

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

VIVIANE DE MENEZES CACERES

“Efeito do tratamento com doadores de óxido nítrico ou nitroxila sobre parâmetros cardiovasculares e a população de adrenoceptores β no coração de camundongos LDLr-/-”

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Helena Krieger

Co-Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Spadari

Campinas, 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

VIVIANE DE MENEZES CACERES



“Efeito do tratamento com doadores de óxido nítrico ou nitroxila sobre parâmetros cardiovasculares e a população de adrenoceptores β no coração de camundongos LDLr-/-”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Viviane de Menezes Caceres
RjC
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese (ou Dissertação) apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Helena Krieger

Co-Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Spadari

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C113e

Caceres, Viviane de Menezes

Efeito do tratamento com doadores de óxido nítrico ou nitroxila sobre parâmetros cardiovasculares e a população de adrenoceptores β no coração de camundongos LDLr -/- / Viviane de Menezes Caceres. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: Marta Helena Krieger, Regina Célia Spadari-Bratfish.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Adrenoceptores beta. 2. Óxido nítrico. 3. Nitroxila. 4. Modulação gênica. 5. Hipercolesterolemia. I. Krieger, Marta Helena. II. Spadari-Bratfish, Regina Célia. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Effect of the treatment with nitric oxide or nitroxil donors on cardiovascular parameters and β adrenoceptor population in the heart of LDLr -/- mice.

Palavras-chave em inglês: Beta adrenoceptors; Nitric oxide; Nitroxil; Genic modulation; Hypercholesterolemia.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Regina Célia Spadari-Bratfish, Cássia Marta de Toledo Bergamaschi, Rosana Almada Bassani.

Data da defesa: 25/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 25 de fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Regina Célia Spadari (Co-Orientadora)

R.C.

Assinatura

Profa. Dra. Rosana Almada Bassani

Rosana Almada Bassani

Assinatura

Profa. Dra. Iraídes Nunes dos Santos

Assinatura

Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior

Assinatura

Profa. Dra. Cássia Marta de Toledo Bergamaschi

Cássia Marta de Toledo Bergamaschi

Assinatura

DEDICO

Ao meu pai Aroldo Machado Caceres e à minha mãe Dagmar de Menezes Caceres.
Pelo verdadeiro amor de família. Vocês me ensinaram como viver de maneira
digna, apoiaram e acreditaram em mim. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- À minha irmã Vanessa de Menezes Caceres, que mesmo distante é minha companheira de momentos bons e horas difíceis. Te amo.
- Ao João Paulo Damiano que tem sido muito mais que meu namorado. Sempre me incentivou e apoiou com muito amor e paciência. Te admiro muito.
- À minha co-orientadora Regina Célia Spadari, por ter acreditado em mim. Para mim você é um exemplo de competência.
- Aos camundongos que cederam o maior tesouro que um ser vivo pode ter: A VIDA!!

AGRADECIMENTOS

- À Deus.

- Agradeço a minha orientadora Marta Helena Krieger pela oportunidade.

-À minha equipe de laboratório, Amarylis Wanschel, Carol Minozzi, José Antônio Dias Garcia e Daniel Kiatkowski pela alegria, apoio e companherismo.

-Aos meus amigos e funcionários de departamento, especialmente ao pessoal do laboratório 2, Márcia Carvalho Garcia, Edla Sanches, Geruza Perlato Bella, Danilo Crege, Heder Frank Estrela, Elaine Francesconi, Juliana de Almeida e Profa. Dora Maria Grassi-Kassisse, pelos ensinamentos e carinho.

-À todos amigos queridos e especialmente à minha amiga-irmã Marina Arrais Gerola, pela amizade sincera e apoio a qualquer momento.

- Às entidades de fomento à pesquisa FAPESP e CAPES que financiaram este projeto.

Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar.

(Autor desconhecido)

ÍNDICE

| | |
|------------------------------------|------|
| Lista de Abreviações..... | ix |
| Lista de Figuras..... | xi |
| Lista de Tabelas..... | xiii |
| Resumo..... | xiv |
| Abstract..... | xv |
| 1-Introdução..... | 1 |
| 2- Objetivos..... | 8 |
| 3-Materiais e Métodos..... | 9 |
| 4- Resultados..... | 20 |
| 5- Discussão..... | 44 |
| 6- Conclusões..... | 60 |
| 7- Referências Bibliográficas..... | 62 |

LISTA DE ABREVIACOES

HV- hipertrofia ventricular

°C- graus centígrados

µm- micrmetro

LDLr-/- knockout para o receptor de LDL

SNAC (S- nitroso-N-acetylcistena)- S-nitroso-N-acetilcisteína

Gs- proteína G estimulatória

Gi- proteína G inibitória

AMPc (cyclic adenosine monophosphate)- adenosina monofosfato cíclica

PKA- proteína kinase A

AC- adenilil-ciclase

NO (nitric oxide)- óxido nítrico

GCs- guanilato ciclase solúvel

GMPc (cyclic guanosine monophosphate)- guanosina monofosfato cíclica

HNO/NO - nitroxil

RSNO- S- notrosotiol

GSNO- S-nitrosoglutationa

NO₂- dióxido de nitrogênio

ONOO - peroxinitrito

NO₂ - nitrito

Na₂N₂O₃ - trioxodinitrato de sódio

SA- Sal de Angelis

CGRP- peptídeo relacionado com o gene da calcitonina

WT- grupo camundongos selvagens, os quais receberam ração comercial (Nuvital®) por 15 dias

CT- grupo camundongos LDLr-/-, que receberam ração comercial (Nuvital®) por 15 dias

CT+SNAC- camundongos LDLr-/-, que receberam ração comercial (Nuvital®) por 15 dias e concomitante tratamento com SNAC

CT+SA- camundongos LDLr-/-, que receberam ração comercial (Nuvital®) por 15 dias e concomitante tratamento com Sal de Angelis

HC- camundongos LDLr-/- que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura, 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico (AIN93G) por 15 dias

HC+SNAC- camundongos LDLr-/- que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura, 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico e concomitante tratamento com SNAC durante 15 dias, na dose de 0,51 μ mol/Kg/dia, por via intraperitoneal

HC+SA- camundongos LDLr-/- que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura, 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico e concomitante tratamento com Sal de Angelis

ICI118.551- antagonista seletivo para adrenoceptor subtipo b₂

mN- miliNewton

pD₂- logaritmo negativo da concentração molar do agonista

EC₅₀- resposta igual a 50% da resposta máxima

PTX- toxina pertussis

RNA- ácido ribonucléico

mM- miliMol

nM-nanoMol

mg- miligrama

DEPC- água tratada com dietil pirocarbonato

RNA_m- RNA mensageiro

PCR- reação em cadeia da polimerase

cDNA- ácido desoxiribonucleico complementar

GAPDH- gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

PAM- pressão arterial média

R_{max}- resposta máxima

TB-tensão basal

CDR- curva dose resposta

FB- frequência basal

bpm- batimentos por minuto

ISO- isoprenalina

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Relação dose resposta da pressão arterial média (Δ PAM), após administração de SNAC (painel superior) (Ricardo et al ., 2002) e Sal de Angelis (painel inferior) em ratos machos Wistar conscientes e normotensos. Cada coluna representa a média \pm 1 SEM de 6 ratos..... 21
- Figura 2-** Pressão arterial média (PAM) de camundongos *wild type* (WT) e LDLr/-..... 22
- Figura 3** – Peso ventricular esquerdo relativo (mg/g peso corpóreo) em camundongos *wild type* (WT) e LDLr/-..... 23
- Figura 4** – Diâmetro dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de camundongos *wild type* (WT) e LDLr/-..... 24
- Figura 5** - Cardiomiócitos de ventrículo esquerdo de camundongos *wild type* (WT) e LDLr/-..... 25
- Figura 6** – Deposição intersticial e perivascular de colágeno, em ventrículo esquerdo de camundongos *wild type* (WT) e LDLr/-..... 26
- Figura 7-** Deposição de colágeno na região perivascular de ventrículo esquerdo de camundongos *wild type* (WT) e LDLr/-..... 26
- Figura 8-** Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO), na ausência (painel A) e presença de ICI 118.551 (painel B), em átrio esquerdo de camundongos *wild type* (WT) e LDLr/- (efeito do SNAC)..... 28
- Figura 9** - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO), na ausência e presença de ICI 118.551, em átrio esquerdo de camundongos LDLr/- alimentados com dieta hiperlipídica (HC;painel A) e LDLr/- alimentados com dieta hiperlipídica e tratados 15 dias com SNAC (HC+SNAC, painel B)..... 30
- Figura 10** - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO) em átrio esquerdo de camundongos LDLr/- alimentados com dieta hiperlipídica (HC) (painel A) e LDLr/- alimentados com dieta hiperlipídica, tratados durante 15 dias com SNAC (HC+SNAC) (painel B). Os dados apresentados no painel B são provenientes de camundongos que receberam uma dose de PTX (600 μ g / Kg, i. p.) 24 h antes do sacrifício..... 31
- Figura 11** - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO), na ausência (painel A) e presença de ICI 118.551 (painel B), em átrio direito (AD) de camundongos *wild type* (WT), LDLr/- (efeito do SNAC) 34

| | |
|---|----|
| Figura 12 - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO) em átrio direito de camundongos LDLr ^{-/-} alimentados 15 dias com dieta hiperlipídica (HC), e LDLr ^{-/-} alimentados 15 dias com dieta hiperlipídica que receberam uma dose de toxina pertussis (PTX; 600 µg / Kg, i. p.) 24 h antes do sacrifício (HC-PTX,)..... | 35 |
| Figura 13 - Efeito do ICI118,551 sobre a tensão desenvolvida (painel A, n=5) e sobre a frequência de batimentos (painel B, n=5) de átrio esquerdo e direito, respectivamente, de camundongos LDLr ^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica, e concomitante tratamento com SNACpor 15 dias (HC+SNAC)..... | 36 |
| Figura 14 - Expressão dos genes de adrenoceptores β_1 adrenoceptores β_2 em ventrículo esquerdo de camundongos <i>wild type</i> (WT), LDLr ^{-/-} | 38 |
| Figura 15 - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO), na ausência (painel A) e presença de ICI 118.551 (painel B), em átrio esquerdo de camundongos <i>wild type</i> (WT), LDLr ^{-/-} (efeito do Sal de Angelis)..... | 40 |
| Figura 16 - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO), na ausência (painel A) e presença de ICI 118.551 (painel B), em átrio esquerdo de camundongos <i>wild type</i> (WT), LDLr ^{-/-} (efeito do Sal de Angelis)..... | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Seqüência dos "primers" utilizados na reação de PCR..... | 18 |
| Tabela 2- Tensão basal (TB, mN/100mg), pD ₂ e resposta máxima (R _{max}) isoprenalina em átrio esquerdo de camundongo machos C57BL6 (WT), LDLr ^{-/-} (CT), LDLr ^{-/-} tratados 15 dias com SNAC (CT+SNAC), LDLr ^{-/-} alimentados 15 dias com dieta hiperlipídica (HC) e LDLr ^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica e tratados 15 dias com SNAC (HC+SNAC), na presença e ausência de antagonista β ₂ adrenérgico (ICI118.551)..... | 29 |
| Tabela 3- Tensão basal (TB, mN/100mg), pD ₂ e resposta máxima (R _{max}) à isoprenalina em átrio esquerdo de camundongo, tratados ou não com PTX..... | 31 |
| Tabela 4- Frequência basal de batimentos (FB, bpm), pD ₂ e resposta máxima (R _{max} , bpm) para isoprenalina em átrio direito de camundongo machos C57BL6 (WT), LDLr ^{-/-} (CT), LDLr ^{-/-} tratados 15 dias com SNAC (CT+SNAC), LDLr ^{-/-} alimentados 15 dias com dieta hiperlipídica (HC) e LDLr ^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica e tratados 15 dias com SNAC (HC+SNAC), na presença e ausência de antagonista β ₂ adrenérgico (ICI 118. 551)..... | 33 |
| Tabela 5- Tensão basal (TB, mN/100mg), pD ₂ e resposta máxima (R _{max} , mN/100mg) à isoprenalina em átrio esquerdo de camundongo machos C57BL6 (WT), LDLr ^{-/-} (CT), LDLr ^{-/-} tratados 15 dias com SA (CT+SA), LDLr ^{-/-} alimentados 15 dias com dieta hiperlipídica (HC) e LDLr ^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica e tratados 15 dias com SA (HC+SA), na presença e ausência de antagonista β ₂ adrenérgico (ICI 118.551)..... | 39 |
| Tabela 6- Frequência basal de batimentos (FB, bpm), pD ₂ e resposta máxima (R _{max} , bpm) para isoprenalina em átrio direito de camundongo machos C57BL6 (WT), LDLr ^{-/-} (CT), LDLr ^{-/-} tratados 15 dias com SA (CT+SA), LDLr ^{-/-} alimentados 15 dias com dieta hiperlipídica (HC) e LDLr ^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica e tratados 15 dias com SA (HC+SA), na presença e ausência de antagonista β ₂ adrenérgico (ICI 118. 551)..... | 42 |

RESUMO

Os objetivos do presente estudo são investigar e comparar o efeito do nitrosotiol doador de NO (SNAC) e do doador de NO[•]/HNO (Sal de Angelis) na estrutura e função do miocárdio sob processo aterogênico precoce induzido pela dieta em camundongos com deleção gênica do receptor de LDL (LDLr^{-/-}). Os dados obtidos possibilitam avaliar a eficácia destas espécies químicas, bem como os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos preventivos promovidos pelo sistema NO/NOS e pela via HNO, na hipertrofia ventricular esquerda, neste modelo animal. O papel dos adrenoceptores beta no controle da função cardíaca destes camundongos LDLr^{-/-} também foi avaliado. A deleção gênica do receptor de LDL resultou em déficit contrátil cardíaco, sem alteração na homogeneidade da população miocárdica de adrenoceptores β_1 , mas quando associada à dieta hiperlipídica induziu participação de adrenoceptores β_2 , com conseqüente alteração da sensibilidade aos efeitos inotrópico e cronotrópico da isoprenalina. O tratamento com SNAC e Sal de Angelis (SA) preveniu o aumento da sensibilidade à isoprenalina, provavelmente ao induzir o acoplamento dos adrenoceptores β_2 com a proteína Gi. Além disso, o SA foi capaz de corrigir o déficit contrátil do miocárdio. Camundongos LDLr^{-/-} também apresentaram hipertensão, a qual foi prevenida pelo tratamento com SNAC. Quando a deleção gênica estava associada à dieta hiperlipídica, os camundongos apresentaram hipertensão e hipertrofia ventricular esquerda. O SNAC e o SA previniram a hipertrofia, mas não a hipertensão. Concluimos que camundongos com deleção gênica do receptor de LDL, alimentados com dieta hiperlipídica são um modelo interessante de alterações cardíacas e hemodinâmicas, especialmente quando enfocamos alterações das respostas dos adrenoceptores beta adrenérgicos, e que compostos doadores de NO e seus congêneres podem se tornar uma alternativa para prevenir tais alterações.

ABSTRACT

The aim of this study is to analyze and to compare the effects of a nitrosothiol NO donor (SNAC) and of a NO⁻/HNO donor (Angelis Salt, AS) on the structure and functioning of myocardium under atherogenic process induced by a hyperlipidic diet in LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}). The role played by the β adrenoceptor subtypes in the control of the cardiac function of LDLr^{-/-} mice has also been analysed. LDLr^{-/-} mice exhibited a contractile deficit in the myocardium, with no alteration in the response to isoprenaline, which is mediated by a homogeneous population of β_1 adrenoceptors. However, when it was associated with a hyperlipidic diet, β_2 adrenoceptors participate in the inotropic and chronotropic responses to isoprenaline, causing an alteration on tissue sensitivity to the agonist. LDLr^{-/-} knockout mice treatment with SNAC or AS avoided the atria supersensitivity to isoprenaline by inducing β_2 adrenoceptors coupling to Gi protein. Moreover, AS but not SNAC was able to recover the atria contractile performance. LDLr^{-/-} mice also presented hypertension that it was prevented by the SNAC treatment. Hypertension was accompanied by ventricular hypertrophy when the gene deletion was associated with a hyperlipidic diet. SNAC or AS treatment prevented the hypertrophy, but not the hypertension. We concluded that LDLr^{-/-} mice fed with a hyperlipidic diet are useful models for the study of haemodynamic and cardiac diseases related to a hypercholesterolemic profile, mostly when the focus is to investigate the participation of the adrenoceptors in the involved processes, and that NO donors or similar compounds may be an alternative tool to prevent such alterations.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos ocorreu enorme desenvolvimento e utilização de modelos animais transgênicos ou com deleção de genes-alvo, denominados “*knockout*”, os quais permitem analisar os mais variados e complexos fenótipos. A utilização destes modelos animais associada às precisas avaliações fisiológicas, tornou-se importante ferramenta no esclarecimento da regulação dos vários sistemas orgânicos, principalmente o sistema cardiovascular (Breslow, 1996).

Estudos feitos em nosso laboratório mostraram que camundongos “*knockout*” para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}) e mantidos sob dieta hiperlipídica por 15 dias desenvolveram grave dislipidemia, placa aterosclerótica e hipertrofia ventricular esquerda. Além disso, o átrio esquerdo de camundongos LDLr^{-/-}, alimentados ou não com dieta aterogênica, apresentou déficit contrátil comparado ao átrio de camundongos *wild type*. Tal deficiência não foi corrigida pelo tratamento dos camundongos com S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC). Entretanto, átrios esquerdos de camundongos LDLr^{-/-} mantidos sob dieta aterogênica apresentaram supersensibilidade à noradrenalina associada ao déficit contrátil, a qual foi anulada com a administração do SNAC (Krieger *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2008).

A hipertrofia cardíaca desencadeada por diferentes indutores genéticos associados ou não a fatores ambientais é considerada um indicador do grau de morbidade e do risco de mortalidade das doenças cardiovasculares, pois este remodelamento pode induzir arritmias, insuficiência cardíaca e morte súbita (Arnett *et al.*, 2004).

