



JAMAIRA APARECIDA VICTORIO

**EFEITOS VASCULARES DA HIPERATIVAÇÃO
 β -ADRENÉRGICA ASSOCIADOS À ATIVAÇÃO DO SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA**

CAMPINAS

2014

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia



JAMAIRA APARECIDA VICTORIO

EFEITOS VASCULARES DA HIPERATIVAÇÃO
 β -ADRENÉRGICA ASSOCIADOS À ATIVAÇÃO DO SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: ANA PAULA COUTO DAVEL

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna JAMAIRA APARECIDA VICTORIO e orientada pela PROFA. DRA. ANA PAULA COUTO DAVEL

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ana Paula Couto Davel", written over a horizontal line.

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

V666e Victório, Jasmaira Aparecida, 1967-
Efeitos vasculares da hiperativação β -adrenérgica
associados à ativação do sistema-renina-angiotensina-
aldosterona / Jasmaira Aparecida Victório. – Campinas,
SP: [s.n.], 2014.

Orientador: Ana Paula Couto Davel.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Isoproterenol. 2. Aorta. 3. Aldosterona. 4.
Espironolactona. 5. Endotélio. I. Davel, Ana Paula, 1979-
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Involvement of renin-angiotensin-aldosterone system activation on the vascular effects of β -adrenoceptor hyperactivation

Palavras-chave em inglês:

Isoproterenol

Aorta

Aldosterone

Spirolactone

Endothelium

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Ana Paula Couto Davel [Orientador]

Luciana Venturini Rossoni

Helena Coutinho Franco de Oliveira

Data de defesa: 03-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 03 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel (orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni



Assinatura

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira



Assinatura

Profa. Dra. Marta Helena Krieger



Assinatura

Profa. Dra. Angelina Zanesco



Assinatura

RESUMO

A hiperativação dos receptores β -adrenérgicos (β -AR) tem importante papel na patogênese de doenças cardiovasculares que cursam com hiperatividade simpática. Dentre os seus efeitos, sugere-se a indução da síntese e liberação de angiotensina II e de aldosterona sistemicamente. A hiperativação dos receptores β -AR pode ser mimetizada pelo tratamento crônico com isoproterenol (ISO). Já foi demonstrado que o antagonismo do receptor AT_1 de angiotensina II ou do receptor de mineralocorticoides (MR) previne parcialmente o remodelamento cardíaco induzido pelo ISO. Entretanto, ainda não está elucidado o envolvimento da angiotensina II e da aldosterona nos efeitos vasculares causados pela hiperativação dos receptores β -AR. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar as vias de sinalização dos receptores AT_1 e MR nas alterações vasculares causadas pelo tratamento por 7 dias com ISO em aorta de ratos, assim como os mecanismos envolvidos. Ratos Wistar (3 meses) foram tratados com ISO (0,3 mg/kg/dia, s.c.) ou veículo (CT) e co-tratados ou não com o antagonista do receptor AT_1 losartan (LOS; 40 mg/kg/dia) ou com o antagonista do receptor MR espironolactona (ESP; 200 mg/kg/dia). O tratamento com ISO causou hipertrofia ventricular sem alterações hemodinâmicas, e o co-tratamento com LOS ou ESP atenuaram o remodelamento ventricular observado. Na aorta do grupo ISO observou-se um aumento da resposta máxima à fenilefrina associado à redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e aumento de ânion superóxido, os quais foram prevenidos pelo co-tratamento com ESP, mas não com LOS. O efeito preventivo da ESP sobre a reatividade vascular da aorta dos ratos ISO foi acompanhado de aumento da expressão proteica da HSP90, a qual foi reduzida no grupo ISO. Além disso, a ESP preveniu o aumento da expressão proteica de β -arrestina, $G\alpha_i$, p-Src, ERK1/2, p-ERK1/2 e gênica de osteopontina na aorta deste grupo. As concentrações plasmáticas de corticosterona ou aldosterona não foram alteradas entre os grupos avaliados. Em conjunto, os dados sugerem que o antagonismo do receptor MR com o uso de espironolactona previne o aumento da resposta contrátil à fenilefrina observada em aorta de ratos tratados com ISO, associado a: aumento da biodisponibilidade de NO e redução do estresse oxidativo; aumento da expressão de HSP90, a qual estabiliza a forma dimérica da eNOS; e prevenção do aumento da expressão proteica de β -arrestina, $G\alpha_{i1,2}$, p-Src, ERK1/2 e p-ERK1/2 e gênica de osteopontina, vias de sinalização de estresse oxidativo e prejuízo da função endotelial.

Palavras-chave: isoproterenol, aorta, aldosterona, espironolactona, endotélio.

ABSTRACT

β -adrenergic (β -AR) receptors overstimulation plays an important role in the pathogenesis of cardiovascular diseases concurrent with sympathetic overactivity. It has been suggested to increase plasma levels of angiotensin II and aldosterone. In line with this, angiotensin II/AT₁ receptor or mineralocorticoid (MR) receptor antagonism partially prevents the cardiac remodeling induced by β -AR overstimulation mediated by isoproterenol (ISO) administration. However the implication of angiotensin II or aldosterone on vascular effects provoked by β -AR overstimulation is not yet elucidated. So, the aim of the present study was to investigate the AT₁ and MR receptor signaling pathway on vascular alterations caused by 7-day ISO treatment on rat aorta, as well as the mechanisms involved. For this, male Wistar rats (3-month-old) were treated with ISO (0.3 mg/kg/day, *s.c.*) or vehicle (CT) and co-treated or not with AT₁ antagonist losartan (LOS; 40 mg/kg/day, *v.o.*) or MR receptor antagonist spironolactone (ESP; 200 mg/kg/day, *v.o.*). The ISO treatment resulted in ventricular hypertrophy without hemodynamic alterations, and LOS or ESP co-treatment attenuated the ventricular remodeling of ISO group. ISO aorta showed an increased phenylephrine maximum response associated with a decreased nitric oxide (NO) bioavailability and an increased in superoxide anion; both effects were prevented by ESP co-treatment, but not by LOS. Beneficial effects of ESP on vascular reactivity of aorta from ISO-treated rats were accompanied by an increased HSP90 protein expression, which was reduced in ISO group. Moreover, ESP prevented the increased protein expression of β -arrestin, $G\alpha_i$, p-Src, ERK1/2 and p-ERK1/2 and osteopontin gene expression in the aorta from ISO group. Plasma corticosterone and aldosterone were not changed between the groups. In conclusion, our results suggest that spironolactone, an MR receptor antagonist prevented the increased phenylephrine contractile response in aorta from ISO-treated rats, associated with increased NO bioavailability and decreased oxidative stress; increased expression of HSP90 and; prevented the increase of β -arrestin, $G\alpha_{i1,2}$, p-Src, ERK1/2 and p-ERK1/2 and osteopontin induced by β -adrenergic overstimulation. These results suggest that the vascular effects induced by ISO in aorta are mediated by a MR activation.

Key words: isoproterenol, aorta, aldosterona, spironolactone, endothelium.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Receptores β -AR no sistema cardiovascular: Ativação aguda e crônica....	3
1.1.1.	Modelo de hiperativação dos receptores β -AR induzido por isoproterenol..	6
1.2.	Interação entre o receptor β -AR e o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....	8
1.2.1	Papel do SRAA na fisiopatologia do modelo de hiperativação dos receptores β -AR induzido por isoproterenol.....	11
2.	OBJETIVOS.....	15
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1.	Animais experimentais.....	16
3.2.	Massa corporal, medidas hemodinâmicas e índice de hipertrofia ventricular.....	17
3.3.	Obtenção das amostras de plasma e de tecido da aorta.....	18
3.4.	Reatividade vascular em anéis de aorta.....	18
3.4.1.	Protocolos experimentais.....	19
3.5.	Avaliação da produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio em aorta.....	20
3.6.	Avaliação da expressão de proteínas em aorta.....	21
3.6.1.	Obtenção do extrato proteico total.....	21
3.6.2.	Eletroforese, transferência e detecção de proteínas.....	21
3.7.	Detecção da expressão gênica pelo método de RT-PCR.....	24
3.8.	Medida plasmática de aldosterona e corticosterona.....	25
3.9.	Drogas.....	26

3.10.	Expressão dos dados e análise estatística.....	26
4.	RESULTADOS.....	29
4.1.	Massa corporal, hemodinâmica arterial e índice de hipertrofia ventricular..	29
4.2.	Ensaio de reatividade vascular de aorta.....	31
4.3.	Avaliação da produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio em aorta.....	38
4.4.	Expressão gênica e proteica em aorta.....	41
4.5.	Medida plasmática de aldosterona e corticosterona.....	46
5.	DISCUSSÃO.....	47
6.	CONCLUSÃO.....	62
7.	BIBLIOGRAFIA.....	63
8.	ANEXO.....	75
8.1.	Anexo A: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	75

Dedico este trabalho à minha família, amigos
e a minha orientadora Ana Paula.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a todos aqueles que me apoiaram quando decidi continuar com os meus estudos, buscando amadurecimento científico e pessoal, fazendo o que me faz feliz, e também àqueles que ao longo do meu caminho também me incentivaram.

Agradeço a Deus por toda a iluminação e bênçãos na minha vida.

A minha orientadora Profa Dra Ana Paula Davel, agradeço por todo o ensinamento e atenção dada durante esses anos. Sou muito grata a paciência, compreensão, confiança e amizade construída ao longo dos anos, que contribuíram e irão contribuir ainda mais para o meu conhecimento.

A minha família, em especial a minha mãe, Odete, pelas conversas, orações, conselhos e por principalmente acreditar em mim e possibilitar que meus sonhos se tornassem realidade. Ao meu pai, José Roque, por me ensinar que “a vida é uma escola, na qual o mestre é o tempo”. A minha amada irmã Charlene, por todos os conselhos, pelo ouvido amigo e as horas de papo enquanto pegava o ônibus de volta para casa depois de um dia de trabalho.

Agradeço em memória a minha querida tia, Maria José, e a minha mais amada vizinha, Rita, obrigada ao apoio e incentivo aos meus estudos e as orações, vocês são exemplos de mulher para minha vida e deixaram uma saudade imensa.

Ao meu tio, José Luiz Pirola, padrinho querido, por ter me acolhido em sua casa durante a minha trajetória, possibilitando também a realização desse sonho, me dando segurança e carinho. Dizem que o padrinho é o segundo pai, e ele tem sido mesmo.

Aos meus primos, Marina e Matheus, por todo carinho que me oferecem e por sempre alegrarem os meus dias.

Ao meu amor, Wagner, por todos os momentos de atenção e compreensão, conversas, risadas e principalmente por dar um sentido diferente a vida, com um gostinho a mais de alegria sem muitas preocupações.

Aos amigos do laboratório, especialmente ao Stefano, por sempre me ajudar diretamente na execução deste trabalho. As novas amigas Mirian sempre muito carinhosa e atenciosa, a Dani pela alegria contagiante e disposição, a Amanda Negreti

e a Mari pela amizade. A Carmem, ao Hygor, Amanda Sponton, Andressa e Clarissa, muito obrigada. E a todos amigos de corredor de laboratório que sempre em uma conversa ou outra nos auxiliam de certa forma, seja com um aprendizado, uma piada ou um elogio.

Aos amigos que já terminaram seus estudos, Aline e Rodrigo, pelo incentivo, conversas científicas e não científicas e ao aprendizado adquirido com vocês.

Aos amigos de longe, Ana Cláudia (Naná), Carol e André pelas conversas e amizade a qualquer hora do dia.

A Profa Dra Maria Andréia Delbin pelos ensinamentos de todo o dia e colaborações.

A Profa Dra Luciana Rossoni por colaborar com este trabalho permitindo aprendizado de novas técnicas em seu laboratório.

A Dra Gisele Couto, técnica do laboratório da Profa Luciana Rossoni, que me ensinou algumas técnicas que utilizei neste trabalho, pela hospedagem durante as idas à USP e amizade.

Aos professores da banca de qualificação, Profa Dra Helena Coutinho, Prof Dr Edson Antunes e Profa Dra Cristina Vicente, pela discussão e colaboração ao presente trabalho.

A Profa Dra Helena Coutinho pela supervisão na disciplina de Fisiologia Humana Geral, na qual participei do Programa de Estágio Docente – Pós-Graduação, PED em 2012.

A secretária da pós-graduação, Andréia, por todo auxílio e ajuda burocrática.

Aos técnicos do departamento, Letícia, Francini, Bil, Juvenal e Washington que cuidam dos nossos animais.

As faxineiras por manterem sempre limpo nosso ambiente de trabalho.

Aos animais que possibilitaram a realização desse trabalho.

Agradeço as agências de fomento FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro, as quais possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho e participação em eventos científicos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta.....	33
FIGURA 2	Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta incubados com o inibidor da óxido nítrico sintase, L-NAME (100 µM)....	36
FIGURA 3	Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta incubados com a superóxido dismutase, SOD (150 U/mL).....	37
FIGURA 4	Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) basal pela fluorescência da diaminofluoresceína (DAF, 8 µM).....	39
FIGURA 5	Avaliação da produção de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) pela fluorescência a dihidroetidina, DHE (2 µM) basal, na presença de +L-NAME e do mimético da SOD – MnTMPyP em cortes transversais de aorta.....	40
FIGURA 6	Expressão proteica da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) total e fosforiladas no resíduo serina 1177 (^{Ser1177} p-eNOS) e treonina 495 (^{Thr495} p-eNOS) e da chaperona HSP90 em aortas de ratos.....	42
FIGURA 7	Expressão proteica de Gα _{i1,2} , Gα _{i3} , Src total e fosforilada no resíduo de ativação (^{Tyr418} p-Src) em aortas de ratos.....	43
FIGURA 8	Expressão proteica da ERK1/2 total e fosforilada (^{Thr202/Tyr204} p-ERK1/2), do receptor MR e da β-arrestina em aorta de ratos	44
FIGURA 9	Expressão gênica da osteopontina em aortas de ratos.....	45
FIGURA 10	Valores plasmáticos de aldosterona e corticosterona de ratos.....	46
FIGURA 11	Esquema demonstrando os efeitos induzidos pela hiperativação dos receptores β-AR em aorta de ratos tratados por 7 dias com isoproterenol (ISO) e o efeito benéfico do co-tratamento com a espironolactona (ESP).....	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Pressão arterial, frequência cardíaca, massa corpórea e índice de hipertrofia ventricular.....	30
TABELA 2	Contração máxima induzida por KCl 75 mM, potência (-Log EC ₅₀) e resposta máxima (R _{máx}) de relaxamento, induzidos pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio, e de contração, induzida pela fenilefrina, em anéis de aorta.....	32
TABELA 3	Efeito das incubações com o inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME) e superóxido dismutase (SOD) na resposta contrátil à fenilefrina (E+) em anéis de aorta.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -AR: receptor β -adrenérgico

11 β HSD: 11 β hidroxiesteroide desidrogenase

AMPc: 3', 5' adenosina monofosfato cíclica

BH₄: Tetrahydrobiopterina

DAF-2: 4,5 diaminofluoresceína

DHE: dihidroetidina

ECA: enzima conversora da angiotensina

eNOS: óxido nítrico sintase isoforma endotelial

EROs: Espécies reativas do oxigênio

ERK 1/2: Kinase regulada por sinalização extracelular

ESP: espironolactona

GPCR: receptor acoplado a proteína G

GRK-2: proteína kinase de receptores acoplados a proteína G tipo 2

G α _i: proteína G inibitória

G α _s: proteína G estimulatória

HSP90: proteína de choque térmico de 90kDa

***i.p.*:** intraperitoneal

IL 1 β : interleucina 1 β

IL 6: interleucina 6

iNOS: óxido nítrico sintase isoforma induzível

ISO: isoproterenol

L-NAME: N(G)-nitro-L-arginina metil éster

-Log EC₅₀: logaritmo negativo das concentrações do agonista que produziram 50% da resposta máxima

LOS: losartan

MAPK: proteína kinase ativada por mitógenos

MC: massa corpórea
MnTMPyP: Mn(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin pentachloride
MR: receptor mineralocorticóide
MV: massa ventricular
NFkB: fator nuclear kappa B
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintase
PAD: pressão arterial diastólica
PAM: pressão arterial média
PAS: pressão arterial sistólica
PKA: proteína kinase dependente de AMPc
Ras: Rat Sarcoma vírus
R_{máx}: resposta máxima
s.c.: sub cutâneo
Ser: serina
SGK-1: proteína kinase induzida por glicocorticóides
SHR: ratos espontaneamente hipertensos
SOD: superóxido dismutase
SRA: Sistema renina-angiotensina
SRAA: sistema renina angiotensina aldosterona
Src: proteína tirosina kinase
Thr: treonina
Tyr: tirosina
v.o.: via oral

1. INTRODUÇÃO

A ativação persistente do sistema nervoso simpático exerce papel importante na patogênese das doenças cardiovasculares como na hipertensão essencial, hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca (BRISTOW, 2000; PARATI & ESLER, 2012), relacionando-se diretamente à redução da sobrevida em portadores de insuficiência cardíaca (BARRETO *et al.*, 2009).

Segundo a *World Health Organization*¹ 17,3 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2008. Esse número representa 30% da mortalidade global, e ainda estima-se que em 2030 esse número chegue a 23,3 milhões de casos. Neste contexto, dados do DATASUS² de 2008 apresentaram que no Brasil as doenças do aparelho circulatório perfazem a primeira causa de mortalidade (31,8%) e a terceira de morbidade hospitalar (10,2%).

Dentre os principais tratamentos clínicos utilizados para as doenças cardiovasculares associadas ao aumento do tônus simpático, encontra-se o uso de antagonistas de receptores β -adrenérgicos (β -AR), os quais tem demonstrado serem eficazes na redução da taxa de mortalidade em modelos experimentais (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008; CHAN *et al.*, 2011) e em pacientes com insuficiência cardíaca (BRISTOW *et al.*, 2003; AL-GOBARI *et al.*, 2013), assim como na redução da pressão arterial sistólica e diastólica de pacientes hipertensos (WEISS *et al.*, 2007),

¹Cardiovascular diseases (CVDs)- Ficha N° 317. Dados atualizados em março de 2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Acessado em setembro de 2013.

² Cadernos de Informações de Saúde – Informações gerais – Brasil. Disponível em: tabnet.datasus.gov.br/tabdata/cadernos/cadernosmap.htm. Acessado em setembro de 2013.

demonstrando o envolvimento dos receptores β -AR na etiologia dos efeitos patológicos da hiperativação simpática. Assim, o estudo sobre os efeitos da ativação dos receptores β -AR no sistema cardiovascular tornou-se crucial para o entendimento da fisiopatologia associada.

Mais recentemente, outras linhas de fármacos têm sido utilizadas para o tratamento das doenças cardiovasculares causadas pelo aumento da estimulação simpática, sendo elas os antagonistas do receptor AT_1 da angiotensina II e do receptor de mineralocorticoides (MR). Nesse sentido, tem sido demonstrado que o antagonismo do receptor AT_1 é eficaz em corrigir a disfunção endotelial e as alterações estruturais vasculares de humanos e de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (SCHIFFRIN *et al.*, 2000; CEDIEL *et al.*, 2003), assim como melhora a hipertrofia e insuficiência cardíaca causada pelo tratamento com isoproterenol em camundongos (ZHANG *et al.*, 2007). SANZ-ROSA e colaboradores (2005a) demonstraram que o tratamento de ratos SHR com eplerenona, um antagonista do receptor MR, normaliza a disfunção endotelial observada na aorta dos animais hipertensos. Em conjunto, estes estudos evidenciam o papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) em doenças cardiovasculares que cursam com a hiperativação dos receptores β -AR. No entanto não se sabe se a angiotensina II e aldosterona via receptor AT_1 e MR, respectivamente, poderiam mediar os efeitos vasculares da hiperativação dos receptores β -AR.

1.1. Receptores β -AR no sistema cardiovascular: Ativação aguda e crônica

Os receptores β -AR são classificados em três subtipos: β_1 -, β_2 - e β_3 -AR (LANDS *et al.*, 1967; TAN *et al.*, 1983). Classicamente, no sistema cardiovascular os receptores β_1 -AR são encontrados predominantemente no coração, onde sua estimulação causa cronotropismo (frequência cardíaca), inotropismo (força de contração) e lusitropismo (velocidade de relaxamento) positivos. Os receptores β_2 -AR estão localizados principalmente em vasos sanguíneos, tanto nas células do músculo liso vascular como nas células endoteliais e sua estimulação aguda medeia vasodilatação, que pode ser dependente e/ou independente do endotélio (FERRO *et al.*, 2004). Receptores β_3 -AR foram descritos primeiramente em adipócitos, onde sua estimulação induz lipólise (EMORINE *et al.*, 1989). Posteriormente, este subtipo de receptor β -AR foi também descrito em vasos sanguíneos onde sua ativação promove vasodilatação (TROCHU *et al.*, 1999). Tanto no coração, como em vasos sanguíneos, os três subtipos de receptor β -AR podem estar presentes (CONTI *et al.*, 2013).

