tratamento (semanas)	Com Endotélio		Sem Endotélio	
	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂
6	29,39 ± 3,43 ^a (7)	9,32 ± 0,29	5,15 ± 0,75 ^{ab} (4)	—

Os valores são expressos como a média ± EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações. ^a Diferença significativa em relação ao grupo controle com endotélio ^b Diferença significativa em relação ao grupo etanol com endotélio (ANOVA / pós-teste de Bonferroni, p<0,05).

4.4 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta ao CGRP

Foram realizadas curvas concentração-resposta para o CGRP com a concentração variando de 10⁻¹² a 10⁻⁷ mol/L. O relaxamento induzido pelo CGRP nos anéis de aorta foi dependente do endotélio, tanto em animais do grupo controle como etanol (Figura 5). O tratamento com etanol não alterou os valores de Emax (porcentagem de relaxamento) do CGRP quando comparado ao grupo controle (Tabela 2). Não foram encontradas diferenças nos valores de pD₂, para o CGRP, entre os grupos, em anéis com endotélio (Tabela 2).

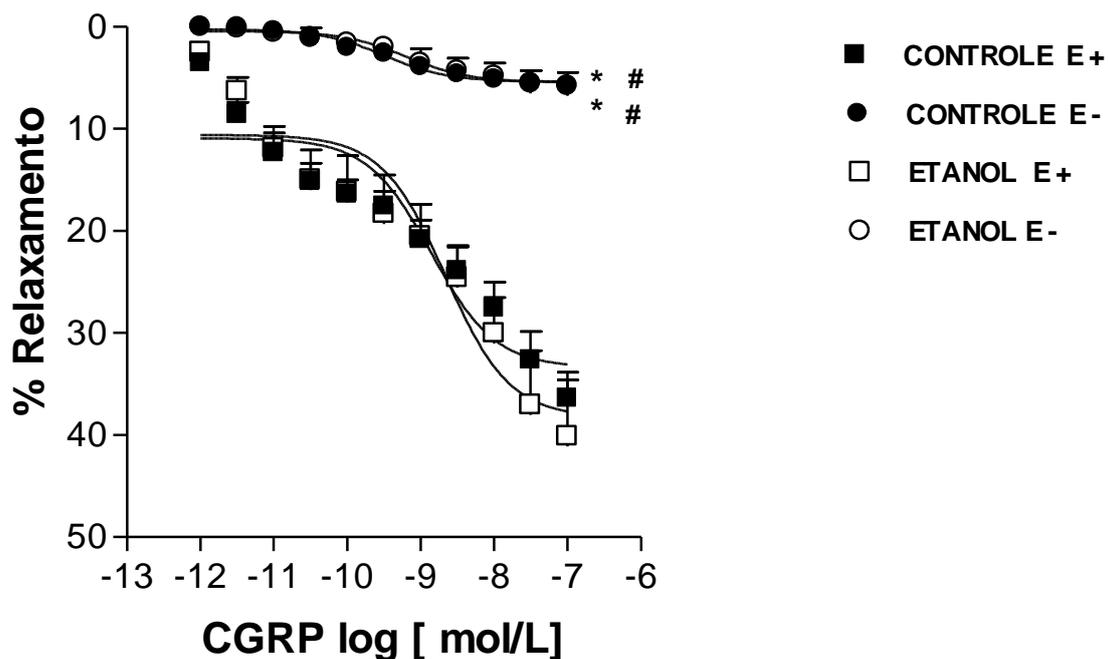


Figura 5: Efeito do tratamento crônico com etanol por 6 semanas na resposta de relaxamento induzida pelo CGRP em anéis de aorta torácica de rato. Curvas concentração-resposta para o CGRP foram obtidas em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) de animais tratados com água (controle) ou solução de etanol 20% (etanol). Os pontos representam a média + EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração de CGRP. * Diferença significativa em relação ao grupo controle com endotélio. # Diferença significativa em relação ao grupo etanol com endotélio. (ANOVA / pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Tabela 2: Valores de Emax (porcentagem de relaxamento) e pD₂ calculados a partir de curvas concentração-resposta para o CGRP determinadas em preparações isoladas de aorta torácica com e sem endotélio.

Controle				
Tempo de Tratamento (semanas)	Com Endotélio		Sem Endotélio	
	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂
6	36,46 ± 2,53 (6)	9,63 ± 0,29	5,82 ± 0,29 ^a (4)	–
Etanol				
Tempo de Tratamento (semanas)	Com Endotélio		Sem Endotélio	
	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂
6	40,15 ± 5,49 (6)	9,38 ± 0,21	5,80 ± 1,29 ^a (4)	–

Os valores são expressos como a média ± EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações. ^a Diferença significativa em relação aos anéis com endotélio. (ANOVA / pós-teste de Bonferroni, p<0,05).

4.5 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de anéis de aorta à acetilcolina.

A acetilcolina induziu relaxamento em aortas torácicas com endotélio (Figura 6). O tratamento com etanol por 6 semanas não alterou o Emax (porcentagem de relaxamento) nem os valores de pD₂ para a acetilcolina (Tabela 3).

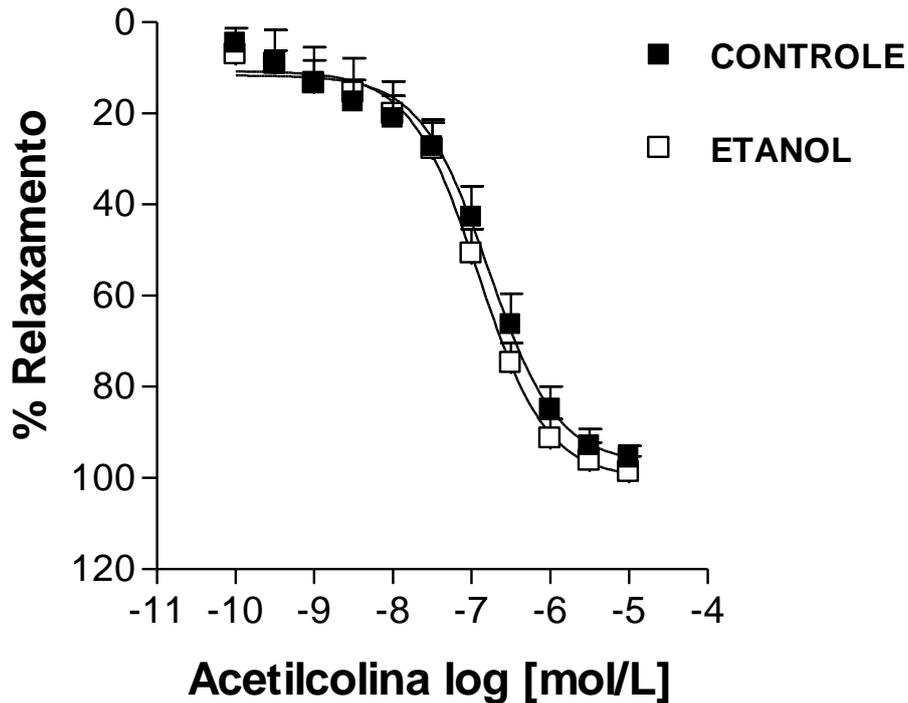


Figura 6: Efeito do tratamento crônico com etanol por 6 semanas na resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina em anéis de aorta torácica de rato com endotélio. Curvas concentração-resposta para acetilcolina foram obtidas em anéis de aorta de animais tratados com água (controle), solução de etanol 20% (etanol). Os pontos representam a média + EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração de acetilcolina.

Tabela 3: Valores de Emax (porcentagem de relaxamento) e pD_2 calculados a partir de curvas concentração-resposta para acetilcolina, determinadas em preparações isoladas de aorta torácica com endotélio.

Tempo de Tratamento (semanas)	Controle		Etanol	
	Emax	pD_2	Emax	pD_2
6	$95,73 \pm 2,72$ (5)	$7,0 \pm 0,14$	$98,87 \pm 3,49$ (5)	$7,11 \pm 0,12$

Os valores são expressos como a média \pm EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.

4.6 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta sem endotélio.

O NPS induziu relaxamento em aortas torácicas sem endotélio (Figura 7). O tratamento com etanol não alterou os valores de E_{max} e pD_2 (Tabela 4)

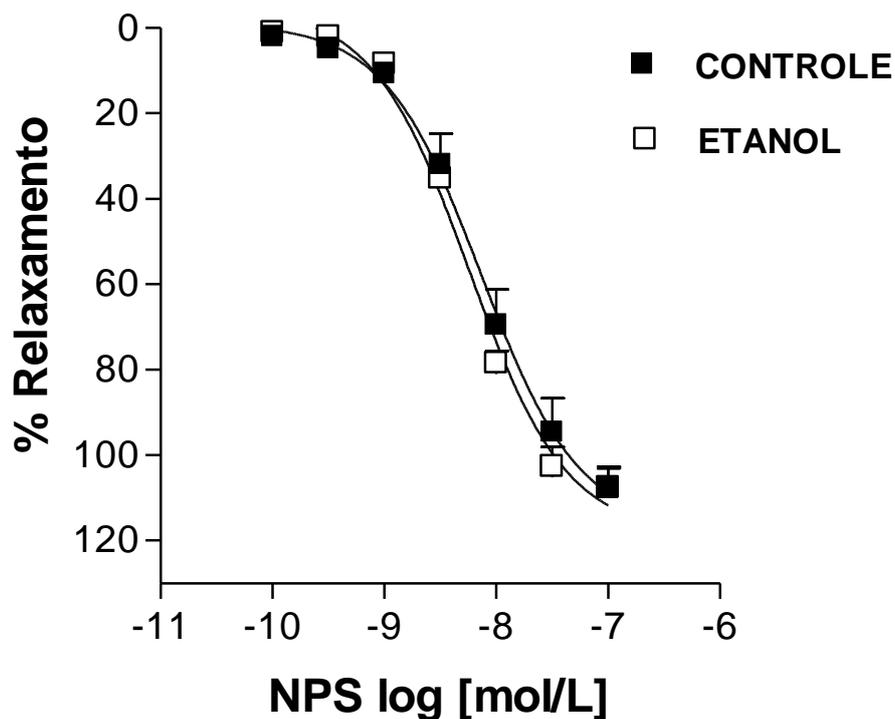


Figura 7: Efeito do tratamento crônico com etanol por 6 semanas sobre a resposta de relaxamento induzida pelo NPS em anéis de aorta de rato sem endotélio. Curvas concentração-resposta para o NPS foram obtidas em anéis de aorta de animais tratados com água (controle) ou solução de etanol 20% (etanol). Os pontos representam a média + EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração do NPS.

Tabela 4: Valores de Emax (porcentagem de relaxamento) e pD₂ calculados a partir de curvas concentração-resposta para o NPS determinadas em anéis de aorta sem endotélio.