A exposição crônica a concentrações elevadas de catecolaminas é um dos mais potentes estímulos para o remodelamento cardíaco. Este estímulo resulta na alteração da expressão e das vias de sinalização dos receptores beta adrenérgicos, os quais são responsáveis pelo controle do

cronotropismo, inotropismo e metabolismo cardíacos (Port e Bristow, 2001; Santos e Spadari-Bratfisch, 2001; 2006).

A hipercolesterolemia associada ao fenótipo hipertrófico induz intensa ativação simpática e esta condição é acompanhada de alterações na resposta cardíaca às catecolaminas mediada pelos adrenoceptores β (Crandall *et al.*, 1983; Kaufman *et al.*, 1991).

Em tecido cardíaco de camundongos, a população de adrenoceptores β consiste de 71% do subtipo β_1 e 29% do subtipo β_2 (Heubach, 1999), muito similar à de corações humanos, onde a proporção entre os subtipos β_1 e β_2 de adrenoceptores está por volta de 70 a 80% : 30 a 20%, respectivamente (Brodde, 2006).

Os adrenoceptores do subtipo β_1 e β_2 são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G. Sua ativação resulta em estímulo da cascata de sinalização que inclui a proteína G estimulatória (G_s) - adenil ciclase (AC)- 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPC) - proteína kinase A (PKA). Estas enzimas fosforilam outras proteínas, promovendo efeitos celulares específicos, de acordo com o repertório enzimático de cada célula. Em cardiomiócitos, a PKA fosforila canais de cálcio voltagem-dependentes, aumentando assim influxo de cálcio na célula (Reuter, 1983), que por sua vez induz a liberação de cálcio (Fabiato e Fatiato, 1979) pelo retículo sarcoplasmático, através do receptor de rianodina (Meissner, 1994), causando aumento da força de contração. A estimulação dos adrenoceptores β_1 e β_2 também induz eventos que aceleram o relaxamento da musculatura cardíaca como: (1) ativação da fosfolambam (uma proteína regulatória inibitória da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático), favorecendo assim a atividade da Ca^{+2} ATPase e, conseqüentemente, a recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Koss e Kranias, 1996); e (2) fosforilação da troponina I, o que reduz a afinidade da troponina C pelo cálcio (Kaumman e Molenaar, 1996).

Em algumas circunstâncias, os adrenoceptores β_2 podem acoplar-se também à proteína G inibitória (G_i) que, quando ativada, inibe a via da adenilil-ciclase (AC)-AMPc-PKA e, conseqüentemente, os efeitos promovidos por esta via (Xiao *et al.*, 1995; Daaka *et al.*, 1997; 1998; Kuschel *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 1999; Chen-Izu *et al.*, 2000; Kilts *et al.*, 2000). No entanto, esta parece não ser a principal função do acoplamento do adrenoceptor β_2 com a proteína G_i , visto que este acoplamento também ativa a via G_i - $\beta\gamma$ -fosfatidilinositol-3-fosfato/proteína quinase B, que exerce efeito anti-apoptótico em miócitos cardíacos (Zhu *et al.*, 2001). A ativação dos adrenoceptores β_2 também participa na redução ou impede a apoptose induzida por hipóxia, por espécies reativas de oxigênio e pela excessiva estimulação dos adrenoceptores β_1 (Communal *et al.*, 1999; Shizukuda e Buttrick, 2002; Chesley *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001). A estimulação da via β_2 -proteína G_i parece ter implicações clínicas importantes, uma vez que já foi observada em modelo animal de hipertensão (Santos *et al.*, 2005), em algumas condições patogênicas, tais como insuficiência cardíaca congestiva (Bohm *et al.*, 1990; 1994; 1995; Eschenhagen, 1992) e em tecidos cardíacos de indivíduos idosos (Brodde *et al.*, 1995).

Os efeitos do NO na reatividade cardíaca são bifásicos e dose-dependentes, sendo que no coração normal onde as concentrações de NO são reduzidas (0,1 - 10 μ M), observa-se um efeito inotrópico positivo. Por outro lado, concentrações mais elevadas (> 100 μ M), induzidas pela administração de doadores de NO, causam efeito inotrópico negativo. Assim, por meio da biodisponibilidade de NO, também é possível modular o inotropismo e o cronotropismo cardíacos (Pinsky *et al.*, 1997; Casadei e Sears, 2003).

Compostos doadores de óxido nítrico (NO) vem sendo usados para o tratamento de doenças cardiovasculares como angina e insuficiência cardíaca há mais de 150 anos. Contudo, há apenas 26 anos foi descoberta a geração de óxido nítrico endógeno em mamíferos, e desde sua

descoberta, a química, a bioquímica e a fisiopatologia de espécies de óxido de nitrogênio se tornaram destaque no interesse clínico e científico.

O NO é uma molécula de sinalização capaz de regular uma série de funções cardiovasculares, sendo que o relaxamento da musculatura lisa, adesão/agregação plaquetária, modulação da neurotransmissão e neuroproteção, bem como na toxicidade mediada pelos macrófagos (Marin e Martinez, 1997) são as de maior repercussão. O óxido nítrico é liberado pela ativação da NO sintase (NOS) neural ou endotelial, essa ativação é mediada pela Ca^{+2} -calmodulina, sendo que sua meia-vida é de apenas poucos segundos.

Muitas das propriedades de sinalização do NO envolvem sua capacidade de ativar a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que é considerada o receptor fisiológico primário do NO, a qual catalisa a formação do segundo mensageiro: guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Porém, algumas evidências apontam para um mecanismo independente de GMPc, no qual o NO pode ativar proteínas alvo, de maneira direta, por meio de reações de S-nitrosilação (Massion e Balligand, 2003).

Dentre os doadores de NO, destacam-se os S-nitrosotióis (RSNOs), os quais são também espécies endógenas, pois foram detectados em fluidos do revestimento das vias aéreas, nas plaquetas e em neutrófilos. Estes compostos podem atuar em sistemas biológicos como carregadores de NO, na forma de tíois livres, ou de proteínas contendo cisteína, como a S-nitrosoglutationa (GSNO) (Stamler *et al.*, 1992). Desta forma, os RSNOs podem ser ferramentas úteis no tratamento de doenças que envolvem disfunções na biodisponibilidade de NO (Eiserich *et al.*, 1998), uma vez que são potentes relaxantes da musculatura lisa e inibidores da agregação plaquetária. O SNAC é um S-nitrosotiol (RSNOs) sintético, doador de NO.

A maquinaria de sinalização dos receptores acoplados à proteína G pode servir como alvo direto tanto de espécies reativas de oxigênio, incluindo NO, como também dos S-nitrosotióis. Tal efeito ocorre de maneira reversível e altamente específica, por meio de um mecanismo tiol-sensível, envolvendo uma reação de S-nitrosilação (Tarja Kokkola *et al.*, 2005; Whalen *et al.*, 2007).

Além do interesse científico pelo NO, existe também interesse significativo por seus congêneres oxidados, como o dióxido de nitrogênio (NO₂), o peroxinitrito (ONOO⁻) e o nitrito (NO₂⁻), entre outros, sendo tais moléculas importantes efetores biológicos, toxinas celulares e/ou agentes de sinalização celular. Contudo, as espécies reduzidas de óxido de nitrogênio foram relativamente ignoradas uma vez que acreditava-se que apenas o NO oxidado fosse ativo. Assim, o nitroxil (HNO), produzido a partir do NO reduzido em um elétron, recebeu, até recentemente, menor atenção do que as espécies oxidadas. Porém, estudos recentes revelaram aspectos importantes da química do HNO, que lhe conferiram importância biológica. A simplicidade estrutural dessa espécie triatômica contrasta com a complexidade de algumas de suas características e propriedades químicas fundamentais (Fukuto *et al.*, 2005).

Um dos primeiros estudos sobre a ação biológica do HNO em mamíferos avaliou seus efeitos anti-alcoólicos, exercidos por meio da inibição da aldeído-desidrogenase, uma enzima envolvida no metabolismo do etanol, responsável por metabolizar o acetaldeído derivado do etanol (Nagasawa *et al.*, 1990).

Para o estudo dos efeitos do HNO são usados compostos doadores desta espécie. Entre estes, o que está melhor caracterizado é o trioxodinitrato de sódio (Na₂N₂O₃), também chamado de Sal de Angelis (SA). Este, além de ser usado em terapias anti-alcoólicas, também tem propriedades vasodilatadoras (Fukuto *et al.*, 1993) mas, o mecanismo pelo qual tais compostos

induzem relaxamento da musculatura lisa vascular continua indeterminado, embora se saiba que tais efeitos são independentes de elevação da concentração plasmática de GMPc (Paolucci *et al.*, 2001).

Doadores de HNO também se mostraram capazes de modular a contratilidade cardíaca, exercendo efeitos inotrópico e lusitrópico positivos, independentes da carga imposta ao coração. Tais efeitos em miócitos cardíacos se relacionam com aumento da liberação e da captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, e aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio; e são independentes de GMPc e AMPc (Tochetti *et al.*, 2007).

Os efeitos inotrópicos do Sal de Angelis estão relacionados com a liberação de um peptídeo não-colinérgico-não-adrenérgico chamado: peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), dotado de diversas propriedades cardiovasculares, incluindo o efeito inotrópico positivo (Huang *et al.*, 1999).

Em 2003, Paolucci *et al.* demonstraram que os efeitos inotrópicos e lusitrópicos do Sal de Angelis são independentes da ativação dos receptores beta adrenérgicos, de modo que seu efeito complementa aquele da estimulação beta adrenérgica.

Tais informações não apenas destacam as diferenças de sinalização do HNO em relação ao NO nos vasos sangüíneos e no músculo cardíaco, mas também abrem caminho para novas investigações com o objetivo de identificar os alvos do HNO na bomba cardíaca. As evidências de atuação do HNO independente da sinalização do AMPc, fazem dos doadores do HNO candidatos potenciais para o tratamento do coração insuficiente.

Os objetivos deste estudo foram: (1) avaliar, do ponto de vista farmacológico, a população de adrenoceptores β mediando os efeitos cronotrópico e inotrópico das catecolaminas em átrios

direito e esquerdo de camundongos LDLr^{-/-} sob processo aterogênico e hipertrófico precoce; (2) avaliar por técnicas de biologia molecular a população de adrenoceptores β em ventrículo esquerdo de camundongos LDLr^{-/-} sob processo aterogênico e hipertrófico precoce; (3) analisar e comparar os mecanismos envolvidos nos efeitos promovidos por um doador de NO (SNAC) e um doador de HNO (Sal de Angelis), nestes camundongos.

2. OBJETIVOS

- Investigar a população de adrenoceptores β , do ponto de vista farmacológico, mediando os efeitos cronotrópico e inotrópico das catecolaminas em átrios direito e esquerdo de camundongos LDLr-/- sob processo aterogênico e hipertrófico precoce.
- Determinar a expressão dos genes dos adrenoceptores dos subtipos β_1 e β_2 em ventrículo esquerdo de camundongos LDLr-/- sob processo aterogênico e hipertrófico precoce.
- Analisar os mecanismos envolvidos nos efeitos promovidos pelo SNAC e Sal de Angelis nas respostas inotrópicas e cronotrópicas atriais cardíacas à isoprenalina obtidas nestes camundongos.
- Avaliar a capacidade do Sal de Angelis na prevenção das alterações hemodinâmicas, estruturais e funcionais do sistema cardiovascular.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Foram utilizados ratos da cepa Wistar (*Rattus norvegicus*), com três meses de idade e peso de 250-350g. Estes foram fornecidos ao biotério do Instituto de Biologia (IB) com 30 dias de idade, pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP e permaneceram no biotério, por 2 meses, antes do início dos experimentos.

Também foram utilizados camundongos machos, *knockout* para o gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}) e camundongos wild type, ou seja “não transgênico” (WT) da cepa C57BL6 de três meses de idade. As matrizes foram originalmente obtidos do *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA). Atualmente, os camundongos são criados em um dos biotérios do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Os animais foram mantidos em salas climatizadas, com temperatura controlada, e ciclo claro/escuro de 12/12 h, recebendo água potável e ração à vontade.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê Institucional para Ética em Experimentação Animal (CEEAA/IB – UNICAMP/ nº 881-1), que segue as diretrizes do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA).

Os camundongos foram distribuídos em 7 grupos experimentais, com número amostral variando de 4 a 13 camundongos em cada grupo. Estes foram assim constituídos:

Grupo 1) camundongos WT, os quais receberam ração comercial (Nuvital®) por 15 dias (WT);

Grupo 2) camundongos LDLr^{-/-}, que receberam ração comercial (Nuvital®) por 15 dias (CT);

Grupo 3) camundongos LDLr^{-/-}, que receberam ração comercial (Nuvital®) por 15 dias e concomitante tratamento com SNAC (produzido no Laboratório de Bioensaios “*in vitro*” Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia/UNICAMP pela Dra. Silvia Mika Shishido), na dose de 0,51 µmol/Kg/dia (veículo: água ultrapura), por via intraperitoneal (CT+SNAC)

Grupo 4) camundongos LDLr^{-/-}, que receberam ração comercial (Nuvital®) por 15 dias e concomitante tratamento com Sal de Angelis (produzido no Departamento de Química da Universidade do Arizona, pela Dra. Katrina M. Miranda), na dose de 0,30 µmol/Kg/dia (veículo: solução 10mM NaOH), por via intraperitoneal (CT+SA);

Grupo 5) camundongos LDLr^{-/-} que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura, 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico (AIN93G) por 15 dias (HC);

Grupo 6) camundongos LDLr^{-/-} que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura, 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico e concomitante tratamento com SNAC durante 15 dias, na dose de 0,51 µmol/Kg/dia (veículo: água milliQ), por via intraperitoneal (HC+SNAC);

Grupo 7) camundongos LDLr^{-/-} que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura, 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico e concomitante tratamento com Sal de Angelis na dose de 0,30 µmol/Kg/dia (veículo: solução 10mM NaOH), por via intraperitoneal (HC+SA).

Após 15 dias de tratamento e jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados utilizando xilazina-quetamina (Bayer AS[®] e Parke-Davis[®]) nas doses de 6 e 40mg/Kg, respectivamente, administradas por via intraperitoneal.

3.2 Determinação da Dose de Sal de Angelis Equipotente à de SNAC

Ratos Wistar machos, adultos foram submetidos à cateterização da veia e artéria femurais, sob anestesia por xilazina e ketamina (Bayer AS e Parke-Davis®) nas doses de 6 e 40 mg/Kg, respectivamente, administradas por via intraperitoneal. Após 24 h de recuperação da anestesia, os animais tiveram sua pressão arterial monitorada por meio de registro direto utilizando transdutor de pressão, enquanto recebiam doses crescentes de Sal de Angelis, por via endovenosa *in bolus*, de acordo com o procedimento, descrito por Ricardo *et al* (2002) para administração de SNAC. Os sinais do transdutor foram pré-amplificados e integrados para obtenção das pressões sistólica e diastólica pelo programa DI 220 AT-CODAS (Data Q Instruments, Springside Drive Akron, OH, EUA). A partir das diferenças entre a pressão arterial média na condição basal e após administração do Sal de Angelis foi calculado o efeito pressórico de cada dose do composto. Soluções de Sal de Angelis foram preparadas imediatamente antes do uso e descartadas em seguida. Cada uma das doses foi administrada *in bolus*, no volume final de 100 µl, através do cateter venoso, em ratos acordados, mantidos em suas gaiolas-moradia. Cada rato recebeu doses crescentes de Sal de Angelis na faixa de 0,1 a 3 µmol/Kg de peso corporal. As doses subsequentes foram aplicadas após a recuperação do valor basal da pressão arterial. A avaliação da equipotência pressórica do Sal de Angelis foi realizada em comparação ao SNAC (Ricardo *et al.*, 2002).

3.3 Determinação da Pressão Caudal

Os valores de pressão caudal foram registrados em camundongos acordados, por meio de sistema computadorizado por oclusão da artéria caudal (Kent Scientific XPB 1000, Litchfield Street Torrington, CT, EUA). O protocolo foi constituído de 6 sessões de treinamento, composta

por 15 ciclos de medida em cada sessão durante o ciclo claro dos animais. Após tal período, a pressão caudal de cada animal adaptado e em jejum de 12 horas, foi aferida utilizando-se 30 ciclos de medida. As medidas foram arquivadas em planilhas eletrônicas e para efeito de análise foram consideradas as pressões que se encontravam relacionadas aos valores dentro da faixa consideradas normais de volume caudal (25 a 50 μ l), para este sistema de medidas.

3.4 Determinação de Índices Morfométricos: Diâmetro de Cardiomiócitos e Deposição de Colágeno

Os corações foram retirados, por toracotomia mediana, sendo que o ventrículo esquerdo foi separado do tecido e fixado por 48 horas em formalina. Após fixação e processamento, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se, a seguir, cortes histológicos transversais de 4 μ m. Os cortes histológicos foram corados em lâmina com solução hematoxilina - eosina para aferição do diâmetro dos cardiomiócitos. Lâminas com cortes histológicos transversais de 6 μ m e corados pela técnica de *Picro Sirius red*, específica para visualização de colágeno, foram preparadas para avaliação do interstício e região perivascular do miocárdio.

Fotomicrografias foram obtidas de tais cortes utilizando-se câmara digital acoplada ao microscópio Leica IM50 (versão 1.20). Uma linha perpendicular que atravessava o núcleo foi traçada através do eixo longitudinal do cardiomiócito, e seu diâmetro foi mensurado pelo programa *Spring* (Camara *et al*, 1996). A área ocupada pelo colágeno foi medida nas fotomicrografias pelo programa *BioColorScanner*. Foram analisados 5 diferentes cortes transversais por ventrículo, nos quais efetuaram-se 5 a 10 medições dos cardiomiócitos por corte histológico. Um único examinador analisou todos os cortes histológicos.