Os receptores β -AR são receptores de 7 domínios transmembrana acoplados a proteína G (GPCR- "*Guanine nucleotide-binding G protein-coupled receptor*"). A família dos GPCRs apresenta uma estrutura conservada composta por α -hélices e a proteína G apresenta as subunidades α e $\beta\gamma$ (ROCKMAN *et al.*, 2002). A via de sinalização clássica do receptor β -AR no músculo liso envolve a ligação agonista-receptor ativando uma cascata de sinalização dependente da proteína $G\alpha$ estimulatória ($G\alpha_s$) e adenilato ciclase aumentando os níveis de 3', 5' adenosina monofosfato cíclica (AMPC) e subsequentemente ativando a proteína kinase dependente de AMPC (PKA). O aumento

dos níveis de AMPc e ativação da PKA causam relaxamento vascular por: 1) aumentar a probabilidade de abertura dos canais de K^+ ativados por cálcio (BK), sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e retificadores retardados (K_{DR}), o que hiperpolariza a célula muscular lisa e assim reduz o influxo de cálcio pelos canais de cálcio dependentes de voltagem; 2) inibir a formação do complexo cálcio/calmodulina; 3) inibir a fosforilação da cinase da cadeia leve de miosina; e 4) aumentar a recaptção de cálcio pelo retículo sarcoplasmático via fosforilação da fosfolambam pela PKA (TANAKA *et al.*, 2005).

Em células endoteliais, sugere-se que o receptor β_2 -AR pode estar acoplado tanto à proteína G_{α_s} como à proteína G_{α_i} inibitória (G_{α_i}). Quando um agonista não seletivo dos receptores β -AR, o isoproterenol, se liga ao receptor β_2 -AR há ativação de diferentes cascatas de sinalização: uma via dependente de adenilato ciclase/AMPc/PKA e outra via dependente de PI3 cinase e proteína cinase B (Akt). Ambas vias de sinalização culminam com ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) - isoforma endotelial (eNOS) por fosforilar o seu sítio de ativação em serina 1177, o que resulta em aumento da síntese e liberação do fator vasodilatador óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais (QUEEN *et al.*, 2006; BANQUET *et al.*, 2011). Em conjunto, tanto as ações diretas nas fibras musculares lisas, como um aumento da liberação de NO pelas células endoteliais em alguns tipos de vasos sanguíneos, são mecanismos responsáveis em mediar o efeito relaxante da ativação aguda dos receptores β -AR. Entretanto, a ação fisiológica da ativação dos receptores β -AR pode estar prejudicada e/ou modificada quando há ativação crônica dos mesmos.

A sustentada estimulação dos receptores β -AR ativa a sinalização dependente da proteína cinase de receptores acoplados à proteína G tipo 2 (GRK-2) que, em

conjunto com a PKA, fosforilam o receptor β -AR levando ao seu desacoplamento da proteína $G\alpha_s$, prejudicando a ativação da sinalização do receptor β -AR via proteína $G\alpha_s$ (HAUSDORFF *et al.*, 1990; DAAKA *et al.*, 1997). Em sequência pode haver internalização e regulação negativa (*downregulation*) destes receptores. GRK-2 e PKA também causam a desestabilização do RNA mensageiro do receptor β -AR. Ambos os mecanismos, internalização e redução da síntese de receptores β -AR, resultam em diminuição do número destes receptores na membrana celular (GUEST *et al.*, 1990; MILLS, 2002). A fosforilação do receptor β -AR pela PKA, além de desacoplá-lo da proteína $G\alpha_s$, leva ao acoplamento preferencial deste receptor à proteína $G\alpha_i$ (DAAKA *et al.*, 1997). Este acoplamento induz a sinalização $G\alpha_i$ /Src/Ras que, por sua vez, causa a ativação da cinase regulada por sinalização extracelular (ERK1/2) (DAAKA *et al.*, 1997).

A dessensibilização da via β -AR/proteína $G\alpha_s$ e/ou redução do número de receptores β -AR na membrana dependem do tempo de exposição às catecolaminas, sendo que em células isoladas, como cardiomiócitos, estes eventos podem ser observados em minutos a horas e, no animal intacto, horas a dias, dependendo também dos níveis de catecolaminas circulantes. A dessensibilização da via do receptor β -AR/proteína $G\alpha_s$ está associada a uma reduzida capacidade vasodilatadora induzida por agonistas do receptor β -AR, a qual pode ser observada em modelos experimentais de doenças que cursam com aumento da atividade do sistema nervoso simpático, como é observado em modelos experimentais de insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio (GABALLA *et al.*, 2001) e de hipertensão arterial (ASANO *et al.*, 1988; CALLERA *et al.*, 2004).

1.1.1. Modelo de hiperativação dos receptores β -AR induzido por isoproterenol

Um modelo bastante utilizado para estudar os efeitos da hiperativação β -AR foi desenvolvido por RONA e colaboradores (1959), os quais realizaram a administração subcutânea de isoproterenol, um agonista β -AR não-seletivo, por dias consecutivos em ratos. Estes autores demonstraram que esse tratamento causa injúria miocárdica similar à induzida pelo infarto do miocárdio, caracterizando uma cardiomiopatia. Neste sentido, o tratamento prolongado com isoproterenol causa mudanças estruturais do miocárdio que estão relacionadas ao aumento da massa ventricular (hipertrofia) e aumento da deposição de fibras colágenas no interstício do miocárdio ventricular (fibrose) (BENJAMIN *et al.*, 1989). Quando o modelo experimental é associado à administração de baixas doses de isoproterenol (0,02 - 3,0 mg/kg) há aumento da espessura da parede dos ventrículos, mas sem alteração do raio da cavidade ventricular, o que caracteriza o desenvolvimento de uma hipertrofia cardíaca do tipo compensada (BENJAMIN *et al.*, 1989; DIWAN & DORN II, 2006; OSADCHII, 2007). Se o estímulo persistir, a hipertrofia pode progredir de modo que há prejuízo da função cardíaca, resultando em progressiva dilatação das cavidades ventriculares, ou seja, há aumento do raio da cavidade ventricular (DIWAN & DORN II, 2006).

A dilatação do ventrículo esquerdo e redução da espessura da sua parede aumentam o estresse de parede gerando um estresse hemodinâmico sobre o coração, estimulando ainda mais as vias de sinalização de hipertrofia, resultando em um desequilíbrio na proliferação e morte celular, e os mecanismos compensatórios humorais falham em manter o débito cardíaco necessário para o organismo. Assim, a

hipertrofia cardíaca passa de compensada para descompensada (DIWAN & DORN II, 2006). A evolução desses processos resulta em perda de cardiomiócitos e sua substituição por tecido fibroso, reduzindo rapidamente o desempenho contrátil em um estado final de cardiomiopatia levando à deterioração funcional, insuficiência cardíaca, e à morte (DIWAN & DORN II, 2006). Por isso a hipertrofia cardíaca é considerada um importante fator de risco cardiovascular, o que justifica o estudo dos mecanismos associados a este processo fisiopatológico, como a hiperativação β -adrenérgica.

O tratamento com isoproterenol causa ativação da ERK1/2 em cardiomiócitos, e esta sinalização está envolvida no efeito hipertrófico da hiperativação β -adrenérgica (ZOU *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2006). Já em vasos sanguíneos, os dados sobre os efeitos da hiperativação β -adrenérgica são mais escassos. Em artérias cerebrais de coelho demonstrou-se que a estimulação crônica dos receptores β -AR induzida pelo tratamento com isoproterenol por 7 dias também causa ativação da ERK1/2, associado com estresse oxidativo e prejuízo da contratilidade nesta artéria (KIM *et al.*, 2006; 2012). Por sua vez, dados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento por 7 dias com isoproterenol aumenta a resposta máxima ao agente contrátil fenilefrina em aorta de ratos e camundongos (DAVEL *et al.*, 2006; 2008; 2011; FUKUDA *et al.*, 2008). Essa disfunção contrátil foi relacionada à redução da biodisponibilidade de NO, à maior produção de ânion superóxido e de fatores pró-inflamatórios locais (DAVEL *et al.*, 2006; 2008). Importante salientar que os trabalhos supracitados que observaram as alterações vasculares induzidas pela hiperativação β -adrenérgica foram realizados em modelo experimental de tratamento com doses de isoproterenol que não induziram insuficiência cardíaca. Assim, em conjunto, os dados indicam que a sinalização celular

induzida pela hiperativação sustentada dos receptores β -AR causa um dano vascular, associado a estresse oxidativo e disfunção endotelial. Estes são efeitos totalmente distintos da ação fisiológica e/ou da ativação aguda dos receptores β -AR vasculares que são: vasodilatação e ação antioxidante (QUEEN & FERRO, 2006; BANQUET *et al.*, 2011; DAVEL *et al.*, 2012) e podem estar associados à patogênese e/ou piora da disfunção vascular associada a doenças cardiovasculares que cursam com aumento da atividade simpática. Entretanto, ainda não é claro na literatura: 1) a cascata de sinalização envolvida nos efeitos vasculares da hiperativação dos receptores β -AR; e 2) se os efeitos vasculares da hiperativação dos receptores β -AR seriam dependentes da liberação de mediadores do SRAA como a angiotensina II e/ou aldosterona, ativando seus respectivos receptores, AT_1 e MR.

1.2. Interação entre o receptor β -AR e o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

A ativação dos receptores β -AR nas células justaglomerulares adjacentes às arteríolas aferentes do glomérulo renal estimula a secreção da enzima proteolítica denominada renina, a qual converte o seu substrato, a α -globulina angiotensinogênio produzida no fígado, no decapeptídeo angiotensina I. A angiotensina I é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) presente no endotélio vascular, sendo mais abundante no endotélio dos vasos pulmonares. Pela ação da ECA, a angiotensina I perde dois aminoácidos, formando o octapeptídeo angiotensina II.

A angiotensina II tem múltiplas ações no ajuste da função cardiovascular, incluindo ações centrais e locais no coração e vasos sanguíneos dentre elas: retenção

de sódio e água no organismo, vasoconstrição, aumento da contratilidade cardíaca, estimulação da sede, aumento do apetite ao sódio e potencialização dos efeitos e da liberação de noradrenalina. Esses efeitos da angiotensina II resultam no aumento da pressão sanguínea sistêmica e são evidentes em situações de hipotensão (como ocorre na hipovolemia e privação alimentar de sódio) e como consequência da ativação simpática, e são mediados pela ação da angiotensina II no receptor AT_1 nas células-alvo. A ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) também forma outros peptídeos como a angiotensina 1-7 e a angiotensina III, com ação no sistema cardiovascular, mas a angiotensina II continua a ser o peptídeo biologicamente ativo de maior importância fisiológica e patológica do SRA (SANTOS *et al.*, 2000). Adicionalmente, a angiotensina II, atuando via receptor AT_1 nas células do córtex das adrenais promove a síntese e liberação de aldosterona.

Fisiologicamente, a aldosterona, um mineralocorticóide, é um hormônio esteroide sintetizado e secretado pela zona glomerulosa do córtex da glândula adrenal. A ligação da aldosterona ao receptor MR nas células-alvo atua como um fator de transcrição e modula a expressão de várias proteínas que medeiam à ação desse hormônio como a SGK (proteína kinase sérica induzida por glicocorticoide), as MAPKs (proteínas kinases ativadas por mitógenos) e a osteopontina (CONNELL, 2004). Nos rins, a aldosterona aumenta a expressão e estabilidade dos canais de Na^+ sensíveis à amilorida (ENaC) na membrana luminal das células do túbulo distal, o que favorece a reabsorção de Na^+ ; este influxo de Na^+ pela membrana luminal estimula a atividade da Na^+/K^+ ATPase na membrana basolateral. Além disso, a aldosterona aumenta a expressão gênica e atividade da Na^+/K^+ ATPase e do trocador de Na^+/H^+ (NHE3). Em conjunto, estes

efeitos contribuem para a reabsorção de Na^+ e a secreção tubular de K^+ e H^+ . Estes efeitos nas células epiteliais renais são cruciais para a regulação de água, Na^+ e K^+ nos fluidos corporais, e conseqüentemente, da homeostasia do sistema cardiovascular (CONNELL & DAVIES, 2005).

Embora a aldosterona seja o principal ligante do receptor MR, este apresenta afinidade por outros ligantes endógenos como os glicocorticoides, incluindo o cortisol e a corticosterona (FREY *et al.*, 2004). Os níveis de glicocorticoides na circulação são 1.000 vezes superiores àqueles de mineralocorticoides, e eles só não agem nas células de forma mais intensa devido à expressão das enzimas 11β hidroxisteroide desidrogenase (11β -HSD) tipo 1 e 2, onde a enzima 11β -HSD 2 converte glicocorticoides em metabólitos inativos e a 11β -HSD 1 exerce o efeito inverso. A enzima 11β -HSD 2 exerce seu efeito de modo a permitir a ligação da aldosterona ao receptor MR, mesmo na presença de glicocorticoides (FERRARI, 2010).

Elevados níveis de angiotensina II e de aldosterona, em um panorama geral, medeiam importantes mecanismos fisiopatológicos envolvidos em doenças cardiovasculares que cursam com aumento da atividade simpática. Dentre estes, destacam-se: o crescimento das células musculares lisas, prejuízo no relaxamento vascular dependente do endotélio, vasoconstrição exacerbada, além de causar inflamação e estresse oxidativo (XAVIER *et al.*, 2008; CAT & TOUYZ, 2011; VALENTE *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012; TODA *et al.*, 2013). Estes efeitos da angiotensina II e da aldosterona nos vasos sanguíneos ocorrem principalmente via ativação dos receptores AT_1 e MR, respectivamente. O estresse oxidativo é um distúrbio do balanço entre a produção de espécies reativas, como por exemplo, as espécies reativas de oxigênio

(EROs), e a defesa antioxidante, favorecendo a produção de espécies reativas. As EROs são classificadas em radicais livres como o ânion superóxido e o radical hidroxil, entre outros, e espécies não-radicais como o peróxido de hidrogênio e o peroxinitrito (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004). Um quadro de estresse oxidativo, por aumento da produção de ânion superóxido vascular associado à degradação do NO e redução de seus efeitos vasodilatadores e anti-contráteis, é uma das principais causas de disfunção endotelial em doenças cardiovasculares (BAUERSACHS *et al.* 1999; D'USCIO *et al.*, 2001; DAVEL *et al.*, 2011). Vale ressaltar que as EROs ativam MAPKs, como a p38 e a ERK1/2, que medeiam apoptose, resposta inflamatória e diferenciação celular, além de potencializar a produção de EROs (ZARUBIN & HAN, 2005). Nesse sentido, já foi demonstrado que a ativação de receptores AT₁ e MR pode induzir estresse oxidativo vascular via ativação de MAPKs (JOFFE & ADLER, 2005; MARCHESI *et al.*, 2008).

1.2.1. Papel do SRAA na fisiopatologia do modelo de hiperativação dos receptores β -AR induzido por isoproterenol

Trabalhos prévios da literatura demonstraram que há um aumento atividade da renina e da ECA no tecido cardíaco de ratos tratados por 7 dias com isoproterenol, sem sinais de prejuízo da função cardíaca (BUSATTO *et al.*, 1999). GRIMM e colaboradores (1998) observaram uma correlação positiva entre a atividade da ECA cardíaca e o aumento do peso ventricular induzido pelo isoproterenol. Em adição, GRIMM e colaboradores (1999) demonstraram que o co-tratamento dos ratos com ramipril, inibidor da atividade da ECA, melhora significativamente a hipertrofia cardíaca induzida

pela administração de isoproterenol. OLIVEIRA & KRIEGER (2005) observaram que o aumento da atividade e da expressão gênica da ECA no coração de ratos tratados com isoproterenol correlacionou-se positivamente com o peso do ventrículo esquerdo, indicando um possível envolvimento da ativação do SRA local na indução de hipertrofia cardíaca neste modelo experimental.

Em somatória, tem sido demonstrado que alterações cardíacas e hemodinâmicas relacionadas ao aumento da atividade β -adrenérgica podem resultar também no papel da aldosterona, uma vez que, tanto as catecolaminas via estimulação β -AR, como a angiotensina II via receptor AT_1 , resultam na síntese de aldosterona pelo córtex da glândula adrenal (PITT, 2007). De acordo com esta hipótese, GRIMM e colaboradores (1998) observaram que após tratamento com isoproterenol há um significativo aumento dos níveis de aldosterona plasmática. Em corroboração, camundongos *knockout* para os receptores β_1 - e β_2 -AR possuem redução da quantidade de aldosterona circulante (KIM *et al.*, 2007), o que reforça o papel destes receptores estimulando a síntese e liberação de aldosterona.

GALLEGO e colaboradores (2001) e VELIOTES e colaboradores (2010) demonstraram que a administração de espironolactona, um antagonista dos receptores MR, previne a hipertrofia cardíaca e melhora a fibrose miocárdica, além de inibir a indução de apoptose de cardiomiócitos e a transição da hipertrofia compensada do ventrículo esquerdo para dilatação cardíaca em ratos tratados com isoproterenol. A melhora dos parâmetros estruturais e funcionais induzidos pela espironolactona no coração de ratos tratados com isoproterenol está associada a uma redução na

expressão gênica e proteica do mediador da ação celular da aldosterona, a SGK-1 (MARTÍN-FERNANDEZ *et al.*,2012).

Desta maneira, ambos, angiotensina II e aldosterona, destacam-se como possíveis mediadores das ações cardiovasculares da hiperativação β -adrenérgica. Entretanto, apesar dos estudos demonstrarem a importância desta interação no coração, não há dados suficientes sobre o assunto em vasos sanguíneos.

Dados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento por 7 dias com isoproterenol aumenta a produção de ânion superóxido e induz a expressão gênica e proteica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 na aorta de ratos, concomitante com aumento da atividade do fator de transcrição nuclear NF- κ B (DAVEL *et al.*, 2006; 2008). Observou-se ainda, que tanto a inibição da atividade do NF- κ B como a varredura de ânion superóxido com a enzima superóxido dismutase (SOD), melhoraram a reatividade vascular alterada na aorta do grupo tratado com isoproterenol, cursando com aumento da biodisponibilidade de NO (DAVEL *et al.*, 2006; 2011). Estes dados reforçam o papel de fatores pró-inflamatórios e pró-oxidantes na disfunção vascular causada pela hiperativação dos receptores β -AR.

Assim, apesar de ser claro que a angiotensina II, a aldosterona e a hiperativação dos receptores β -AR causam disfunção endotelial associada ao estresse oxidativo, não se sabe se há uma inter-relação entre estes fatores em artérias que foram expostas cronicamente a altas concentrações de catecolaminas. Um estudo *in vitro* demonstrou que a incubação de isoproterenol em cultura de células endoteliais induz a ativação do gene promotor da ECA (XAVIER-NETO *et al.*, 1999). Entretanto, uma interação entre

ativação crônica β -adrenérgica, angiotensina II, aldosterona e disfunção vascular não é conhecida.

Perante o exposto, levantamos a hipótese de um possível papel da sinalização mediada pelo receptor AT_1 e/ou MR nas alterações vasculares induzidas pela hiperativação dos receptores β -AR. Esta hipótese é reforçada por ensaios clínicos que demonstraram que o uso de inibidores da ECA, de antagonistas de receptores AT_1 e de antagonistas dos receptores MR tem alta eficácia na terapêutica de doenças cardiovasculares incluindo a insuficiência cardíaca e o infarto do miocárdio, enfermidades que cursam com aumento do tônus simpático e aumento dos níveis de catecolaminas circulantes (PITT *et al.*, 2000; DICKSTEIN *et al.*, 2002; PITT *et al.*, 2003). E, apesar dos benefícios clínicos dos usos destas drogas, pouco se sabe sobre os mecanismos de interação da ativação dos receptores β -AR e o SRAA em vasos sanguíneos.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi investigar a participação das vias de sinalização dos receptores AT₁ e MR no modelo de hiperativação dos receptores β-AR induzido pelo tratamento crônico com isoproterenol, com ênfase nos mecanismos funcionais, bioquímicos e moleculares associados, utilizando-se para estudo a aorta.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

A utilização de animais e os protocolos experimentais realizados para execução deste trabalho estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas – CEUA/UNICAMP em 13.02.2012 e protocolado sob o nº 2609-1 (ANEXO A).

Ratos Wistar foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP e mantidos no biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da UNICAMP sob condições de temperatura constante e fotoperíodo (12:12 horas ciclo claro-escuro) com livre acesso a ração e água.

Aos 3 meses de idade os animais foram separados aleatoriamente em grupos, pesados e tratados por 7 dias consecutivos com isoproterenol (grupo ISO; 0,3 mg/kg/dia *s.c.*; DAVEL *et al.*, 2006; 2008) ou apenas veículo (grupo CT). Paralelamente, concomitante com o tratamento com ISO, alguns animais foram aleatoriamente divididos para receber co-tratamento por gavagem com o losartan (LOS; 40 mg/kg/dia, *v.o.*; GRIMM *et al.*, 1999), um antagonista do receptor AT₁, ou com a espironolactona (ESP; 200 mg/kg/dia, *v.o.*; SANZ-ROSA *et al.*, 2005a), um antagonista do receptor MR,

durante os 7 dias. Dessa forma perfizeram-se 6 grupos: CT, ISO, LOS, ESP, ISO+LOS e ISO+ESP.