Tempo de Tratamento (semanas)	Controle		Etanol	
	Emax	pD ₂	Emax	pD ₂
6	107,87 ± 4,77 (8)	8,19 ± 0,08	107,55 ± 4,83 (7)	8,29 ± 0,03

Os valores são expressos como a média ± EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.

4.7 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre as concentrações de nitrato e nitrito em aorta de rato

Não houve diferença nas concentrações de nitrato e nitrito entre o grupo etanol (n= 4) e o grupo controle (n= 5) (Figura 8) Apesar de o tratamento com etanol reduzir os níveis de nitrato e nitrito nas aortas essa redução não se mostrou estatisticamente diferente.

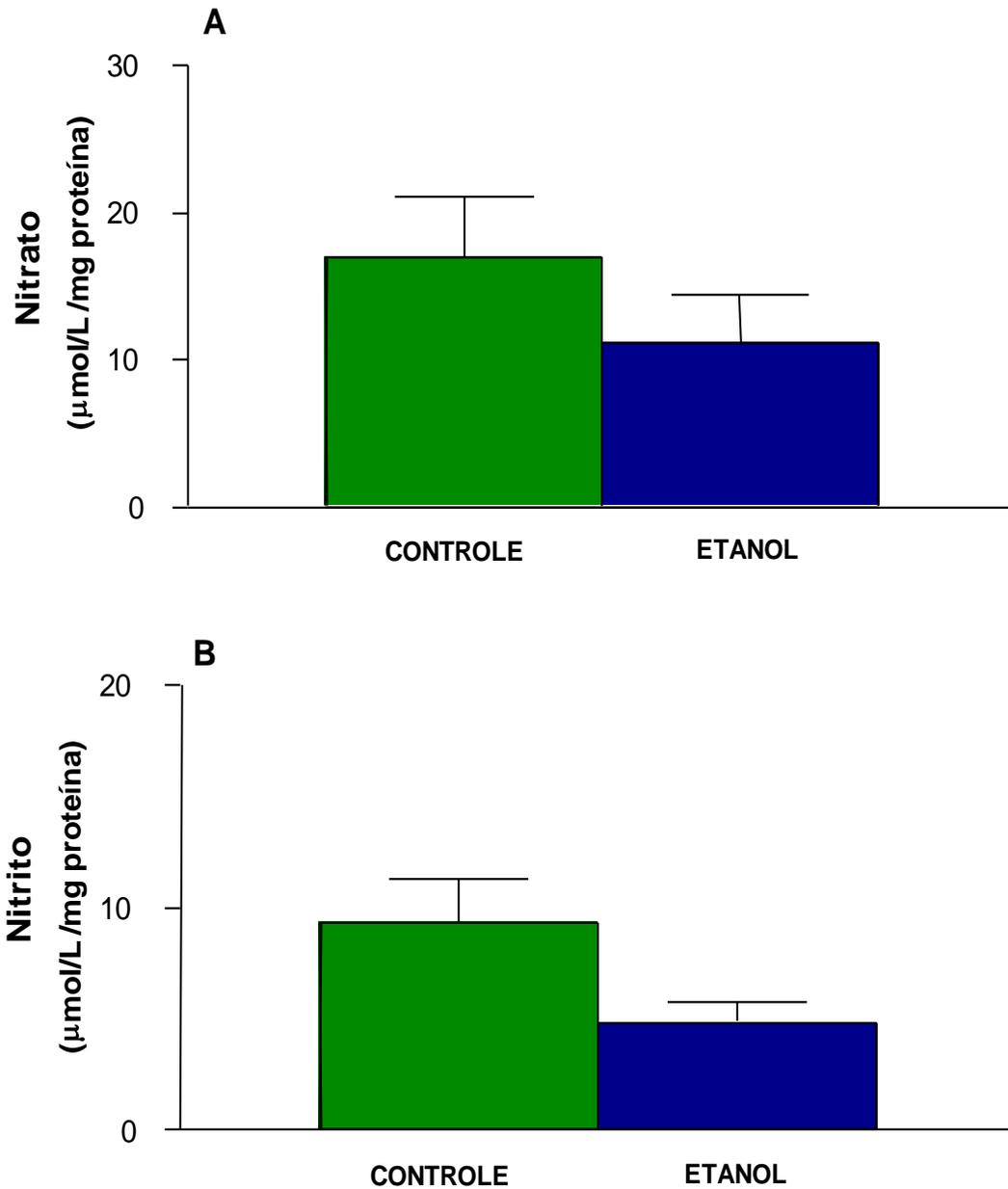


Figura 8: Efeito do tratamento crônico com etanol por 6 semanas sobre as concentrações de nitrato (A) e nitrito (B) em aorta de rato. Realizou-se a dosagem de nitrato e nitrito em aorta com endotélio de animais tratados com água (controle) ou solução de etanol 20% (etanol). Os valores representam a média + EPM de 4-5 anéis de aorta.

4.8 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre as concentrações de MMP-2 em aortas de ratos

Para avaliar os efeitos do tratamento com etanol sobre as concentrações vasculares da MMP-2 foi utilizado o método convencional de zimografia em gel. A figura (9 A) mostra um gel representativo dos extratos de aorta dos dois grupos experimentais. As bandas da pro-MMP-2 e da MMP-2 ativa foram representadas pelos seus respectivos pesos moleculares 72 e 64 KDa.

Foi observado que o tratamento com etanol não alterou as concentrações vasculares, tanto da pro-MMP2 quanto da MMP-2 ativa em relação ao grupo controle (Figura 9).

A

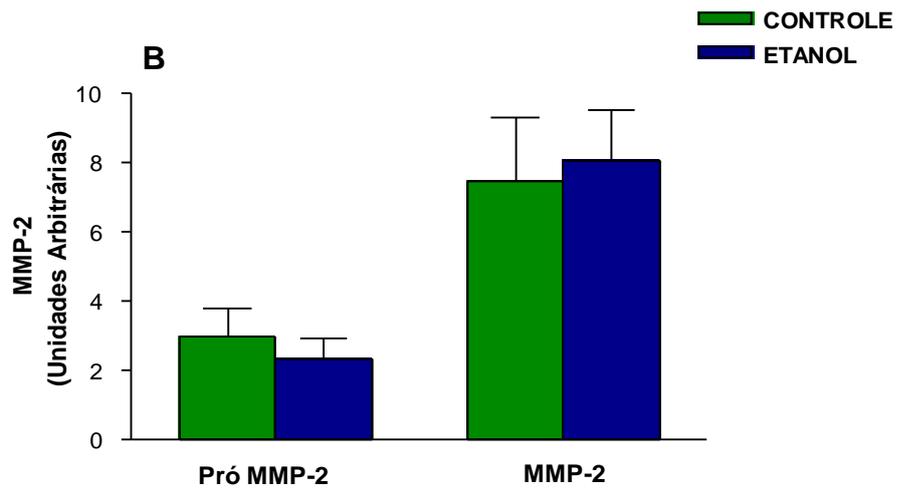
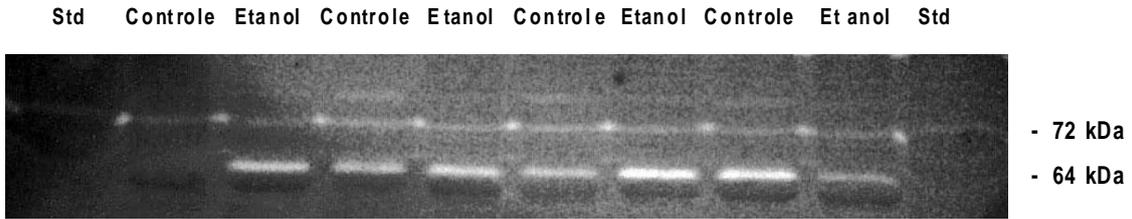


Figura 9: Efeito do tratamento crônico com etanol por 6 semanas sobre as concentrações vasculares da pro-MMP-2 e da MMP-2 ativa representadas na forma de gel (A) e na forma de gráfico (B) em aorta de rato. Realizou-se o método da zimografia em gel em aorta com endotélio de animais tratados com água (controle) ou solução de etanol 20% (etanol). Os valores representam a média + EPM de 5 aortas.

4.9 Mecanismos envolvidos no efeito de etanol sobre a resposta de relaxamento induzida pela AM em aorta de ratos

Após as curvas concentração-resposta para AM demonstrarem que seu efeito de relaxamento é dependente do endotélio vascular e que o tratamento com etanol provocou uma diminuição do seu efeito, os experimentos para estudar se o etanol estaria alterando a cascata de sinalização do referido peptídeo foram realizados apenas em aortas com endotélio, sendo que para isso foi escolhido um ponto da referida curva (10^{-8} mol/L) para o estudo.

O primeiro passo do estudo foi verificar se com a administração pontual de AM o tratamento com etanol também iria provocar uma diminuição na resposta como ocorreu quando curvas dose-resposta foram realizadas. Os resultados mostraram que quando a AM foi administrada de forma pontual também ocorreu redução da resposta de relaxamento induzida por este peptídeo no grupo tratado com etanol (Figura 10).

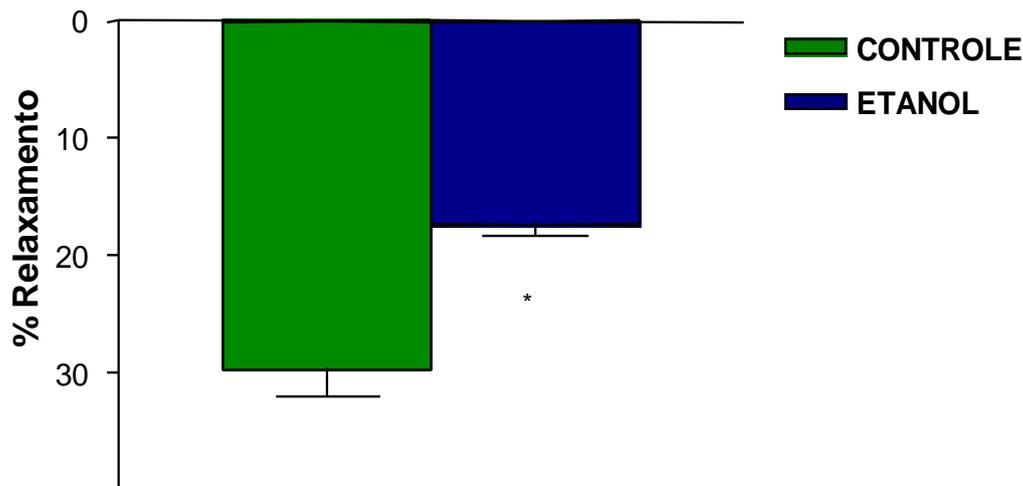


Figura 10: Efeito do tratamento crônico com etanol por 6 semanas na resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta com endotélio. Realizou-se a administração pontual de AM em anéis de aorta de animais tratados com água (controle) ou solução de etanol 20% (etanol). As barras representam a média + EPM de n= 7- 9. * Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, Teste t de Student).