3.5 Reatividade Atrial à Isoprenalina

3.5.1 Átrio Esquerdo Isolado

Mantendo-se o animal sob anestesia (xilazina e ketamina (Bayer AS e Parke-Davis®) nas doses de 6 e 40 mg/Kg, respectivamente, administradas por via intraperitoneal), o átrio esquerdo era isolado e colocado em cuba para órgão isolado contendo 20 ml de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição: (milimolar): NaCl, 115,0; KCl, 4,6; CaCl₂.2H₂O, 2,5; KH₂PO₄, 1,2; MgSO₄.7H₂O 2,5; NaHCO₃, 25,0; glicose, 11,0 e ácido ascórbico, 0,11, mantida a 36, 5±0,1 °C, borbulhado com 95%O₂:5%CO₂. As contrações foram induzidas por estímulos elétricos (5 ms de duração, frequência de 2 Hz e intensidade 20% acima do limiar de excitação do tecido; Blinks, 1965; Kaumann e Molenaar, 1996) que eram aplicados por meio de um eletrodo bipolar de platina, ligado a um estimulador (Grass Instruments, modelo S88, MA, EUA). Cada átrio foi submetido à tensão diastólica de 4,9 mN ou 0,5 gf, até o fim do período de estabilização, de aproximadamente 45 minutos. Foram descartados os átrios que apresentaram irregularidades tais como arritmias, ausência de resposta aos estímulos elétricos ou instabilidade de tensão desenvolvida nos primeiros 45 minutos de incubação.

Curvas comprimento-tensão determinaram o comprimento ótimo de cada átrio esquerdo, que correspondeu ao comprimento em que o músculo atrial desenvolveu máxima tensão. A curva comprimento-tensão foi obtida cerca de 25 minutos após o início de período de estabilização e portanto 20 minutos antes do início da obtenção da curva concentração-efeito ao agonista de adrenoceptores. Este tempo foi suficiente para que a tensão desenvolvida se tornasse estável (Moura, 2002). O aumento de tensão em resposta às doses crescentes de agonista de adrenoceptores foi considerado como indicativo de resposta inotrópica positiva ao agente farmacológico.

3.5.2 Átrio Direito Isolado

Em seguida, o átrio direito também era isolado e colocado nas mesmas condições do átrio esquerdo. O átrio direito se contrai rítmica e espontaneamente, uma vez que nele se encontra o principal marca-passo cardíaco. Foram descartados os átrios que não apresentaram atividade rítmica regular após 45 minutos de incubação (Santos *et al.*, 2005).

Nos átrios direitos foi analisado o efeito cronotrópico positivo de agentes agonistas adrenérgicos, os quais induziram aumento da frequência de batimentos.

3.6 Tratamento Farmacológico dos Átrios

Antes da obtenção das curvas concentração-efeito, todos os átrios foram submetidos a tratamento farmacológico *in vitro* (Santos *et al.*, 2005). Fenoxibenzamina (10 μ M) foi adicionada ao líquido de incubação para promover a inibição do sistema de captação extra-neuronal, recaptção neuronal (Iversen e Salt, 1970; Iversen *et al.*, 1972), bloqueio dos adrenoceptores α (Besse e Furchgott, 1976) e dos receptores colinérgicos muscarínicos (Furchgott e Bursztyl, 1967). A fenoxibenzamina ficou em contato com a preparação por 15 minutos e, após esse período, a solução de Krebs-Henseleit foi substituída, a cada 10 minutos, até que a tensão desenvolvida ou a frequência de batimentos pelo tecido se estabilizasse.

Para garantir o bloqueio do processo de captação extra-neuronal, corticosterona (Iversen e Salt, 1970; Bonisch e Trendelenburg, 1974) foi adicionada às preparações, na concentração de 10 μ M, 15 minutos antes da obtenção da curva concentração-efeito. Este inibidor permaneceu em contato com a preparação durante a obtenção da referida curva concentração-efeito.

Para garantir inibição do sistema de recaptação neuronal, desipramina (10 μM) foi adicionada ao líquido de incubação (Salt, 1972), após o tratamento descrito acima, 15 minutos antes do início da curva concentração-efeito, sendo que esta permaneceu em contato com o tecido durante a obtenção da curva.

3.7 Curvas Concentração-efeito

Obtivemos curvas concentração-efeito ao agonista não seletivo de adrenoceptores β , isoprenalina, na ausência e presença do antagonista seletivo para o adrenoceptor subtipo β_2 , ICI118.551 na concentração de 50 nM. Este antagonista permaneceu em contato com a preparação durante duas horas, antes do início da curva concentração-efeito (Bilsk *et al.*, 1983; Kaumann, 1997). Obtivemos também curvas concentração-efeito ao ICI118.551. Nesta curva cada dose crescente de ICI118.551 permaneceu em contato com o tecido durante 15 minutos.

As curvas concentração-efeito foram obtidas por adição cumulativa de concentrações crescentes, com incrementos sucessivos de 0,5 unidade logarítmica na concentração molar do composto (Van Rossum, 1963). A resposta máxima foi determinada quando três concentrações sucessivas e crescentes do composto não determinaram alterações da resposta obtida com a concentração imediatamente anterior. Ao final deste procedimento, os átrios esquerdos foram removidos, secos em papel de filtro e pesados, depois foram descartados juntamente com os átrios direitos.

A resposta inotrópica foi expressa em miliNewtons (mN) de tensão desenvolvida por 100 miligramas de peso úmido de tecido (mN/100 mg de tecido úmido), e a resposta cronotrópica foi expressa em batimentos por minuto (bat/min).

A sensibilidade dos átrios aos compostos utilizados foi avaliada pela determinação do valor pD_2 do agonista. Este corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina uma resposta igual a 50% da resposta máxima (EC_{50}), em cada experimento.

3.8 Tratamento com Toxina Pertussis (PTX)

Para avaliar o envolvimento da proteína G_i na resposta à isoprenalina, camundongos foram tratados com PTX (600 $\mu\text{g} / \text{Kg}$, i. p.) 24 h antes do sacrifício.

Para certificar a efetividade do tratamento com Toxina Pertussis (PTX), os átrios isolados foram incubados com 20 μM de carbacol por 5 minutos. A ausência de respostas cronotrópica e inotrópica negativas certifica a efetividade do tratamento (Heubach *et al.*, 2002). Este experimento se baseia na premissa que o efeito do carbacol é mediado por receptores muscarínicos do subtipo M_2 acoplados à proteína G_i (Caulfield e Birdsall, 1998). Sendo a PTX uma inativadora da proteína G_i , espera-se que este efeito seja abolido em camundongos tratados com esta toxina (Heubach *et al.*, 2002).

3.9 Determinação do Perfil de Expressão dos mRNAs dos Adrenoceptores β_1 e β_2 .

3.9.1 Extração de mRNA

Ácido ribonucléico (RNA) total foi extraído de cerca de 250 mg de ventrículo esquerdo por meio de adição de 1 ml de reagente Trizol (GIBCO BRL, Life Technologies; Rockville, MD, EUA). Os ventrículos foram homogenizados em homogenizador (Ultra Turrax, Ika, North Chase Pkwy, SE Wilmington, USA) e incubados por 5 min à temperatura ambiente. Em

seguida, 200 µl de clorofórmio foram adicionados e as amostras vigorosamente homogeneizadas por 15 s. Após incubação de 3 min, à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4°C. O volume correspondente à fase aquosa foi transferido para outro tubo e o RNA precipitado pela adição de 500 µL de álcool isopropílico, seguido de incubação por 10 min, à temperatura ambiente. Nova centrifugação a 12.000 g por 15 min a 4°C foi realizada, o *pellet* obtido foi lavado em seguida com 1 ml de etanol a 75%, centrifugado a 7.500 g por 10 min a 4°C e, posteriormente, lavado com 1 ml de etanol a 100%. O etanol foi descartado e o *pellet* parcialmente seco em estufa a 37°C. As amostras foram ressuspensas em 30 µl de água previamente tratada com dietil pirocarbonato (DEPC).

A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose desnaturante para visualização das unidades ribossomais 28S e 18S após coloração com brometo de etídeo, e a quantificação do mesmo foi feita por leituras de absorbâncias a 260 e 280 nm em aparelho Genequant (Pharmacia Biotech; Midland, ON, Canadá).

3.9.2 Obtenção de cDNA a partir de RNA total

A reação da transcriptase reversa (PCR) foi realizada a 42°C durante 50 min, em 20 µl de uma mistura contendo 2 µg de RNA total, 10 mM de dNTP mix, 40 U/µl de inibidor de RNase, 0,1 M de DTT, 5X *first-strand buffer*, 0,5 µg/ml de oligo dT e 200 U da enzima “Super Script II RNase H⁻ Reverse Transcriptase” (GIBCO BRL – Life Technologies; Rockville, MD, EUA).

3.9.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) resultante foi amplificado com os "primers" listados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos "primers" utilizados na reação de PCR.

| GENE | Nº DE CICLOS | TEMPERATURA DE ANELAMENTO | FRAGMENTO OBTIDO (pares de base) | SEQUÊNCIA (5'-3') |
|------------------------|--------------|---------------------------|----------------------------------|--|
| GAPDH | 25 | 60°C | 350 | TTCAACACCATCGAGAAGGCCAGA TCATGAGCCCTTCCACTATGCCAA TGATCTGGTCATGGGATTGCTGGT |
| Adrenoceptor β_1 | 31 | 60°C | 353 | TTGGTGACGAAATCGCAGCACTTG AGGGGCACGTAGAAAGACAC |
| Adrenoceptor β_2 | 30 | 57°C | 199 | ACCAAGAATAAGGCCCGAGT |

A reação de PCR foi realizada em 25 μ l de uma mistura contendo tampão da Taq polimerase, 50 mM de MgCl₂, 10 mM de cada desoxinucleosídeo trifosfato, 2,5 U/ μ l de Taq DNA polimerase, 10 pmol de "primer" direto, 10 pmol de "primer" reverso, e cDNA. A PCR foi realizada em termociclador (modelo 9700, Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA) iniciando com 94°C por 3 min para desnaturação, seguido de número variável de ciclos de 94°C por 30 s, 30 s de anelamento em temperatura específica (Tabela 1) e alongação por 45 s a 72°C. O número de ciclos usados foi 25 para GAPDH, 31 para adrenoceptor β_1 e 30 para adrenoceptor β_2 , determinados após obtenção de curva sigmóide de 18 a 40 ciclos, sendo utilizado o ponto correspondente ao número de ciclos necessários para amplificação semi-máxima (Tabela 1). Os produtos da reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% e a intensidade das bandas obtidas foi determinada por densitometria em programa *Scion Image* (Scion Corporation; Frederick, Maryland, EUA). Foi utilizado como controle interno o gene da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), pois não foram detectadas diferenças significativas na expressão gênica desta enzima em cardiomiócitos de camundongos LDLr^{-/-} comparados aos WT (Winer *et al.*, 1999). Os dados estão expressos em valores de densitometria do gene de interesse em relação ao valor de densitometria do gene da GAPDH. Os experimentos foram realizados a partir de amostras de cDNA originários de 4 animais de cada um dos 4 grupos.

3.10 Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos como médias aritméticas, com seus respectivos erros padrão. Os grupos foram comparados por Análise de Variância (ANOVA) mono e bifatorial, considerando os fatores de variação: gene, dieta e tratamento. Nos casos em que o valor de F foi significativo, a análise de variância era seguida por teste de Tukey.

Para a frequência basal, tensão basal, pD_2 e resposta máxima, além da ANOVA para experimentos fatoriais, foi feita a comparação dos dados obtidos na presença e na ausência de antagonista de adrenoceptores β_2 (ICI 118,551) utilizando teste t de Student.

As diferenças entre os grupos foram considerada significativas quando o valor de p foi menor que 0,05. A análise estatística foi feita com o programa SAS versão 8.2 (*Software Statistical Analysis System*) (SAS Institute, Cary, NC, EUA).

As curvas concentração-efeito foram ajustadas e analisadas pelo método de regressão não linear, as quais forneceram dados para determinar os valores pD_2 dos agonistas. Os gráficos foram feitos com o auxílio do Programa *GraphPad Prism* (San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Determinação da dose ótima de SNAC e de Sal de Angelis

Sal de Angelis, administrado em doses variando de 0,1 até 3 $\mu\text{mol/Kg}$, em ordem aleatória, acarretou diminuição da PAM de $9 \pm 1,41$ até 22 ± 1 mmHg em ratos normotensos (Figura 1). Este efeito é similar ao do SNAC, que também causou queda da pressão arterial média (PAM) em ratos acordados e normotensos, de modo dose dependente (Ricardo *et al.*, 2002).

Estes dados confirmam que HNO, assim como NO, têm propriedade vasodilatadora significativa. O SNAC se mostrou 9 a 10 vezes mais potente que o Sal de Angelis, uma vez que efeitos hemodinâmicos similares foram obtidos com as doses de 0,028 μmol de SNAC / Kg e 0,3 μmol de SA / Kg, as quais provocaram queda máxima da PAM de $14 \pm 1,05$ e $15 \pm 1,04$ mmHg, respectivamente, cuja duração foi inferior a 20 min. Essas duas doses foram usadas para comparação direta entre as ações do NO e do HNO nos experimentos subseqüentes.

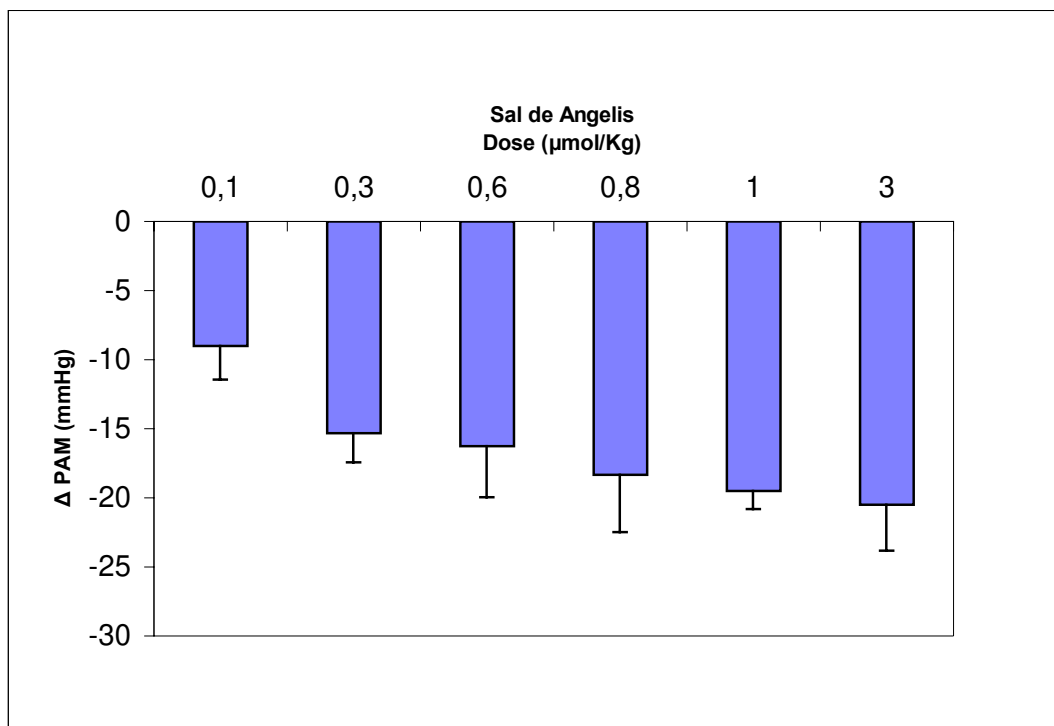
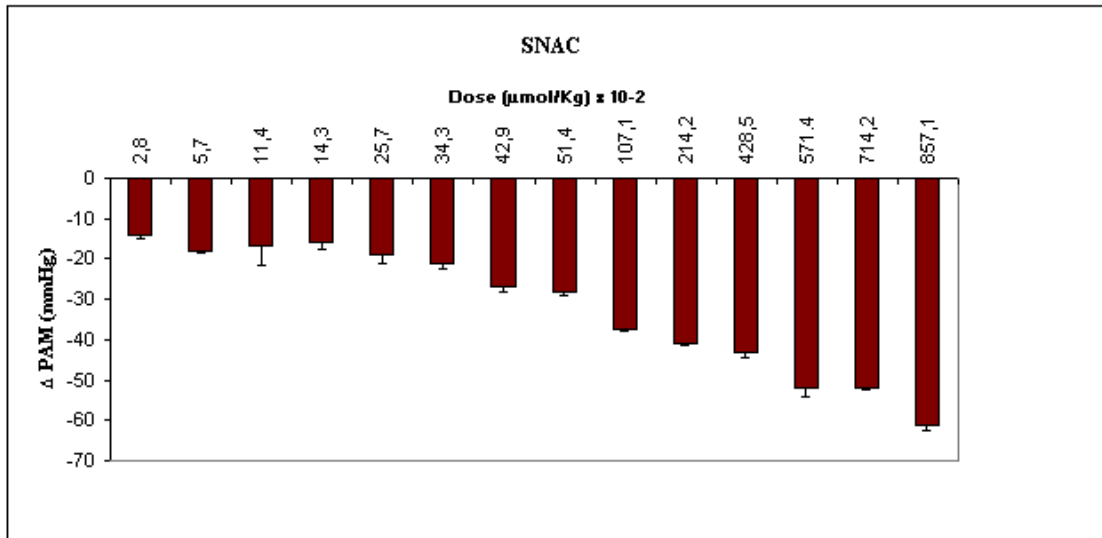


Figura 1- Relação dose resposta da pressão arterial média (Δ PAM), após administração de SNAC (painel superior) (Ricardo et al., 2002) e Sal de Angelis (painel inferior) em ratos machos Wistar conscientes e normotensos. Cada coluna representa a média \pm 1 SEM de 6 ratos.

4.2 Perfil Pressórico

Os valores de pressão arterial média em camundongos machos conscientes estão apresentados na Figura 2. Camundongos dos grupos CT ($129 \pm 2,0$ mmHg) e HC ($126 \pm 1,7$ mmHg) apresentam PAM mais alta (cerca de 12%) comparados com aqueles do grupo WT ($114 \pm 2,3$ mm Hg), indicando assim uma interferência da alteração gênica (F: 27 $p < 0,0001$) e da dieta sobre a PAM (F: 65,7 $p < 0,0001$). Os camundongos do grupo CT tratados com SNAC apresentaram PAM cerca de 23% menor do que camundongos do grupo CT ($99 \pm 3,0$ vs $129 \pm 2,0$ mmHg, respectivamente). Redução similar foi observada quando os camundongos CT foram tratados com SA ($97 \pm 3,8$ vs $129 \pm 2,0$ mmHg). Assim, a hipertensão verificada no grupo CT foi prevenida tanto pelo tratamento com SNAC como com SA, indicando assim uma interferência do tratamento utilizado (F: 9,1 $p < 0,001$) Contudo, em camundongos HC, o tratamento por 15 dias com SNAC (PAM: $128 \pm 1,8$ mm Hg) ou com SA (PAM: 131 ± 4 mm Hg) não foi capaz de prevenir a hipertensão (Figura 2).