Ao final dos 7 dias de tratamentos, todos os animais foram pesados e então os protocolos descritos abaixo foram realizados.

3.2. Massa corporal, medidas hemodinâmicas e índice de hipertrofia ventricular

As medidas hemodinâmicas foram realizadas no 8º dia em animais anestesiados com uretana (1,2 g/kg; *i.p.*). Para isso, uma pequena incisão foi realizada no pescoço do animal para isolamento da artéria carótida direita, a qual foi canulada com cateter (PE50) preenchido com salina heparinizada. O cateter foi conectado a um transdutor de pressão (MTL844 Ad Instruments) e este a um sistema de aquisição de sinais biológicos (PowerLab 4/35, Ad Instruments) acoplado a um computador para medida e aquisição da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) e determinação da frequência cardíaca (FC) (ROSSONI *et al.*, 2006; DAVEL *et al.*, 2008).

Após os registros hemodinâmicos, os átrios foram removidos do coração e os ventrículos direito e esquerdo mais o septo ventricular foram pesados. O valor da razão massa ventricular (MV; mg)/ massa corporal (MC; g)³ foi utilizada como índice de hipertrofia ventricular para comprovar a eficácia do tratamento com isoproterenol.

³ Vale ressaltar que em todos os protocolos experimentais era mensurado o índice de hipertrofia ventricular a fim de comprovar o modelo experimental utilizado.

3.3. Obtenção das amostras de plasma e do tecido de aorta

Ao final do período de tratamento os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina (80 e 5 mg/kg, *i.p*). Realizou-se uma incisão longitudinal no abdômen do animal para coleta de amostra de sangue arterial (4 mL), obtida a partir da aorta abdominal localizada abaixo do intestino delgado. As amostras de sangue foram centrifugadas para a obtenção do plasma e congeladas em freezer -80°C para posteriores análises.

Em seguida, o tórax foi aberto e os pulmões junto com o coração e a aorta torácica foram removidos e colocados sobre uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (em mM): 118 NaCl; 4,7 KCl, 25 NaHCO₃; 2,5 CaCl₂-2H₂O; 1,2 KH₂PO₄; 1,2 MgSO₄-7H₂O; 11 glicose e 0,01 EDTA, previamente aquecida à 37°C e gaseificada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂).

3.4. Reatividade vascular em anéis de aorta

A aorta torácica foi removida e limpa de tecido conjuntivo e perivascular de acordo com o descrito previamente (DAVEL *et al.*, 2006; 2008). A aorta foi dividida em segmentos (3 mm) e cada anel vascular foi montado em um banho de órgãos isolados com 8 cubas (Panlab Harvard Apparatus, Espanha) para medida da tensão isométrica. Cada cuba do banho de órgãos continha 10 mL de solução de Krebs-Henseleit, continuamente aquecida e gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. No processo de montagem no banho de órgãos, os anéis foram

transpassados por duas hastes metálicas, sendo uma fixada à parede do banho e a outra conectada verticalmente a um transdutor de tensão, conectado a um sistema de aquisição de dados, e este, a um computador. Os anéis de aorta foram submetidos a uma tensão de repouso de 1,0 g, a qual era reajustada quando necessário, durante 30 minutos de estabilização (DAVEL *et al.*, 2006; 2008).

3.4.1. Protocolos experimentais

Seguidos 30 minutos de estabilização, todos os anéis foram expostos a contração induzida pelo cloreto de potássio (KCl; 75 mM) duas vezes, sendo a primeira vez para avaliar a integridade do músculo liso e a segunda vez para obter a tensão máxima desenvolvida por cada anel de vaso.

Para avaliar a integridade do endotélio nessas artérias realizou-se curva de relaxamento dependente do endotélio com a acetilcolina (1 η M a 10 μ M), em artérias previamente contraídas com fenilefrina (~1 μ M; 50% da resposta máxima ao KCl 75 mM). Os anéis que apresentavam relaxamento igual ou maior que 80% foram considerados com endotélio íntegro. Em seguida, foram realizadas curvas concentração-resposta ao agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina (1 η M a 10 μ M) e ao doador de óxido nítrico, o nitroprussiato de sódio (NPS; 0,1 η M a 1 μ M).

Alguns anéis de aorta foram incubados com inibidor não-seletivo da NOS (L-NAME, 100 μ M) ou com o varredor de ânion superóxido, a superóxido dismutase (SOD, 150 U/mL) por 30 minutos antes da realização da curva concentração-resposta à fenilefrina.

3.5. Avaliação da produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio em aorta

Segmentos de aorta de aproximadamente 3 mm de comprimento foram imersos em meio de congelamento (Tissue-Tek[®] O.C.T compound 4583) e então congelados imediatamente e mantidos a -80°C até o dia do experimento. Secções transversas foram obtidas em criostato (-25°C) e coletadas em lâminas tratadas com silanina. As lâminas com os cortes eram colocadas em uma placa quente a 37°C por 20 minutos para que o corte fixasse na lâmina.

A produção de NO foi realizada pela análise da fluorescência ao 4,5 - diaminofluoresceína (DAF-2), como previamente descrito (DELBIN *et al.*, 2012). O diacetato (DAF-2 DA) facilmente entra nas células e é hidrolizado por esterases do citosol em DAF-2. Na presença de NO e oxigênio, DAF-2 é transformado na forma de triazol emitindo uma fluorescência verde (KOJIMA *et al.*, 1998). Os cortes transversais de aorta (10 µm) foram incubados por 20 minutos com 100 µL de tampão fosfato (em mM): 0,1 Na₂HPO₄; 0,1 NaH₂PO₄ e 0,45 CaCl₂, pH= 7,4 em câmara úmida a 37°C. As lâminas foram então vertidas para retirada do tampão e uma nova incubação foi realizada com tampão fosfato e DAF-2 (8 µM) por 30 minutos na câmara úmida a 37°C.

A avaliação da produção de ânion superóxido foi realizada pela análise da fluorescência derivada da oxidação da dihidroetidina (DHE), como previamente descrito (HERNANZ *et al.* 2004; WENCESLAU *et al.*, 2011). A dihidroetidina permeia livremente pelas células e na presença do ânion superóxido é oxidada a brometo de etídio, o qual se intercala ao DNA, emitindo uma fluorescência vermelha quando é excitado em 488

nm e com um espectro de emissão de 610 nm. Para este protocolo, secções transversas (14 µm) de aortas foram incubados por 20 minutos com Krebs HEPES (em mM) 130 NaCl; 5,6 KCl, 2 CaCl₂; 0,24 MgCl₂; 8,3 HEPES e 11 glicose (pH= 7,4) em câmara úmida a 37°C. Após essa incubação, as lâminas eram vertidas para retirada da solução de Krebs+HEPES e uma nova incubação foi realizada com Krebs+HEPES e DHE (2 µM) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Em alguns cortes de aorta, foi incubado DHE adicionado de L-NAME (100 µM) para avaliar a produção de EROs dependente da NOS. Para verificar se a fluorescência do DHE era derivada da produção de ânion superóxido, alguns cortes foram incubados com Krebs+HEPES e MnTMPyP (25 µM; D'AGOSTINO *et al.*, 2007), um mimético da SOD.

As imagens foram captadas em microscópio ótico (Eclipse 80i, Nikon, Japan), utilizando-se objetiva de 20X acoplada a uma câmera fotográfica (DS-U3, Nikon). Para a fluorescência do DAF-2 utilizamos o filtro de fluoresceína e para a fluorescência do DHE filtro de rodamina. Cabe ressaltar que estes experimentos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Fisiologia Vascular do ICB/ USP, coordenado pela Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni.

A quantificação da fluorescência foi realizada utilizando-se o Software Image J 1.46p (NIH) com as imagens em 8-bit. Mediu-se a densidade integrada em 5 regiões aleatórias de cada corte com área fixa, e a média destes valores foi considerada a medida final de cada amostra analisada.

3.6. Avaliação da expressão de proteínas em aorta

3.6.1. Obtenção do extrato proteico total

A aorta torácica isolada e limpa de tecido conjuntivo e adiposo foi homogeneizada (homogenizador de vidro) em gelo com tampão de lise RIPA (Upstate, EUA) contendo PMSF (1 mM), ortovanadato de sódio (10 mM), fluoreto de sódio (100 mM), pirofosfato de sódio (10 mM) e coquetel de inibidor de protease (PIC, 2 µL/mL). O homogenato foi centrifugado (2500 rpm, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante transferido para um microtubo limpo. Em seguida foi medido a concentração de proteína em uma alíquota (1 µL) do extrato (Pierce BCA Protein Assay kit, Rockford, IL, EUA). Às amostras (50 µg de proteína total) foram adicionado tampão de Laemmli contendo ditioneitol (DTT, 350 mM) e aquecidas a 100°C por 5 minutos para redução e desnaturação das proteínas.

3.6.2. Eletroforese, transferência e detecção de proteínas

As amostras de extrato proteico (50 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 7,5%) em sistema para mini blot (BioRad, Hercules, USA) contendo solução de corrida (Tris 24 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,10%) durante aproximadamente 3 horas, a uma corrente constante de 80 Volts (Power Pac 200, BioRad, Hercules, CA,EUA). Em um dos poços do gel foi aplicado um padrão de

proteínas marcadoras de peso molecular (Thermo Scientific, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 26619).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (depolivinil difluorida; Amersham, GE Health Care, U.K.) previamente ativada, por 20 segundos, com metanol. Para a transferência, um sistema de sanduíche foi preparado e imersos em um módulo de transferência (Mini-Protean II, BioRad, Hercules, CA, EUA) contendo solução de transferência (Tris 25 mM; Glicina 190 mM; SDS 0,05% e Metanol 20%). O sistema foi submetido a uma corrente de 230 mA (Power Pac 200, BioRad, Hercules, CA, EUA), durante aproximadamente 14 horas.

Após a transferência as proteínas das membranas foram fixadas e coradas com ácido acético 1% por 5 minutos e seguidas de solução Ponceau 1% por 3 minutos. A descoloração das membranas foi realizada com uma sequência de lavagens iniciada com ácido acético 1% (5 minutos) seguida por água (5 minutos) e finalizando com solução TBS-T (Tris-HCl 20 mM; NaCl 0,5 M e Tween 20 0,1%). Em seguida, as membranas foram incubadas por 90 minutos com uma solução de bloqueio (leite desnatado 5%; Tris-HCl 10 mM; NaCl 100 mM e Tween-20 0,1%).

Para a detecção das proteínas de interesse, as membranas contendo as amostras de extrato proteico total foram incubadas por 12 horas a 4°C sob agitação com anticorpo primário específico para eNOS (1:1000), ^{Ser1177}p-eNOS (1:1000), ^{Thr495}p-eNOS (1:1000), HSP90 (1:1000), G $\alpha_{i1,2}$ (1:1500), G α_{i3} (1:2000), Src (1:1500), ^{Tyr418}p-Src (1:1000), ERK1/2 (1:1000), ^{Thr202/Tyr204}p-ERK1/2 (1:2000), β -arrestina (1:500) e MR (1:500).

As membranas foram lavadas sucessivamente com solução de lavagem (Tris-HCl 10 mM; NaCl 100 mM e Tween 20 0,1%) sob agitação. Posteriormente às lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários específicos (1:10.000), sendo estes diluídos em solução de bloqueio e incubados por 90 minutos à temperatura ambiente sob agitação. Após esse período, realizaram-se sucessivas lavagens com solução de lavagem. As proteínas de interesse foram detectadas por uma reação de quimiluminescência utilizando um sistema de detecção (ECL™ normal ou Plus). Em seguida, as membranas foram colocadas em um fotodocumentador (ImageQuant LAS 4000 – GE Healthcare) para a revelação. As imagens foram salvas para posterior análise densitométrica.

Após detecção da expressão das diferentes proteínas de interesse, as membranas foram incubadas com solução de limpeza (Tris-HCl 62,5 mM; SDS 2%; β -Mercaptoetanol 100 mM) por 15 minutos a 50°C e lavadas duas vezes com TBS-T por 7 minutos. Posteriormente, a membrana foi incubada com a solução de bloqueio e todo o protocolo de incubação foi repetido com anticorpo primário para detecção de α -actina (1:5000). A expressão da α -actina foi medida para normalização da expressão das proteínas quantificadas.

3.7. Detecção da expressão gênica pelo método de RT-PCR

O ensaio de PCR foi realizado na Universidad Rey Juan Carlos (Madrid, Espanha) em colaboração com a Profa Dra Maria Jesus Alonso e com o doutorando Roberto Palácios. O RNA total foi obtido a partir da homogeneização (POLYTRON®) de

1 anel de aorta (4 mm) em TRIzol, de acordo com o método previamente descrito (HERNANZ *et al.*, 2012). O RNA extraído foi quantificado com o uso de espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). Um total de 1 µg de RNA foi usado para a reação de retrotranscrição para obtenção do cDNA utilizando-se kit comercial contendo os componentes necessários para a reação (TaqMan Reverse Transcription Reagents) em volume final de 50 µL. As reações de PCR foram realizadas em duplicata em um termociclador (ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems) sendo usado na reação de cada amostra 1 µL de cDNA, 1 x *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e 20 x *TaqMan Gene Expression Assay* (Osteopontina – SPP1: Rn00681031_m1) em volume final de 20 µL.

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Como controle de normalização interna utilizamos a amplificação do GAPDH (Rn01775763_g1). A quantificação da expressão gênica foi calculada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEM, 2001) utilizando como controle a expressão gênica dos ratos não tratados.

3.8. Medida plasmática de aldosterona e corticosterona

As concentrações de aldosterona e corticosterona foram determinadas em amostras de plasma por imunoenensaio enzimático (EIA).

As amostras de sangue para a medida de aldosterona (Aldosterone EIA Kit – Monoclonal No 10004377) foram coletadas em tubos com EDTA, centrifugadas a 3000

rpm por 15 minutos a 4°C e então armazenadas a -80°C até o momento da análise. As amostras de sangue para a medida de corticosterona (Corticosterona EIA Kit No 500651) foram coletadas em tubos com citrato, centrifugadas a 2300 rpm por 15 minutos a 4 °C e também armazenadas a -80 °C até o momento da análise.

Os métodos realizados para a detecção da concentração desses hormônios seguiram as instruções fornecidas pelo fabricante.

3.9. Drogas

As drogas utilizadas foram da Sigma-Aldrich, exceto: Losartana potássica (Medley), Espironolactona (EMS), DHE (D23107 Invitrogen), MnTMPyP (Calbiochem), Laemmli (BioRad), ECL™ (GE Healthcare), TRIzol (Invitrogen Life Technologies), TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems). EIA Kits (Cayman Chemical Company). Ensaio de expressão gênica (Biosystem). Anticorpos para o ensaio de Western blot: eNOS (BD Bioscience), ^{Ser1177}p-eNOS (Cell Signaling), ^{Thr495}p-eNOS (Millipore), HSP90 (Santa Cruz), Gα_{i1,2} (Upstate), Gα_{i3} (Upstate), Src (Millipore), ^{Tyr418}p-Src (Invitrogen), ERK (Cell Signaling), ^{Thr202/Tyr204}p-ERK (Cell Signaling), β-arrestina (Santa Cruz), MR (Abcam) e α-actina (Abcam).

3.10. Expressão dos dados e análise estatística

Os resultados estão apresentados como média ± EPM. A denominação “n” contida nos gráficos e tabelas representa o número de animais utilizados em cada

experimento. As respostas de relaxamento à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio estão expressas como a porcentagem em relação ao tônus obtido pela pré-contração com fenilefrina. As respostas de contração ao KCl e à fenilefrina estão expressas em mN por mm (mN/mm) do comprimento de cada anel de artéria. A resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e o logaritmo negativo das concentrações do agonista que produziram 50% do $R_{\text{máx}}$ ($-\text{Log EC}_{50}$) foram obtidos pela análise da regressão não-linear de cada curva concentração-resposta utilizando o software Graph Prism 5.0 (San Diego, EUA). O efeito da incubação com SOD ou L-NAME sob a resposta contrátil a fenilefrina foi comparada entre os grupos, e expressa como a diferença da área abaixo da curva concentração-resposta (dAUC) no controle e nas situações experimentais. As AUCs foram calculadas a partir de cada curva concentração-resposta e as diferenças foram expressas como a porcentagem da AUC para o controle correspondente.

As bandas obtidas pelo experimento de Western blot foram quantificadas mediante análise densitométrica. Para tal, as imagens salvas foram analisadas pela quantificação das bandas utilizando o programa de análise de imagens Image J 1.46p (NIH). A expressão das proteínas totais foi normalizada pela expressão da banda correspondente de α -actina na mesma amostra, uma vez que não houve diferença significativa da expressão proteica de α -actina entre os grupos estudados, enquanto que as formas fosforiladas foram normalizadas pela expressão da mesma proteína total da amostra. A expressão das proteínas está apresentada como porcentagem do grupo CT de cada membrana. A expressão de RNA mensageiro para osteopontina foi normalizada pela expressão de GAPDH do respectivo grupo experimental. A média do grupo controle foi definida como 1, e as médias individuais (normalizadas) dos outros

grupos como o número de vezes deste valor, baseado no método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). A quantidade de aldosterona e corticosterona estão expressas em pg/ mL.

A estatística dos dados foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA), duas vias, completamente randomizadas, seguida pelo *post-hoc* de Bonferroni utilizando-se o programa GraphPad Prism Software 5.0 (San Diego, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Massa corporal, hemodinâmica arterial e índice de hipertrofia ventricular

Os 7 dias de tratamento com ISO ou veículo, e com LOS ou ESP não alteraram significativamente a massa corpórea dos ratos (TABELA 1).

O tratamento com ISO não causou nenhuma alteração significativa na pressão arterial ou frequência cardíaca, como pode ser observado na TABELA 1. O tratamento com LOS reduziu a PAD e a PAM em ratos controle e co-tratados com ISO, e o tratamento com ESP não alterou a pressão arterial nem a frequência cardíaca nos grupos avaliados (TABELA 1).

Após o período de tratamento, o grupo ISO apresentou um aumento significativo da massa ventricular cardíaca (~30%) em comparação ao grupo CT (TABELA 1), evidenciando a eficácia de nosso modelo experimental em causar hipertrofia ventricular. Os co-tratamentos com LOS ou com ESP foram capazes de atenuar esse ganho na massa ventricular induzido pelo ISO em 8% e 13 %, respectivamente (TABELA 1), apontando a participação dos receptores AT₁ e MR no remodelamento ventricular induzido pelo ISO. LOS ou ESP não modificaram a massa ventricular em ratos controle (TABELA 1).

TABELA 1 Pressão arterial, frequência cardíaca, massa corpórea e índice de hipertrofia ventricular de ratos tratados por 7 dias com veículo (CT) ou isoproterenol (ISO) e co-tratados com losartan (LOS) ou espironolactona (ESP).

	CT (n=16)	LOS (n=10)	ESP (n=9)	ISO (n=10)	ISO+ LOS (n=12)	ISO+ ESP (n=8)
PAS (mmHg)	113 ± 5,5	116 ± 3,6	126 ± 3,3	117 ± 2,4	104 ± 2,2	122 ± 2,5
PAD (mmHg)	74 ± 2,1	58 ± 3,9 *	81 ± 4,0	81 ± 2,7	51 ± 3,1 #	83 ± 3,2
PAM (mmHg)	93 ± 1,6	77 ± 3,7 *	94 ± 3,3	94 ± 2,3	67 ± 3,6 #	97 ± 3,2
FC (bpm)	408 ± 8	412 ± 14	385 ± 11	386 ± 6	400 ± 14	382 ± 9
MC final (g)	374 ± 14	397 ± 8	369 ± 8	365 ± 8	380 ± 7	364 ± 9
MV/ MC final (mg/g)	2,64 ± 0,06	2,52 ± 0,03	2,48 ± 0,03	3,45 ± 0,10*	3,14 ± 0,10 ^{+#}	2,98 ± 0,03 ^{+#}

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca; MC: massa corpórea; MV: massa ventricular. Número de animais (“n”) utilizados encontra-se entre parênteses. Dados expressos como média ± EPM. ANOVA 2-vias: *p<0,05 vs. CT; †p<0,05 vs. LOS ou ESP; #p<0,05 vs. ISO.

4.2. Reatividade vascular em aorta

O delta de contração máxima induzido por 75 mM de KCl apresentou-se reduzido no grupo ISO. O co-tratamento de LOS em ratos ISO não modificou a resposta contrátil ao KCl em comparação ao grupo não tratado. O co-tratamento com ESP em ratos ISO reduziu ainda mais a contração ao KCl. ESP e LOS, *per se*, não interferiram nessa resposta (TABELA 2). Devido a essa alteração na resposta contrátil ao KCl, optou-se por apresentar a resposta contrátil da fenilefrina em mN/mm.

As respostas de relaxamento induzidas por acetilcolina e pelo nitroprussiato de sódio foram similares entre todos os grupos estudados (TABELA 2).