4.9.1 Participação das sintases do NO e da guanilato ciclase na diminuição da resposta de relaxamento da AM em anéis de aorta após tratamento com etanol.

Com a finalidade de verificar se o tratamento com etanol influencia a produção de NO endotelial induzido pela AM, foi realizada a administração pontual do referido peptídeo em anéis de aorta com endotélio na presença de L-NAME, um inibidor não seletivo da sintase do óxido nítrico (NOS), 7-nitroimidazol, inibidor seletivo da sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS), 1400W inibidor seletivo da sintase do óxido nítrico induzida (iNOS), e ODQ inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, que é ativada pelo NO. Houve diminuição na resposta de relaxamento induzida pela AM nos anéis de aorta dos grupos controle e etanol na presença de L-NAME e ODQ quando comparada à resposta obtida na ausência dos inibidores. Com relação ao 7-

nitroimidazol e ao 1400W não houve alteração na resposta da AM em nenhum dos dois grupos estudados quando comparados aos experimentos realizados na ausência dos referidos inibidores. (Figura 11).

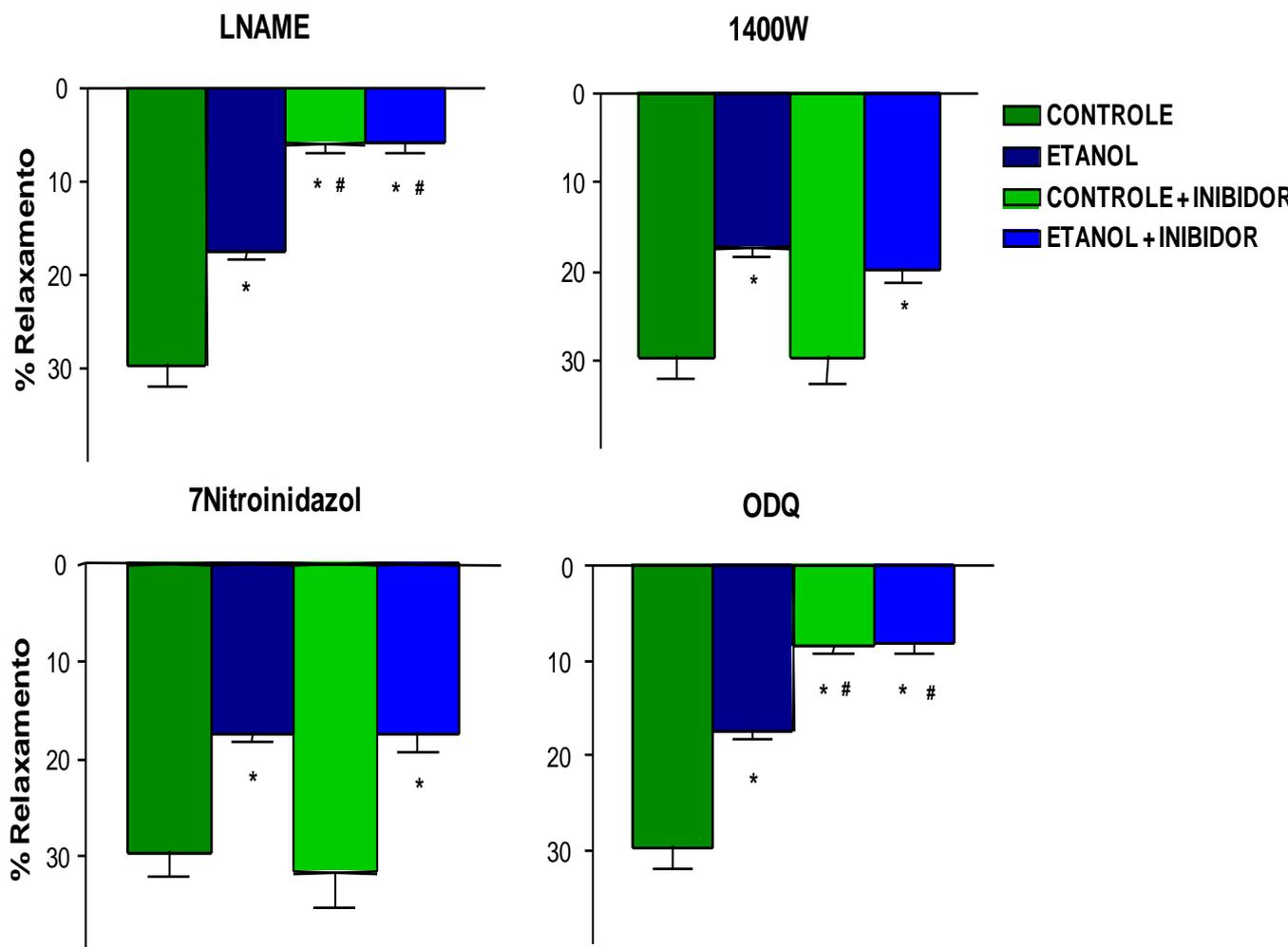


Figura11: Efeito do L-NAME, 1400W, 7-nitroimidazol e ODQ sobre a resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta com endotélio. Realizou-se a administração pontual de AM após incubação dos anéis por 30 minutos com L-NAME (10^{-4} mol/L), 1400W (10^{-6} mol/L), 7-nitroimidazol (10^{-4} mol/L) e ODQ (10^{-6} mol/L). As barras representam a média + EPM de n= 5 - 8. * Diferença significativa em relação ao grupo controle. # Diferença significativa em relação ao grupo etanol (ANOVA / pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

4.9.2 Participação da ciclooxygenase na diminuição da resposta de relaxamento da AM em anéis de aorta após tratamento com etanol

A indometacina, um inibidor não seletivo da enzima ciclooxygenase, não alterou o relaxamento produzido pela AM tanto no grupo controle como no grupo etanol (Figura 12).

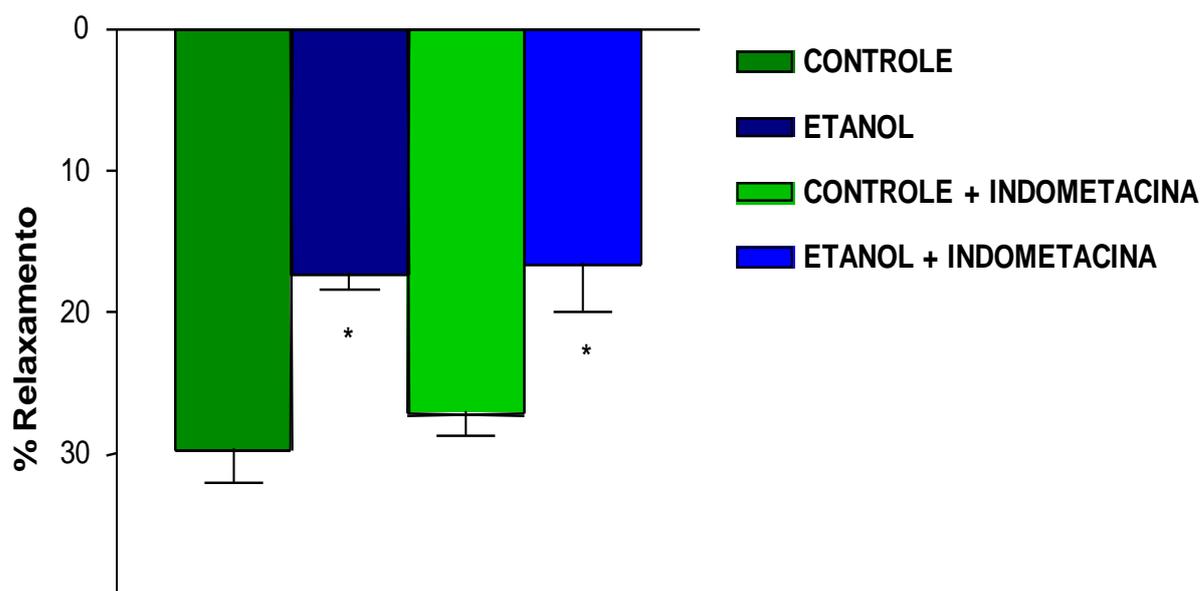


Figura12: Efeito da indometacina sobre a resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta com endotélio. Realizou-se a administração pontual de AM após incubação dos anéis por 30 minutos com indometacina (10^{-5} mol/L). As barras representam a média + EPM de n= 5 - 6. * Diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle (ANOVA / pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

4.9.3 Participação dos canais para potássio (K^+) na diminuição da resposta de relaxamento da AM em anéis de aorta após tratamento com etanol.

O tetraetilamônio (TEA), um inibidor não seletivo dos canais para K^+ , promoveu redução do relaxamento induzido pela AM tanto no grupo controle como no grupo etanol (Figura 13).

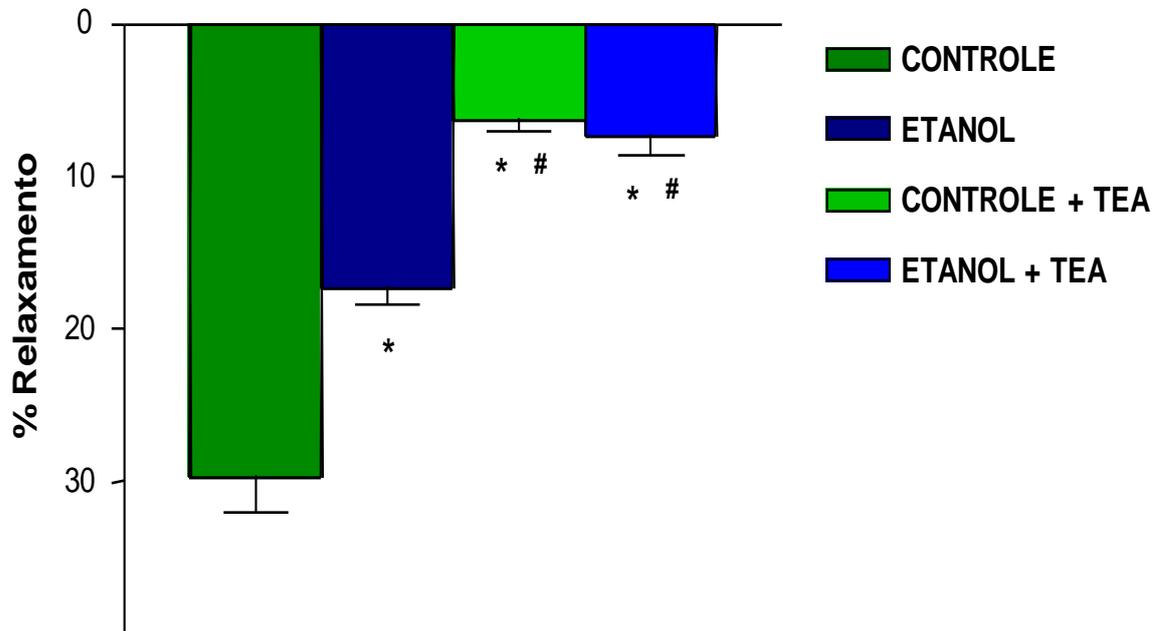


Figura 13: Efeito do TEA sobre a resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta com endotélio. Realizou-se a administração pontual de AM após incubação dos anéis por 30 minutos com TEA (10^{-3} mol/L). As barras representam a média + EPM de n= 6 - 7. * Diferença significativa em relação ao grupo controle. # Diferença significativa em relação ao grupo etanol (ANOVA / pós teste de Bonferroni, p<0,05).