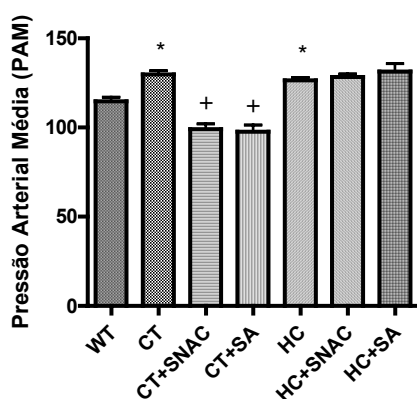


Figura 2- Pressão arterial média (PAM) de camundongos WT e LDLr/-. Valores expressos em média \pm EPM, WT(wild type) (n=10); CT (LDLr/-) (n=10); CT+SNAC (LDLr/- tratados 15 dias com SNAC) (n=13); CT+SA (LDLr/- tratados 15 dias com Sal de Angelis) (n=5); HC (LDLr/- alimentados 15 dias com dieta aterogênica) (n=13); HC+SNAC (LDLr/- alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com SNAC durante 15 dias) (n=10); HC+ SA (LDLr/- alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com Sal de Angelis durante 15 dias) (n=7). Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, ANOVA e teste de Tukey): * CT e HC vs WT; + CT+SNAC e CT+SA .vs CT.

4.3 Índices Morfométricos Cardíacos e Deposição de Colágeno no Coração

4.3.1 Peso Ventricular Esquerdo Relativo

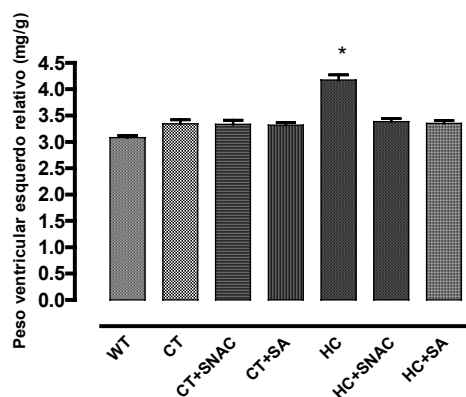


Figura 3 – Peso ventricular esquerdo relativo (mg/g peso corpóreo) em camundongos *wild type* (WT) e LDLr-/- machos. WT (*wild type*); CT (LDLr-/-); CT+SNAC (LDLr-/- tratados 15 dias com SNAC); CT+SA (LDLr-/- tratados 15 dias com Sal de Angelis); HC (LDLr-/- alimentados 15 dias com dieta aterogênica); HC+SNAC (LDLr-/- alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com SNAC durante 15 dias); HC+ SA (LDLr-/- alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com Sal de Angelis durante 15 dias). Valores expressos em médias \pm EPM (n= 4 – 6); Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significativas (* $p < 0,05$ vs demais grupos, ANOVA e teste de Tukey).

A figura 3 apresenta a comparação do peso ventricular esquerdo em camundongos machos dos grupos estudados. Verificou-se que os camundongos do grupo HC apresentam significativo incremento no peso ventricular esquerdo relativo, o qual foi 1,25 vezes maior em relação aos camundongos do grupo CT e 1,35 vezes maior em relação aos camundongos do grupo WT ($4,16 \pm 0,10$ vs $3,34 \pm 0,09$ vs $3,08 \pm 0,04$ mg/g de peso corporal, respectivamente), indicando assim uma interferência da dieta (F: 50,1 $p < 0,0001$). O aumento do peso ventricular esquerdo relativo observado em camundongos HC ($4,18 \pm 0,25$) foi impedido pelo tratamento com SNAC ou com SA ($3,57 \pm 0,39$ e $3,35 \pm 0,05$ mg/g de peso corporal, respectivamente), indicando assim uma interferência do tratamento (F: 32 $p < 0,0001$).

4.3.2 Diâmetro de Cardiomiócitos e Deposição de Colágeno

Camundongos do grupo CT não apresentaram alterações na deposição de colágeno e diâmetro dos cardiomiócitos quando comparados com camundongos do grupo WT. Nenhuma alteração foi observada com a administração de SNAC e SA nos camundongos do grupo CT. Porém, cardiomiócitos de camundongos HC apresentaram diâmetro significativamente maior que aqueles do grupo CT ($25,20 \pm 0,59 \mu\text{m}$ vs. $19,26 \pm 0,80 \mu\text{m}$, respectivamente; $p < 0,05$, ANOVA e teste de Tukey), indicando uma interferência da dieta (F: 8,6 $p < 0,05$). O diâmetro de cardiomiócitos de camundongos tratados com SNAC não diferiu do grupo CT ($21,70 \pm 0,65 \mu\text{m}$; $p < 0,05$, ANOVA e teste de Tukey) (Garcia *et al.*, 2008). O diâmetro de cardiomiócitos de camundongos tratados com SA foi significativamente menor do que o diâmetro dos cardiomiócitos de camundongos de todos os outros grupos ($13,86 \pm 0,36 \mu\text{m}$), inclusive o WT ($18,77 \pm 0,52 \mu\text{m}$), indicando uma interferência do tratamento (F: 48 $p < 0,0001$) (Figuras 4 e 5).

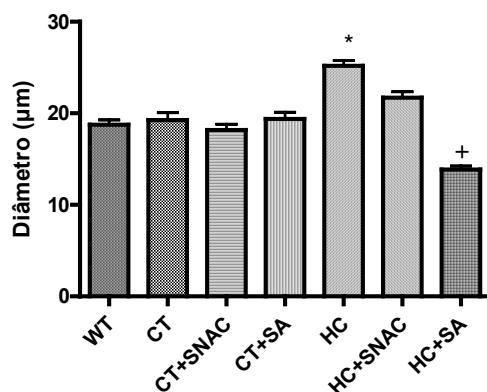


Figura 4 – Diâmetro dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de camundongos machos (μm). WT (wild type); CT (LDLr^{-/-}); CT+SNAC (LDLr^{-/-} tratados 15 dias com SNAC); CT+SA (LDLr^{-/-} tratados 15 dias com Sal de Angelis); HC (LDLr^{-/-} alimentados 15 dias com dieta aterogênica); HC+SNAC (LDLr^{-/-} alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com SNAC durante 15 dias); HC+SA (LDLr^{-/-} alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com Sal de Angelis durante 15 dias). Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, segundo ANOVA e teste de Tukey): * vs CT; † vs. diferente dos demais.

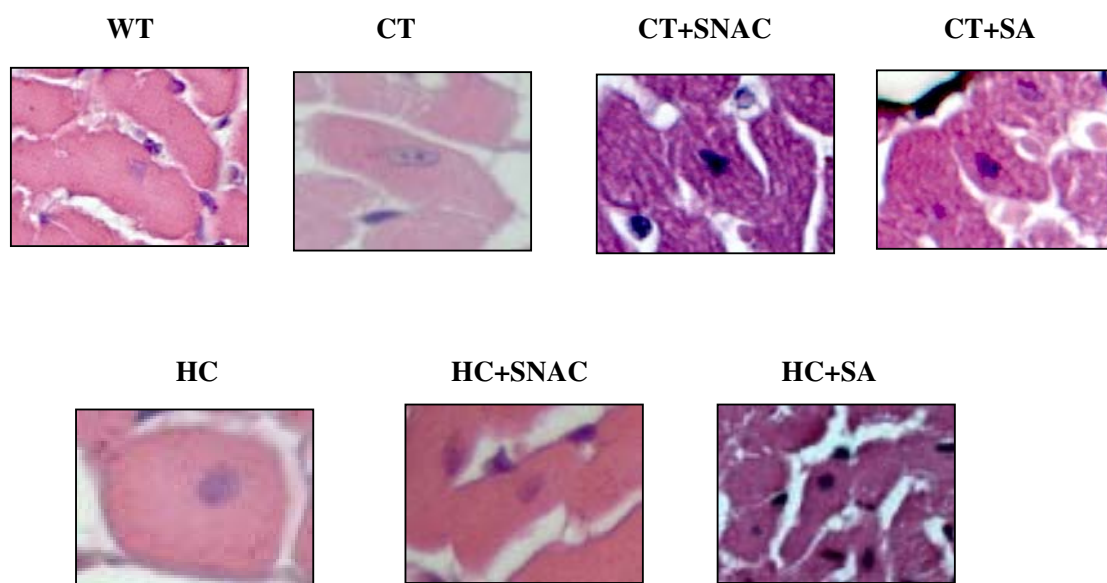


Figura 5 - Cardiomiócitos de ventrículo esquerdo de camundongos macho. WT (wild type); CT (LDLr-/-); CT+SNAC (LDLr-/- tratados 15 dias com SNAC); CT+SA (LDLr-/- tratados 15 dias com Sal de Angelis); HC (LDLr-/- alimentados 15 dias com dieta aterogênica); HC+SNAC (LDLr-/- alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com SNAC durante 15 dias); HC+ SA (LDLr-/- alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com Sal de Angelis durante 15 dias).. Os cortes histológicos foram corados com picrosirius red e estão com aumento de 400X.

Os camundongos do grupo CT não apresentaram alterações na quantidade de colágeno depositado no tecido ventricular esquerdo quando comparados com camundongos WT, seja na região intersticial ($0,33 \pm 0,05\%$ vs $0,55 \pm 0,17\%$, respectivamente), seja na região perivascular ($1,14 \pm 0,42\%$ vs $0,84 \pm 0,23\%$, respectivamente). Porém, houve aumento significativo na deposição de colágeno no ventrículo esquerdo de camundongos HC em ambas as regiões, intersticial ($2,69 \pm 0,30\%$), indicando uma interferência da dieta (F:25,9 $p < 0,0001$) e perivascular ($5,17 \pm 1,2\%$), indicando um efeito da dieta (F: 6,1 $p < 0,05$) (Figuras 6 e 7). Tal deposição foi prevenida pela administração de SNAC e Sal de Angelis no grupo HC, indicando uma interferência do tratamento (F: 18,8, $p < 0,0001$). Nenhuma alteração significativa foi observada com a administração de SNAC e SA nos camundongos do grupo CT (Figuras 6 e 7).

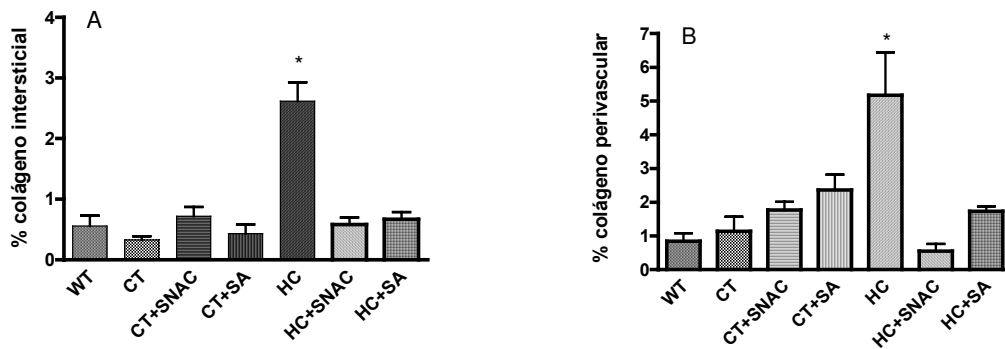


Figura 6 – Deposição intersticial (A) e perivascular (B) de colágeno, em ventrículo esquerdo de camundongos machos. WT (wild type); CT (LDLr-/-); CT+SNAC (LDLr-/- tratados 15 dias com SNAC); CT+SA (LDLr-/- tratados 15 dias com Sal de Angelis); HC (LDLr-/- alimentados 15 dias com dieta aterogênica); HC+SNAC (LDLr-/- alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com SNAC durante 15 dias); HC+ SA (LDLr-/- alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com Sal de Angelis durante 15 dias). Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significativas (* $p < 0,05$, segundo ANOVA e teste de Tukey).

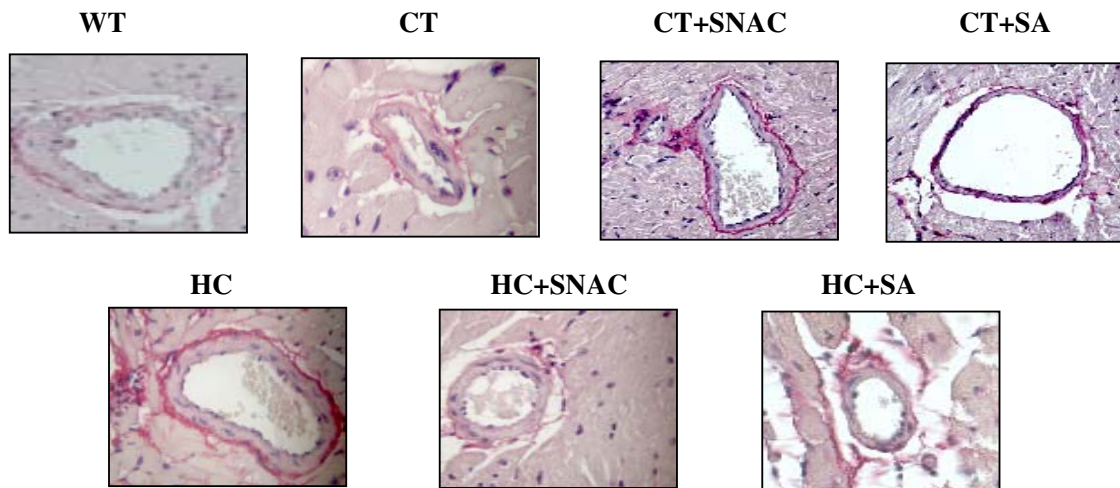


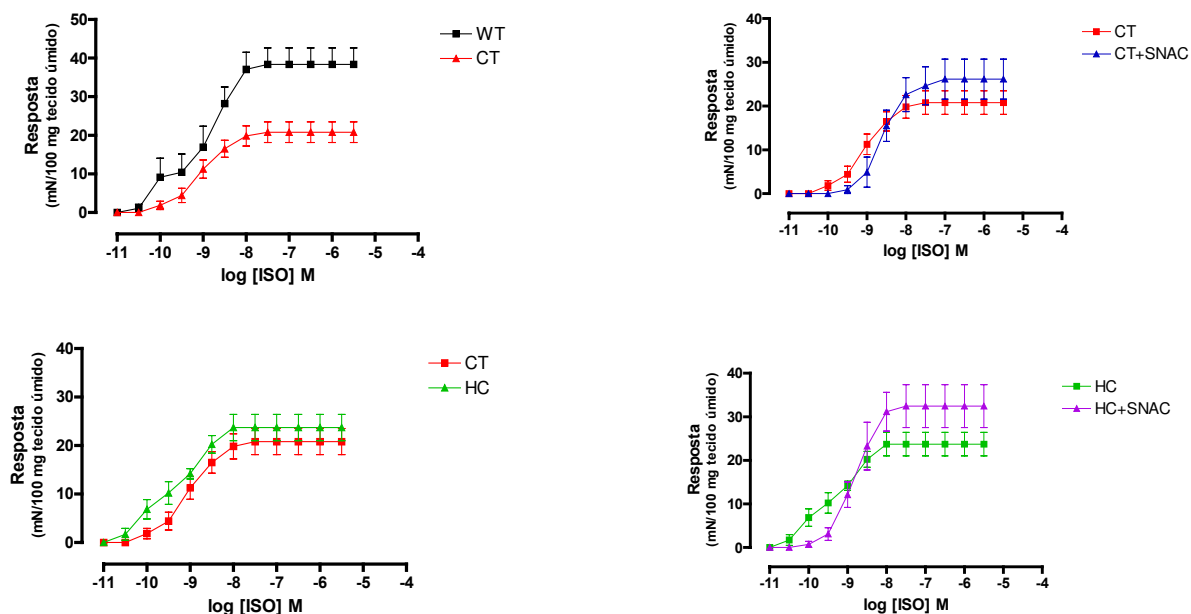
Figura 7- Deposição de colágeno na região perivascular de ventrículo esquerdo de camundongos machos. WT (wild type); CT (LDLr-/-); CT+SNAC (LDLr-/- tratados 15 dias com SNAC); CT+SA (LDLr-/- tratados 15 dias com Sal de Angelis); HC (LDLr-/- alimentados 15 dias com dieta aterogênica); HC+SNAC (LDLr-/- alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com SNAC durante 15 dias); HC+ SA (LDLr-/- alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com Sal de Angelis durante 15 dias).. Os cortes histológicos foram corados com picrosirius red e estão com aumento de 400X.

4.4 Resposta Inotrópica à Isoprenalina – Efeito do SNAC

Encontram-se apresentados na Tabela 2 a tensão basal desenvolvida por átrios esquerdos isolados de camundongos, o pD_2 e a resposta máxima à isoprenalina, na ausência e na presença de ICI 118.551. As respectivas curvas concentração-efeito à isoprenalina estão na Figura 8. Átrios esquerdos de camundongos do grupo CT apresentaram menor tensão basal (62%) e resposta máxima em comparação com os átrios de animais do grupo WT, indicando uma interferência da alteração gênica (F: 6,2 $p < 0,01$; F: 10,4 $p < 0,0001$, respectivamente). A administração de SNAC aos camundongos do grupo CT não alterou a tensão basal, ou a resposta máxima à isoprenalina. O tratamento dos camundongos do grupo CT com dieta aterogênica não alterou estes parâmetros (HC vs. CT).

Nenhuma diferença foi observada nos valores pD_2 da isoprenalina entre WT vs. CT e CT vs. HC ($p > 0,05$; ANOVA e teste de Tukey). No grupo CT+SNAC a sensibilidade à isoprenalina também não foi significativamente alterada. O tratamento dos animais do grupo HC com SNAC não alterou o déficit de tensão, mas reverteu a supersensibilidade à isoprenalina no átrio esquerdo de camundongos HC, indicando uma interferência do tratamento (F:9 $p < 0,001$) (Figura 8A). Quando a curva concentração-efeito foi obtida na presença de ICI 118.551, foram canceladas as diferenças na tensão basal e na resposta máxima à isoprenalina (Figura 8B e Tabela 2). Este efeito do ICI118.551 sobre a tensão basal não foi observado em átrio esquerdo de camundongos CT tratados com SNAC. E ainda, na presença deste antagonista seletivo de adrenoceptores β_2 , o átrio esquerdo de camundongos do grupo HC+SNAC apresentou supersensibilidade à isoprenalina quando comparado ao grupo HC ($pD_2 = 9,48 \pm 0,26$ vs. $9,07 \pm 0,17$) indicando uma interferência do tratamento (F: 5,7 $p < 0,05$).