A resposta máxima de contração induzida pela fenilefrina foi aumentada no grupo ISO em comparação ao grupo CT, sem alteração da potência a este agonista α_1 -adrenérgico (FIGURA 1A, TABELA 2). O tratamento com LOS não foi capaz de reverter este efeito do ISO (FIGURA 1B, TABELA 2). Interessantemente, ESP reduziu significativamente a contração aumentada à fenilefrina causada pelo tratamento com isoproterenol, normalizando-a a níveis do respectivo grupo controle (FIGURA 1C, TABELA 2). Os tratamentos apenas com ESP ou LOS *per se* não modificaram a resposta contrátil da fenilefrina (TABELA 2).

TABELA 2 Contração máxima induzida por KCl 75 mM, potência (-Log EC₅₀) e resposta máxima (R_{máx}) de relaxamento, induzidos pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio, e de contração, induzida pela fenilefrina, em anéis de aorta de ratos tratados por 7 dias com veículo (CT) ou isoproterenol (ISO) e co-tratados com losartan (LOS) ou espironolactona (ESP).

		CT	LOS	ESP	ISO	ISO+ LOS	ISO+ ESP
Δ KCl (mN/mm)		8,83 ± 0,3	8,41 ± 0,4	8,80 ± 0,3	7,36 ± 0,3*	7,80 ± 0,3	6,54 ± 0,4 ⁺
Acetilcolina (%)	R _{máx}	88 ± 1,4	88 ± 2,4	92 ± 1,9	92 ± 1,9	89 ± 2,1	95 ± 1,9
	-Log EC ₅₀	7,3 ± 0,04	7,4 ± 0,09	7,5 ± 0,07	7,4 ± 0,07	7,4 ± 0,09	7,4 ± 0,04
Nitroprussiato de sódio (%)	R _{máx}	93 ± 4,3	94 ± 3,2	92 ± 2,7	96 ± 1,0	98 ± 2,1	97 ± 0,8
	-Log EC ₅₀	8,1 ± 0,1	7,7 ± 0,2	8,1 ± 0,1	7,8 ± 0,2	7,7 ± 0,3	8,0 ± 0,1
Fenilefrina (mN/mm)	R _{máx}	6,4 ± 0,5	6,3 ± 0,3	6,6 ± 0,2	8,8 ± 0,5*	8,6 ± 0,4 ⁺	6,3 ± 0,3 [#]
	-Log EC ₅₀	6,7 ± 0,06	6,8 ± 0,09	6,8 ± 0,05	6,8 ± 0,06	6,8 ± 0,08	6,8 ± 0,06

Dados expressos como média ± EPM. ANOVA 2-vias: *p<0,05 vs. CT; ⁺p<0,05 vs. LOS; [#] p<0,05 vs. ISO.

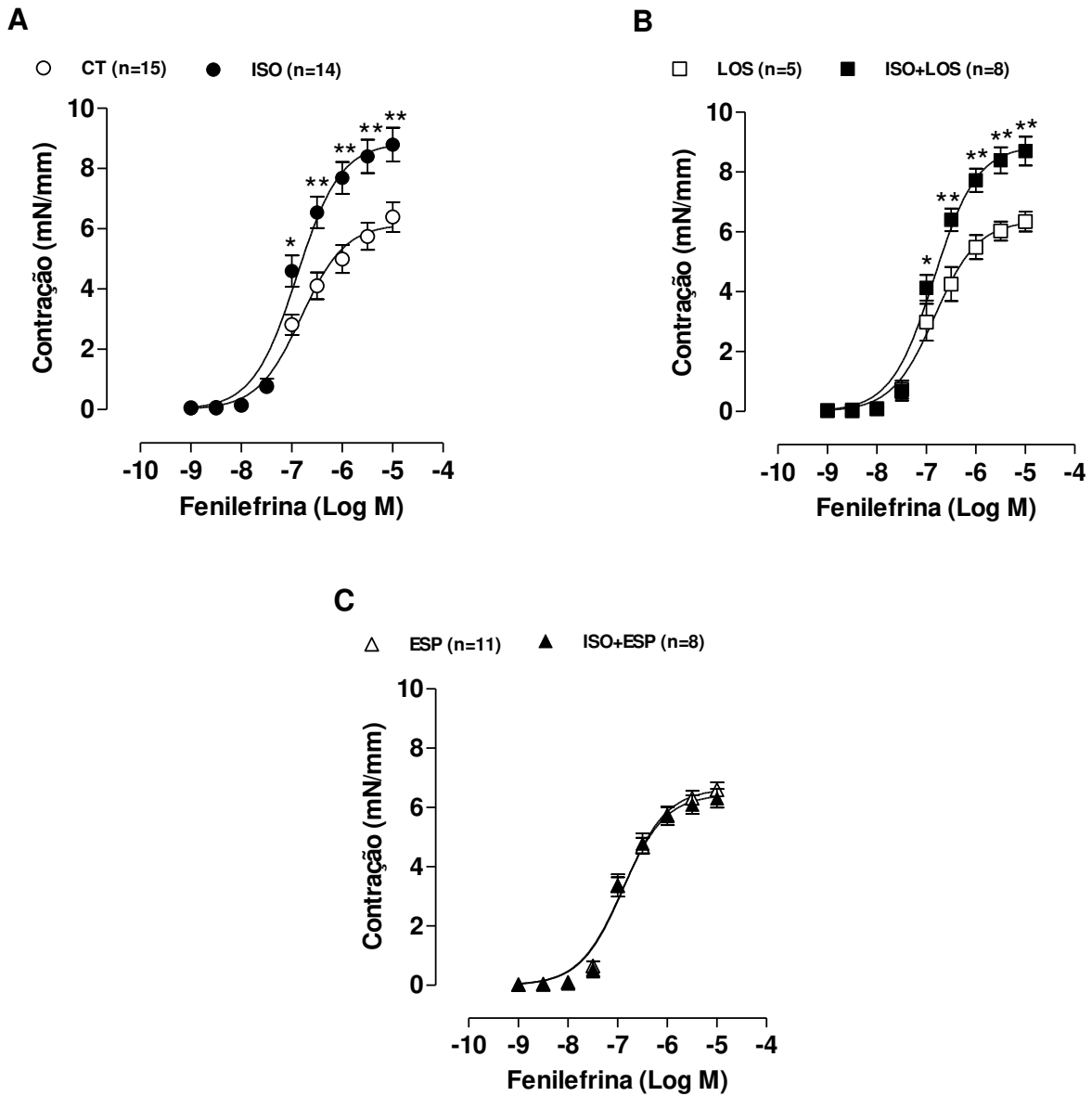


FIGURA 1 Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos tratados por 7 dias com veículo (CT) ou isoproterenol (ISO) (**A**) e co-tratados com losartan (LOS) (**B**) ou espironolactona (ESP) (**C**). Os dados estão expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) utilizados está indicado entre parênteses. ANOVA 2-vias. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ vs. respectivo grupo controle.

Uma vez que, apenas o co-tratamento com ESP foi eficaz em prevenir o aumento da resposta contrátil à fenilefrina induzido pelo isoproterenol, evidenciando o papel do receptor MR nessa disfunção vascular, fomos investigar quais os fatores estavam envolvidos no efeito benéfico do antagonismo do receptor MR.

Assim, avaliamos o papel do NO, incubando alguns anéis com o inibidor da NOS, o L-NAME. Essa incubação resultou em um aumento da resposta máxima e da potência da fenilefrina em todos os grupos estudados (FIGURA 2A-B, TABELA 3). Entretanto, o aumento da resposta máxima da fenilefrina induzido pelo L-NAME é mais significativo nos anéis de aorta dos grupos CT, ESP e ISO+ESP do que no grupo ISO (FIGURA 2A e 2B, TABELA 3). Após a incubação com L-NAME não há diferenças na resposta contrátil à fenilefrina entre os grupos estudados (TABELA 3). A dAUC entre as curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença e ausência de L-NAME foi menor na aorta do grupo ISO do que observada no grupo controle, e o co-tratamento com ESP foi capaz de prevenir essa redução (FIGURA 2C).

Também avaliamos a participação do ânion superóxido na resposta da fenilefrina incubando alguns anéis com SOD. A incubação com SOD no grupo CT ou tratados apenas com ESP não causou efeito significativo na resposta contrátil à fenilefrina (FIGURA 3A e 3B, TABELA 3). Nos anéis de aorta do grupo ISO, a SOD reduziu a $R_{máx}$ da fenilefrina, sem alterar a potência a este fármaco (FIGURA 3A, TABELA 3), efeito este que foi abolido no grupo ISO+ESP (FIGURA 3B, TABELA 3). A dAUC calculada entre presença e ausência de SOD foi maior no grupo ISO do que no grupo controle, e o co-tratamento com ESP foi capaz de prevenir este aumento (FIGURA 3C).

TABELA 3 Efeito das incubações com o inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME) e superóxido dismutase (SOD) na resposta contrátil à fenilefrina (E+) em anéis de aorta de ratos tratados por 7 dias com veículo (CT) ou isoproterenol (ISO) e co-tratados com espironolactona (ESP).

		CT	ESP	ISO	ISO+ ESP
E+ (mN/mm)	Emáx	6,4 ± 0,5	6,6 ± 0,2	8,8 ± 0,5*	6,3 ± 0,3 [#]
	-Log EC₅₀	6,7 ± 0,06	6,8 ± 0,05	6,8 ± 0,06	6,8 ± 0,06
E+/L-NAME (mN/mm)	Emáx	11,8 ± 0,7 ⁺⁺	12,2 ± 0,6 ⁺⁺	10,4 ± 0,4 ⁺	10,6 ± 0,6 ⁺⁺
	-Log EC₅₀	7,1 ± 0,08 ⁺	7,3 ± 0,04 ⁺	7,4 ± 0,06 ⁺	7,3 ± 0,07 ⁺
E+/ SOD (mN/mm)	Emáx	5,9 ± 0,6	6,2 ± 0,5	7,1 ± 0,2 ⁺	6,4 ± 0,5
	-Log EC₅₀	6,6 ± 0,08	6,6 ± 0,09	6,6 ± 0,07	6,6 ± 0,12

Dados expressos como média ± EPM. ANOVA 2 vias: *p<0,05 vs. CT; #p<0,05 vs. ISO; +p<0,05 ou ++p<0,001 vs. anel E+ sem incubação.

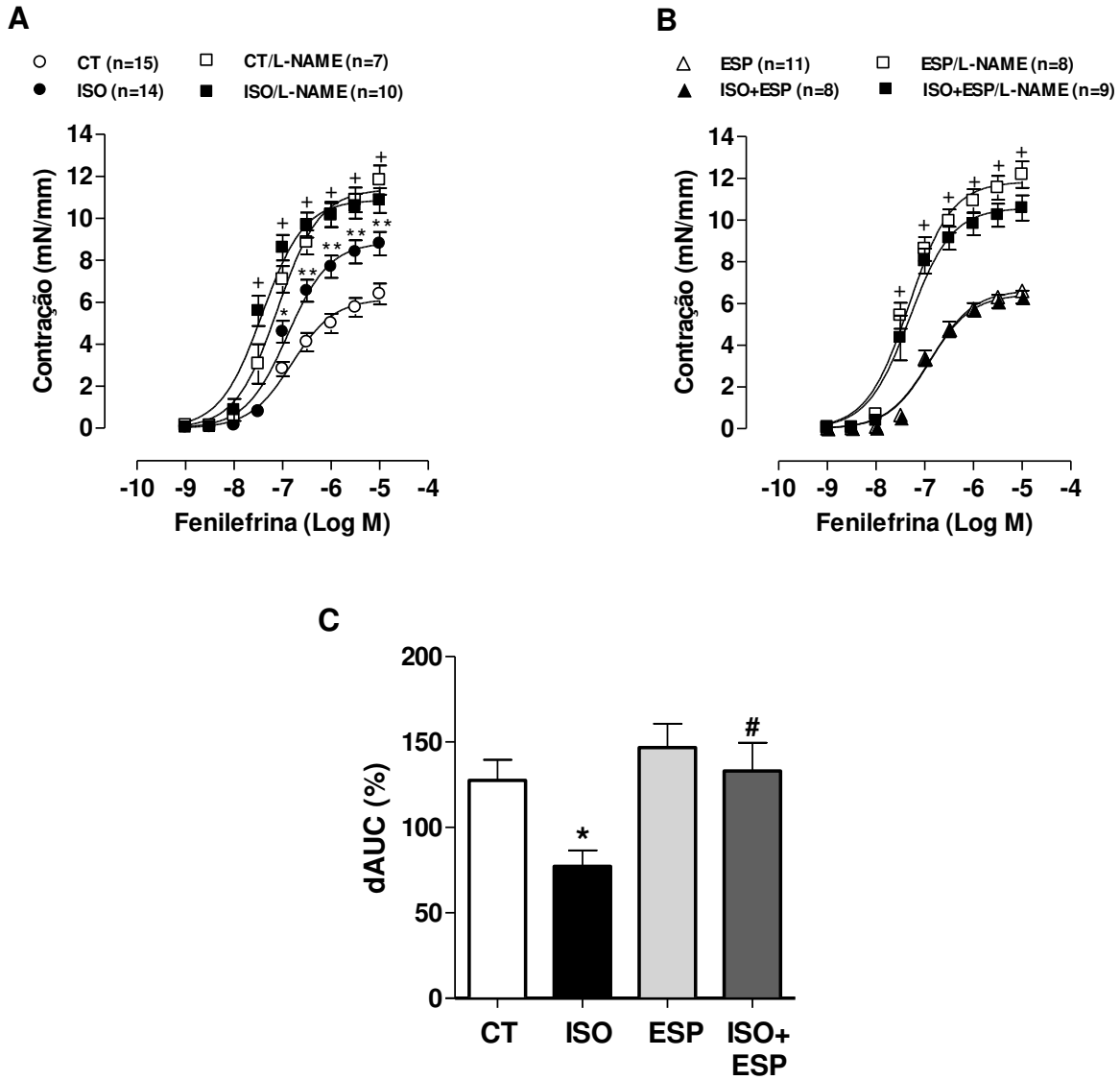


FIGURA 2 Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos tratados por 7 dias com veículo (CT) ou isoproterenol (ISO) e co-tratados espironolactona (ESP) incubados com o inibidor da óxido nítrico sintase, L-NAME (100 μ M) (**A-B**). Os dados estão expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) utilizados está indicado entre parênteses. ANOVA 2-vias. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ vs. respectivo grupo controle; + $p < 0,05$ vs. grupo sem incubação com L-NAME. dAUC calculada em anéis de aorta com e sem incubação com L-NAME (**C**); dAUC está expressa como porcentagem da AUC correspondente a curva de fenilefrina obtida em anéis de aorta sem incubação. ANOVA 2-vias. * $p < 0,05$ vs. CT; # $p < 0,05$ vs. ISO.

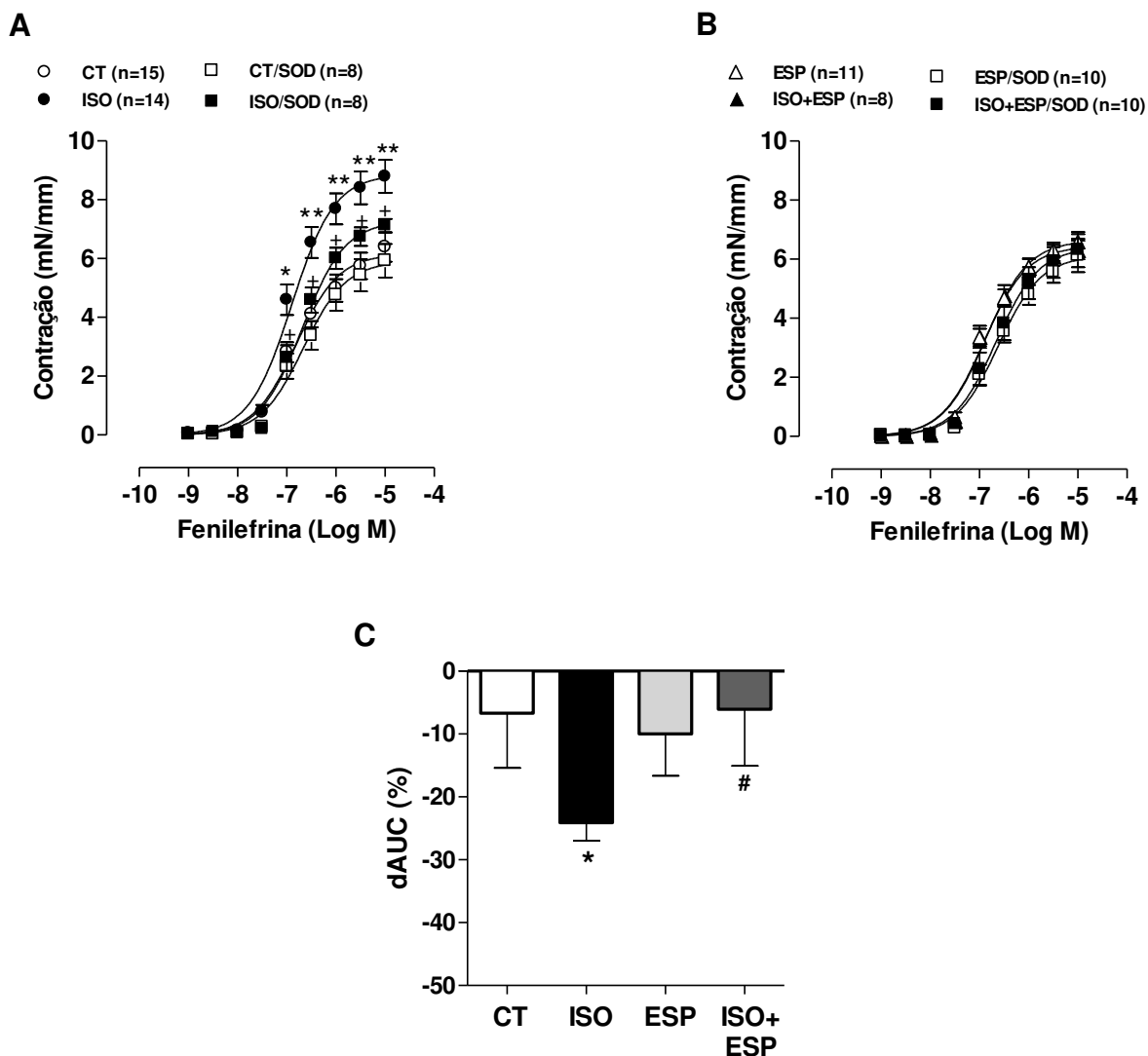


FIGURA 3 Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos tratados por 7 dias com veículo (CT) ou isoproterenol (ISO) e co-tratados espironolactona (ESP) incubados com a superóxido dismutase, SOD (150 U/mL) (**A-B**). Os dados estão expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) utilizados está indicado entre parênteses. ANOVA 2-vias. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ vs. respectivo grupo controle; + $p < 0,05$ vs. grupo sem incubação com SOD. dAUC calcular em anéis de aorta com e sem incubação com SOD (**C**); dAUC está expressa como porcentagem da AUC correspondente a curva de fenilefrina obtida em anéis de aorta sem incubação. ANOVA 2-vias. * $p < 0,05$ vs. CT; # $p < 0,05$ vs. ISO.

4.3. Avaliação da produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio em aorta

Em condições basais observou-se que o grupo tratado com ISO apresenta uma redução na produção de NO, a qual é indicada pela redução da fluorescência emitida pelo DAF-2 quando comparado ao grupo CT (FIGURA 4A-B). O co-tratamento de ISO com ESP foi eficaz em prevenir a redução na produção de NO (FIGURA 4A-B). O tratamento com ESP, *per se*, não modificou a produção de NO basal na aorta (FIGURA 4A-B).

As aortas do grupo tratado com ISO apresentaram um aumento na fluorescência emitida ao DHE quando comparado ao grupo CT, indicando um aumento na produção de EROs nesta artéria (FIGURA 5A e C). O co-tratamento com ESP foi capaz de reduzir a produção de EROs aumentada pelo ISO em níveis similares ao observado no respectivo grupo controle ESP (FIGURA 5A e C). A incubação de alguns cortes de aorta com L-NAME reduziu a fluorescência ao DHE apenas em aortas do grupo ISO (FIGURA 5B e C), indicando a produção de EROs pela NOS. O mimético da SOD MnTMPyP praticamente aboliu a fluorescência do DHE demonstrando que o ânion superóxido é a principal EROs detectada pelo DHE nestes vasos.