4.9.4 Efeito do antagonista para receptores de AM (AM₂₂₋₅₂) sobre a resposta desencadeada pela AM.

O efeito do AM₂₂₋₅₂ sobre a resposta de relaxamento induzida pela AM foi avaliado nos anéis de aorta com endotélio dos animais dos dois grupos experimentais. Para tanto, analisou-se o efeito de diferentes concentrações desse antagonista (3×10^{-8} mol/L e 10^{-7} mol/L) sobre resposta desencadeada pela AM. Observou-se que no grupo controle o AM₂₂₋₅₂ reduziu a resposta de relaxamento da AM de maneira dependente da concentração. No entanto, é importante notar, que essa redução não foi observada no grupo etanol (Figura 14).

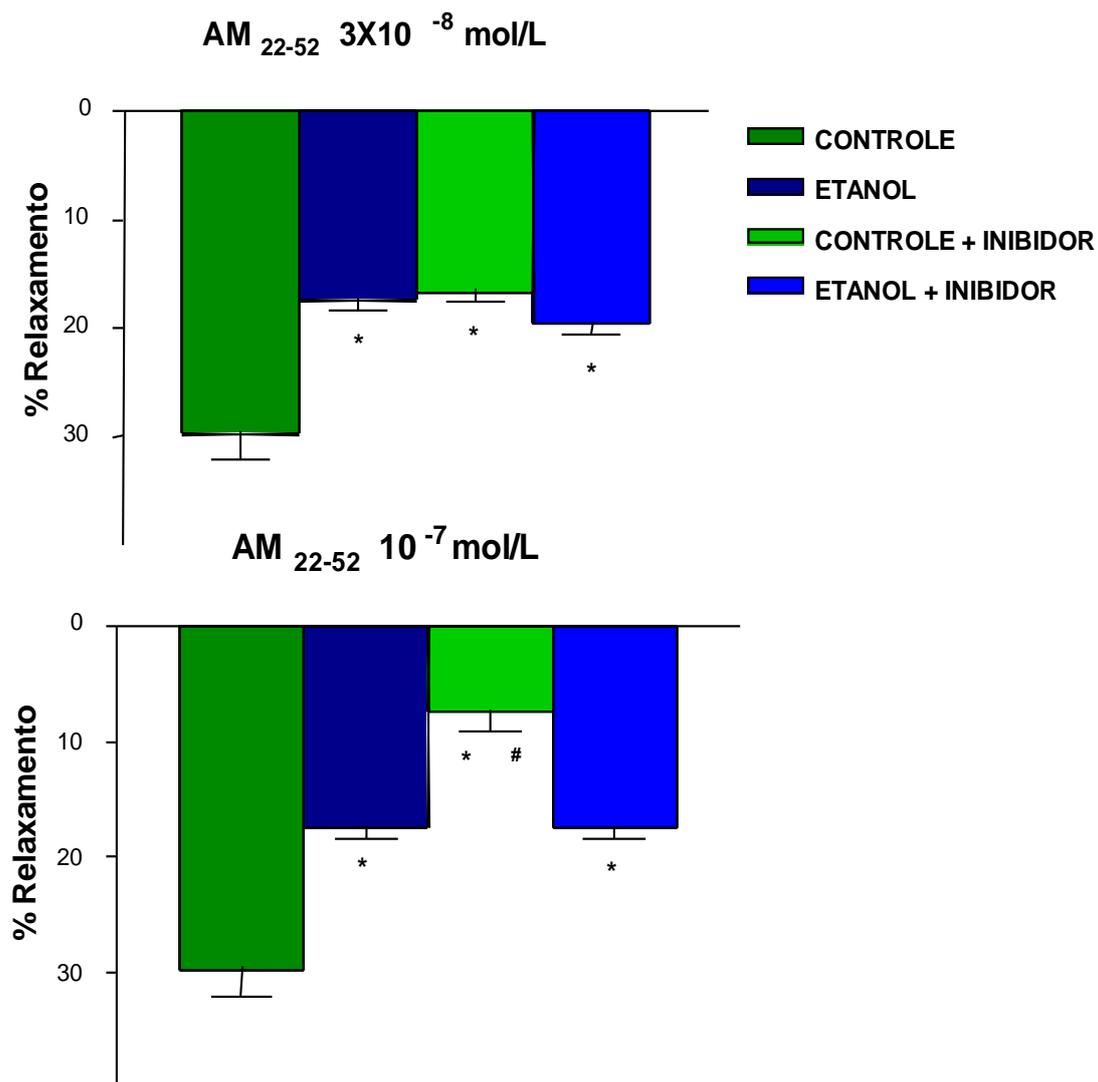


Figura 14: Avaliação do efeito do antagonista AM₂₂₋₅₂ na resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta com endotélio. Realizou-se a administração pontual de AM após incubação com o AM₂₂₋₅₂ por 30 minutos nas concentrações de 3x10⁻⁸ e 10⁻⁷ mol/L. As barras representam a média + EPM de n= 5 - 7. * Diferença significativa em relação ao grupo controle. # Diferença significativa em relação ao grupo etanol. (ANOVA / pós teste de Bonferroni, p<0,05).

4.9.5 Efeito do antagonista para receptores de CGRP (CGRP₈₋₃₇) sobre a resposta desencadeada pela AM.

O efeito do CGRP₈₋₃₇ sobre a resposta de relaxamento induzida pela AM foi avaliado nos anéis de aorta com endotélio dos animais dos dois grupos experimentais. Para tanto, analisou-se o efeito de diferentes concentrações desse antagonista (10^{-7} e 3×10^{-7} mol/L) sobre resposta desencadeada pela AM.

Observou-se que tanto no grupo controle como no grupo etanol o CGRP₈₋₃₇ não interferiu na resposta de relaxamento da AM independentemente da concentração (Figura 15).

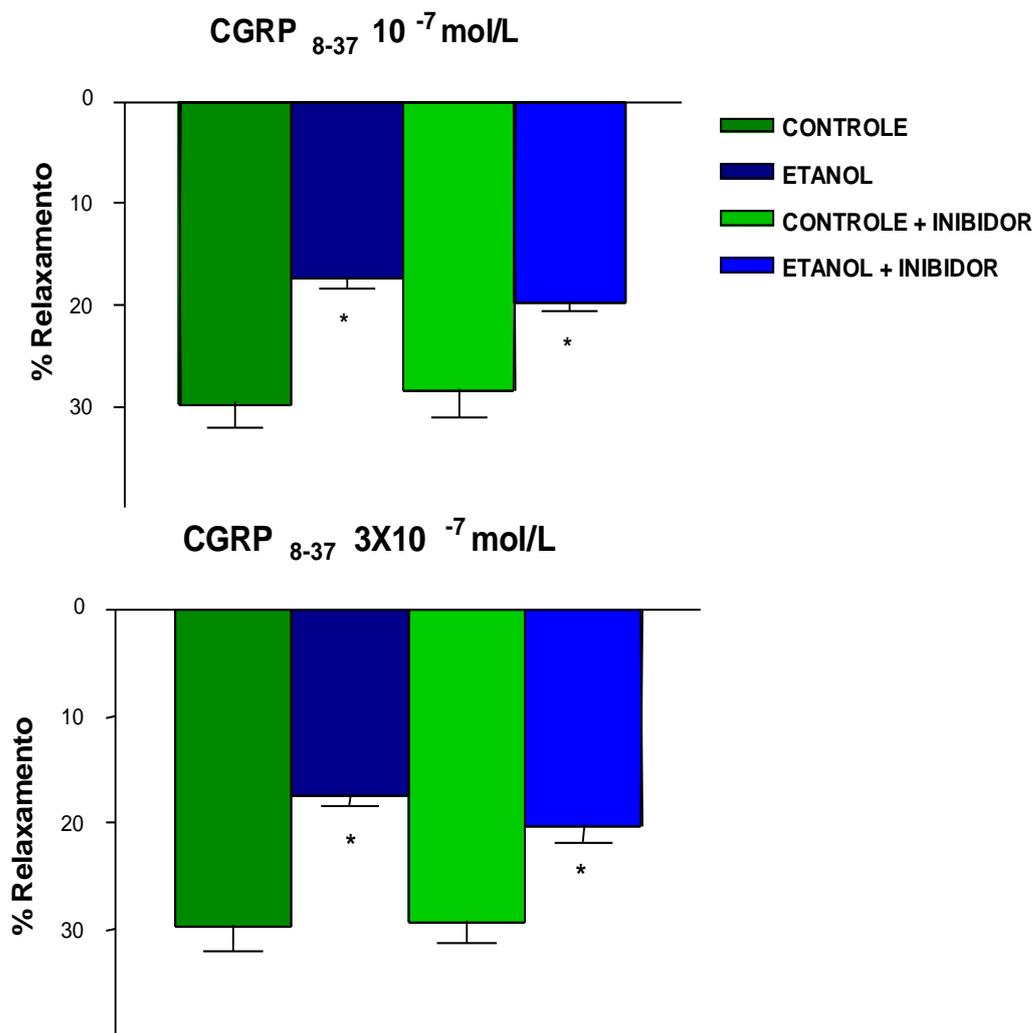


Figura 15: Avaliação do efeito do antagonista CGRP₈₋₃₇ na resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta com endotélio. Realizou-se a administração pontual de AM após incubação com o CGRP₈₋₃₇ por 30 minutos nas concentrações de 10⁻⁷ e 3x10⁻⁷ mol/L. As barras representam a média + EPM de n= 5 - 6. * Diferença significativa em relação ao grupo controle. (ANOVA / pós teste de Bonferroni, p<0,05).

4.10 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de RNAm da pré-pró-AM.

Houve aumento nos níveis de RNAm da pré-pró-AM em anéis de aorta com endotélio do grupo etanol em relação ao grupo controle (Figura 16).