(A)



(B)

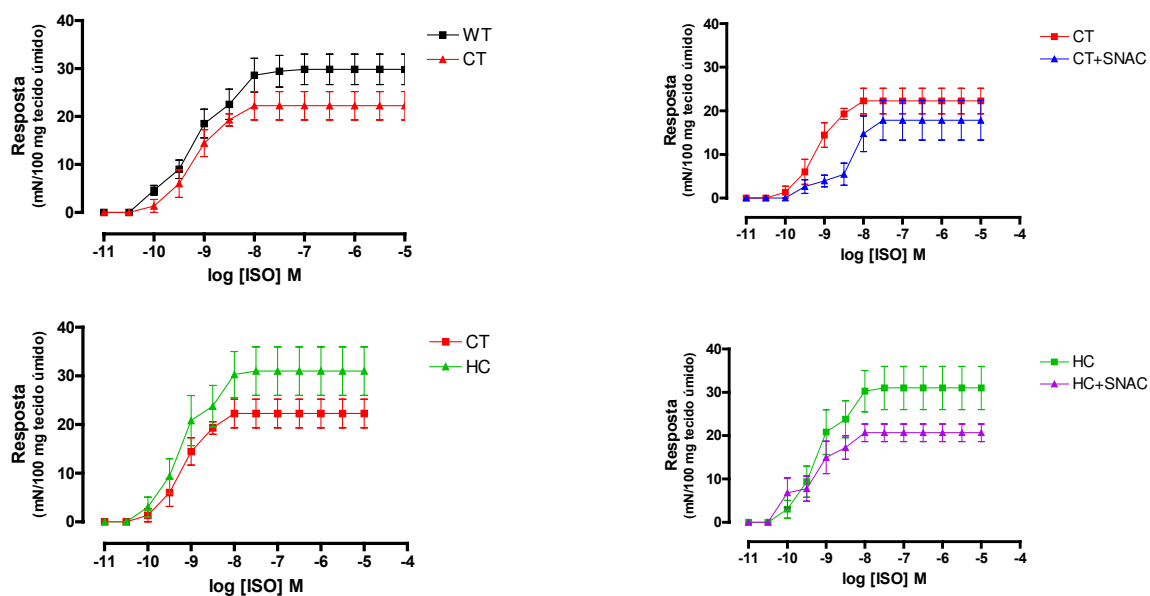


Figura 8- Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO) em átrio esquerdo de WT (wild type); CT (LDLr^{-/-}); CT+SNAC (LDLr^{-/-} tratados 15 dias com SNAC); CT+SA (LDLr^{-/-} tratados 15 dias com Sal de Angelis); HC (LDLr^{-/-} alimentados 15 dias com dieta aterogênica); HC+SNAC (LDLr^{-/-} alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com SNAC durante 15 dias); HC+ SA (LDLr^{-/-} alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com Sal de Angelis durante 15 dias), na ausência de ICI 118.551 (painel A) e presença de ICI 118.551 (painel B).

Tabela 2- Tensão basal (TB, mN/100mg), pD₂ e resposta máxima (Rmax) à isoprenalina em átrio esquerdo de camundongo, na presença e ausência de antagonista β₂ adrenérgico (ICI 118.551).

| | SEM ICI118.551 | | | COM ICI118.551 | | |
|---------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|--------------|
| | TB | pD ₂ | Rmax | TB | pD ₂ | Rmax |
| WT | 51,93 ± 3,79 | 8,66 ± 0,10 | 41, 22 ± 2,9 | 58,63 ± 5,54 | 8,87 ± 0,17 | 33,02 ± 2,88 |
| CT | 25,21 ± 8,06 † | 9,05 ± 0,17 | 21,99 ± 2,39 † | 71,56 ± 9,45 # | 9,05 ± 0,23 | 22,27 ± 9,95 |
| CT+SNAC | 35,44 ± 5,02 † | 8,53 ± 0,13 | 26,18 ± 4,58 † | 30,94 ± 5,8 | 8,44 ± 0,22 | 17,85 ± 4,53 |
| HC | 27,93 ± 3,44 † | 9,56 ± 0,22 † | 25,87 ± 2,03 † | 62,25 ± 5,46 # | 9,07 ± 0,17 | 34,59 ± 4,22 |
| HC+SNAC | 26,55 ± 4,31 † | 8,79 ± 0,10 ° | 32,48 ± 0,92 † | 72,09 ± 14,56 # | 9,48 ± 0,26 # | 29,61 ± 9,07 |

Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, ANOVA e teste de Tukey): † vs WT, ° vs HC, # vs. sem ICI; sem ICI- WT (**wild type**) (n:7) CT (LDLr-/-) (n: 7) CT+SNAC (LDLr-/- tratados 15 dias com SNAC) (n:4) HC (LDLr-/- alimentados 15 dias com dieta aterogênica) (n: 6) HC+SNAC (LDLr-/- alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com SNAC durante 15 dias) (n: 5); com ICI- WT(**wild type**) (n: 7) CT (LDLr-/-) (n: 6) CT+SNAC (LDLr-/- tratados 15 dias com SNAC) (n:4) HC (LDLr-/- alimentados 15 dias com dieta aterogênica) (n: 7) HC+SNAC (LDLr-/- alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com SNAC durante 15 dias) (n: 5).

A Figura 9 evidencia o efeito do ICI 118.551 sobre a resposta à isoprenalina em átrios esquerdos de camundongos dos grupos HC (painel A) e HC+SNAC (painel B). O antagonista de adrenoceptores β₂ não alterou a resposta à isoprenalina em átrio esquerdo de camundongos HC (Figura 9A). Entretanto, deslocou para a esquerda a curva concentração-efeito à isoprenalina obtida em átrio esquerdo de camundongos do grupo HC + SNAC em relação à curva concentração-efeito obtida na ausência de ICI 118.551 (Figura 9B). Este dado indica que, neste grupo, o adrenoceptor β₂ pode estar exercendo um efeito negativo sobre o inotropismo cardíaco, provavelmente por acoplar-se à proteína G inibitória (Gi), contrapondo-se ao efeito estimulatório mediado pelo acoplamento dos adrenoceptores β₁ à proteína G estimulatória (Gs).

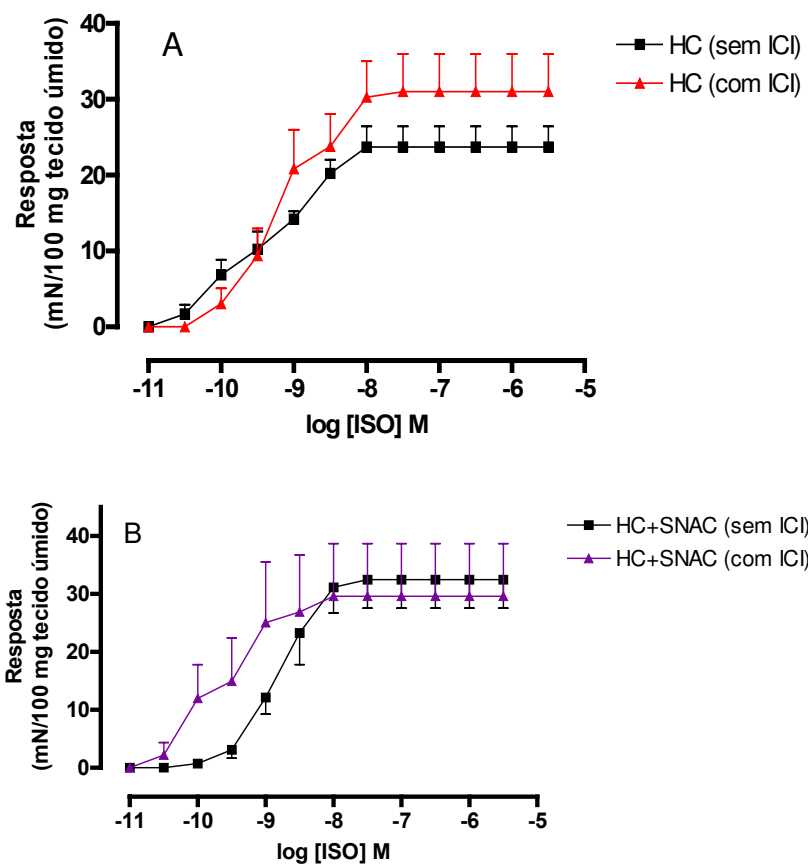


Figura 9 - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO), na ausência e presença de ICI 118.551, em átrio esquerdo de camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica (HC; painel A) e LDL^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica e tratados 15 dias com SNAC (HC+SNAC, painel B).

Os camundongos dos grupos HC e HC+SNAC foram tratados previamente com toxina pertussis (PTX) objetivando a inativação das respostas mediadas por G_i. Entretanto, as curvas aqui apresentadas referem-se a um, ou no máximo dois experimentos e, portanto, estes resultados precisam ser analisados com cautela, pois não foi possível realizar uma análise estatística. O efeito do tratamento com PTX pode ser observado na Figura 10. A curva concentração-efeito à isoprenalina obtida em átrio esquerdo de camundongos do grupo HC não foi alterada pelo tratamento com PTX (Figura 10A), o que provavelmente indica que neste grupo o adrenoceptor β_2 , se presente, estaria acoplado à G_s. Em átrio esquerdo (Figura 1A), o tratamento de

camundongos HC+SNAC com PTX também não alterou a CDR à isoprenalina (Figura 10B). Entretanto, como este resultado foi obtido com apenas um ou dois experimentos, estes dados precisam ser confirmados.

Tabela 3- Tensão basal (TB, mN/100mg), pD₂ e resposta máxima (Rmax, mN/100mg) à isoprenalina em átrio esquerdo de camundongos, tratados ou não com PTX.

| | TB | pD ₂ | Rmax |
|---------------|--------------|-----------------|--------------|
| HC | 27,93 ± 3,4 | 9,56 ± 0,22 | 25,87 ± 2,03 |
| HC (PTX) | 54,9 | 9,45 | 15,69 |
| HC+SNAC | 26,55 ± 4,31 | 8,79 ± 0,10 | 32,48 ± 0,92 |
| HC+SNAC (PTX) | 35,26 ± 2,51 | 8,89 ± 0,30 | 30,38 ± 7,75 |

Sem PTX- HC (LDLr-/- alimentados 15 dias com dieta aterogênica) (n: 6) HC+SNAC (LDLr-/- alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com SNAC durante 15 dias) (n: 5); Com PTX - HC (LDLr-/- alimentados 15 dias com dieta aterogênica) (n: 1) HC+SNAC (LDLr-/- alimentados com dieta aterogênica e concomitante tratamento com SNAC durante 15 dias) (n: 2).

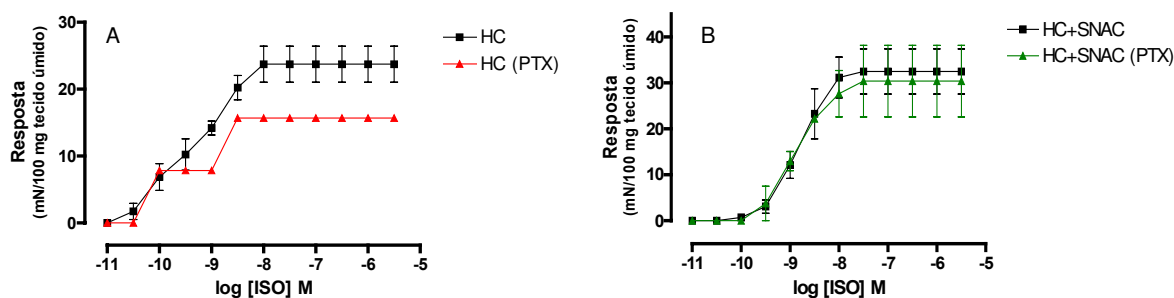


Figura 10 - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO) em átrio esquerdo de camundongos LDL-/- alimentados com dieta hiperlipídica (HC) e LDL-/- alimentados com dieta hiperlipídica, tratados durante 15 dias com SNAC (HC+SNAC). Os dados apresentados no painel B são provenientes de camundongos que receberam uma dose de PTX (600 µg / Kg, i. p.) 24 h antes do sacrifício.

4.5 Resposta Cronotrópica à Isoprenalina –Efeito do SNAC

A frequência basal de batimentos espontâneos em átrios direitos isolados de camundongos, o pD_2 e a resposta máxima da isoprenalina na ausência e na presença de ICI 118.551 encontram-se apresentados na Tabela 4, e as respectivas curvas concentração-efeito à isoprenalina estão na Figura 11. Átrios direitos de camundongos do grupo CT apresentaram frequência basal de batimentos mais alta quando comparados com os animais dos grupos WT e HC ($p < 0,05$; ANOVA e teste de Tukey), indicando um efeito da alteração gênica ($F: 63$ $p < 0,0001$). A administração de SNAC aos camundongos do grupo CT não alterou a frequência basal de batimentos do átrio direito. Não houve diferença significativa na frequência de batimentos de átrios de camundongos HC + SNAC comparados com HC ($p > 0,05$). A resposta máxima e a sensibilidade à isoprenalina não foram significativamente diferentes entre os grupos ($p > 0,05$), exceto no grupo HC+SNAC, que apresentou redução significativa da sensibilidade quando comparado com o grupo CT, indicando um efeito do tratamento ($F: 3,5$ $p < 0,05$).

As diferenças entre os grupos na frequência basal de batimentos foram canceladas pelo ICI 118.551 (Tabela 4), exceto no grupo CT+SNAC. Além disso, átrios direitos de camundongos do grupo HC+SNAC desenvolveram arritmia, quando expostos à ação do ICI 118.551, o que inviabilizou a obtenção de curvas concentração-resposta à isoprenalina. Estes dados reforçam a hipótese de um possível acoplamento de adrenoceptores β_2 a G_i também no tecido atrial direito dos camundongos do grupo HC+SNAC, os quais exerceriam um efeito cardioprotetor contra o surgimento de arritmias em situações nas quais ocorre aumento da estimulação β -adrenérgica.

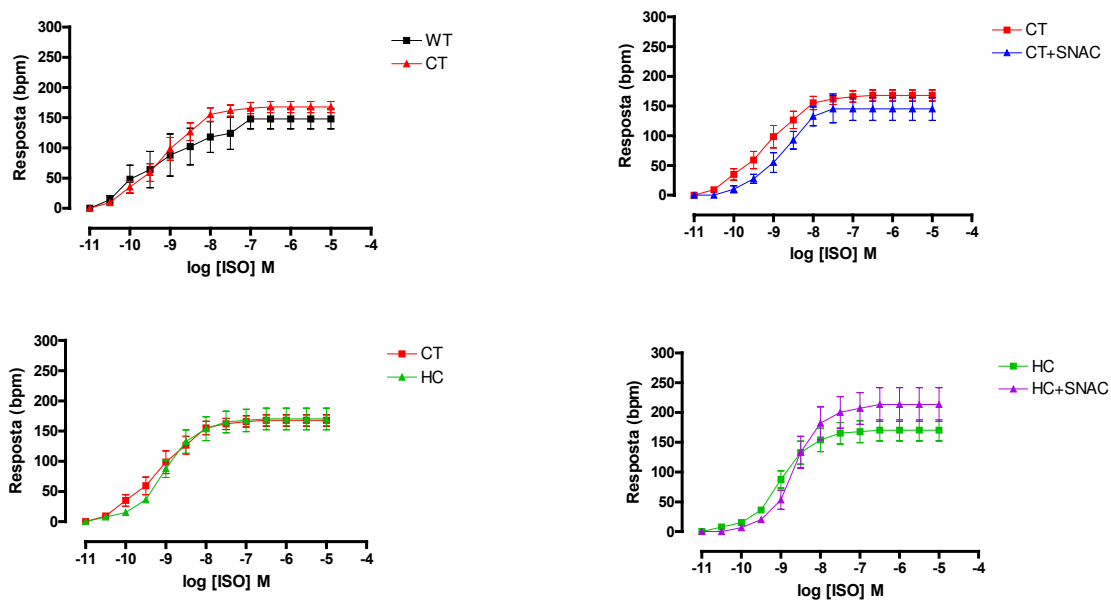
Tabela 4- Frequência basal de batimentos (FB, bpm), pD₂ e resposta máxima (Rmax, bpm) para isoprenalina em átrio direito de camundongo, na presença e ausência de antagonista β₂ adrenérgico (ICI 118.551).

| | SEM ICI 118.551 | | | COM ICI 118.551 | | |
|---------|-----------------|-----------------|------------|-----------------|-----------------|------------|
| | FB | pD ₂ | Rmax | FB | pD ₂ | Rmax |
| WT | 225 ± 15 | 9,18 ± 0,27 | 150±10 | 292 ± 32 | 9,08 ± 0,24 | 134 ± 20 |
| CT | 350 ± 10† | 9,65 ± 0,19 | 160 ±12,65 | 260 ± 36 # | 9,52 ± 0,09 | 126 ± 17 |
| CT+SNAC | 335 ± 16 | 8,84 ± 0,23 | 150 ±21 | 333 ± 33 | 8,39 ± 0,26 | 120 ± 29 |
| HC | 256 ± 6,7 | 9,06 ±0,03 | 190 ±21,60 | 252 ± 8,53 | 9,35 ± 0,19 | 118 ± 22 # |
| HC+SNAC | 265 ± 6,19 | 8,60 ± 0,09* | 213 ±28,13 | arritmia | arritmia | arritmia |

Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, segundo ANOVA e teste de Tukey) : † vs. WT; * vs. CT, # vs. sem ICI. Sem ICI- WT (n: 5), CT (n: 7), HC (n: 7), HC+SNAC (n: 6); com ICI- WT (n CT: 6), CT (n: 5), HC (n: 5)

A Figura 12 mostra que o tratamento dos camundongos HC com PTX causou deslocamento à direita na curva concentração-resposta à isoprenalina e redução da resposta máxima em átrio direito de camundongos HC. Entretanto não foram apresentadas as curvas concentração-resposta à isoprenalina em átrios direitos de camundongos HC + SNAC tratados com PTX, pois estes desenvolvem arritmia quando estimulados pela isoprenalina, inviabilizando a obtenção das curvas, de modo semelhante ao que ocorre quando o tecido atrial direito é exposto ao ICI 118.551.