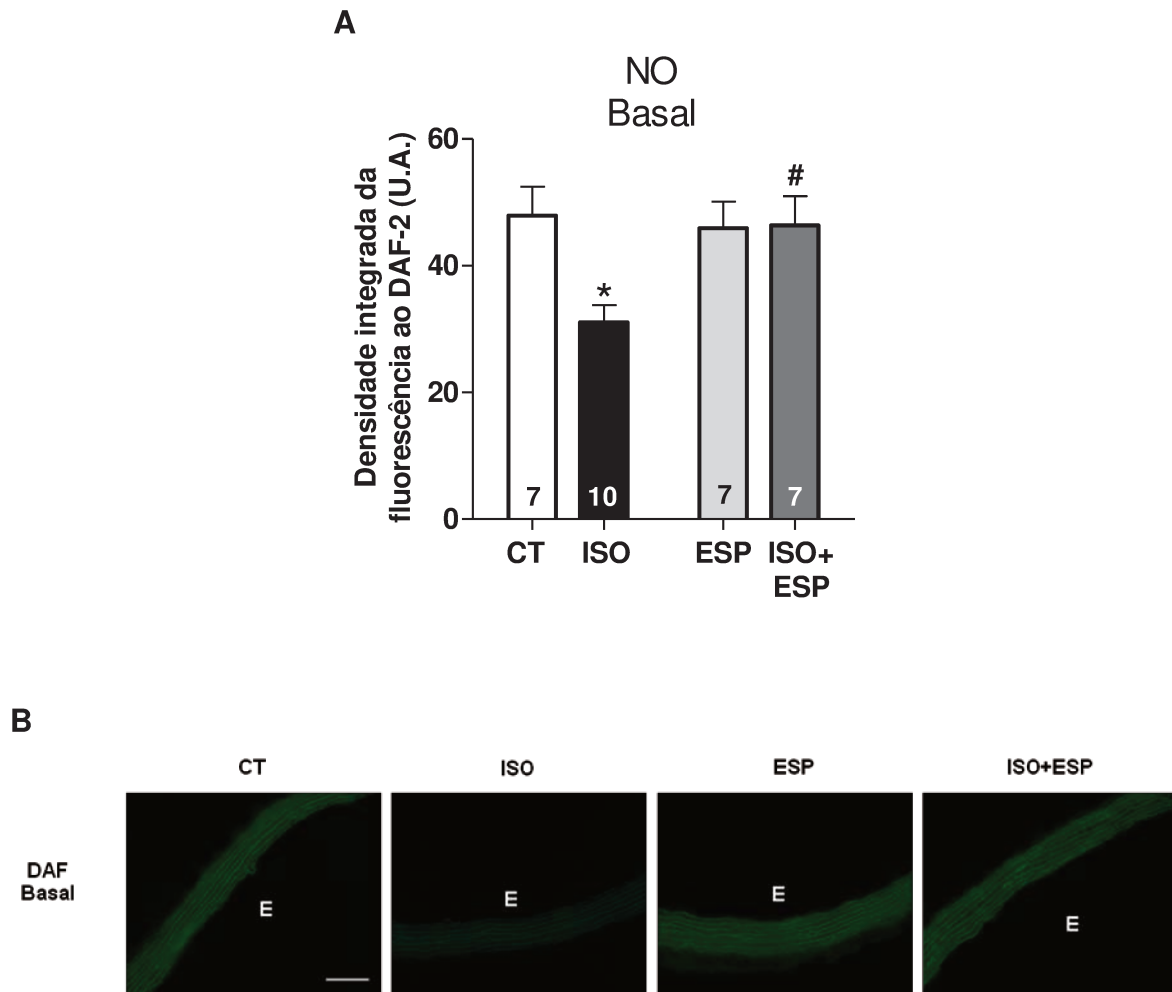


FIGURA 4 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) basal pela fluorescência da diaminofluoresceína (DAF, 8 μ M) (**A**) basal em cortes transversais de aorta de ratos tratados por 7 dias com veículo (CT) ou isoproterenol (ISO) e co-tratados com espironolactona (ESP). As imagens representativas de DAF basal (objetiva 20X) estão expressas em (**B**). O número de animais (n) está expresso dentro das barras. As barras representam média \pm EPM. ANOVA 2-vias: * $p < 0,05$ vs. CT; # $p < 0,05$ vs. ISO. E= camada endotelial. Barra branca= 100 μ m.

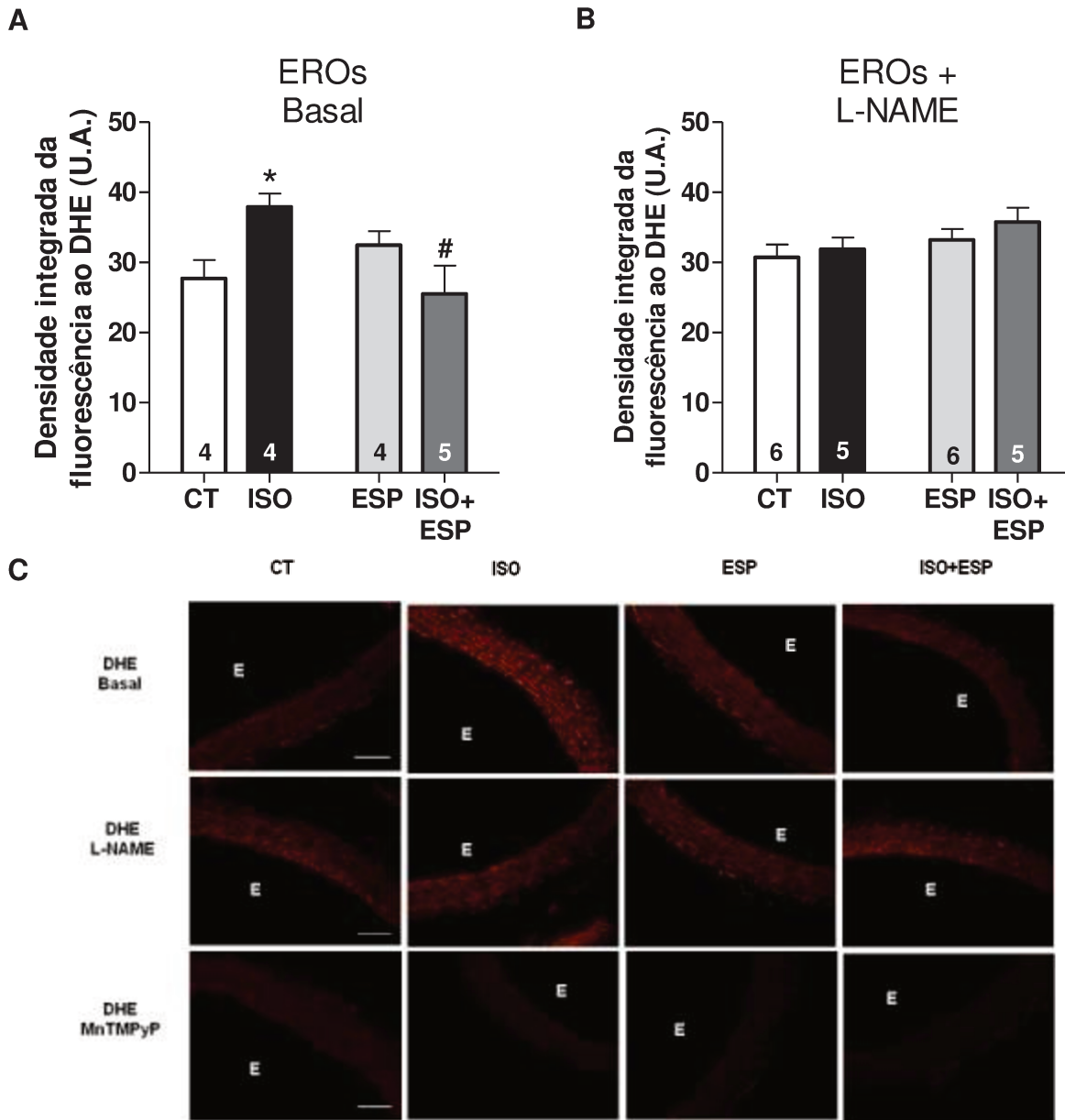


FIGURA 5 Avaliação da produção de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) pela fluorescência a dihidroetidina, DHE (2 μ M) **(A)** basal e **(B)** na presença de +L-NAME em cortes transversais de aorta de ratos tratados por 7 dias com veículo (CT) ou isoproterenol (ISO) e co-tratados com espirolactona (ESP). As imagens representativas de DHE basal e na presença de L-NAME ou de mimético da SOD (MnTMPyP) (objetiva 20X) estão apresentadas em **C**. O número de animais (n) está expresso dentro das barras. As barras representam média \pm EPM. ANOVA 2-vias: * $p < 0,05$ vs. CT; # $p < 0,05$ vs. ISO. E= camada endotelial. Barra branca= 100 μ m.

4.4. Expressão gênica e proteica em aorta

O tratamento com ISO aumentou a expressão proteica da eNOS na aorta desses animais e o co-tratamento com ESP não foi capaz de alterar essa resposta (FIGURA 6A). Entretanto, a fosforilação da eNOS em seu resíduo de ativação serina1177, encontra-se reduzida pelo tratamento com ISO, e novamente esse parâmetro não foi alterado pelo co-tratamento com ESP (FIGURA 6B). A fosforilação da eNOS em seu resíduo de inativação treonina 475 não foi alterada entre os grupos (FIGURA 6C).

A expressão da chaperona HSP90, uma proteína estabilizadora da forma dimérica da eNOS, foi reduzida pelo tratamento com ISO e, interessante, o co-tratamento com ESP preveniu essa redução (Figura 6D).

O tratamento por 7 dias com ISO foi capaz de aumentar a expressão proteica das proteínas $G\alpha_{i1,2}$ (FIGURA 7A), p-Src (FIGURA 7D), ERK1/2 (FIGURA 8A), p-ERK1/2 (FIGURA 8B) e β -arrestina (FIGURA 8D), sem alteração da expressão proteica de $G\alpha_{i3}$ (FIGURA 7B), Src (FIGURA 7C) e do receptor MR (FIGURA 8C). O co-tratamento de ISO e ESP reverteu os efeitos observados do ISO na expressão destas proteínas (FIGURA 7 e 8).

O tratamento com ISO aumentou a expressão gênica da osteopontina e o co-tratamento com ESP foi capaz de prevenir este efeito (FIGURA 9).

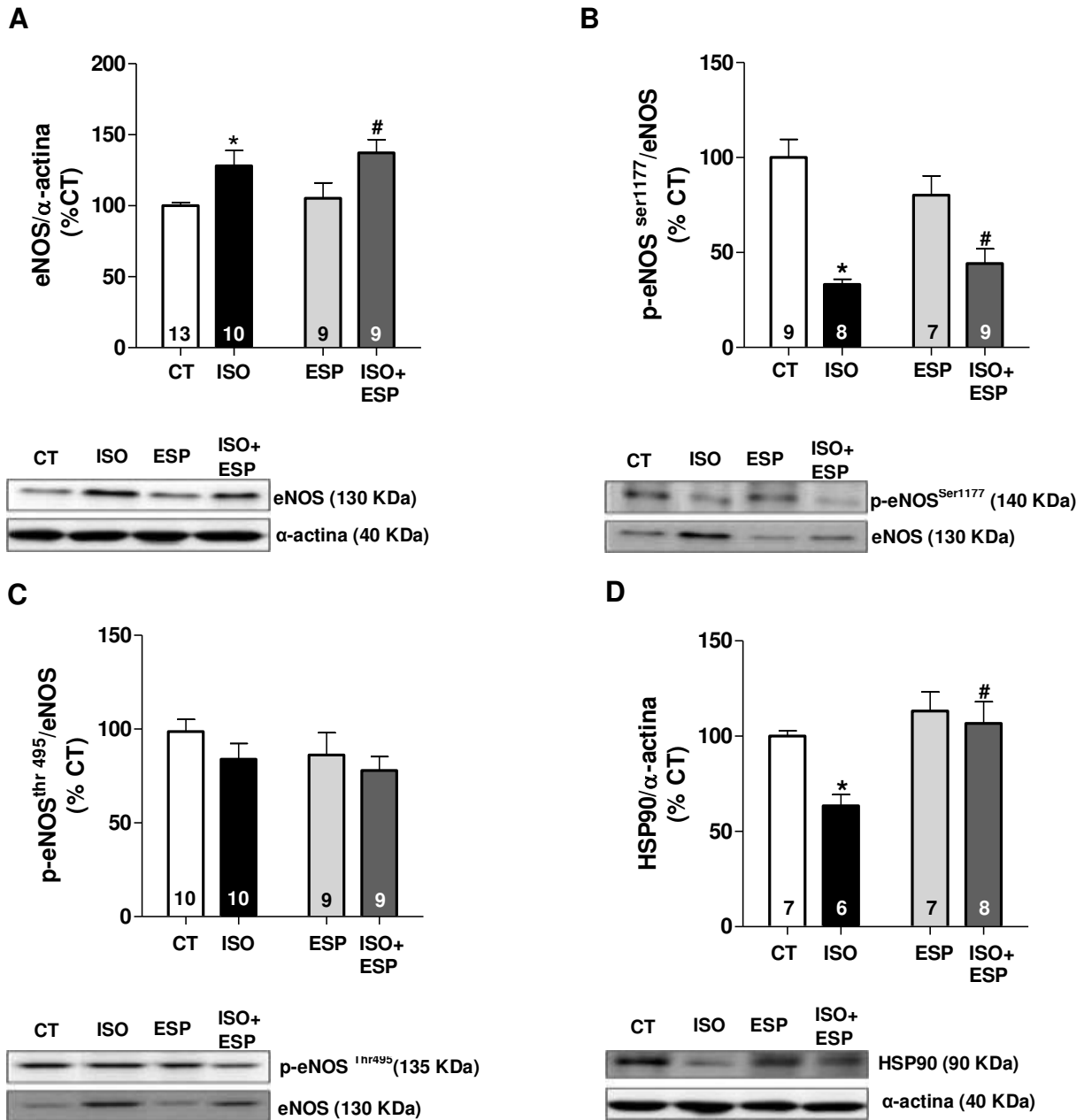


FIGURA 6 Expressão proteica da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) total (**A**) e fosforiladas no resíduo serina 1177 (^{Ser1177}p-eNOS) (**B**) e treonina 495 (^{Thr495}p-eNOS) (**C**) e da chaperona HSP-90 (**D**) em aortas de ratos controle (CT), tratados com isoproterenol (ISO) e co-tratados com espironolactona (ESP). A expressão das proteínas estão apresentadas como porcentagem do grupo CT. O número de animais (n) está expresso dentro das barras. Dados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA 2- vias, $p < 0,05$: * vs. CT; # vs. ISO; + vs. ESP.

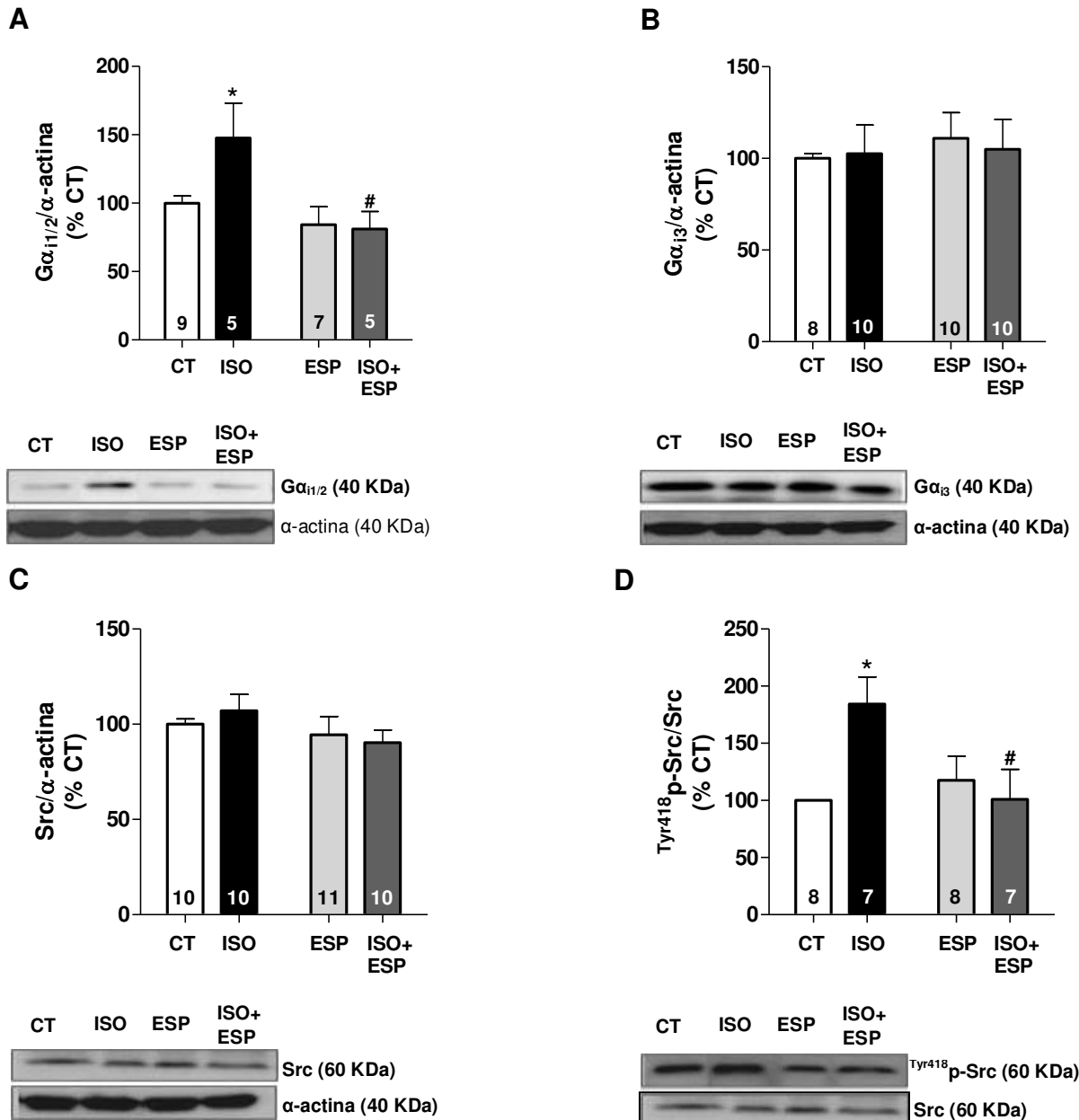


FIGURA 7 Expressão proteica de $G\alpha_{1,2}$ (A), $G\alpha_{13}$ (B), Src total (C) e fosforilada no resíduo de ativação Tyr418 (Tyr418 p-Src) (D) em aorta de ratos controle (CT), tratados com isoproterenol (ISO) e co-tratados com espironolactona (ESP). Imagens representativas estão apresentadas no painel inferior de cada gráfico. A expressão das proteínas estão apresentadas como porcentagem do grupo CT. O número de animais (n) está expresso dentro das barras. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA 2-vias, $p < 0,05$: * vs. CT; # vs. ISO; + vs. ESP.

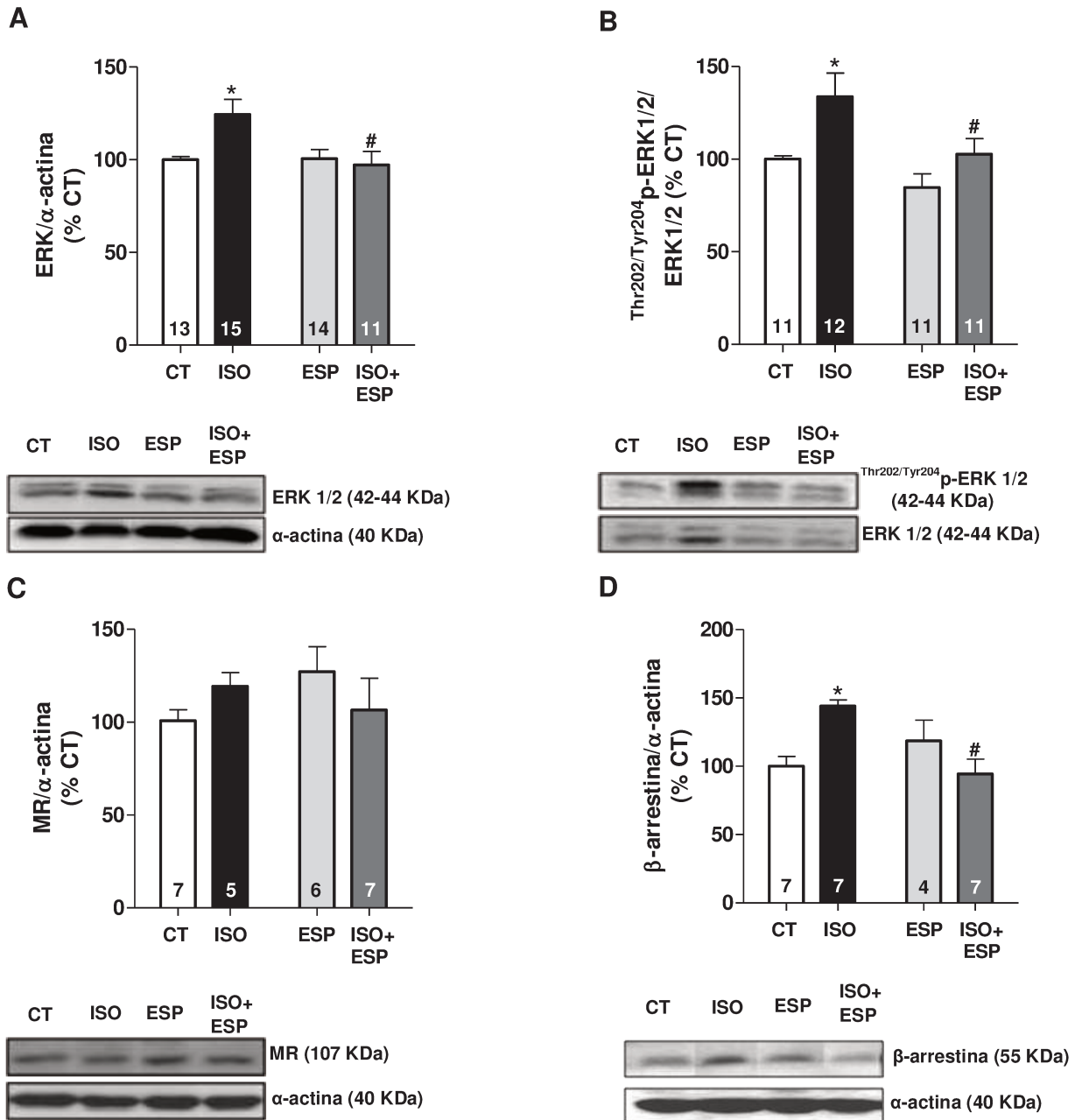


FIGURA 8 Expressão proteica da ERK1/2 total (**A**) e fosforilada no resíduo Thr202/Tyr204 ($^{Thr202/Tyr204}$ p-ERK1/2), do receptor MR (**C**) e da β -arrestina (**D**) em aorta de ratos controle (CT) e tratados com isoproterenol (ISO) e co-tratados com espironolactona (ESP). Imagens representativas estão apresentadas no painel inferior de cada gráfico. A expressão das proteínas estão apresentadas como porcentagem do grupo CT. O número de animais (n) está expresso dentro das barras. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA 2-vias, $p < 0,05$: * vs. CT; # vs. ISO.