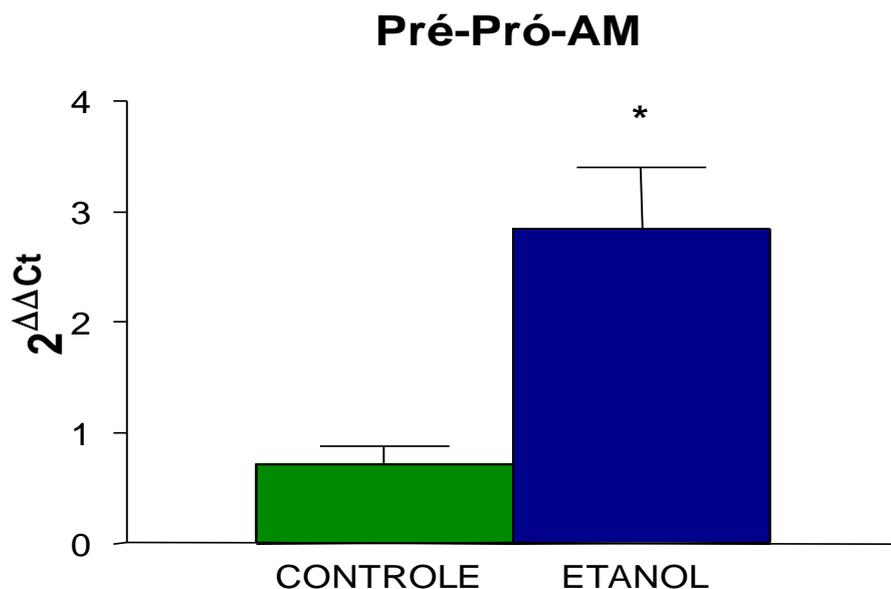


Figura 16: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de RNAm para a pré-pró-AM em anéis de aorta com endotélio. O gráfico mostra os valores de $2^{\Delta\Delta Ct}$ para a pré-pró-AM em aorta de ratos do grupo controle e etanol. Os valores foram normalizados pelo produto correspondente da reação de RQ-PCR para GAPDH. As barras representam a média + EPM de n=7 para ambos os grupos. *Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, Teste t de Student).

4.11 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de RNAm do CRLR (receptor semelhante ao receptor de calcitonina) e RAMPs (proteínas modificadoras da atividade do receptor).

Não houve diferença nos níveis de RNAm para o CRLR (receptor da AM) entre o grupo etanol (n= 7) e o grupo controle (n= 8). No entanto, observou-se aumento nos níveis de RNAm para a RAMP1 nas artérias de animais provenientes do grupo etanol (n= 7) em relação ao grupo controle (n= 7) (Figura 17). Com relação às RAMPs 2 e 3 não houve diferença nos níveis de RNAm entre o grupo etanol (n=7 e n=6, respectivamente) e o grupo controle (n=8 e n=7, respectivamente) (Figura 17).

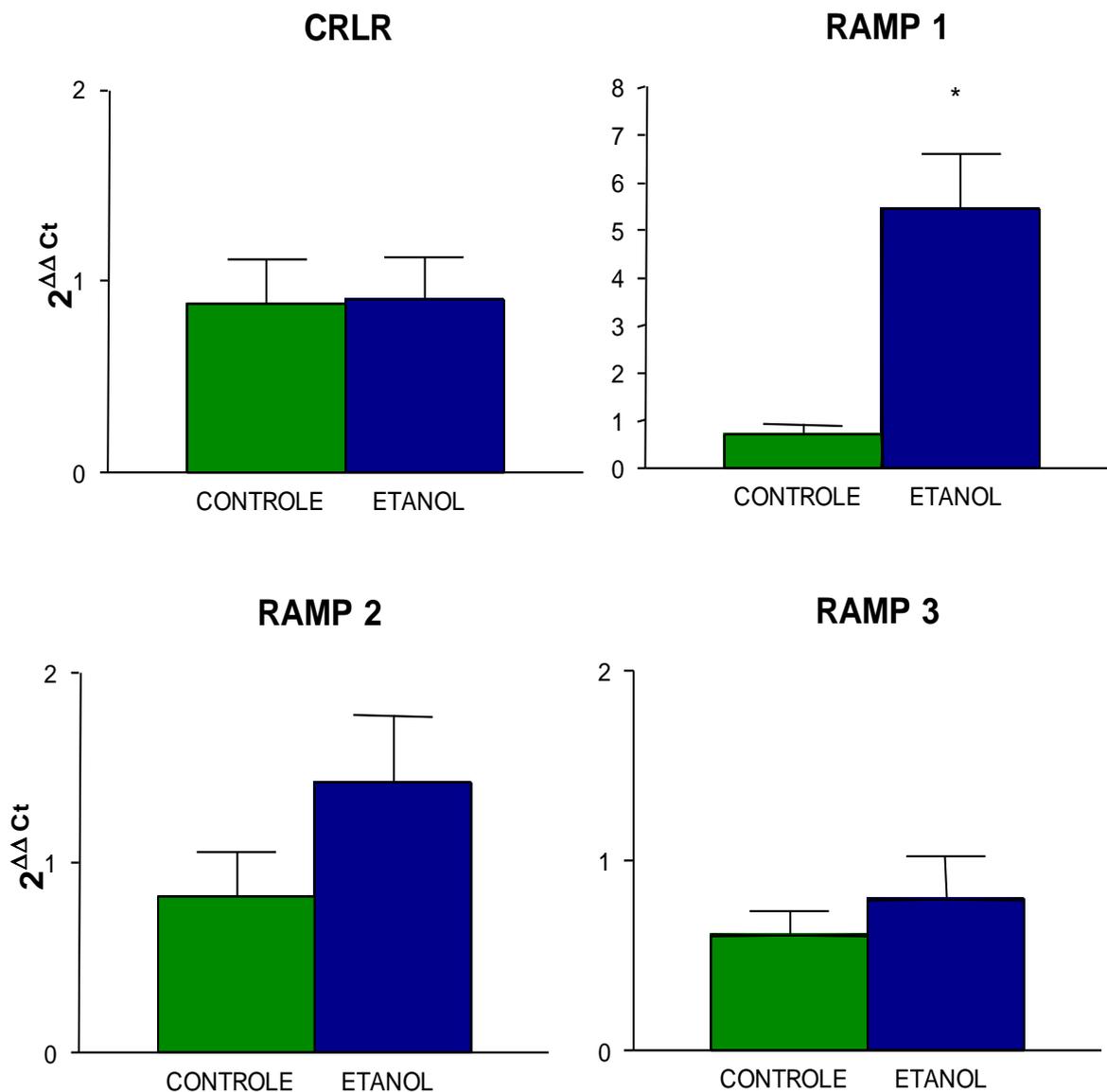


Figura 17: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de RNAm para o CRLR e das RAMPs 1, 2 e 3 em anéis de aorta com endotélio. Os gráficos mostram os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o CRLR e as RAMPs em aorta de ratos do grupo controle e etanol. Os valores foram normalizados pelo produto correspondente da reação de RQ-PCR para GAPDH. As barras representam a média + EPM de n= 6 - 8. *Diferença significativa em relação ao grupo controle (p<0,05, Teste t de Student).

4.12 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de RNAm da eNOS.

Não houve diferença nos níveis de RNAm para a eNOS entre o grupo etanol (n= 7) e o grupo controle (n= 7) (Figura 18).

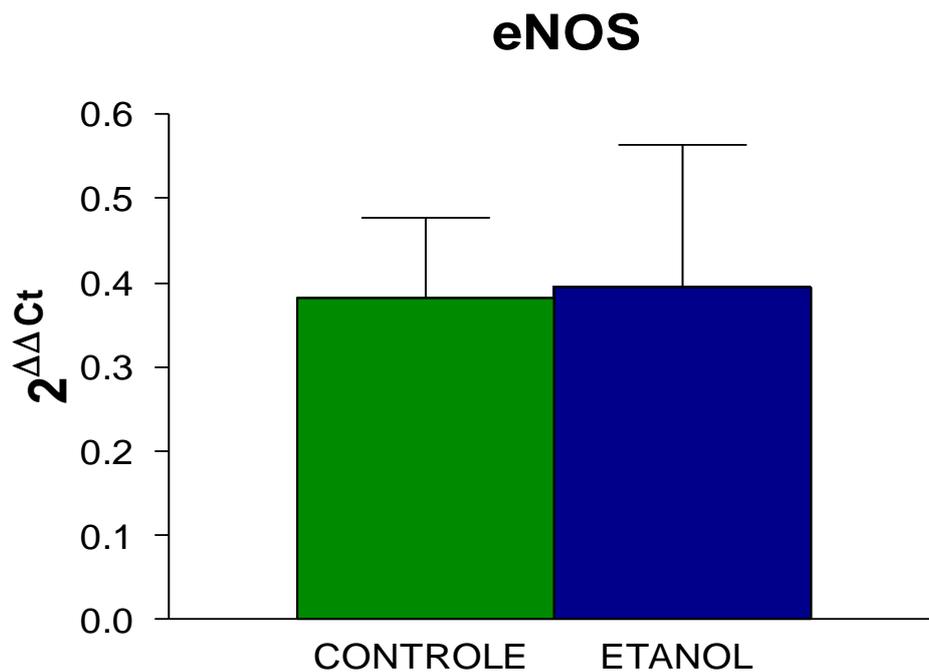


Figura 18: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de RNAm da eNOS em anéis de aorta com endotélio. O gráfico mostra os valores de $2^{\Delta\Delta Ct}$ para a eNOS em aorta de ratos do grupo controle e etanol. Os valores foram normalizados pelo produto correspondente da reação de RQ-PCR para GAPDH. As barras representam a média + EPM de n= 7 para ambos os grupos.

5. RESUMO DOS RESULTADOS

5. RESUMO DOS RESULTADOS

Efeitos da AM

- 1) Nossos resultados mostram que o relaxamento mediado pela adrenomedulina (AM) em aorta de rato é dependente do endotélio.
- 2) O relaxamento envolve a produção de NO, ativação da enzima guanilato ciclase e abertura de canais para potássio (K^+).
- 3) O relaxamento induzido pela AM foi inibido pelo AM_{22-52} , antagonista do receptor de AM, mas não pelo $CGRP_{8-37}$, antagonista do receptor do CGRP.

Efeitos do Etanol sobre o Sistema AM

- 1) O tratamento com etanol (solução 20%) por 6 semanas reduziu a resposta de relaxamento induzida pela AM em aorta de rato.
- 2) O tratamento com etanol não afetou o relaxamento induzido pela acetilcolina, CGRP e nitroprussiato de sódio.
- 3) Não houve alteração dos níveis de MMP-2 e de nitrito e nitrato basal após tratamento com etanol.
- 4) No grupo etanol o AM_{22-52} , antagonista do receptor de AM, não foi capaz de inibir a resposta da AM.
- 5) O tratamento com etanol aumenta os níveis de RNAm para a pré-pró AM e do RAMP 1.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O ganho de peso corporal do grupo etanol se mostrou menor em relação ao grupo controle a partir da terceira semana de adaptação e persistiu até o final do tratamento. Isso pode ter ocorrido devido aos efeitos prejudiciais do etanol sobre digestão e absorção de nutrientes essenciais (Lieber, 1991). O consumo de ração do grupo etanol foi menor que do grupo controle durante todo o período de tratamento provavelmente devido às calorias fornecidas pelo etanol que provoca uma sensação de saciedade nos animais (Aguiar et al., 2004). A ingestão de líquido também foi menor no grupo etanol durante todo tratamento possivelmente devido ao gosto desagradável do etanol (Aguiar et al., 2004).