(A)



(B)

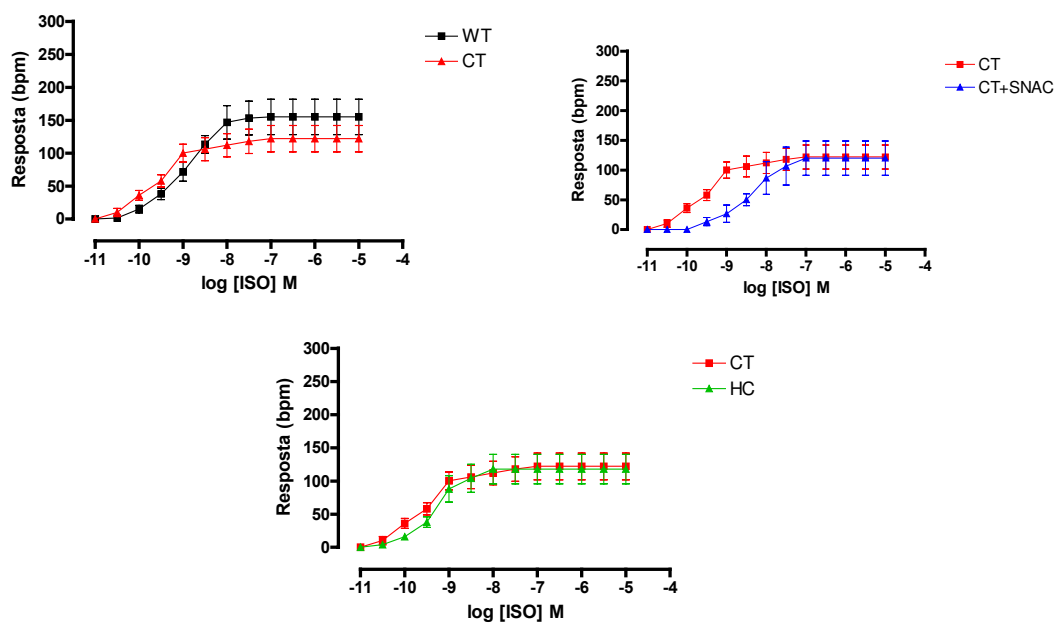


Figura 11 - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO) em átrio direito (AD) de camundongos wild type (WT), LDLr^{-/-} (CT), LDLr^{-/-} tratados 15 dias com SNAC (CT+SNAC), LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica (HC) e LDLr^{-/-} alimentado com dieta hiperlipídica tratados 15 dias com SNAC (HC+SNAC), na ausência de ICI 118.551 (painel A) e presença de ICI 118.551 (painel B).

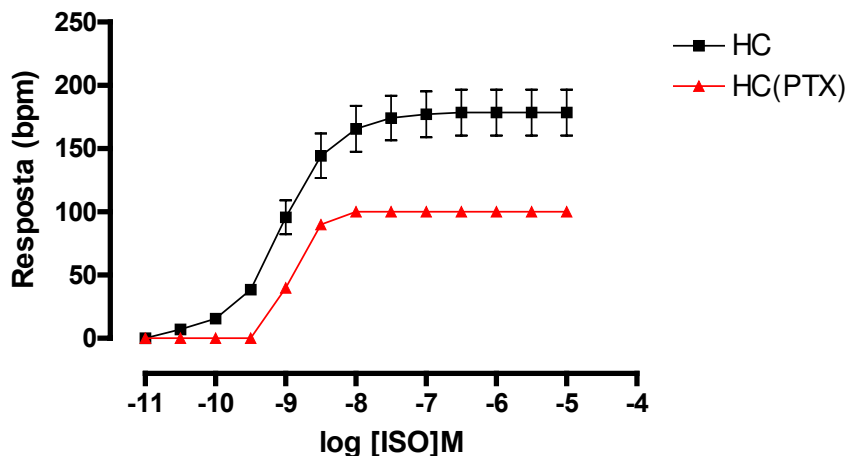


Figura 12 - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO) em átrio direito de camundongos LDL-/- alimentados com dieta hiperlipídica que receberam (HC) (PTX, n: 1) ou não (HC, n: 7) uma dose de Toxina Pertussis (PTX; 600 µg / Kg, i. p.) 24 h antes do sacrifício.

4.6 Curvas concentração-efeito ao antagonista β_2 adrenérgico, ICI118.551

Os resultados acima apresentados sugerem que em tecido atrial direito e esquerdo de camundongos dos grupos HC e HC+SNAC, adrenoceptores β_2 podem participar das respostas cronotrópica e inotrópica a agentes adrenérgicos, sendo que este mesmo subtipo de adrenoceptor poderia atuar por duas diferentes vias de sinalização em cada situação, sendo uma estimulatória e outra inibitória.

Essa hipótese se baseia na premissa de que o composto ICI 118.551, na concentração de 50 nM, se comporta como antagonista seletivo para adrenoceptores do subtipo β_2 (Bilsk *et al.*, 1983; Kaumann, 1997).

Na condição de antagonista competitivo, o ICI 118.551 não deveria exercer efeito algum sobre o inotropismo cardíaco. Entretanto, os resultados aqui apresentados mostram que, na presença deste composto, átrios esquerdos de camundongos CT, HC e HC+SNAC apresentam aumento da força de batimentos (Tabela 3), sugerindo que adrenoceptores β_2 presentes no tecido estariam exercendo efeito inotrópico negativo, por meio de atividade constitutiva do receptor. Raciocínio semelhante se aplica ao átrio direito de camundongos do grupo HC+SNAC, os quais desenvolvem arritmia na presença de bloqueio dos adrenoceptores β_2 , exercido pelo ICI 118.551.

Para investigar esta hipótese, obtivemos curvas concentração-resposta ao ICI 118.551 em átrios direito e esquerdo de camundongos do grupo HC+SNAC, mediante exposição a concentrações crescentes deste composto. Na Figura 13 é possível observar que a exposição do átrio esquerdo ao ICI 118.551 causou aumento da tensão desenvolvida, que é diretamente proporcional à concentração, confirmando nossa hipótese. Em átrio direito, o ICI118.551 promoveu arritmia, inviabilizando a obtenção da curva.

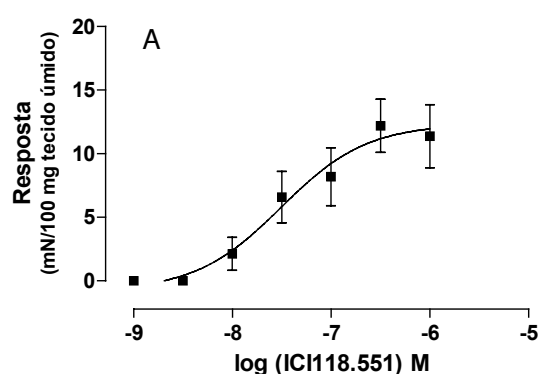


Figura 13- Efeito do ICI118,551 sobre a tensão desenvolvida (painel A, n=5) de átrio esquerdo, de camundongos LDLr-/- alimentados com dieta hiperlipídica, tratados 15 dias com SNAC (HC+SNAC).

4.7 Efeito do SNAC sobre a Expressão Gênica dos Adrenoceptores β_1 e β_2

A expressão dos genes do adrenoceptor β_1 e do adrenoceptor β_2 cardíacos, foi analisada por meio da quantificação do RNAm destes receptores em tecido ventricular de camundongos dos grupos experimentais WT, CT, HC e HC+SNAC.

Houve menor expressão (de cerca de 62%), na expressão dos genes dos adrenoceptores β_1 e β_2 em ventrículo esquerdo de camundongos do grupo CT quando comparado ao WT. Entretanto, a expressão dos adrenoceptores β_1 e β_2 foi similar no tecido cardíaco dos camundongos dos grupos WT e HC. Os animais do grupo HC tratados com SNAC apresentaram redução de cerca de 44% na expressão dos adrenoceptores β_1 e β_2 comparados com camundongos do grupo HC (Figura 14).

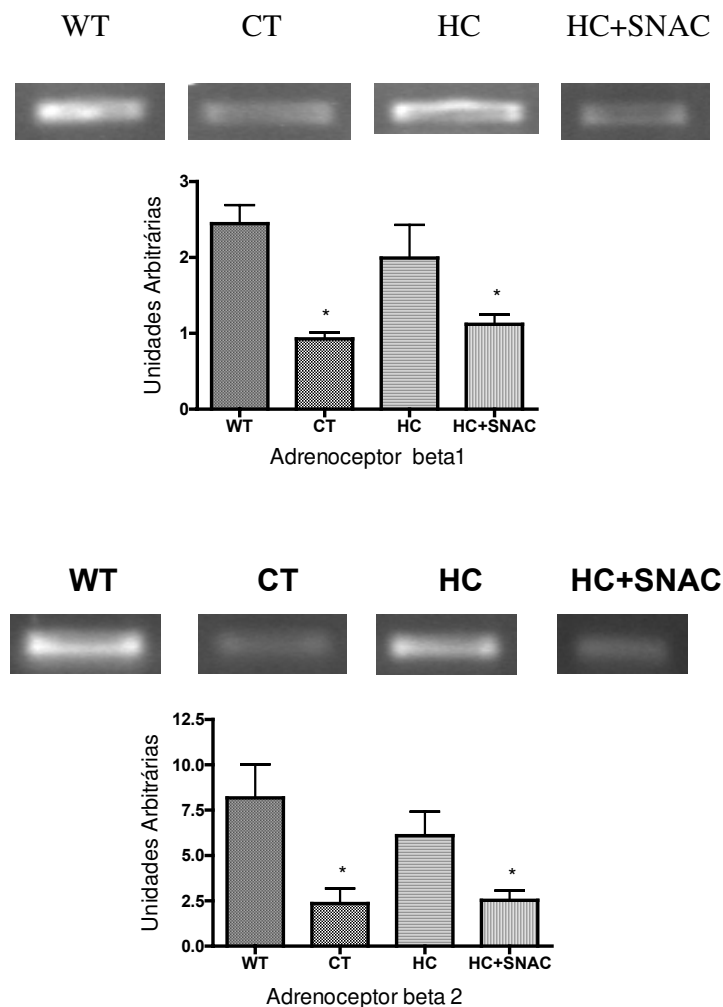


Figura 14- Expressão dos genes de adrenoceptores β_1 adrenoceptores β_2 em ventrículo esquerdo de camundongos C57BL6 (WT), LDLr^{-/-} (CT), LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica (HC) e LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica e tratados 15 dias com SNAC (HC+SNAC). Dados mostram médias EPM, n : 4. * P < 0.05 vs WT.

4.8 Efeito do Sal de Angelis na Resposta Inotrópica à Isoprenalina

A tensão basal desenvolvida por átrios esquerdos isolados de camundongos, o pD₂ e a resposta máxima à isoprenalina, na ausência e na presença de ICI 118.551 estão apresentados na Tabela 5. As respectivas curvas concentração-efeito à isoprenalina estão na Figura 15.

Como já foi mencionado átrios esquerdos de camundongos CT e HC apresentam déficit contrátil e átrios de camundongos HC são supersensíveis à isoprenalina em relação aos átrios esquerdos de camundongos WT, indicando uma interferência da dieta (F: 8,2 p< 0,01). O tratamento com Sal de Angelis não alterou o déficit contrátil ou a sensibilidade à isoprenalina no grupo CT, mas no grupo HC este tratamento cancelou tanto o déficit contrátil como a supersensibilidade à isoprenalina, indicando um efeito do tratamento (F: 4,4 p< 0,05; F: 9 p< 0,001, respectivamente). Quando a curva concentração-efeito foi obtida na presença de ICI 118.551, foram canceladas as diferenças na tensão basal, na resposta máxima e na sensibilidade à isoprenalina, exceto no grupo CT+SA.

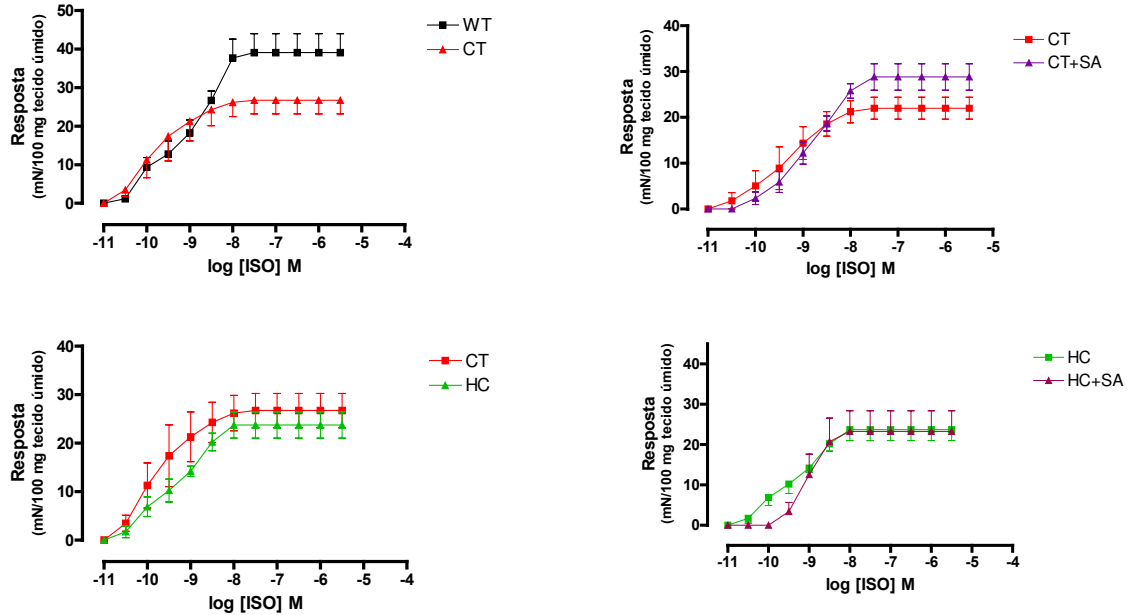
Tabela 5- Tensão basal (TB, mN/100mg), pD₂ e resposta máxima (Rmax, mN/100mg) à isoprenalina em átrio esquerdo de camundongo machos C57BL6 (WT), LDLr-/- (CT), LDLr-/- tratados 15 dias com SA (CT+SA), LDLr-/- alimentados 15 dias com dieta hiperlipídica (HC) e LDLr-/- alimentados com dieta hiperlipídica e tratados 15 dias com SA (HC+SA), na presença e ausência de antagonista β₂ adrenérgico (ICI 118.551).

| | SEM ICI118.551 | | | COM ICI118.551 | | |
|--------|---------------------------|-----------------|----------------|---------------------------|-----------------|--------------|
| | TB | pD ₂ | Rmax | TB | pD ₂ | Rmax |
| WT | 51,93 ± 3,79 | 8,66 ± 0,10 | 41,22 ± 2,90 | 58,63 ± 5,54 | 8,87 ± 0,17 | 33,02 ± 2,88 |
| CT | 25,21 ± 8,06 † | 9,05 ± 0,17 | 21,99 ± 2,39 † | 71,56 ± 9,45 [#] | 9,05 ± 0,23 | 22,27 ± 9,95 |
| CT+SA | 28,66 ± 4,9 | 8,89 ± 0,21 | 28,82 ± 2,88 | 33,49 ± 3,19 | 8,37 ± 0,12 | 19,24 ± 1,7 |
| HC | 27,93 ± 3,44 | 9,56 ± 0,22 † | 25,87 ± 2,03 | 62,25 ± 5,46 [#] | 9,07 ± 0,17 | 34,59 ± 4,22 |
| HC+ SA | 65,13 ± 11,0 [°] | 8,98 ± 0,12 | 27,25 ± 8,00 | 71,76 ± 11,65 | 8,79 ± 0,17 | 21,43 ± 5 |

Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05, ANOVA e teste de Tukey): † vs WT, * CT vs CT+SA,

[°]HC vs. HC+SA, [#]sem ICI vs. com ICI; sem ICI- WT (n:7) CT (n: 7) CT+SA (n: 5)HC (n: 6) HC+SA (n: 5); com ICI- WT (n: 7) CT (n: 6) CT+SA (n: 5) HC (n: 7) HC+SA (n: 5)

(A)



(B)

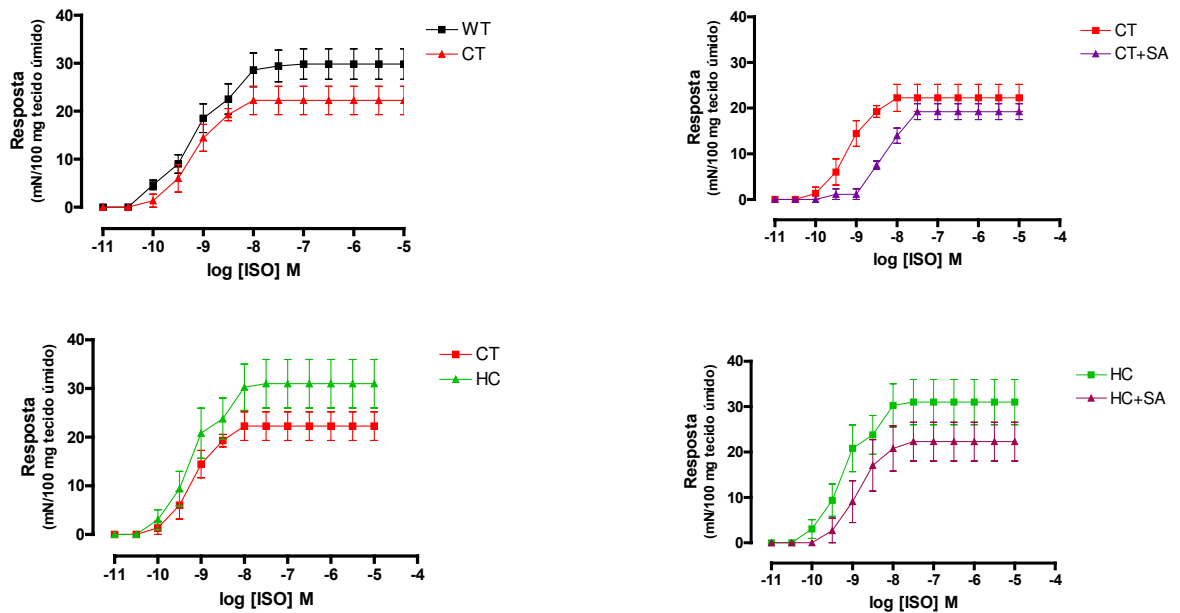


Figura 15- Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO) em átrio esquerdo de camundongos wild type (WT), LDLr-/- (CT), LDLr-/- tratados 15 dias com SA (CT+SA), LDLr-/- alimentados com dieta hiperlipídica (HC) e LDLr-/- alimentados com dieta hiperlipídica e tratados 15 dias com SA (HC+SA), na ausência de ICI 118.551 (A) e presença de ICI 118.551(B).