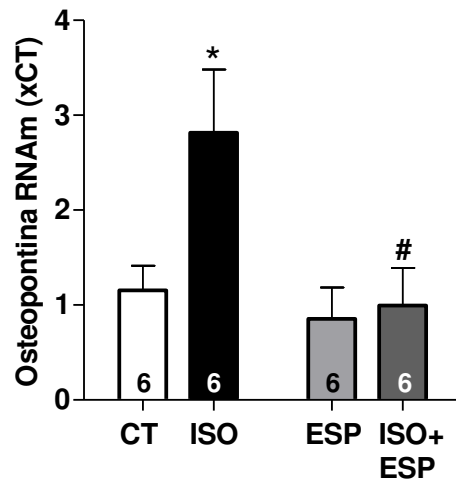


FIGURA 9 Expressão gênica da osteopontina em aortas de ratos controle (CT), tratados com isoproterenol (ISO) e co-tratados com espironolactona (ESP). A expressão de RNA mensageiro foi avaliada por PCR em tempo real e está representada como porcentagem do valor médio obtido em ratos controles normalizado pelo ciclo correspondente para GAPDH. O número de animais (n) está expresso dentro das barras. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA 2-vias, $p < 0,05$: * vs. CT; # vs. ISO.

4.5. Medida plasmática de aldosterona e corticosterona

O tratamento com ISO não alterou a concentração plasmática de aldosterona enquanto que o tratamento com ESP aumentou essa concentração em ratos ESP e ISO+ESP (FIGURA 10A). A concentração de corticosterona não foi modificada significativamente entre os grupos (FIGURA 10B).

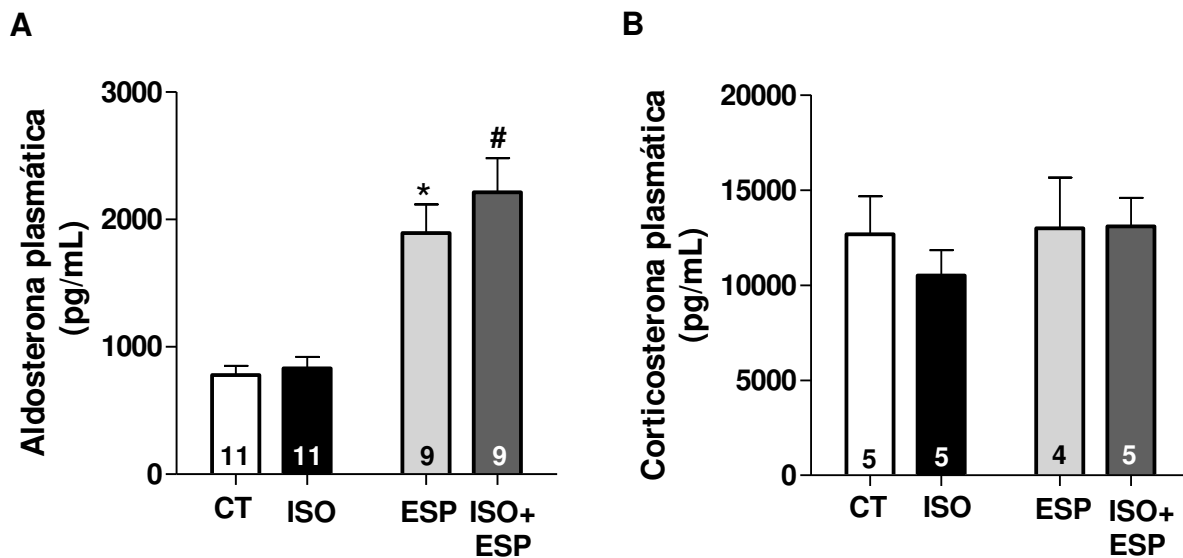


FIGURA 10 Valores plasmáticos de (A) aldosterona e (B) corticosterona de ratos controle (CT), tratados com isoproterenol (ISO) e co-tratados com espironolactona (ESP). O número de animais (n) está expresso dentro das barras. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA 2-vias, $p < 0,05$: * vs. CT; # vs. ISO.

5. DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que a exposição prolongada ao agonista β -adrenérgico isoproterenol, além de causar remodelamento cardíaco, é capaz de aumentar a resposta constritora à fenilefrina em aorta de ratos via redução da biodisponibilidade de NO e aumento da produção de ânion superóxido (DAVEL *et al.*, 2006; 2008). Além disso, demonstrou-se previamente que a espironolactona, um antagonista do receptor MR, previne as alterações cardíacas causadas pelo isoproterenol: hipertrofia, fibrose, inflamação e disfunção diastólica, via redução do principal mediador de ação celular da aldosterona, o SGK1 (MARTÍN-FERNANDEZ *et al.*, 2012). E no presente estudo estamos mostrando pela primeira vez que as alterações vasculares causadas pela ativação sustentada dos receptores β -AR via tratamento com isoproterenol são prevenidas pela espironolactona, mas não pelo losartan, em aorta de ratos. O uso de espironolactona normalizou a biodisponibilidade de NO, o estresse oxidativo e hipercontratibilidade à fenilefrina induzidas no grupo ISO, associado à reversão do aumento da expressão proteica de $G\alpha_i$, p-Src, ERK1/2, p-ERK1/2 e β -arrestina e da expressão gênica de osteopontina causados pela hiperativação dos receptores β -AR; além de normalização dos níveis proteicos de HSP-90, chaperona crucial para estabilização da forma dimérica da eNOS. Em conjunto, os dados indicam uma associação da via do receptor β -AR e receptor MR, independente do receptor AT_1 , e reforça o papel da hiperativação β -adrenérgica e do receptor MR na patogênese da injúria vascular, mesmo na ausência de alterações da pressão arterial.

No modelo experimental utilizado, induzimos a hiperativação dos receptores β -AR através da administração diária de isoproterenol por 7 dias. Como descrito por outros autores, esta dose e tempo de administração é capaz de causar remodelamento cardíaco dependente da ativação do receptor β -AR, sem alterações hemodinâmicas arteriais ou ventriculares significativas (TAYLOR & TANG, 1984; DAVEL *et al.*, 2006, 2008; KIM *et al.*, 2012). O remodelamento cardíaco é iniciado após 24 horas de administração da primeira dose de isoproterenol, atinge o máximo após 4 dias de administração e platoniza com 7 dias (TAYLOR & TANG, 1984; TANG *et al.*, 1987). De acordo, observou-se no presente estudo que a administração diária de isoproterenol por 7 dias causou aumento da razão massa ventricular/massa corporal sem alterar a pressão arterial avaliada diretamente por canulação da artéria carótida direita. Sabe-se que alterações hemodinâmicas podem induzir *per se* sinalizações vasculares, detectadas por integrinas e canais iônicos da membrana plasmática das células vasculares sensíveis a deformações mecânicas causadas pelo estresse de cisalhamento do sangue nas células endoteliais e/ou pelo estiramento das células musculares lisas (LEHOUX *et al.*, 2006). Assim, o presente modelo experimental é vantajoso no sentido que permite avaliar os efeitos vasculares da hiperativação dos receptores β -AR independente de alterações hemodinâmicas.

O aumento de massa ventricular observada no grupo ISO foi parcialmente prevenido pela coadministração do antagonista AT_1 , o losartan, apesar de este fármaco não apresentar efeitos sobre as alterações vasculares induzidas pelo isoproterenol em anéis de aorta. O papel da angiotensina II mediando os efeitos cardíacos da hiperativação dos receptores β -AR ainda é controverso. LEENEN e colaboradores

(2001) observaram que o tratamento com isoproterenol aumenta a atividade da renina plasmática, e os níveis de angiotensina I e II plasmáticos e cardíacos, mas o tratamento com losartan ou quinapril não modifica nem a hipertrofia nem a fibrose cardíaca induzida pela hiperativação β -AR. Em contraposição, GRIMM e colaboradores (1998; 1999) demonstraram que o uso do losartan ou do inibidor da ECA, ramipril, reduziu significativamente a hipertrofia e a fibrose cardíaca induzida pelo isoproterenol. Mas vale ressaltar que nos trabalhos de GRIMM e colaboradores, a dose de isoproterenol administrada foi capaz de induzir insuficiência cardíaca, indicando que o efeito anti-hipertrofico do bloqueio do SRA neste caso poderia ser secundário a alterações hemodinâmicas induzidas pelo bloqueio AT_1 .

A redução da pressão arterial em animais tratados com antagonistas do receptor AT_1 foi descrita previamente em outros estudos (GRIMM *et al.*, 1998; COLLISTER & HENDEL, 2003; ZHANG *et al.*, 2007). O efeito hipotensor do tratamento com LOS parece ser independente do efeito do anestésico, uma vez que estudos que utilizaram de medidas de pressão em rato acordados por pletismografia de cauda (ZHANG *et al.*, 2007) ou por telemetria (COLLISTER & HENDEL, 2003) observaram o mesmo efeito hipotensor do losartan. Vale ressaltar que camundongos deficientes para o receptor AT_{1a} apresentam redução da pressão arterial sistólica quando comparado ao grupo controle, sugerindo que a hipotensão é diretamente relacionada a menor ou não ativação deste receptor (ZHANG *et al.*, 2007), semelhante ao observado com o uso do antagonista do receptor AT_1 , o losartan. Outra hipótese que poderia explicar a hipotensão observada nos animais tratados com LOS estaria relacionada à síntese de outros peptídeos do sistema renina-angiotensina (SRA) a partir da angiotensina II,

como a angiotensina 1-7. Nesse sentido, COLLISTER & HENDEL (2003) observaram que o tratamento com losartan (10 mg/kg/dia) em ratos consumindo uma dieta com quantidade normal de sódio apresentam hipotensão, associado a aumento dos níveis de angiotensina 1-7; e o tratamento com A779, antagonista da ação da angiotensina 1-7, atenuou a hipotensão causada pelo tratamento apenas com LOS, sugerindo que a angiotensina 1-7 pode contribuir para o efeito hipotensor do losartan. Entretanto, apesar dos efeitos hipotensor e anti-hipertrófico observados nos grupos tratados com losartan no presente estudo, este fármaco não foi capaz de prevenir os efeitos na função vascular induzidos pela hiperativação β -adrenérgica.

A espironolactona além de atenuar o efeito hipertrófico cardíaco do tratamento com isoproterenol preveniu as alterações vasculares induzidas pela hiperativação β -AR, normalizando a reatividade da aorta torácica, especificamente a aumentada resposta contrátil à fenilefrina observada, sem alterar a pressão arterial dos animais. Em somatória, dados prévios de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o bloqueio do receptor MR com espironolactona previne o remodelamento cardíaco induzido pelo tratamento com isoproterenol em ratos, inibindo a síntese de colágeno, de enzimas oxidantes e de citocinas pró-inflamatórias (MARTIN-FERNANDEZ *et al.*, 2012). Estes dados sugerem que a ativação do receptor MR está envolvida nos efeitos cardiovasculares da hiperativação β -adrenérgica. De acordo com esta hipótese, observamos um aumento da expressão gênica de osteopontina na aorta dos animais do grupo ISO, que foi prevenido pelo tratamento com espironolactona. A osteopontina é uma glicofosfoproteína multifuncional secretada por diversos tipos celulares incluindo células endoteliais e de músculo liso vascular (O'BRIEN *et al.*, 1994; SUGIYAMA *et al.*,

2005; FU *et al.*, 2012). A ativação do receptor MR induz a expressão gênica da osteopontina de maneira tempo dependente tanto em células endoteliais como em células de músculo liso vascular, sendo esta responsável por iniciar as alterações vasculares causadas por este hormônio, sendo mediadora dos efeitos pró-inflamatórios e pró-fibróticos da aldosterona (SUGIYAMA *et al.*, 2005; FU *et al.*, 2012). Assim, sugere-se que o tratamento com isoproterenol cursa com a ativação da sinalização celular induzida pelo receptor MR na aorta.

A importância clínica da osteopontina tem sido demonstrada, uma vez que há uma correlação positiva entre o grau de severidade da insuficiência cardíaca com o aumento de osteopontina plasmática (ROSENBERG *et al.*, 2008). A utilização de antagonistas do receptor MR reduz a expressão gênica de osteopontina tanto em coração (NAGATA *et al.*, 2006) quanto em aorta de ratos hipertensos (LEA *et al.*, 2009), reforçando o papel da ativação do receptor MR na indução gênica de osteopontina. Assim, nossos dados indicam que há ativação da via do receptor MR na aorta dos animais tratados com ISO e a inibição desta via está associada aos efeitos benéficos da espironolactona.

Na aorta dos animais do grupo ISO observamos uma redução da participação do NO na resposta contrátil da fenilefrina, o que pode ser evidenciado pelo menor efeito da incubação com L-NAME na aorta desses animais. Essa redução foi associada à menor produção e/ou biodisponibilidade de NO nesses vasos, uma vez que a fluorescência ao DAF-2, sonda específica para marcar NO, foi reduzida na aorta do grupo ISO. Além disso, quando os anéis de aorta foram incubados com SOD, houve a normalização da contração à fenilefrina na aorta de ratos ISO. A fluorescência ao DHE corroborou este

dado, apresentando-se elevada em aorta dos animais ISO e corrigida pela incubação dos cortes com o mimético da SOD, MnTMPyP. Em conjunto estes dados evidenciam que há um aumento de EROs, nesse caso, de ânion superóxido, mediando o aumento da resposta contrátil à fenilefrina, e provavelmente associado à redução da biodisponibilidade de NO. Estes dados estão de acordo com resultados prévios de nosso grupo de pesquisa e de outros pesquisadores que demonstraram que aorta de ratos tratados por 7 dias com isoproterenol apresentam estresse oxidativo e aumento da contratilidade a fenilefrina, sem alteração da função relaxante vascular (KRENEK *et al.*, 2006; DAVEL *et al.*, 2006; 2008; FUKUDA *et al.*, 2008).

O tratamento com espironolactona preveniu o aumento da contratilidade à fenilefrina, associado a um aumento da biodisponibilidade de NO e redução do estresse oxidativo induzido na aorta de ratos do grupo ISO, indicando o envolvimento da sinalização do receptor MR no desbalanço NO/ânion superóxido vascular observado neste modelo experimental. Já foi demonstrado que a aldosterona aumenta o estresse oxidativo tanto em células musculares lisas (CALLERA *et al.*, 2005) quanto em artéria mesentérica (XAVIER *et al.*, 2011) de ratos SHR, de maneira dependente da estimulação do receptor MR. Assim, é plausível a hipótese de que ligantes do receptor MR possam mediar os efeitos oxidantes da ativação crônica dos receptores β -AR nas células vasculares.

Apesar da redução dos níveis basais de NO observados na aorta do grupo ISO, a expressão proteica total da eNOS foi aumentada. Assim, levantamos a hipótese que a redução dos níveis basais de NO poderia estar relacionada a alterações pós-traducionais da eNOS, como alterações na fosforilação em sítios de ativação e

inativação, desacoplamento da eNOS, redução de substrato e/ou co-fatores, como a L-arginina e a tetrahydrobiopterina (BH₄) e/ou menor interação com a HSP-90 (CARNICER *et al.*, 2013). Avaliamos então a fosforilação da eNOS em seu sítio de ativação serina 1177 e no sítio de inativação treonina 495. Não foram observadas alterações na fosforilação dessa enzima em treonina 495, mas houve redução da expressão da eNOS fosforilada em serina 1177 na aorta do grupo ISO, indicando uma menor atividade desta enzima para sintetizar NO, mesmo com um aumento da sua expressão total. Apesar da redução da fosforilação da eNOS em serina 1177 e do estresse oxidativo induzidos pela hiperativação β -adrenérgica, a aorta dos animais tratados com isoproterenol não apresentou alteração do relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina. Este resultado está de acordo com dados prévios da literatura (KRENEK *et al.*, 2006; DAVEL *et al.*, 2006) e é possível que apesar do NO basal estar prejudicado, a estimulação da produção de NO pela acetilcolina esteja mantida pelo aumento da eNOS total.

Na aorta do grupo ISO, a expressão da proteína HSP-90 foi reduzida, e o tratamento com espirolactona foi capaz de prevenir esse efeito. A HSP90 é uma chaperona envolvida no tráfego e no acoplamento de proteínas, e este envolvimento estende-se à eNOS. GARCIA-CARDEÑA e colaboradores (1998) demonstraram em lisado de aorta que a eNOS e HSP90 formam um complexo, e que esta interação aumenta a atividade da eNOS. A interação da eNOS com a HSP90 estabiliza a forma dimérica da eNOS, e assim aumenta a produção de NO (PRITCHARD *et al.*, 2001; OU *et al.*, 2003), enquanto que uma redução da interação da HSP90/eNOS, além de reduzir a produção de NO, aumenta a produção de ânion superóxido via eNOS (PRITCHARD

et al., 2001; SONG *et al.*, 2002). Assim, a redução da quantidade de HSP90, em conjunto com a normalização da produção de EROs nas aortas incubadas com L-NAME, sugere a geração de ânion superóxido via eNOS em resposta à hiperestimulação β -AR.

O co-tratamento do grupo ISO com ESP não alterou nem a expressão aumentada da eNOS, nem sua reduzida fosforilação em serina 1177. Já foi demonstrado que o bloqueio do receptor MR pode melhorar a produção de NO por aumentar a expressão de eNOS total e fosforilada em serina 1177 em aorta de animais com insuficiência cardíaca (THAI *et al.*, 2006; SARTÓRIO *et al.*, 2007) e SHR (SANZ-ROSA *et al.*, 2005b). Entretanto, não parece ser por este mecanismo que o antagonismo do receptor MR aumenta a produção de NO em aorta de ratos submetidos à hiperativação dos receptores β -AR. Interessantemente, a espironolactona normalizou a expressão proteica de HSP90 vascular e a produção de ânion superóxido dependente de NOS. Assim, o presente estudo destaca pela primeira vez na literatura um efeito benéfico do antagonismo MR em reduzir o estresse oxidativo vascular associado à normalização do conteúdo de HSP90. Este efeito provavelmente causa a estabilização da forma dimérica da eNOS, o que melhora sua atividade em sintetizar NO e reduz a produção de ânion superóxido.

Tem sido demonstrado que antagonistas do receptor MR apresentam efeito antioxidante, e este é um mecanismo associado à normalização do tônus vascular e biodisponibilidade de NO em diferentes modelos experimentais de doenças cardiovasculares (RAJAGOPALAN *et al.*, 2002; VIRDIS *et al.*, 2002; SARTÓRIO *et al.*, 2007; NAKAMURA *et al.*, 2011; SCHAFER *et al.*, 2013). O efeito antioxidante dos

antagonistas dos receptores MR tem sido principalmente relacionado à inibição da atividade da enzima NADPH oxidase (RAJAGOPALAN *et al.*, 2002; VIRDIS *et al.*, 2002; SARTÓRIO *et al.*, 2007; NAKAMURA *et al.*, 2011; SCHAFER *et al.*, 2013). Nesse sentido, a eplerenona por atenuar a geração de EROs da NADPH oxidase, reduz a oxidação de BH₄, que é um importante cofator para a produção de NO pela eNOS, por manter a eNOS dimerizada (IMANISHI *et al.*, 2008). Entretanto, já foi demonstrado que um aumento da atividade da NADPH oxidase não parece ser o mecanismo associado ao estresse oxidativo induzido pela hiperativação β -AR neste modelo experimental (DAVEL *et al.*, 2006).