Os resultados de reatividade vascular do presente estudo foram analisados utilizando-se dois parâmetros: o Emax (efeito máximo induzido pelo agonista) e o pD_2 ($-\log EC_{50}$). Alterações nos valores de Emax e pD_2 podem ser decorrentes de diferentes fatores, tais como alterações: na densidade dos receptores, na afinidade do agonista pelo receptor, no acesso da droga ao receptor (solubilidade do agonista, condições iônicas do líquido nutriente e pH), ou da musculatura lisa vascular e de mecanismos de transdução intra-celulares (Kenakin, 1997).

Outro fator que influencia a análise dos efeitos promovidos pelos agonistas farmacológicos é a geração de substâncias por parte dos tecidos estudados. Muitas vezes essas substâncias geradas nos tecidos estabelecem interações sinérgicas ou antagônicas com os agonistas estudados, constituindo, assim, mecanismos locais moduladores das atividades vasomotoras dos agonistas farmacológicos. Com efeito, a atuação destes

mecanismos moduladores locais pode modificar o perfil da curva concentração-resposta e, conseqüentemente, os parâmetros farmacológicos obtidos pela análise das curvas (Kenakin, 1997). Assim, alterações dos valores desses dois parâmetros farmacológicos nos fornecem indícios dos possíveis mecanismos, anteriormente citados, que poderiam estar envolvidos na alteração da reatividade vascular.

Os valores de E_{max} e pD_2 para a AM, em aorta de ratos, foram semelhantes aos previamente descritos na literatura (Yoshimoto et al., 1998; Cao et al., 2003). Além disso, nossos resultados confirmam estudos prévios onde foi observado que a AM induz relaxamento de maneira dependente do endotélio e da concentração (Yoshimoto et al., 1998; Cao et al., 2003). Como o tratamento com etanol afetou o relaxamento da AM com endotélio, experimentos com outros agonistas foram realizados para avaliar se o efeito do etanol era específico sobre a AM ou afetaria outros agonistas.

O CGRP é um peptídeo que se liga ao mesmo receptor da AM sendo que as RAMPs são as responsáveis pela especificidade de ligação do CGRP ou da AM (McLatchie et al., 1998). Quanto ao efeito de relaxamento provocado pelo CGRP em aorta de ratos, os resultados da literatura mostram ser dependente do endotélio vascular (Yoshimoto et al., 1998; Wisskirchen et al., 1999). Nossos resultados corroboram com os da literatura e mostram que o tratamento com etanol não modifica a resposta de relaxamento induzida pelo CGRP. Como o receptor da AM e do CGRP é o mesmo, sendo a especificidade de ligação determinada pelas RAMPs, pode ser então que o tratamento com etanol esteja alterando a ligação das RAMPs ao receptor o que justificaria alteração da resposta à AM mas não ao CGRP.

A resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina em anéis de aorta não foi afetada pelo tratamento com etanol após o período de tratamento empregado nesse estudo. Esses resultados estão em acordo com os descritos por Sahna et al. (2000) e Tirapelli et al. (2008a) que também não observaram alteração na resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina em aorta de ratos tratados com etanol. Por outro lado, foi descrito anteriormente que em animais tratados com etanol, ocorreu aumento da resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina em aorta de ratos (Hatake et al., 1994). É importante notar que a grande variabilidade de respostas observada nos diferentes estudos com músculo liso vascular pode estar relacionada à dose e/ou duração do tratamento com etanol ou ainda aos diferentes protocolos experimentais utilizados (Sahna et al., 2000; Utkan et al., 2001).

O NPS, um doador de NO, também não teve sua resposta alterada pelo tratamento. Essa observação está em acordo com resultados prévios da literatura (Tirapelli et al., 2008a) e sugere que o tratamento com etanol não afeta a via de sinalização do NO no músculo liso vascular. Portanto os resultados mostram que o tratamento com etanol induziu alterações específicas no sistema AM.

Como mencionado anteriormente o NO é importante mediador da ação da AM. Portanto, alterações em suas concentrações poderiam ser a causa da diminuição na resposta da AM. Uma forma de mensurar alterações nas concentrações de NO é através da dosagem de nitrato e nitrito que são produtos do metabolismo do NO (Lauer et al., 2001). Nossos resultados mostram que não houve diferença significativa nas concentrações de nitrato e nitrito entre o grupo controle e etanol. Resultados semelhantes foram

encontrados por Lizarte et al. (2009) em músculo cavernoso de rato após tratamento com etanol 20% durante 4 semanas. No entanto é importante salientar que os níveis de nitrato e nitrito descritos aqui representam os níveis basais de NO e não o NO gerado em resposta a AM.

A família das metaloproteinases MMP inclui mais de 20 membros que tem estrutura semelhante, mas difere na especificidade por substrato e origem celular. Uma característica comum dessas enzimas é sua habilidade para degradar componentes da matrix extracelular, sendo essa ação importante em condições fisiológicas e patofisiológicas (Brinckerhoff & Matrisian, 2002). Partridge et al. (1999) observaram que o consumo crônico de etanol ativa a MMP-2 e alguns anos depois Martínez et al. (2004) mostraram que esta enzima era capaz de degradar a AM em fragmentos que tinham uma ação vasorelaxante menor que a AM e um fragmento com ação vasoconstritora. Com base nesses estudos nós investigamos se o tratamento com etanol estaria alterando as concentrações de MMP-2 nas aortas o que poderia justificar a diminuição no relaxamento provocado pela AM no grupo etanol. Os dados mostraram não haver diferença nas concentrações vasculares de MMP-2 entre o grupo etanol e seu respectivo controle. No entanto, é importante ressaltar que nossos resultados não descartam a participação da MMP-2 na diminuição da resposta da AM, uma vez que pode estar ocorrendo um aumento na atividade da MMP-2 sem alterar suas concentrações vasculares.

Furchgott & Zawadzki (1980) mostraram a obrigatoriedade da participação das células endoteliais da aorta isolada de coelho no relaxamento induzido pela acetilcolina, evidenciando que este efeito era mediado por uma substância que foi denominada de fator de relaxamento derivado do endotélio.

Posteriormente Palmer et al., (1987) identificaram este fator como sendo o NO. Além do NO, o endotélio libera outras substâncias vasodilatadoras que participam do controle do tônus vascular como a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF; endothelium derived hyperpolarizing factor) (Momboli & Vanhoutte, 1999). Portanto, o endotélio participa da regulação do tônus arterial, produzindo e liberando seletivamente seus mediadores em resposta a estímulos físicos ou humorais.

Uma vez que a geração de substâncias por parte dos tecidos estudados influencia os efeitos promovidos pelos agonistas farmacológicos (Kenakin, 1997), é possível sugerir que o tratamento com etanol promoveu alteração na liberação, síntese, disponibilidade ou ação dos fatores endoteliais envolvidos no relaxamento provocado pela AM o que levou a uma redução do relaxamento nos anéis de aorta de animais do grupo etanol. Portanto, os experimentos para estudar se o etanol estaria alterando a cascata de sinalização do referido peptídeo foram realizados apenas em aortas com endotélio, sendo que para isso foi escolhido, com base na literatura (Gout et al., 1999), a concentração de 10^{-8} mol/L para o estudo. Os resultados encontrados com a concentração de 10^{-8} mol/L foram semelhantes ao do referido trabalho sendo que também na administração pontual da AM o grupo etanol apresentou redução na resposta à AM corroborando os resultados encontrados na curva concentração-resposta.

O principal fator derivado do endotélio responsável pela ação da AM é o NO (Nishimatsu et al., 2001). Doenças que induzem alterações no sistema cardiovascular influenciam o processo de relaxamento induzido pela AM. Nesse sentido, Takenouchi et al. (2008) mostraram que em ratos diabéticos o relaxamento da AM em anéis de aorta foi reduzido e que essa resposta ocorreu

devido a alterações no sistema de produção do NO. Portanto, a via do NO foi inicialmente estudada no presente trabalho. O inibidor não seletivo da enzima NOS, L-NAME, reduziu significativamente o relaxamento mediado pela AM em anéis de aorta do grupo controle. Estes resultados estão de acordo com os da literatura que mostraram que inibidores não seletivos da NOS reduzem a resposta de relaxamento induzida pela AM (Yoshimoto et al., 1998; Cao et al., 2003). O L-NAME também reduziu a resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta de animais do grupo etanol, sugerindo que o tratamento com etanol não alterou a produção/liberação do NO endotelial induzida pela AM. Também investigamos qual a isoforma da NOS era responsável pela produção do NO em resposta à AM. Para isso foram realizados experimentos com o 7-nitroimidazol (inibidor seletivo da nNOS) e 1400W (inibidor seletivo da iNOS). O 7-nitroimidazol não alterou a resposta de relaxamento da AM em anéis de aorta de animais do grupo controle ou etanol. Resultados semelhantes foram observados com o 1400W. Esses resultados sugerem que o NO responsável pelo relaxamento da AM é proveniente da eNOS. A formação de NO leva a um aumento dos níveis de GMPc pela ativação da enzima guanilato ciclase (Fujitani et al., 1993). No presente estudo, o inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel, ODQ (Garthwaite et al., 1995) reduziu o relaxamento induzido pela AM confirmando o envolvimento da via NO-GMPc no relaxamento mediado por este peptídeo. Além disso, observou-se, que o tratamento com etanol não provocou alterações na via de sinalização NO-GMPc uma vez que o ODQ reduziu o relaxamento induzido pela AM em anéis de aorta de animais do grupo controle e etanol.

É importante notar que o relaxamento induzido pela AM não é exclusivamente mediado pelo NO. Observou-se em coronária de humanos (Terata et al., 2000) e na artéria ciliar de suínos (Dettmann et al., 2003), que além do NO, os canais para K^+ também participam da vasodilatação induzida pela AM. Por outro lado, Ishizaka et al. (1994) e Okamura et al. (1997) sugeriram que a vasodilatação mediada pela AM é um processo independente do endotélio e que envolve a participação do AMPc e da proteína quinase A no músculo liso vascular. No entanto, é importante ressaltar que os resultados do presente estudo indicam uma redução da resposta de relaxamento induzida pela AM após tratamento com etanol. Com base nesses resultados, foram realizados experimentos para verificar se o relaxamento mediado pela AM envolveria a produção de substâncias vasodilatadoras provenientes da ação da enzima ciclooxygenase (Alfranca et al., 2006). A indometacina, um inibidor não seletivo da enzima ciclooxygenase, não alterou o relaxamento induzido pela AM em anéis de aorta do grupo controle. Resultados semelhantes foram observados por Yoshimoto et al., (1998). Como foi mostrado por Tirapelli et al. (2006a), o tratamento com etanol aumenta a contração induzida pela fenilefrina devido ao aumento na produção de substâncias vasoconstritoras provenientes da ação da enzima ciclooxygenase. Portanto, o aumento das referidas substâncias poderia ser considerado como a causa na diminuição do relaxamento à AM, pois poderiam estar contrapondo o efeito relaxante desse peptídeo. No entanto, isso não foi confirmado, pois os resultados mostraram não haver diferença no relaxamento da AM no grupo etanol na ausência e presença da indometacina.