4.9 Resposta Cronotrópica à Isoprenalina – Efeito do Sal de Angelis

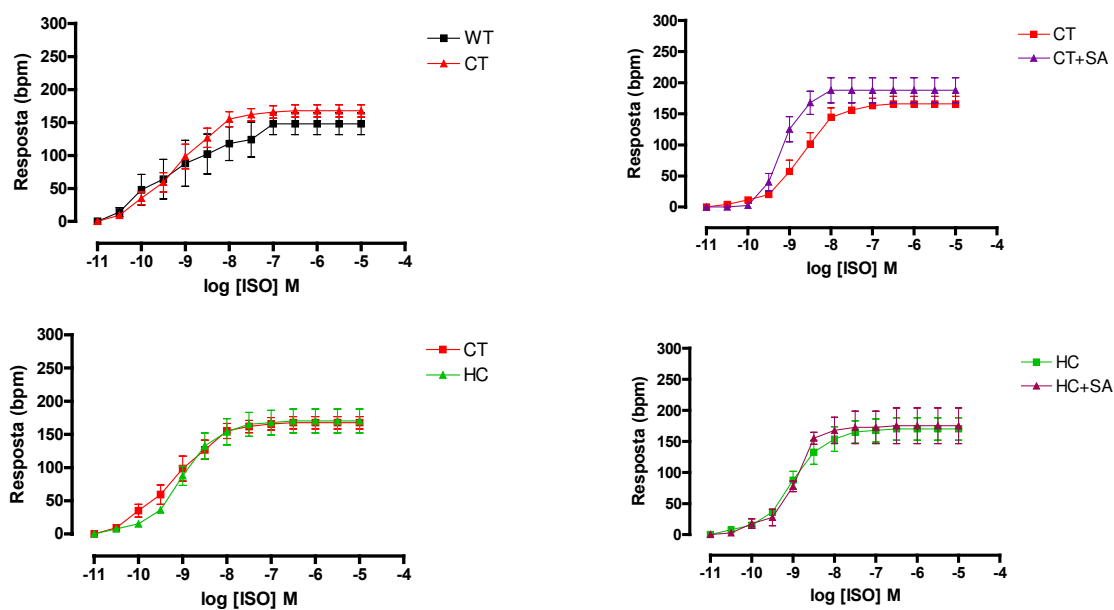
A tabela 6 mostra que átrios direitos de camundongos do grupo CT, CT+SA e HC+SA apresentaram frequência basal de batimentos mais alta quando comparados com os camundongos dos grupos WT e HC, indicando uma interferência da alteração gênica e do tratamento (F: 63 $p < 0,0001$; F: 4,2 $p < 0,05$, respectivamente). Não houve diferença significativa na frequência de batimentos de átrios de camundongos HC+SA comparados com HC ($p > 0,05$; ANOVA e teste de Tukey). A resposta máxima e a sensibilidade à isoprenalina não foram significativamente diferentes entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA e teste de Tukey, figura 16). As diferenças entre os grupos na frequência basal de batimentos foram canceladas pelo ICI 118.551 (Tabela 6). Na presença deste antagonista seletivo de adrenoceptores β_2 o átrio direito de camundongos do grupo HC+SA apresentou supersensibilidade à isoprenalina quando comparado ao grupo HC ($pD_2 = 10,23 \pm 0,6$ vs $9,35 \pm 0,19$), indicando uma interferência da interação dieta e tratamento (F: 8,3 $p < 0,01$) (Figura 16).

Tabela 6- Frequência basal de batimentos (FB, bpm), pD₂ e resposta máxima (Rmax, bpm) para isoprenalina em átrio direito de camundongo machos C57BL6 (WT), LDLr^{-/-} (CT), LDLr^{-/-} tratados 15 dias com SA (CT+SA), LDLr^{-/-} alimentados 15 dias com dieta hiperlipídica (HC) e LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica e tratados 15 dias com SA (HC+SA), na presença e ausência de antagonista β₂ adrenérgico (ICI 118. 551).

| | SEM ICI 118.551 | | | COM ICI 118.551 | | |
|--------|-----------------|-----------------|----------|-----------------|-----------------|------------|
| | FB | pD ₂ | Rmax | FB | pD ₂ | Rmax |
| WT | 225 ± 15 * | 9,18 ± 0,27 | 150 ± 10 | 292 ± 32 | 9,08 ± 0,24 | 134 ± 20 |
| CT | 350 ± 10 | 9,65 ± 0,19 | 160 ± 13 | 260 ± 36** | 9,52 ± 0,09 | 126 ± 17 |
| CT+SA | 357 ± 16 | 9,15 ± 0,08 | 187 ± 20 | 285 ± 17 | 8,68 ± 0,06 | 155 ± 19 |
| HC | 256 ± 7* | 9,06 ± 0,03 | 190 ± 22 | 252 ± 8 | 9,35 ± 0,19 | 118 ± 22** |
| HC+ SA | 292 ± 12* | 9,12 ± 0,20 | 180 ± 40 | 285 ± 5 | 10,23 ± 0,6** | 163 ± 47 |

Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significativas * $p < 0,05$ comparado com CT, † $p < 0,05$ comparado com WT, ** $p < 0,05$ comparado com ICI, ANOVA e teste de Tukey): sem ICI- WT (n:7) CT (n: 7) CT+SA (n: 5) HC (n: 6) HC+SA (n: 5); com ICI- WT (n: 7) CT (n: 6) CT+SA (n: 5) HC (n: 7) HC+SA (n: 5)

(A)



(B)

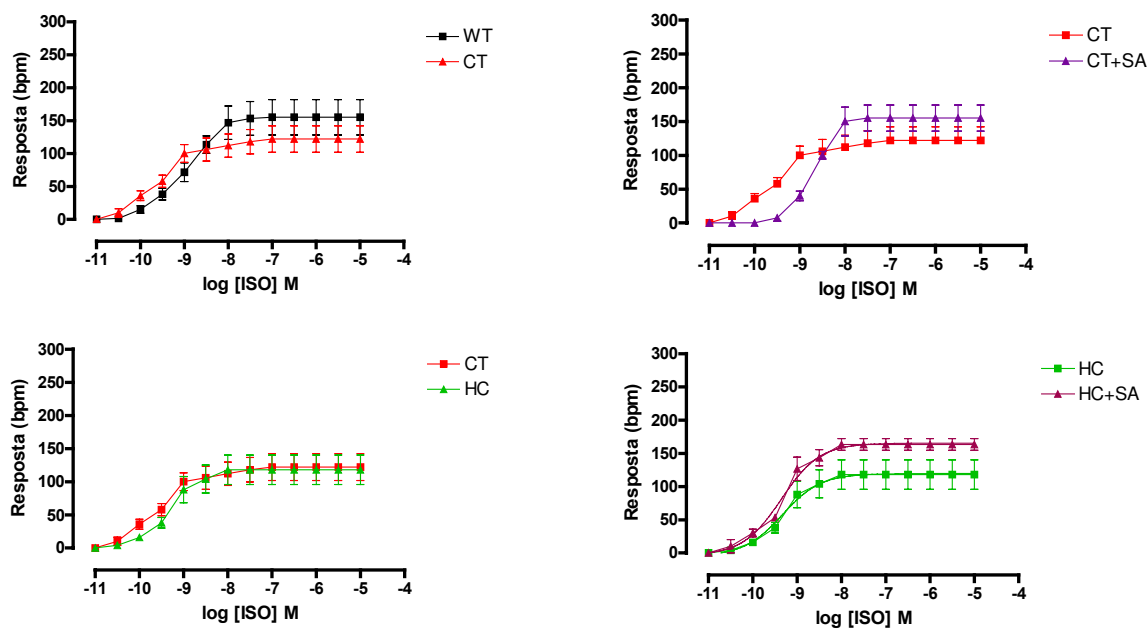


Figura 16- Curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO) em átrio esquerdo de camundongos *wild type* (WT), *LDLr*^{-/-} (CT), *LDLr*^{-/-} tratados 15 dias com SA (CT+SA), *LDLr*^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica (HC) e *LDLr*^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica e tratados 15 dias com SA (HC+SA), na ausência de ICI 118.551 (A) e presença de ICI 118.551 (B).

DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados mostraram que camundongos *knockout* para o gene do receptor de LDL (grupo CT) apresentam pressão arterial média mais elevada do que camundongos do grupo WT, e que tal diferença na PAM se mantém nos camundongos do grupo HC. O tratamento com doses equipotentes de SNAC ou SA de camundongos do grupo CT produziu significativa redução na PAM. Contudo, nem o tratamento com SNAC nem com SA foi capaz de prevenir a hipertensão de camundongos do grupo HC. Sabe-se que em camundongos LDLr^{-/-} ocorre diminuição na capacidade antioxidante das mitocôndrias devido ao desacoplamento da cadeia respiratória, o que causa aumento da liberação de radicais livres das mitocôndrias levando a um estado de estresse oxidativo no tecido vascular, condição relacionada com a hipertensão e a formação de placas de aterosclerose (Droge, 2002; Oliveira *et al.*, 2004).

A hipertensão é caracterizada por inúmeras alterações na estrutura e na função da membrana celular, sendo freqüentemente associada com importantes anormalidades metabólicas, incluindo aquelas relacionadas com o metabolismo de lipídios. Quando a hipertensão é acompanhada de dislipidemia, esta se caracteriza por concentrações plasmáticas elevadas de triglicerídeos e de partículas de LDL, causando mudança na composição dos lípidos da membrana, o que altera sua viscosidade. Esta resulta em alterações na síntese de lipídios e no metabolismo celular, no transporte através da membrana e na transdução de sinais, bem como em prejuízo do controle da concentração citosólica de cálcio e da regulação do pH intracelular (Zicha *et al.*, 1999). Além disso, na vigência de hipercolesterolemia e de formas modificadas de LDL, são observadas inúmeras alterações na função endotelial, como a geração de ânion superóxido, o qual pode levar à formação de peroxinitrito e, conseqüentemente, diminuição da biodisponibilidade de NO.

Ambos NO e HNO têm propriedade vasodilatadora significativa, embora o SNAC seja de 9 a 10 vezes mais potente que o SA no que se refere ao efeito hipotensor. O SA também se mostrou menos potente que vários doadores de NO em corrigir a isquemia induzida em ratos (Ma *et al.*, 1999) e em anéis de aorta de camundongo isolados e pré-contraídos com fenilefrina (Wanstall *et al.*, 2001). Os efeitos do SA foram dependentes da dose e de ativação da via de sinalização do GMPc. Tais resultados são geralmente interpretados como consequência da conversão do HNO para NO e subsequente ativação da guanilato ciclase (Wanstall *et al.*, 2001). Entretanto, a infusão intravenosa de doadores de HNO em mamíferos não induz aumento da concentração plasmática de GMPc. Além disso, a conversão do HNO em NO em ambiente fisiológico é consideravelmente pequena (Nelli *et al.*, 2000; Paolucci *et al.*, 2001).

Em leito mesentérico de ratos, o doador de HNO (Sal de Angelis) induziu dilatação por meio da ativação da guanilato ciclase e de canais de potássio voltagem-dependentes, o que causou hiperpolarização das células da musculatura lisa vascular (Irvine *et al.*, 2003). Mas, a ativação dos canais de potássio pelo HNO foi, em parte, independente do acúmulo de GMPc (Irvine *et al.*, 2003).

Tais resultados indicam que o mecanismo pelo qual o HNO induz vasodilatação continua indeterminado. A indução de vasodilatação dependente de GMPc pelo HNO pode ser um artefato do sistema *in vitro*, onde a presença de advento oxidante é mais provável, ou ainda de parâmetros experimentais, tais como concentração dos doadores de HNO utilizados *in vivo* e *in vitro*, ou a sensibilidade do método de detecção do GMPc.

Outro aspecto que necessita mais investigações é a provável habilidade de doadores de HNO induzirem dilatação do leito venoso em maior proporção que do leito arterial de mamíferos, onde a administração de HNO induz liberação do peptídeo relacionado com o gene da calcitonina

(CGRP), diminuindo de maneira discreta a resistência vascular periférica, sem alterar significativamente a pré-carga (Paolocci *et al.*, 2001; Katori *et al.*, 2005).

Em camundongos do grupo CT, tanto o SNAC como o SA apresentaram efeito hipotensor. No entanto, este efeito não foi observado em camundongos do grupo HC. Sensibilidade reduzida aos efeitos hipotensores de doadores de NO foi demonstrada também em em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Stys *et al.*, 1998), nos quais as células endoteliais apresentam alteração na capacidade de estoque e/ou mecanismo de recaptção de cálcio e diminuição da guanilato ciclase (Bauersachs *et al.*, 1998; Failliet *et al.*, 2000), o que resulta em atenuação do aumento de GMPc induzido por um doador de NO.

Alterações estruturais no tecido cardíaco de camundongos LDLr^{-/-} também foram avaliadas. Muitos estudos demonstram que a indução da hipertrofia ventricular esquerda pela hipercolesterolemia pode ocorrer por diferentes mecanismos (Sundström *et al.*, 2001; Genda *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006). Dieta rica em colesterol pode acelerar o processo aterogênico em alguns modelos de camundongos (ApoE^{-/-} e LDLr^{-/-}), porém a aterogênese não está associada com doença arterial coronária oclusiva e disfunção cardíaca.

No presente estudo, demonstramos que camundongos LDLr^{-/-} que ingerem dieta hiperlipídica (HC) desenvolvem hipertrofia ventricular esquerda caracterizada por aumento das dimensões dos cardiomiócitos e aumento na deposição de colágeno intersticial e perivascular, quando comparados com camundongos do grupo controle (CT) e camundongos selvagens (WT). Tais resultados, particularmente o surgimento de processo hipertrófico, podem estar relacionados com estresse oxidativo observado nos camundongos LDLr^{-/-} (Oliveira *et al.*, 2004). Uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um potente estímulo para o crescimento dos cardiomiócitos (Touyz *et al.*, 2005), e pode ser responsável, pelo menos em parte, pelas alterações estruturais aqui descritas.

A hipertensão e o aumento da ativação neurohormonal são as principais causas de hipertrofia ventricular esquerda (HVE). Porém, a hipertrofia de cardiomiócitos também pode estar associada à via de sinalização da insulina e à atividade dos receptores de ativação-proliferação dos peroxissomos (PPARs), sugerindo que alterações metabólicas podem estar envolvidas neste processo patogênico. Os (PPARs) são fatores de transcrição ativados por dietas ricas em gordura, responsáveis pela oxidação dos ácidos graxos e ativação da expressão gênica e do crescimento cardíaco (Sharma *et al.*, 2006).

Um dos efeitos dos tratamentos com SNAC em nosso modelo experimental foi a prevenção da hipertrofia cardíaca. Os seguintes mecanismos de ação podem estar envolvidos em relação ao efeito anti-hipertrófico do SNAC: (1) inibição da liberação do fator de crescimento, um processo em parte mediado pelo GMPc, gerado pelo NO (Kempf e Wollert, 2004); (2) diminuição do estresse oxidativo em consequência de atividade anti-oxidante (Krieger *et al.*, 2006).

O nitroxil liberado pelo Sal de Angelis também tem propriedade antioxidante, capaz de prevenir o processo hipertrófico. O HNO é um bom doador de hidrogênio (H^+), resultando também na formação de NO, sendo que ambos (H^+ e NO) extinguem espécies radicais reativas e são capazes de inibir a peroxidação lipídica (Rubbo *et al.*, 1995; Lopez *et al.*, 2006).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que está envolvida na patogênese das doenças cardiovasculares, incluindo a hipertrofia cardíaca. Esta citocina atua através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos cardiomiócitos, e também induz remodelamento ventricular através de estimulação de produção da matriz extracelular (Elahi *et al.*, 2007). O CGRP também é capaz de mediar, em parte, a capacidade cardioprotetora do HNO, através da redução na produção do TNF- α , via ativação da proteína kinase C, além da ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP (Li e Peng, 2002).

Assim, os experimentos *in vivo* mostraram que a deleção do gene do receptor de LDL em camundongos machos resultou em hipertensão e, quando essa deleção está associada à dieta aterogênica, a hipertensão é acompanhada de hipertrofia ventricular caracterizada por aumento das dimensões dos cardiomiócitos e da deposição de colágeno intersticial e perivascular. O tratamento com SNAC e SA é capaz de prevenir o processo hipertensivo apenas nos camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta normolipídica, mas previne o processo hipertrófico também nos camundongos alimentados com dieta aterogênica. O SNAC é cerca de dez vezes mais potente do que o Sal de Angelis no que se refere ao efeito hipotensor de ambos os compostos.

Nossos resultados mostraram também que camundongos *knockout* para o gene do receptor de LDL (grupo CT) apresentam redução de aproximadamente 62% da tensão desenvolvida pelo átrio esquerdo. Este déficit contrátil permanece presente em camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica (HC) e também naqueles camundongos tratados com SNAC (CT+SNAC e HC+SNAC). Sal de Angelis não corrige o déficit contrátil no grupo CT, mas o faz no grupo HC. A redução da capacidade contrátil do miocárdio atrial dependente da deleção gênica foi acompanhada de aumento da frequência de batimentos do átrio direito.