A ativação crônica dos receptores β -AR pode cursar com a sua dessensibilização e desacoplamento da proteína G α_s por ativação da via GRK-2/ β -arrestina, além de mudança da via de sinalização de G α_s para G α_i (BRISTOW, 2011). Assim, levantamos a hipótese que os efeitos vasculares da ativação sustentada dos receptores β -AR induzida pelo tratamento com isoproterenol poderiam ser mediados pela via G α_i e/ou GRK-2/ β -arrestina, e que o bloqueio dos receptores MR poderia apresentar efeito benéfico modulando a expressão destes fatores. Nossos dados demonstraram um aumento da expressão proteica de β -arrestina e da proteína G $\alpha_{i1,2}$ na aorta do grupo ISO, sugerindo que a sinalização celular associada a estas duas proteínas estão primariamente envolvidos nos efeitos vasculares da hiperativação dos receptores β -AR. Apesar da regulação positiva da β -arrestina, o efeito vasodilatador induzido pela administração de isoproterenol *in vitro* diretamente nos anéis de aorta do grupo ISO é preservado (DAVEL *et al.*, 2006), indicando que a sinalização do receptor β -AR aguda está mantida.

A ligação do receptor β -AR com a proteína $G\alpha_i$ ativa uma via de sinalização associada à ativação das proteínas Src e ERK (DAAKA *et al.*, 1997; BAILLIE *et al.*, 2003). Além disso, a proteína β -arrestina associa-se a MEK1 (MAPK kinase) e ativa a ERK (SHENOY *et al.*, 2006; MENG *et al.*, 2009). De acordo, observamos um aumento da fosforilação de Src e de ERK1/2 na aorta do grupo ISO. Corroborando esses dados, BAILLIE e colaboradores (2003) demonstraram que em cardiomiócitos a ativação dos receptores β -AR com isoproterenol muda o acoplamento desse receptor da proteína $G\alpha_s$ para $G\alpha_i$, agora ativando a cascata de sinalização da ERK1/2. E dados recentes de nosso grupo demonstram que a ativação crônica do receptor β_2 -AR é associada a um aumento da expressão de p-ERK1/2 em aorta de camundongos (DAVEL *et al.*, submetido). No presente estudo, demonstramos ainda que o aumento da expressão proteica de $G\alpha_i$, β -arrestina, p-Src, ERK1/2 e p-ERK1/2 foram prevenidos pela coadministração de isoproterenol e espironolactona. Estudo prévio demonstrou que a estimulação de células musculares lisas com aldosterona pode ativar Src e ERK1/2 em minutos, estendendo-se por horas, efeito mediado por receptor MR (CALLERA *et al.*, 2005). Assim, é plausível a hipótese de que um ligante do receptor MR possa estar envolvido na sinalização celular associados aos efeitos vasculares da estimulação β -adrenérgica sustentada.

A aldosterona e os glicocorticoides corticosterona e cortisol se ligam ao receptor MR aproximadamente com a mesma afinidade (ARRIZA *et al.*, 1987). No presente estudo medimos as concentrações plasmáticas de aldosterona e corticosterona, principal glicocorticoide em roedores, utilizando kits comerciais de imunoenensaio enzimático específicos. Observamos que o tratamento com isoproterenol não modificou

as concentrações plasmáticas de aldosterona nem de corticosterona. Este resultado foi diferente do observado em estudo prévio da literatura onde obtiveram aumento de aldosterona plasmática em ratos tratados com isoproterenol (GRIMM *et al.*, 1998). Entretanto, neste prévio estudo os autores utilizaram uma dose de isoproterenol 500x maior (150 mg/kg) que a do atual trabalho, sendo capaz de induzir alterações hemodinâmicas significativas, se caracterizando como modelo de insuficiência cardíaca, dificultando a interpretação dos efeitos da hiperativação β -adrenérgica *per se* no SRAA. Além disso, não podemos descartar a hipótese de que, apesar de não modificar as concentrações plasmáticas de aldosterona e corticosterona, a hiperativação β -adrenérgica no modelo utilizado no presente estudo possa modular a produção local desses hormônios como no tecido adiposo perivascular, uma vez que já foi demonstrado que adipócitos isolados apresentam maquinaria funcional para sintetizá-los (BRIONES *et al.*, 2012). Considerando-se que não houve alteração nem da quantidade de receptor MR vascular, nem da concentração plasmática de seus principais ligantes endógenos, sugere-se que o tratamento com isoproterenol aumenta a afinidade do receptor MR por algum dos seus ligantes.

Apesar de aldosterona e glicocorticoides terem afinidade pelo receptor MR, trabalhos demonstram que os glicocorticoides só podem ativar uma resposta biológica via receptor MR em circunstâncias específicas, por exemplo, quando há estresse oxidativo tecidual (FUNDER *et al.*, 2007; BREM, 2012). FUNDER (2005) propôs que complexos MR/glicocorticoides podem ser transcricionalmente ativos com a geração de EROs. Assim, uma vez que na aorta dos animais tratados com isoproterenol há um aumento da geração de EROs, é possível que ocorra uma ativação da sinalização do

receptor MR via glicocorticoides no tecido sob injúria, que é prevenido pela administração de espironolactona. De acordo com esta hipótese, NAGATA e colaboradores (2006) demonstraram que a eplerenona apresenta efeito benéfico cardíaco em ratos sensíveis ao sal (*Dahl salt-sensitive* - DS) alimentados com alto sódio, mesmo com baixos níveis plasmáticos de aldosterona e níveis controle de corticosterona. Os autores demonstraram que o estresse oxidativo no coração dos animais DS é revertido pela eplerenona, sugerindo que o aumento de EROs pode desencadear a sinalização celular via glicocorticoides/receptor MR. Neste mesmo sentido MICHEA e colaboradores (2008) demonstraram em um modelo animal de hipertensão arterial causada por nefrectomia 5/6 em ratos apesar de não apresentarem alteração plasmática ou tecidual cardíaca dos níveis de aldosterona e corticosterona, apresentam aumento da expressão gênica e proteica da SGK1 associado com estresse oxidativo, reforçando o papel do estresse oxidativo na ativação da sinalização do receptor MR.

A seletividade do receptor MR é regulada pelas enzimas 11 β -HSD1 e 11 β -HSD2 (ARRIZA *et al.*, 1987; BREM, 2012). 11 β -HSD1 atua como uma enzima bidirecional com a direção dependente do estado redox do cofator NADP(H) (BREM, 2012): NADP direciona a reação para a inativação dos glicocorticoides endógenos pela reação de desidrogenase, enquanto que o NADPH promove a regeneração dos glicocorticoide, de modo que o estado redox da célula irá direcionar a reação enzimática (BREM, 2012). Já a enzima 11 β -HSD2 atua como desidrogenase, convertendo corticosterona/cortisol em cortisona, metabólito inativo, e assim favorece a ligação da aldosterona ao receptor MR (FREY *et al.*, 2004). Se houver inibição da atividade da 11 β -HSD2, conseqüentemente

há acúmulo de glicocorticoides, favorecendo a ligação e ação destes sobre o receptor MR (BREM, 2012). Assim, as isoformas da 11 β -HSD e o estado redox tem papel limitante em determinar a especificidade do receptor MR e sua ativação pelos glicocorticoides no tecido vascular (BREM, 2012). Nesse sentido, não podemos excluir a hipótese de que a hiperativação β -adrenérgica possa influenciar a expressão e/ou atividade das enzimas 11 β -HSD, diretamente ou via estresse oxidativo, e assim facilitar a ação de glicocorticoides no receptor MR e a sinalização celular subsequente, que é inibida pela administração de espironolactona.

Há dois antagonistas de receptor MR amplamente utilizados na literatura: a eplerenona e a espironolactona. Sugere-se que a espironolactona é 40 vezes mais potente do que a eplerenona em antagonizar a ativação dos receptores MR pela aldosterona (GARTHWAITE & MCMAHON, 2004). Entretanto, a eplerenona é mais seletiva em antagonizar o receptor MR, pois a espironolactona pode também antagonizar receptores de glicocorticoides, de progesterona e androgênicos (GARTHWAITE & MCMAHON, 2004). Vale ressaltar que mesmo que a espironolactona antagonize receptores de glicocorticoides, este receptor apresenta 30 vezes menos afinidade pelos glicocorticoides do que o receptor MR (FUNDER, 2005). O aumento dos níveis de aldosterona no soro em resposta ao antagonismo do receptor MR, seja com espironolactona ou eplerenona, é um biomarcador útil da eficácia do bloqueio do receptor MR *in vivo* (GARTHWAITE & MCMAHON, 2004). Uma vez que os animais tratados com espironolactona apresentaram um aumento significativo da concentração de aldosterona plasmática, evidenciou-se a efetividade do tratamento com espironolactona em antagonizar o receptor MR. Ainda foi observado no presente estudo

que o tratamento com espironolactona preveniu o aumento da expressão gênica de osteopontina induzida pelo isoproterenol em aorta. Sabendo-se que a indução gênica de osteopontina é um marcador da atividade nuclear do receptor MR, este dado reforça a efetividade do tratamento com espironolactona em bloquear a atividade vascular do receptor MR.

Em conjunto, os dados sugerem que o tratamento com ISO causa um aumento da resposta contrátil em aorta de ratos, associado a maior ativação da via do receptor MR, provavelmente por uma ação de glicocorticoides facilitada pelo estresse oxidativo local. A ativação sustentada dos receptores β -AR resultou em aumento da expressão das proteínas β -arrestina, $G\alpha_{i1,2}$, p-Src, ERK1/2 e p-ERK1/2, aumento da expressão gênica da osteopontina e redução da expressão proteica de HSP90, efeitos que foram normalizados pelo uso do antagonista do receptor MR espironolactona (Figura 11). A ativação destas vias é relacionada a estresse oxidativo, redução da biodisponibilidade de NO e consequente disfunção endotelial e do controle do tônus vascular, reforçando o papel da hiperativação dos receptores β -AR na patogênese de danos vasculares, que são mediados, ao menos em parte, pela ativação do receptor MR (Figura 11A). Recentemente, SCHAFFER e colaboradores (2013) demonstraram que a deleção do receptor MR especificamente na célula endotelial é capaz de reverter a disfunção endotelial em aorta de camundongos obesos. Em somatória, estes dados enfatizam a importância do estudo dos mecanismos associados aos efeitos vasculares do antagonismo do receptor MR para a melhora da função do sistema cardiovascular em situações adversas.

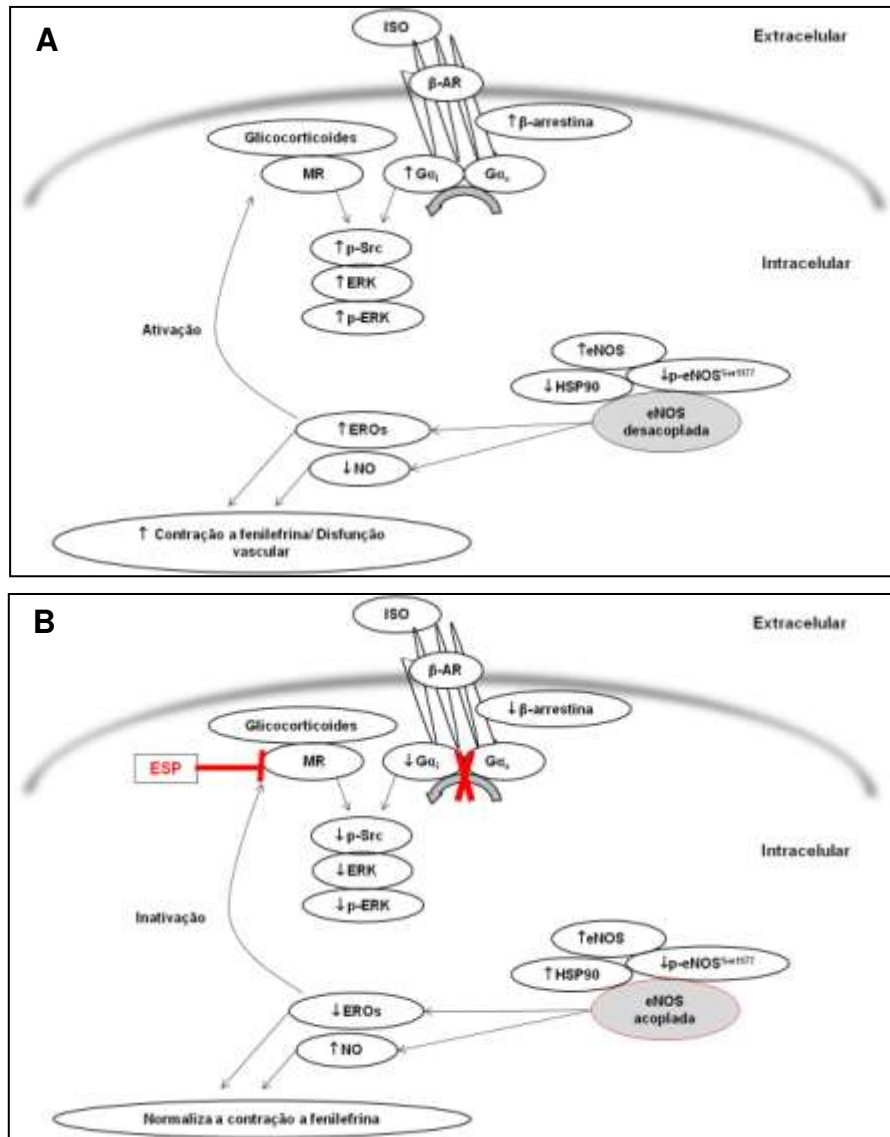


FIGURA 11 Esquema demonstrando os efeitos induzidos pela hiperativação dos receptores β -AR em aorta de ratos tratados por 7 dias com isoproterenol (ISO) **(A)**, e o efeito benéfico do co-tratamento com a espironolactona (ESP) **(B)**. EROs: espécies reativas do oxigênio; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; NO: óxido nítrico; β -AR: receptor β -adrenérgico; P^{Ser1177}: resíduo de ativação da fosforilação da eNOS; ISO: isoproterenol; MR: receptor mineralocorticoide; ESP: espironolactona; G α_s : proteína G estimulatória; G α_i : proteína G inibitória; ERK: quinase regulada por sinalização extracelular; Src: proteína tirosina kinase; p: fosforilação.

6. CONCLUSÃO

Os presentes resultados demonstram pela primeira vez que o aumento da contração à fenilefrina induzido pela hiperativação dos receptores β -AR em aorta de ratos está relacionado à ativação do receptor MR, mediando redução da biodisponibilidade de NO e estresse oxidativo. O aumento da geração de EROs e redução do NO vascular induzido pelo tratamento com isoproterenol parece estar relacionado ao desacoplamento da eNOS devido a redução da expressão da HSP90, efeito que foi prevenido pela espironolactona. Além disso, o antagonismo do receptor MR reverteu o aumento da expressão de $G\alpha_{i1,2}$, β -arrestina, p-Src, ERK1/2 e p-ERK1/2 induzido pela hiperativação dos receptores β -AR na aorta. Levando-se em consideração que estas proteínas reguladas positivamente estão envolvidas com o estímulo local de estresse oxidativo, inflamação, disfunção endotelial e descontrole do tônus vascular em diversas doenças cardiovasculares, os presentes dados sugerem um efeito benéfico do antagonismo do receptor MR em proteger a injúria vascular causada pela hiperativação dos receptores β -AR. Assim, os presentes resultados estendem o conhecimento sobre as alterações cardiovasculares mediadas pelo SRAA e ainda, a necessidade de mais estudos, visto a especificidade de cada leito vascular em responder a hiperestimulação adrenérgica ocorrida em doenças cardiovasculares como a hipertrofia e insuficiência cardíaca.

7. BIBLIOGRAFIA

AL-GOBARI M, KHATIB CE, PILLON F, GUEYFFIER. Beta-blockers for the prevention of sudden cardiac death in heart failure patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cardiovascular Disorders*, 13:52, 2013.

ARRIZA JL, WEINBERGER C, CERELLI G, GLASER TM, HANDELIN BL, HOUSMAN DE, EVANS RM. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, 237:268-74, 1987.

ASANO M, MASUZAWA K, MATSUDA T. Role of stimulatory GTP-binding protein (Gs) in reduced β -adrenoceptor coupling in the femoral artery of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, 95:241-51, 1988.

BAILLIE GS, SOOD A, MCPHEE I, GALL I, PERRY SJ, LEFKOWITZ, HOUSLAY MD. β -arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates β -adrenoceptor switching from Gs to Gi. *PNAS*, 100(3):940-45, 2003.

BANQUET S, DELANNOY E, AGOUNI A, DESSY C, LACOMME S, HUBERT F, RICHARD V, MULLER B, LEBLAIS V. Role of G(i/o)-Src Kinase-PI3K/Akt pathway and caveolin-1 in β 2-adrenoceptor coupling to endothelial NO synthase in mouse pulmonary artery. *Cell Signal*, 23(7):1136-43, 2011.

BARRETTO AC, SANTOS AC, MUNHOZ R, RONDON MU, FRANCO FG, TROMBETTA IC, ROVEDA F, DE MATOS LN, BRAGA AM, MIDDLEKAUFF HR, NEGRÃO CE. Increased muscle sympathetic nerve activity predicts mortality in heart failure patients. *Int J Cardiol*, 135:302-7, 2009.

BARTHOLOMEU JB, VANZELLI AS, ROLIM NP, FERREIRA JC, BECHARA LR, TANAKA LY, ROSA KT, ALVES MM, MEDEIROS A, MATTOS KC, COELHO MA, IRIGOYEN MC, KRIEGER EM, KRIEGER JE, NEGRÃO CE, RAMIRES PR, GUATIMOSIM S, BRUM PC. Intracellular mechanisms of specific β -adrenoceptor antagonists involved in improved cardiac function and survival in a genetic model of heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 45:240-9, 2008.

BAUERSACHS J, BOULOUMIE A, FRACCAROLLO D, HU K, BUSSE R, ERTL G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation*, 100:292-8, 1999.

BENJAMIN IJ, JALIL JE, TAN LB, CHO K, WEBER KT, CLARK WA. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ Res*, 65: 657-70, 1989.

BREM AS. Targeting activated mineralocorticoid receptor: Occam's razor revisited. *Kidney Intern*, 82:619-20, 2012.

BRIONES AM, CAT AND, CALLERA GE, YOGI A, BURGER D, HE Y, CORREA JW, GAGNON AM, GOMEZ-SANCHEZ CE, GOMEZ-SANCHEZ EP, SORISKY A, OOI TC, RUZICKA M, BURNS KD, TOUYS RM. Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: Implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. *Hypertension*, 59:1069-78, 2012.

BRISTOW MR. Treatment of chronic heart failure with β -adrenergic receptor antagonists: A convergence of receptor pharmacology and clinical cardiology. *Circulation Research*, 109:1176-94, 2011.

BRISTOW MR, FELDMAN AM, ADAMS KF JR, GOLDSTEIN S. Selective versus nonselective beta-blockade for heart failure therapy: are there lessons to be learned from the COMET trial? *J Card Fail*, 9:444-53, 2003.

BRISTOW MR. β -Adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation*, 101:558-69, 2000.

BUSATTO VC, CUNHA V, CICLINI MA, MILL JG. Differential effects of isoproterenol on the activity of angiotensin-converting enzyme in the rat heart and aorta. *Braz J Med Biol Res*, 32(3):355-60, 1999.

CALLERA GE, MONTEZANO ACI, YOGI A, TOSTES RC, HE Y, SCHIFFRIN EL, TOUYS RM. c-Src-dependent nongenomic signaling responses to aldosterone are increased in vascular myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 46:1032-38, 2005.

CALLERA GE, YEH E, TOSTES RC, CAPERUTO LC, CARVALHO CR, BENDHACK LM. Changes in the vascular β -adrenoceptor-activated signalling pathway in 2 Kidney-1 Clip hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, 141:1151-8, 2004.

CARNICER R, CRABTREE MJ, SIVAKUMARAN V, CASADEI B, KASS DA. Nitric oxide synthases in heart failure. *Antiox & Redox Sign*, 18(9):1078-99, 2013.

CAT AND, TOUYS RM. Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: novel mechanisms. *Curr Hypertens Rep*, 13:122-128, 2011.

CEDIEL E, SANZ-ROSA D, OUBINA MP, DE LAS HERAS N, GONZÁLEZ PACHECO FR, VEGAZO O, JIMÉNEZ J, CACHOFEIRO V, LAHERA V. Effect of AT₁ receptor blockade on hepatic redox status in SHR: possible relevance for endothelial function? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285:R674-81, 2003.

CHAN V, FENNING A, HOEY A, BROWN L. Chronic β -adrenoceptor antagonist treatment controls cardiovascular remodeling in heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol*, 58(4):424-31, 2011.