Terata et al., (2000) estudando artéria ciliar de suínos mostraram o envolvimento dos canais para K^+ na resposta de relaxamento mediada pela AM. O tetraetilamônio (TEA), um inibidor não seletivo dos canais para K^+ , reduziu a resposta de relaxamento induzida pela AM em anéis de aorta de animais do grupo controle e etanol, sugerindo que a abertura de canais para K^+ participa do relaxamento induzida pela AM, mas não foi alterada pelo tratamento com etanol.

Relatos da literatura apontam resultados contraditórios quanto ao receptor envolvido no relaxamento vascular induzido pela AM, sendo a resposta ao peptídeo dependente do leito vascular e espécie estudada. Por exemplo, na artéria da retina de bovinos o relaxamento induzido pela AM é inibido pelo, AM_{22-52} e $CGRP_{8-37}$, antagonistas dos receptores para a AM e CGRP, respectivamente (Boussery et al., 2005). Por outro lado, o relaxamento induzido pela AM foi inibido pelo $CGRP_{8-37}$ mas não pelo AM_{22-52} na artéria ciliar de suínos (Dettmann et al., 2003), artéria coronária de humanos (Hasbak et al., 2003) e aorta de camundongos (Ashton et al., 2000).

Em aortas de ratos os resultados da literatura tem mostrado que a AM age apenas via seu próprio receptor pois sua resposta foi bloqueada pelo AM_{22-52} mas não pelo $CGRP_{8-37}$ (Yoshimoto et al., 1998., Cao et al., 2003). Nossos resultados mostraram que o $CGRP_{8-37}$, inibidor do receptor do CGRP não alterou o relaxamento mediado pela AM, tanto no grupo controle como no grupo etanol. Por outro lado o AM_{22-52} , inibidor do receptor de AM inibiu o relaxamento mediado pela AM, apenas no grupo controle não apresentando efeito de inibição no grupo etanol. Nossos dados corroboram os estudos de Yoshimoto et al. 1998 e Cao et al. 2003 onde o relaxamento induzido pela AM

em aorta de rato foi inibido pelo AM₂₂₋₅₂. Além disso, observamos que o tratamento com etanol interferiu na ação do antagonista do receptor da AM. Essa alteração na ação do antagonista pode ser decorrente de diferentes fatores, tais como alterações: na afinidade do antagonista pelo receptor, no acesso da droga ao receptor (solubilidade do antagonista, condições iônicas do líquido nutriente e pH) e na densidade dos receptores (Kenakin, 1997). Esse último fator tem grande relevância em estudos que investigam os efeitos cardiovasculares do etanol, pois vários estudos da literatura mostram que o consumo crônico de etanol afeta a expressão de diferentes receptores (Tirapelli et al., 2006b; Tirapelli et al., 2008b) e enzimas (Tirapelli et al., 2008a, Tirapelli et al., 2008c, Lizarte et al., 2009) no sistema cardiovascular. Além disso, o consumo do etanol também altera os componentes do sistema AM vascular. Nesse sentido, Wang et al. (1999) e Tomikawa et al. (1999) mostraram que a expressão da AM e seu receptor no estômago é alterada pelo tratamento agudo com etanol. No presente estudo, avaliou-se a possibilidade de que o tratamento crônico com etanol alteraria a expressão da AM, do CRLR, das RAMPs (proteínas que modificam a atividade do receptor) e também da enzima eNOS na aorta. Os dados mostraram um aumento nos níveis de RNAm da pré-pró-AM e da RAMP1, cuja co-expressão com o CRLR origina o receptor para o CGRP (McLatchie et al., 1998). No entanto, não houve alteração nos níveis de RNAm para RAMP2 e RAMP3 que, quando co-expressas com o CRLR, originam o receptor para AM (McLatchie et al., 1998). A redução na resposta de relaxamento da AM em anéis de aorta com endotélio do grupo etanol pode ter ocorrido por uma diminuição na expressão de receptores ou das RAMPs. Apesar de os experimentos de RQ-PCR não mostraram isso, essa hipótese

não pode ser descartada, pois o etanol poderia estar afetando a expressão da proteína como foi observado em outros estudos (Tirapelli et al., 2008b, Tirapelli et al., 2006b).

Estudos têm revelado aumento nos níveis circulantes de AM em doenças cardiovasculares tais como hipertensão e choque (Richards et al., 1996; Wang et al., 1995). Tirapelli et al. (2007) mostraram que o tratamento com etanol provocou aumento na pressão arterial dos animais quando estes foram comparados ao seu respectivo grupo controle. Esse conjunto de dados levantam a hipótese que o aumento nos níveis de RNAm da pré-pró AM não seja um efeito direto do etanol mas sim consequência dos danos causados por ele no sistema cardiovascular.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Os resultados evidenciam que o consumo crônico de etanol reduz a resposta de relaxamento induzida pela AM em aorta de ratos e aumenta os níveis de RNAm da pré-pró-AM e da RAMP 1. Esses resultados confirmam a hipótese do projeto inicial de que o consumo crônico de etanol afeta o sistema AM vascular.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- Abou-Agag LH, Khoo NK, Binsack R, White CR, Darley-Usmar V, Grenett HE, Booyse FM, Digerness SB, Zhou F, Parks DA. Evidence of cardiovascular protection by moderate alcohol: role of nitric oxide. *Free. Radic. Biol. Med.* 39:540-548, 2005.
- Aguiar AS, Da-Silva VA, Boaventura GT. Can calories from ethanol contribute to body weight preservation by malnourished rats? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34:841-846, 2004.
- Alfranica A, Iñiguez MA, Fresno M, Redondo JM. Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: Role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* 70:446-456, 2006.
- Asada Y, Hara S, Marutsuka K, Kitamura K, Tsuji T, Sakata J, Sato Y, Kisanuki A, Eto T, Sumiyoshi A. Novel distribution of adrenomedullin-immunoreactive cells in human tissues. *Histochem. Cell. Biol.* 112:185-191, 1999.
- Ashton D, Hieble P, Gou B, Aiyar N. Vasodilatory effect of adrenomedullin in mouse aorta. *Pharmacology* 61:101-105, 2000.
- Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ. Res.* 75:539-545, 1994.
- Boussery K, Delaey C, Voorde J. The vasorelaxing influence of adrenomedullin in isolated bovine retinal arteries. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19(3):401, 2005.
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of frog that became a price. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3:207-214, 2002.
- Cao YN, Kitamura K, Ito K, Kato J, Hashida S, Morishita K, Eto T. Glicine-extended adrenomedullin exerts vasodilatador effect through amidation in the rat aorta. *Peptides* 113:109-114, 2003.
- Castro MM, Rizi E, Rodrigues GJ, Ceron CS, Bendhack LM, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. *Free. Radic. Biol. Med.* 46:1298-1307, 2009.
- Chan TC & Sutter MC. Ethanol consumption and blood pressure. *Life. Sci.* 33:1965-1973, 1983.

- Chan TC, Wall RA, Sutter MC. Chronic ethanol consumption, stress and hypertension. *Hypertension* 7: 519-524, 1985.
- Chun TH, Itoh H, Saito T, Yamahara K, Doi k, Mori Y, Ogawa Y, Yamashita J, Tanaka T, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Fukunaga Y, Nakao K. Oxidative stress augments secretion of endothelium-derived relaxing peptides, C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *J. Hypertens.* 18:575-580, 2000.
- Criqui M.H, Wallace RB, Mishkel M, Connor EB, Heiss G. Alcohol consumption and blood pressure. *Hypertension* 3: 557-565, 1981.
- De Lima, J.M.B. Da necessidade de uma nova abordagem – Parte II. *Rev. Bras. Neurol.* 33: 171-172, 1997.
- Dettmann ES, Vysniauskiene I, Wu R, Flammer J, Haefliger IO. Adrenomedullin-induced endothelium-dependent relaxation in porcine ciliary arteries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:3961-3966, 2003.
- Feng CJ, Kang B, Kaye AD, Kadowitz PJ, Nossaman BD. L-NAME modulates responses to adrenomedullin in the hindquarters vascular bed of the rat. *Life. Sci.* 55:433-438, 1994.
- Fujitani Y, Ueda H, Okada T, Urade Y, Karaki H. A selective agonist of endothelin type B receptor, IRL1620, stimulates cyclic GMP increase via nitric oxide formation in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267:683-689, 1993.
- Fukai N, Shichiri M, Ozawa N, Matsushita M, Hirata Y. Coexpression of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying protein 2 or 3 mediates the antimigratory effect of adrenomedullin. *Endocrinology* 144:447-453, 2003.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature. Lond.* 288:373-376, 1980.
- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K. & MAYER B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.* 48:184-188, 1995.

- Godin D, Ivan E, Johnson C, Magid R, Galis ZS. Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model. *Circ. Res.* 102:2861-2866, 2000.
- Gout B, Quiniou M-J, Khandoudi N, Le Dantec C, Saiag B. Impaired endothelium-dependent relaxation by adrenomedullin in monocrotaline-treated rat arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 380:23-30, 1999.
- Hasbak P, Opgaard OS, Eskesen K, Schifter S, Arendrup H, Longmore J, Edvinsson L. Investigation of CGRP receptors and peptide pharmacology in human coronary arteries. Characterization with nonpeptide antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304:326-333, 2003.
- Hatake K, Wakabayashi I, Taniguchi T, Hishida S. Increased endothelium-dependent vascular relaxation in ethanol-fed rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18(4):1018-1023, 1994.
- Hatton DC, Bukoski RD, Edgar S, Mccarron DA. Chronic alcohol consumption lowers blood pressure but enhances vascular contractility in Wistar rats. *J. Hypertens.* 10: 529-537, 1992.
- Hernandez-Hernandez R, Armas-Padilla M.C, Armas-Hernandez M.J, Velasco M. The prevalence of hypertension and the state of cardiovascular health in Venezuela and surrounding nations. *Ethn. Dis.* 4(3): 398-405, 1998.
- Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki Y, Suzuki E, Ikenouchi H, Kohmoto O, Kimura K, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Masuo H, Omata M. Mechanisms of adrenomedullin-induced vasodilation in the rat kidney. *Hypertension.* 25:790-795, 1995.
- Husain K, Vazquez-Ortiz M, Ansari RA, Malafa MP, Lalla J. Chronic alcohol-induced oxidative endothelial injury relates to angiotensin II levels in the rat. *Mol. Cell. Biochem.* 307:51-58, 2008.
- Ibsen, H, Christentesen NJ, Rasmussen S, Hollnagel H, Nielsen MD, Giese J. Effects of high alcohol intake on blood pressure, adrenergic activity, and the renin-angiotensin system. *Scan. J. Clin. Lab. Inv. suppl.* 174-176:87-91, 1985.
- Ishiyama Y, Kitamura K, Ichiki Y, Nakamura S, Kida O, Kangawa K, Eto T. Hemodynamic effects of a novel hypotensive peptide, human adrenomedullin in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 241:271-273, 1993.

- Ishizaka Y, Ishizaka Y, Tanaka M, Kitamura K, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin stimulates cyclic AMP formation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200:642-646, 1994.
- Kahomen M, Karjala K, Hutri-Kahomen N, Wu X, Jaatinen P, Riihioja P, Hervonen A, Porsti I. Influence of chronic ethanol consumption on arterial tone in young and aged rats. *Am. J. Physiol.* 276:H464-H471, 1999.
- Kamitani S, Asakawa M, Shimekake Y, Kuwasako K, Nakahara K, Sakata T. The RAMP2/CRLR complex is a functional adrenomedullin receptor in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *FEBS. Lett.* 448:111-114, 1999.
- Kaneko H, Mitsuma T, Nagai H, Mori S, Iyo T, Kusugami K, Tache Y. Central action of adrenomedullin to prevent ethanol-induced gastric injury through vagal pathways in rats. *Am. J. Physiol. Regulatory. Integrative. Comp. Physiol.* 274:1783-1788, 1998.
- Kenakin TP. *Molecular Pharmacology: a short course.* Cambridge, Blackwell Science, 1997 cap. 5:92-113. Concentration of drugs in tissue.
- Kleinhenz DJ, Sutliff RL, Polikandriotis JA, Walp ER, Dikalov SI, Guidot DM, Hart CM. Chronic ethanol ingestion increases aortic endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in the rat. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32(1):148-154, 2008.
- Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolate from human pheochromocytoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192:553-560, 1993.
- Kitamura K, Kato J, Kawamoto M, Tanaka M, Chino N, Kangawa K, Eto T. The intermediate form of glycine-extended adrenomedullin is the major circulating molecular form in human plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:551-555, 1998.
- Ladipo CO, Adigum SA, Nwaigwe CI, Adegunloye BJ. Chronic ethanol consumption alters vascular smooth muscle responses in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29:707-709, 2002.

- Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* 98:12814-12819, 2001.
- Li J, Ren Y, Dong X, Zhong G, Wu S, Tang C. Roles of different peptide fragments derived from proadrenomedullin in the regulation of vascular tone in the isolated aorta. *Peptides* 24:563-568, 2003.
- Lieber CS. Perspective: do alcohol calories count? *Am. J. clin. Nutr.* 54:976-982, 1991.
- Lizarte FS, Claudino MA, Tirapelli CR, Morgueti M, Tirapelli DPC, Batalhão ME, Carnio EC, Queiroz RH, Evora PRB, Tucci S, Cologna A, Antunes E, Martins ACP, Tirapelli LF. Chronic ethanol consumption induces cavernosal smooth muscle dysfunction in rats. *Urology.* 74(6):1250-1256, 2009.
- Marmot MG. Alcohol and coronary heart disease. *Int. J. Epidemiol.* 30:724-729, 2001.
- Martinez A, Oh HR, Unsworth EJ, Bregonzio C, Saavedra JM, Stetler-Stevenson WG, Cuttitta F. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem. J.* 383:413-418, 2004.
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature.* 393:333-339, 1998.
- Miura K, Ebara T, Okumura M, Matsuura T, Kim S, Yukimura T, Iwao H. Attenuation of adrenomedullin-induced renal vasodilation by NG-nitro L-arginine but not glibenclamide. *Br. J. Pharmacol.* 115:917-924, 1995.
- Miyashita K, Itoh H, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Yurugi-Kobayashi T, Park K, Nakao K. Adrenomedullin provokes endothelial Akt activation and promotes vascular regeneration both in vitro and vivo. *FEBS. Lett.* 544:86-92, 2003.
- Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31: 61-74, 1999.
- Nagase H, Woessner JJ. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274:21491-21494, 1999.

- Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Shirato K, Shibahara S. Induction of adrenomedullin by hypoxia in cultured human coronary artery endothelial cells. *Peptides*. 20:769-772, 1999.
- Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc. Res.* 69:614-624, 2006.
- Nishimatsu H, Suzuki E, Nagata D, Moriyama N, Satonaka H, Walsh K, Sata M, Kangawa K, Matsuo H, Goto A, Kitamura T, Hirata Y. Adrenomedullin induces endothelium-dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/akt-dependent pathway in rat aorta. *Circ. Res.* 89:63-70, 2001.
- Okamura T, Ayajiki K, Kangawa K, Toda N. Mechanism of adrenomedullin-induced relaxation in isolated canine retinal arteries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38(1):56-61, 1997.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327:524-526, 1987.
- Partridge CR, Sampson HW, Forough R. Long-term alcohol consumption increases matrix metalloproteinase-2 activity in rat aorta. *Lif. Sci.* 65(13):1395-1402, 1999.
- Pinardi G, Brieva C, Vinet R, Penna M. Effects of chronic ethanol consumption on α -adrenergic-induced contractions in rat thoracic aorta. *Gen. Pharmacol.* 23(2):245-248, 1992.
- Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM. International union of pharmacology XXXII The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol. Rev.* 54:233-246, 2002.
- Puddey IB, Beilin LJ. Alcohol is bad for blood pressure. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33:847-852, 2006.
- Resstel LBM, Tirapelli CR, Lanchote VL, Uyemura SA, de Oliveira AM, Corrêa FMA. Chronic ethanol consumption alters cardiovascular function in conscious rats. *Life. Sci.* 78(19): 2179-2187, 2006.
- Reynolds K, Lewis LB, Nolen JD, Kinney GL, Sathya B, He J. Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *JAMA*. 289:579-588, 2003.

- Richards AM, Nicolls MG, Lewis L, Lainchbury JG. Adrenomedullin. *Clin. Sci.* 91:3-16, 1996.
- Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New Engl. J. Med.* 340:115-126, 1999.
- Sahna E, Kurcer Z, Ozturk F, Cengiz N, Vardi N, Birincioglu M, Olmez E. Effects of chronic ethanol consumption on α -adrenergic-induced contractions and endothelium-dependent relaxations in rat thoracic aorta. *Pharmacol. Res.* 41(6): 2000.
- Strickland J.A. & Wooles W.R. Effect of acute and chronic ethanol on the agonist responses of vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 152:83-91, 1988.
- Sugo S, Minamino N, Kangawa K, Miyamoto K, Kitamura K, Sakata J, Eto T, Matsuo H. Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201:1160-1166, 1994.
- Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T, Matsuo H. Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207:25-32, 1995.
- Takenouchi Y, Kobayashi T, Matsumoto T, Kamata K. Possible involvement of akt activity in endothelial dysfunction in type 2 diabetic mice. *J. Pharmacol. Sci.* 106:600-608, 2008.
- Terata K, Miura H, Liu Y, Loberiza F, Gutterman DD. Human coronary arteriolar dilatation to adrenomedullin: role of nitric oxide and K^+ channels. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 279:H2620-H2626, 2000.
- Tirapelli CR, Al-Khoury J, Bkaily G, D'Orléans-Juste P, Lanchote VL, Uyemura SA, de Oliveira AM. Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta. *J. Exp. Pharmacol. Ther.* 316(1): 233-241, 2006a.
- Tirapelli CR, Casolari DA, Yogi A, Montezano AC, Tostes RC, Legros E, D'Orleans-Juste P, Lanchote VL, Uyemura SA, de Oliveira AM. Chronic ethanol consumption enhances endothelin-1-induced contraction in the isolated rat carotid. *J. Exp. Pharmacol. Ther.* 318(2): 819-827, 2006b.
- Tirapelli CR, Leone A, Coelho EB, Resstel LB, Correa FMA, Lanchote V, Uyemura S, Padovan CM, De Oliveira AM. Effect of ethanol consumption

- on blood pressure and rat mesenteric arterial bed, aorta and carotid responsiveness. *J. Pharm. Pharmacol.* 59(7): 985-993, 2007.
- Tirapelli CR, Fukada SY, Yogi A, Chignalia AZ, Tostes RC, Bonaventura D, Lanchote VL, Cunha FQ, De Oliveira AM. Gender-specific vascular effects elicited by chronic ethanol consumption in rats: a role for inducible nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.* 153: 468-479, 2008a.
- Tirapelli CR, Legros E, Brochu I, Honoré JC, Lanchote VL, Uyemura SA, de Oliveira AM, D'Orleans-Juste P. Chronic ethanol intake modulates vascular levels of endothelin-1 receptor and enhances the pressor response to endothelin-1 in anaesthetized rats. *Br. J. Pharmacol.* 154:971-981, 2008b.
- Tirapelli CR, Leone AF, Yogi A, Tostes RC, Lanchote VL, Uyemura SA, Resstel LB, Corrêa FM, Padovan CM, de Oliveira AM, Coelho EB. Ethanol consumption increases blood pressure and alters the responsiveness of the mesenteric vasculature in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 60 (3): 331-341, 2008c.
- Tomikawa M, Wang H, Jones MK, Sugimachi K, Sarfeh J, Tamawski AS. Reduced adrenomedullin expression in gastric mucosa of portal hypertensive rats after ethanol induced injury. *Ann. Surg.* 230(1):38-44, 1999.
- Utkan T, Yildiz F, Ilbay G, Ozdemirci S, Erden BF, Gacar N, Ulak G. Blood pressure and vascular reactivity to endothelin-1, phenylephrine, serotonin KCl and acetylcholine following chronic alcohol consumption in vitro. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 15:157-165, 2001.
- Wang H, Tomikawa M, Jones MK, Sarfeh IJ, Tarnawski AS. Ethanol injury triggers activation of adrenomedullin and its receptor genes in gastric mucosa. *Dig. Dis. Sci.* 44(7):1390-1400, 1999.
- Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Clark RK, Willete RN, Sulpizio AC, Aiyar NV, Ruffolo RR Jr, Feuerstein GZ. Discovery of adrenomedullin in rat ischemic cortex and evidence for its role in exacerbating focal brain ischemic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:11480-11484, 1995.
- Wisskirchen FM, Gray DW, Marshall I. Receptors mediating CGRP-induced relaxation in the rat isolated thoracic aorta and porcine isolated coronary artery differentiated by α CGRP₈₋₃₇. *Br. J. Pharmacol.* 128:283-292, 1999.

World Health Organization. Preventing chronic disease a vital investment. WHO Geneva, 2005.

Yoshimoto T, Fukai N, Sato R, Sugiyama T, Ozawa N, Shichiri M, Hirata Y. Antioxidant effect of adrenomedullin on angiotensin Π -induced reactive oxygen species generation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*. 145:3331-3337, 2004.

Yoshimoto R, Mitsui-Saito M, Ozaki H, Karaki H. Effects of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide on contractions of the rat aorta and porcine coronary artery. *Brit. J. Pharmacol*. 123:1645-1654, 1998.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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