COLLISTER JP, HENDEL MD. The role of Ang (1-7) in mediating the chronic hypotensive effects of losartan in normal rats. *J Ren-Ang-Ald Sys*, 4:176, 2003.

CONNELL JMC. DAVIES E. The new biology of aldosterone. *J. Endocrinol*, 186, 1-20, 2005.

CONNELL J. Aldosterone – the future challenge in cardiovascular disease? *British J Diab. & Vasc. Disease*, 4:370-76, 2004.

CONTI V, RUSSOMANNO G, CORBI G, IZZO V, VECCHIONE C, FILIPPELLI A. Adrenoreceptors and nitric oxide in the cardiovascular system. *Front Physiol.*, 4(6):321, 2013.

DAAKA Y, LUTTRELL LM, LEFKOWITZ RJ. Switching of the coupling of the β 2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 390:88-91, 1997.

D'AGOSTINO DP, PUTNAM RW, DEAN JB. Superoxide (O_2^-) production in CA1 neurons of rat hippocampal slices exposed to graded levels of oxygen. *J Neurophysiol*, 98(2):1030-41, 2007.

DAVEL AP, BRUM PC, ROSSONI LV. Isoproterenol induces vascular oxidative stress and endothelial dysfunction via a $G_{i\alpha}$ -coupled β_2 -adrenoceptor signaling pathway. Submetido a Plos ONE.

DAVEL AP, CERAVOLO GS, WENCESLAU CF, CARVALHO MH, BRUM PC, ROSSONI LV. Increased vascular contractility and oxidative stress in β_2 -adrenoceptor knockout mic: the role of NADPH oxidase. *J Vasc Res*, 49(4):342-52, 2012.

DAVEL AP, WENCESLAU CF, AKAMINE EH, XAVIER FE, COUTO GK, OLIVEIRA HT, ROSSONI LV. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Braz J Med Biol Res*, 44(9)920-32, 2011.

DAVEL AP, FUKUDA LE, DE SÁ LL, MUNHOZ CD, SCAVONE C, SANZ-ROSA D, CACHOFEIRO V, LAHERA V, ROSSONI LV. Effects of isoproterenol treatment for 7

days on inflammatory mediators in the rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295:H211-19, 2008.

DAVEL AP, KAWAMOTO EM, SCAVONE C, VASSALLO DV, ROSSONI LV. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. *Br J Pharmacol*, 148:629-39, 2006.

DELBIN MA, DAVEL APC, COUTO GK, DE ARAÚJO GG, ROSSONI LV, ANTUNES E, ZANESCO A. Interaction between advanced glycation end products formation and vascular responses in femoral and coronary arteries from exercised diabetic rats. *PLoS ONE*, 7(12):e53318, 2012.

DICKSTEIN K, KJEKSHUS J. Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. *Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan*. *Lancet*, 360:752-60, 2002.

DIWAN A, DORN II GW. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology*, 22:56–64, 2007.

D'USCIO LV, BAKER TA, MANTILLA CB, SMITH L, WEILER D, SIECK GC, KATUSIC ZS. Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21:1017-22, 2001.

EMORINE LJ, MARULLO S, BRIEND-SUTREN MM, PATEY G, TATE K, DELAVIER-KLUTCHKO C, STROSBURG AD. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science*, 245:1118-21, 1989.

FERRARI P. The role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. *Biochimica et Biophysica Acta* 1802, 1178-87, 2010.

FERRO A, COASH M, YAMAMOTO T, ROB J, JI Y, QUEEN L. Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *Br J Pharmacol*, 143(3):397-403, 2004.

FREY FJ, ODERMATT A, FREY BM. Glucocorticoid-mediated mineralocorticoid receptor activation and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 13:451-58, 2004.

FU GX, XU CC, ZHONG Y, ZHU DL, GAO PJ. Aldosterone-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells involves MR, ERK, and p38 MAPK. *Endocrine*, 42(3):676-83, 2012.

FUKUDA LE, DAVEL APC, VERÍSSIMO-FILHO S, LOPES LR, CACHOFEIRO V, LAHERA V, ROSSONI LV. Fenofibrate and pioglitazone do not ameliorate the altered vascular reactivity in aorta of isoproterenol-treated rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 52:413-21, 2008.

FUNDER JW. Mineralocorticoid receptor activation and oxidative stress. *Hypertension*, 50(2):840-1, 2007.

FUNDER JW. RALES, EPHESUS and redox. *Steroid Bioch & Mol Biol*, 93:121-5, 2005.

GABALLA MA, ECKHART A, KOCH WJ, GOLDMAN S. Vascular β -adrenergic receptor system is dysfunctional after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280:H1129-35, 2001.

GALLEGO M, ESPINA L, VEGAS L, ECHEVARRIA E, IRIARTE MM, CASIS O. Spironolactone and captopril attenuates isoproterenol-induced cardiac remodelling in rats. *Pharmacol Res*, 44:311-5, 2001.

GARCÍA-CARDEÑA G, FAN R, SHAH V, SORRENTINO R, CIRINOS G, PAPAPETROPOULOS A, SESSA W. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by HSP90. *Nature*, 392:821-24, 1998.

GARTHWAITE SM, MCMAHON EG. The evolution of aldosterone antagonists. *Mol Cell Endoc*, 217:27-31, 2004.

GRIMM D, HOLMER SR, RIEGGER GA, KROMER EP. Effects of β -receptor blockade and angiotensin II type I receptor antagonism in isoproterenol-induced heart failure in the rat. *Cardiovasc Pathol*, 8:315-23, 1999.

GRIMM D, ELSNER D, SCHUNKERT H, PFEIFER M, GRIESE D, BRUCKSCHLEGEL G, MUDERS F, RIEGGER GA, KROMER EP. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res*, 37:91-100, 1998.

GUEST SJ, HADCOCK JR, WATKINS DC, MALBON CC. Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor expression in differentiating 3T3-L1 cells. Independent regulation at the level of mRNA. *J Biol Chem*, 265:5370-5, 1990.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142:231-255, 2004.

HAUSDORFF WP, CARON MG, LEFKOWITZ RJ. Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J*, 4:2881-9, 1990.

HERNANZ R, MARTÍN Á, PÉREZ-GIRÓN JV, PALACIONS R, BRIONES AM, MIGUEL M, SALAICES M, ALONSO MJ. Pioglitazone treatment increases COX-2-derived prostacyclin production and reduces oxidative stress in hypertensive rats: role in vascular function. *Br J Pharmacol*, 166(4):1303-19, 2012.

HERNANZ R, BRIONES AM, ALONSO MJ, VILA E, SALAICES M. Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287:H225-H234, 2004.

IMANISHI T, IKEJIMA H, TSUJIOKA H, KUROI A, KOBAYASHI K, MURAGAKI Y, MOCHIZUKI S, GOTO M, YOSHIDA K, AKASAKA T. Addition of eplerenona to an angiotensin-converting enzyme inhibitor effectively improves nitric oxide bioavailability. *Hypertension*, 51(3):734-41, 2008.

JOFFE HV, ADLER GK. Effect of aldosterone and mineralocorticoid receptor blockade on vascular inflammation. *Heart Fail Rev*, 10:31-7, 2005.

KIM HK, PARK WS, WARDA M, PARK SY, KO EA, KIM MH, JEONG SH, HEO HJ, CHOI TH, HWANG YW, LEE S, KYUNG SK, RHEE BD, KIM N, HAN J. Beta adrenergic overstimulation impaired vascular contractility via actin-cytoskeleton disorganization in rabbit cerebral artery. *PLoS ONE*, 7(8):e43884, 2012.

KIM SM, CHEN L, FAULHABER-WALTER R, OPPERMANN M, HUANG Y, MIZEL D, BRIGGS JP, SCHNERMANN J. Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Hypertension*, 50(1):103-9, 2007.

KIM N, KIM H, YOUM JB, PARK WS, WARDA M, KO JH, HAN J. Site specific differential activation of Ras/Raf/ERK signaling in rabbit isoproterenol-induced left ventricular hypertrophy. *Biochim Biophys Acta*, 1763(10):1067-75, 2006.

KOJIMA H, NAKATSUBO N, KIKUCHI K, KAWAHARA S, KIRINO Y, NAGOSHI H, HIRATA Y, NAGANO T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem*, 70:2446-2453, 1998.

KRENEK P, KLIMAS J, KROSLAKOVA M, GAZOVA A, PLANDOROVA J, KUCEROVA D, FECENKOVA A, SVEC P, KYSELOVIC J. Increased expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in the aorta of rats with isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol*, 84(12):1245-50, 2006.

LANDS AM, LUDUENA FP, BUZZO HJ. Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sci*, 6(21):2241–49, 1967.

LEA WB, KWAK ES, LUTHER JM, FOWLER SM, WANG Z, MA J, FOGO AB, BROWN NJ. Aldosterone antagonism or synthase inhibition reduces end-organ damage induced by treatment with angiotensin and high salt. *Kidney Int*, 75(9):936-44, 2009.

LEENEN FHH, WHITE R, YUAN B. Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac rennin-angiotensin system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281:H2410-16, 2001.

LEHOUX S, CASTIER Y, TEDGUI A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *Jou Int Med*, 259:381-92, 2006.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta CT}$. *Methods*, 25:402-8, 2001.

MARCHESI C, PARADIS P, SCHIFFRIN EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci*, 29:367-74, 2008.

MARTÍN- FERNANDEZ B, DE LAS HERAS N, MIANA M, BALLESTEROS S, VALERO MM, VASSALO D, DAVEL AP, ROSSONI LV, CACHOFEIRO V, LAHERA V. Spironolactone prevents alterations associated with cardiac hypertrophy produced by isoproterenol in rats: involvement of serum- and glucocorticoid- regulated kinase type 1. *Exp Physiol*, 97(6):710-18, 2012.

MENG D, LYNCH MJ, HUSTON E, BEYERMANN M, EICHHORST J, ADAMS DR, KLUSSMANN E, HOUSLAY MD, BAILLIE GS. MEK1 binds directly to beta-arrestin1, influencing both its phosphorylation by ERK and the timing of its isoprenaline-stimulated internalization. *J Biol Chem*, 284:11425-35, 2009.

MICHEA L, VILLAGRÁN A, URZÚA A, KUNTSMANN S, VENEGAS P, CARRASCO L, GONZALEZ M, MARUSIC ET. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and prevents oxidative stress in uremic rats. *Hypertension*, 52:295-300, 2008.

MILLS SE. Implications of feedback regulation of beta-adrenergic signaling. *J Anim Sci*, 80:E30-5, 2002.

NAGATA K, OBATA K, XU J, ICHIHARA S, NODA A, KIMATA H, KATO T, IZAWA H, MUROHARA T, YOKOTA M. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac

hypertrophy and failure in Low-Aldosterone hypertensive rats. *Hypertension*, 47:656-64, 2006.

NAKAMURA T, FUKUDA M, KATAOKA K, NAKO H, TOKUTOMI Y, DONG Y, YAMAMOTO E, YASUDA O, OGAWA H, KIM-MITSUYAMA S. Eplerenone potentiates protective effects of amlodipine against cardiovascular injury in salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertension Research*, 34:817–824, 2011.

O'BRIEN ER, GARVIN MR, STEWART DK, HINOHARA T, SIMPSON JB, SCHWARTZ SM, GIACHELLI CM. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb*, 14:1648–1656, 1994.

OLIVEIRA EM, KRIEGER JE. Chronic β -adrenoceptor stimulation and cardiac hypertrophy with no induction of circulating renin. *Eur J Pharmacol*, 520:135-41, 2005.

OSADCHII OE. Cardiac hypertrophy induced by sustained b-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart Fail Ver*, 12:66–86, 2007.

OU J, OU Z, ACKERMAN AW, OLDHAM KT, PRITCHARD KA. Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) in proliferating endothelial cells uncouples endothelial nitric oxide synthase activity. *Free Radical Biol Med*, 34:269–276, 2003.

PARATI G, ESLER M. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *European Heart Journal*, 33:1058-66, 2012.

PITT B. Promise of mineralocorticoid receptor blockade in asymptomatic left ventricular dysfunction. *Hypertension*, 50:461-62, 2007.

PITT B, REMME W, ZANNAD F, NEATON J, MARTINEZ F, RONIKER B, BITTMAN R, HURLEY S, KLEIMAN J, GATLIN M. Eplerenone post-acute myocardial infarction heart failure efficacy and survival study investigators. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 348:1309–21, 2003.

PITT B, POOLE-WILSON PA, SEGAL R, MARTINEZ FA, DICKSTEIN K, CAMM AJ, KONSTAM MA, RIEGGER G, KLINGER GH, NEATON J, SHARMA D, THYAGARAJAN B. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomized trial—the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet*, 355:1582-7, 2000.

PRITCHARD KA, ACKERMAN AW, GROSS ER, STEPP DW, SHI Y, FONTANA JT, BAKER JE, SESSA W. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chemistry*, 278(21):17621-24, 2001.

QUEEN LR, FERRO A. β -Adrenergic receptors and nitric oxide generation in the cardiovascular system. *Cell Mol Life Sci*, 63:1070-83, 2006.

QUEEN LR, JI Y, XU B, YOUNG L, YAO K, WYATT AW, ROWLANDS DJ, SLOW RC, MANN GE, FERRO A. Mechanisms underlying β_2 -adrenoceptor-mediated nitric oxide generation by human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol*, 15:585-94, 2006.

RAJAGOPALAN S, DUQUAINE D, KING S, PITT B, PATEL P. Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. *Circulation*, 105:2212-16, 2002.

ROCKMAN HA, KOCH WJ, LEFKOWITZ RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*, 415:206-12, 2002.

RONA G, CHAPPEL CI, BALAZS T, GAUDRY R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol*, 67:443-55, 1959.

ROSENBERG M, ZUGCK C, NELLES M, JUENGER C, FRANK D, REMPPIS A, GIANNITSIS E, KATUS HA, NORBERT F. Osteopontin, a new prognostic biomarker in patients with chronic heart failure. *Circ Heart Fail*, 1:43-9, 2008.

ROSSONI LV, XAVIER FE, MOREIRA CM, FALCOCHIO D, AMANSO AM, TANOUE CU, CARVALHO CR, VASSALLO DV. Ouabain-induced hypertension enhances left ventricular contractility in rats. *Life Sci*, 79:1537-45, 2006.

SANTOS RAS, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, ANDRADE SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory Peptides*, 91:45-62, 2000.

SANZ-ROSA D, OUBIÑA MP, CEDIEL E, DE LAS HERAS N, ARAGONCILLO P, BALFAGÓN G, CACHOFEIRO V, LAHERA V. Eplerenone reduces oxidative stress and enhances eNOS in SHR: vascular functional and structural consequences. *Antioxid Redox Signal*, 7:1294-1301, 2005a.

SANZ-ROSA D, OUBIÑA MP, CEDIEL E, DE LAS HERAS N, VEGAZO O, JIMENEZ J, LAHERA V, CACHOFEIRO V. Effect of AT₁ receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288:H111-H115, 2005b.

SARTÓRIO CL, FRACCAROLLO D, GALUPPO P, LEUTKE M, ERTL G, STEFANON I, BAUERSACHS J. Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction. *Hypertension*, 50:919-25, 2007.

SCHÄFER N, LOHMANN C, WINNIK S, VAN TITS LJ, MIRANDA MX, VERGOPOULOS A, RUSCHITZKA F, NUSSBERGER J, BERGER S, LÜSCHER TF, VERREY F, MATTER CM. Endothelial mineralocorticoid receptor activation mediates endothelial dysfunction in diet-induced obesity. *Eur Heart J*, 34(45):3515-24, 2013.

SCHIFFRIN EL, PARK JB, INTENGAN HD, TOUYZ RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation*, 101:1653-9, 2000.

SHENOY SK, DRAKE MT, NELSON CD, HOUTZ DA, XIAO K, MADABUSHI S, REITER E, PREMONT RT, LICHTARGE O, LEFKOWITZ RJ. β -arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 281:1261-73, 2006.

SONG Y, CARDOUNEL AJ, ZWEIER JL, XIA Y. Inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase by heat shock protein 90: Implications in NOS regulation. *Biochemistry*, 41:106161-22, 2002.

SUGIYAMA T, YOSHIMOTO T, HIRONO Y, SUZUKI N, SAKURADA M, TSUCHIYA K, MINAMI I, IWASHIMA F, SAKAI H, TATENO T, SATO R, HIRATA Y. Aldosterone increases osteopontin gene expression in rat endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 336:163-7, 2005.

TAN S., CURTIS-PRIOR P. B. Characterization of the beta-adrenoceptor of the adipose cell of the rat. *Int J Obes*, 7(5):409-414, 1983.

TANAKA Y, HORINOUCHE T, KOIKE K. New insights into β -adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 32:503-14, 2005.

TANG Q, TAYLOR PB, HELBING RK. Catecholamine induced cardiac hypertrophy. *Can J Cardiol*, 3(6):311-6, 1987.

TAYLOR PB, TANG Q. Development of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol*, 62(4):384-9, 1984

THAI HM, DO BQ, TRAN TD, GABALLA MA, GOLDMAN S. Aldosterone antagonism improves endothelial-dependent vasorelaxation in heart failure via upregulation of endothelial of endothelial nitric oxide synthase production. *Jour Cardiac Failure*, 12(3):240-45, 2006.

TODA N, NAKANISHI S, TANABE S. Aldosterone affects blood flow and vascular tone regulated by endothelium-derived NO: therapeutic implications. *Brit Jou Pharmacol*, 168:519-33, 2013.

TROCHU JN, LEBLAIS V, RAUTUREAU Y, BÉVÉRELLI F, MAREC HL, BERDEAUX A, GAUTHIER C. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *British Journal of Pharmacology*, 128:69-76, 1999.

VALENTE AJ, YOSHIDA T, MURTHY SN, SAKAMURI SSV, KATSUYAMA M, CLARK RA, DELAFONTAINE P, CHANDRASEKAR B. Angiotensin II enhances AT₁-Nox1 binding and stimulates arterial smooth muscle cell migration and proliferation through AT₁, Nox1, and interleukin-18. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303(3):H282-96, 2012.

VELIOTES GA, NORTON GR, CORREIA RJ, STRIJDOM H, BANDENHORST D, BROOKSBANK R, WOODIWISS AJ. Impact of aldosterone receptor blockade on the deleterious cardiac effects of adrenergic activation in hypertensive rats. *Cardiovasc Pharmacol*, 56:2-203, 2011.

VIRDIS A, NEVES MF, AMIRI F, VIEL E, TOUYZ RM, SCHIFFRIN EL. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension*, 40(4):504-10, 2002.

WEISS RJ, WEBER MA, CARR AA, SULLIVAN WA. A randomized, double-blind, placebo-controlled parallel-group study to assess the efficacy and safety of nebivolol, a novel β -blocker, in patients with mild to moderate hypertension. *J Clin Hypert*, 9(9):666-76, 2007.

WENCESLAU CF, DAVEL AP, XAVIER FE, ROSSONI LV. Long-term ouabain treatment impairs vascular function in resistance arteries. *J Vasc Res*, 48:316–326, 2011.

XAVIER FE, BLANCO-RIVERO J, AVENDAÑO MS, SATRE E, YELA R, VELÁZQUEZ K, SALÁICES M, BALFAGON G. Aldosterone alters the participation of endothelial factors in noradrenaline vasoconstriction differently in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats. *Eur Journal Pharmacol*, 654:280-88, 2011.

XAVIER FE, ARAS-LÓPEZ R, ARROYO-VILLA I, DEL CAMPO L, SALAICES M, ROSSONI LV, FERRER M, BALFAGÓN G. Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A2 and prostacyclin. *British Jour Pharmacol*, 154:1225-35, 2008.

XAVIER-NETO J, PEREIRA AC, JUNQUEIRA ML, CARMONA R, KRIEGER JE. Rat angiotensin-converting enzyme promoter regulation by β -adrenergics and cAMP in endothelium. *Hypertension*, 34:31-8, 1999.

ZARUBIN T, HAN J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*, 15:11–8, 2005.

ZHANG GX, OHMORI K, NAGAI Y, FUJISAWA Y, NISHIYAMA A, ABE Y, KIMURA S. Role of AT1 receptor in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and oxidative stress in mice. *J Mol Cell Cardiol*, 42(4):804-11, 2007.

ZHU C, WANG Q, ZHOU J, LIU H, HUA F, YANG H, HU Z. The mineralocorticoid receptor- p38MAPK-NFkB or ERK-Sp1 signal pathways mediate aldosterone-stimulated inflammatory and profibrotic responses in rat vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sinica*, 33:873-78, 2012.

ZOU Y, KOMURO I, YAMAZAKI T, KUDOH S, UOZUMI H, KADOWAKI T, YAZAKI Y. Both Gs and Gi proteins are critically involved in isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*, 274:9760-70, 1999.

8. ANEXO

8.1. Anexo A: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



CEUA/Unicamp


Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp


CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Efeitos Vasculares da Hiperativação β -adrenérgica Associados à Ativação do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona" (protocolo nº 2609-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel / Jamaíra Aparecida Victório, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 13 de fevereiro de 2012.

Campinas, 13 de fevereiro de 2012.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Aloqso
Secretária Executiva