Camundongos *knockout* para o receptor de LDL são modelos ideais para o estudo da influência dos fatores genéticos e ambientais na aterogênese, uma vez que desenvolvem disfunção do endotélio e placas de ateroma, promovidas pela ingestão de dieta rica em colesterol por um breve período (Krieger *et al.*, 2006). Assim como as células endoteliais dos vasos periféricos são capazes de regular o tônus vascular, as células endoteliais do endocárdio e das artérias coronárias também são capazes de regular a contratilidade e a ritmicidade dos cardiomiócitos subjacentes, além de participar do controle de seu metabolismo por meio de liberação ou ativação de substâncias que exercem efeito autócrino e parácrino (Brutsaert, 2003).

Os receptores de LDL são importantes para a internalização celular das apolipoproteínas E e B (Kamataki *et al.*, 2002), as quais são degradadas, liberando aminoácidos e ésteres de colesterol. Estes são hidrolizados em ácidos graxos de cadeia carbônica longa e colesterol livre. Os ácidos graxos de cadeia longa são importantes combustíveis moleculares para os cardiomiócitos, e sua oxidação nas mitocôndrias providencia considerável aporte energético para o funcionamento cardíaco (Schaap *et al.*, 1998). Assim sendo, hipotetizamos inicialmente que a diminuição na capacidade contrátil do tecido atrial fosse uma característica dos camundongos LDLr^{-/-}, desenvolvida como consequência do déficit metabólico, causado pela falha no transporte de apolipoproteínas E e B, e na utilização dos ácidos graxos pelos cardiomiócitos. Contudo, Oliveira *et al.* (2004) demonstraram as células hepáticas de camundongos LDLr^{-/-} apresentam aumento da lipogênese, que compensa a deficiência do receptor de LDL. Este mecanismo, no entanto, requer maior consumo energético, o qual induz diminuição da capacidade antioxidante nas mitocôndrias hepáticas desses camundongos. Mecanismo semelhante poderia estar presente também nas células miocárdicas destes camundongos.

A dislipidemia decorrente da ingestão aumentada de lipídeos, associada à dificuldade de captação das apolipoproteínas pelas células deficientes do receptor de LDL, determina aumento da ocorrência de LDL oxidada e altera o equilíbrio redox celular, condição na qual ocorre formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de células inflamatórias. Tais ROS alteram a função do retículo sarcoplasmático, o que reduz a concentração de cálcio no citosol e a contratilidade cardíaca. Além disso, as ROS liberam NO, sendo este um dos principais responsáveis pela atenuação da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, o que diminui a força contrátil destas células (Nian *et al.*, 2004).

O tratamento de camundongos do grupo HC com SNAC não alterou o déficit contrátil do tecido miocárdico atrial, mas o SA recuperou a capacidade contrátil. Embora nós não tenhamos

avaliado os mecanismos pelos quais o SA afeta a contratilidade cardíaca e sua responsividade às catecolaminas, sabe-se que doadores de HNO apresentam efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos (Paolucci *et al.*, 2001; Wink *et al.*, 2003), e que tais efeitos não são acompanhados de alterações nas concentrações plasmáticas de GMPc, mas parecem estar relacionados com a liberação de CGRP por terminações nervosas não-colinérgicas e não-adrenérgicas (NANC). O CGRP ativa proteínas quinases A, as quais induzem aumento na liberação e na recaptção de cálcio pelo retículo sarcoplasmático em células musculares cardíacas e esqueléticas, por meio da ativação de receptores de rianodina. Esses efeitos combinados induzem aumento da contratilidade e aceleram o relaxamento dos cardiomiócitos, melhorando a performance cardíaca, de maneira independente da liberação de AMPc e de GMPc (Tocchetti *et al.*, 2005). Além disso, o efeito inotrópico do CGRP também pode ser mediado pela sua capacidade de estimular liberação de catecolaminas das terminações nervosas simpáticas distais (Seyedi *et al.*, 2005).

Déficit contrátil pode resultar em redução da capacidade de bombeamento do sangue pelo coração se não forem desencadeados mecanismos adaptativos compensatórios para manutenção do débito cardíaco. Um destes mecanismos poderia ser o aumento da frequência de batimentos. Hardt *et al.* (2002) observaram que em um modelo de cardiomiopatia hipertrófica familiar, que se caracteriza por déficit contrátil, ocorre aumento da atividade tônica simpática, que induz aumento compensatório da frequência cardíaca. Embora inicialmente este aumento de tônus simpático seja benéfico, a longo prazo pode promover agravamento da doença e mal prognóstico. Nós não avaliamos a atividade simpática ou o débito cardíaco dos camundongos, mas observamos que átrios direitos isolados de camundongos LDLr^{-/-} apresentam frequência de batimentos mais alta do que átrios de camundongos selvagens.

Entretanto, esta alteração que, acreditamos ser de caráter adaptativo, não ocorreu nos camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica tratados ou não com SNAC (HC e

HC+SNAC), sugerindo a perda de uma condição estável pelo acréscimo de fatores estressantes representados pela dieta e conseqüente dislipidemia.

A deleção do gene do receptor de LDL não causa alteração significativa de sensibilidade aos efeitos inotrópico e cronotrópico da isoprenalina (CT *vs.* WT), mas se a deleção do referido gene for associada à dieta aterogênica, esta resulta em aumento da sensibilidade ao efeito inotrópico deste agonista de adrenoceptores β (HC *vs.* WT), mas não do seu efeito cronotrópico. Tal aumento de sensibilidade é prevenido pelo tratamento com SNAC (HC+SNAC *vs.* HC) e pelo SA (HC+SA *vs.* HC).

A administração de SNAC nos camundongos do grupo CT não alterou significativamente a sensibilidade ao efeito inotrópico da isoprenalina, mas reduziu a sensibilidade atrial ao efeito cronotrópico deste mesmo composto. A resposta à isoprenalina não foi alterada pelo ICI118.551, indicando que adrenoceptores β_2 não participam das respostas cronotrópica às catecolaminas nestes tecidos.

Associado ao desenvolvimento da aterosclerose, os camundongos LDLr^{-/-} que recebem dieta aterogênica por 15 dias (HC) apresentam hipertrofia ventricular esquerda (HVE), a qual foi decorrente de um processo adaptativo e compensatório ao processo aterogênico, uma vez que esta alteração é totalmente prevenida por meio de tratamento que reduz a aterogênese (Garcia *et al.*, 2007). Frequentemente, o fenótipo hipertrófico está associado à ativação simpática e alterações na população de adrenoceptores β . Em átrio isolado de ratos submetidos a estresse, situação na qual supostamente também ocorre aumento da atividade simpática, ocorre alteração de sensibilidade aos efeitos cronotrópicos das catecolaminas e da expressão dos adrenoceptores β_1 e β_2 como um indicativo de um processo adaptativo do coração (Santos & Spadari-Bratfisch, 2001; 2006). Na insuficiência cardíaca humana tais alterações também são observadas, onde o

aumento da atividade simpática induz diminuição dos adrenoceptores β_1 e desacoplamento dos adrenoceptores β_2 (Brodde & Michel, 1999; Brodde *et al.*, 2006).

A isoprenalina é um agonista pleno, não-seletivo, de adrenoceptores β , ou seja, este composto interage com ambos os subtipos β_1 e β_2 , os quais são acoplados à proteína Gs e ao sistema adenilil ciclase-AMPC-PKA. Esta fosforila várias proteínas intracelulares que promovem efeito inotrópico positivo. Entre elas podemos citar: troponina I, receptor de rianodina e canais de cálcio do tipo L (Neumann *et al.*, 1998).

Os receptores acoplados à proteína G (CGRP), quando ativados por agonistas, são alvos de proteínas quinases (GRKs), que os fosforilam. Uma vez fosforilados, estes receptores ligam-se com a proteína arrestina, e são internalizados. Este processo é conhecido como *downregulation* dos receptores e resulta em subsensibilidade ao agonista (Yang & Xia, 2006).

Em tecido cardíaco de camundongos da cepa C57BL6, as respostas inotrópicas e cronotrópicas às catecolaminas são mediadas por uma população homogênea de adrenoceptores β_1 (Oostendorp & Kaumann, 2000). Adrenoceptores β_2 , se presentes, não participam desta resposta (Heubach *et al.*, 2002). Nossos resultados confirmam esta premissa, uma vez que em átrios direito e esquerdo de camundongos selvagens (grupo WT), o antagonista seletivo de adrenoceptores β_2 , ICI 118.551, não causou nenhum efeito sobre a resposta à isoprenalina. Entretanto, o bloqueio dos adrenoceptores β_2 anulou o déficit contrátil do átrio esquerdo e o aumento de frequência de batimentos do átrio direito (grupo CT), sugerindo que, neste grupo de animais, adrenoceptores β_2 poderiam participar destes processos e que estes apresentariam atividade constitutiva, ou seja, atividade intrínseca independente de ligação do agonista. Esta atividade teria efeito inotrópico negativo no átrio esquerdo e cronotrópico positivo no átrio direito. Os mecanismos intracelulares subjacentes ainda não foram investigados. Porém, a

exposição dos tecidos atriais de camundongos do grupo HC+SNAC a concentrações crescentes do bloqueador β_2 adrenérgico (ICI 118.551) resultou em efeito inotrópico positivo dose dependente, mas não alterou a frequência de batimentos do átrio direito. Este dado confirma nossa hipótese no que se refere ao déficit contrátil mas sugere que o aumento de frequência de batimentos não depende da atividade de adrenoceptores β_2 . Efeito agonístico deste composto, porém causando inotropismo negativo, foi descrito anteriormente por Gong *et al.* (2002) em cardiomiócitos ventriculares de pacientes com insuficiência cardíaca e que apresentaram aumento da atividade da proteína Gi.

De modo similar ao observado para os grupos WT e CT, o ICI 118.551 não alterou a sensibilidade à isoprenalina em átrios direito e esquerdo de camundongos do grupo HC. Entretanto, o ICI 118.551 deslocou à esquerda as curvas concentração-resposta da isoprenalina em átrio esquerdo de camundongos do grupo HC+SNAC, evidenciando que o bloqueio dos adrenoceptores β_2 resulta em supersensibilidade do tecido a este agonista de adrenoceptores β . Além disso, causou arritmia em átrio direito de camundongos HC+SNAC. Este conjunto de dados sugere que em tecido atrial direito e esquerdo de camundongos LDLr^{-/-} tratados com SNAC, adrenoceptores β_2 exerceriam um papel protetor contra arritmias, reduzindo a sensibilidade às catecolaminas, e protegendo o tecido cardíaco de excessiva estimulação catecolaminérgica. Esta proteção seria possível mediante o acoplamento do adrenoceptor com proteína Gi, fato este que foi anteriormente descrito em várias outras situações experimentais (Xiao *et al.*, 1999; Sabri *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 2002; Brodde *et al.*, 2006).

A estimulação dos adrenoceptores β leva a aumento da frequência cardíaca por meio do estímulo da corrente de marcapasso (I_f), responsável pela despolarização diastólica espontânea. Aumento da frequência cardíaca, por sua vez, leva a um conjunto de efeitos eletrofisiológicos

secundários, incluindo menor duração do potencial de ação, e do período refratário com aumento na contratilidade e no consumo cardíaco de oxigênio (Dorian, 2005). Por outro lado, a possibilidade de acoplamento do adrenoceptor β_2 com as proteínas Gs e Gi, resulta em liberação melhor equilibrada de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, protegendo o tecido contra arritmias (Xiao *et al.*, 1995).

Enquanto os adrenoceptores β_1 são os principais responsáveis pelos efeitos inotrópicos e cronotrópicos, os adrenoceptores β_2 são importantes na regulação da condução atrioventricular. Isso se deve à sua capacidade de sinalização intracelular via proteína Gi, a qual é capaz de ativar diretamente a proteína G reguladora do canal de potássio (GKIR) e hiperpolarizar a célula, sendo que uma outra possibilidade seria a inibição direta dos canais de cálcio do tipo L (Escobar *et al.*, 2006). Estes dados sugerem que a presença de adrenoceptores β_2 no tecido atrial confere efeito protetor contra arritmias. De fato, Grimm *et al.* (1998) demonstraram que a inativação de Gi pelo tratamento de ratos com toxina pertussis, acentua o efeito arritmogênico da isoprenalina.

Por outro lado, Houle *et al.* (2001) observaram que em coração pós-infartado de cães ocorre diminuição da atividade dos adrenoceptores β_1 sem alteração de atividade dos adrenoceptores β_2 , o que resulta em aumento relativo dos adrenoceptores β_2 e contribui para o desenvolvimento de arritmias. Sua ativação aumentaria a concentração de cálcio levando a redução da estabilidade elétrica e conseqüente modulação inadequada da contratilidade. Tais conseqüências foram abolidas pelo antagonista β_2 adrenérgico (ICI 118.551), o qual atenuando a resposta à isoprenalina foi capaz de proteger o tecido das arritmias (Houille *et al.*, 2001).

A estimulação β -adrenérgica persistente sob condições patogênicas é o principal responsável pela produção de arritmias. Adrenoceptores do subtipo β_1 , sob estimulação persistente de catecolaminas, ativam tanto a via PKA como a via da CaMKII. Esta independe da PKA e induz apoptose, remodelamento, disfunção na contratilidade cardíaca e até mesmo infarto

do miocárdio. Em relação ao adrenoceptor β_2 pode ocorrer acoplamento alternativo com a proteína G_i , a qual inibe a adenilil ciclase e tem efeito anti-apoptótico. Desta forma, ao contrário do que ocorre com os adrenoceptores β_1 , estimulação persistente dos adrenoceptores β_2 tem efeito cardioprotetor (XIAO *et al.*, 2006).

Com o objetivo de testar a hipótese de que o tratamento com SNAC de camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica induz o acoplamento de adrenoceptores β_2 com G_i , camundongos dos grupos HC e HC+SNAC foram tratados com toxina pertussis, a qual inativa as respostas mediadas por G_i (Heubach *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2005). Em camundongos do grupo HC, o tratamento com PTX não alterou a resposta à isoprenalina. Entretanto, em átrios esquerdos de camundongos do grupo HC+SNAC, o deslocamento previamente observado nas curvas concentração-efeito à isoprenalina foi anulado, e em átrios direitos não foi possível obter as curvas, pois estes apresentaram arritmia. Estes dados confirmam nossa hipótese.

O NO e os S-Nitrosotióis através de reações de S-nitrosilação são capazes de modular de maneira reversível e altamente específica os receptores acoplados à proteína G e os componentes de sua via de sinalização, além de algumas proteínas que regulam suas funções, assim como as GRKs. Tal modulação pode potencializar ou inibir a sinalização desses receptores (Whalen *et al.*, 2007). Nós não investigamos se é este o mecanismo através do qual o tratamento com SNAC causou subsensibilidade da resposta do átrio direito e, provavelmente, do átrio esquerdo à isoprenalina. Este mecanismo será investigado posteriormente.

Observamos, entretanto, que o efeito do SNAC na sensibilidade dos átrios direito e esquerdo à isoprenalina foi similar nos grupos CT e HC, ou seja, em ambos os grupos o tecido atrial se tornou subsensível à ação do agonista de adrenoceptores. Mas, os mecanismos desta subsensibilidade parecem ser distintos, uma vez que em átrios de camundongos HC tratados com

SNAC, a subsensibilidade à isoprenalina é devida ao acoplamento dos adrenoceptores β_2 com a proteína G inibitória, enquanto que no grupo CT, este subtipo de adrenoceptores parece não participar deste processo, uma vez que não foram alterados na presença de ICI118.5521. Estes dados reforçam a hipótese de que adrenoceptores participam ativamente dos processos adaptativos desencadeados no tecido cardíaco por situações que alteram a demanda imposta a este órgão, como ocorre no caso deste modelo experimental e de outros, tais como em situações de estresse e de hipertensão causada por desnervação sino-aórtica (Santos *et al.*, 2005; Santos & Spadari-Bratfisch, 2006). Os resultados sugerem também que tais processos adaptativos têm caráter eminentemente específico.

Tal especificidade da resposta adaptativa se constata também em relação às câmaras cardíacas, uma vez que as alterações de sensibilidade observadas nos átrios de camundongos LDLr-/- tratados ou não com dieta hiperlipídica e/ou SNAC não encontram paralelo com a expressão gênica dos adrenoceptores β_1 e β_2 em tecido ventricular destes camundongos. Embora átrios de camundongos do grupo CT não apresentem diferenças de sensibilidade à isoprenalina em relação ao grupo WT, no ventrículo esquerdo de camundongos CT houve queda significativa na expressão dos genes dos adrenoceptores β_1 e β_2 . Por outro lado, átrios de camundongos HC se mostraram supersensíveis à isoprenalina comparados ao CT e ao WT, mas em ventrículos esquerdos de camundongos do grupo HC, a expressão dos adrenoceptores β_1 e β_2 foi maior que no grupo CT e similar ao grupo WT. O tratamento dos animais do grupo HC com SNAC induziu diminuição dos RNAm dos adrenoceptores β_1 e β_2 em relação aos camundongos do grupo HC.

Alterações na reatividade cardíaca não são necessariamente acompanhadas de alterações em paralelo na expressão dos dois subtipos de adrenoceptores beta. De fato, um aumento ou diminuição na concentração de RNAm, não está necessariamente associado com aumento na

proteína correspondente (Lewin, 1997). Mysliveček *et al* (2006) demonstraram que, embora os RNAm dos adrenoceptores β_1 e β_2 estejam igualmente distribuídos nas diferentes câmaras cardíacas de ratos, a densidade desses receptores difere entre as regiões. Deve-se considerar também que em tecido cardíaco a reserva de adrenoceptores β é de cerca de 95%, de modo que a resposta aos agonistas somente será alterada se uma parcela muito grande dos adrenoceptores for comprometida. Outra hipótese alternativa seria que em tecido ventricular de camundongos do grupo HC+SNAC, os adrenoceptores tenham sofrido alterações estruturais, pela ação do SNAC, que impediram seu reconhecimento pelo *primer* utilizado. Neste caso, a queda observada na expressão destes receptores representaria um artefato técnico e não uma situação real.

Assim, ainda não está claro se alterações na expressão dos adrenoceptores beta são responsáveis pela diminuição da resposta funcional no coração. Por outro lado, as variações do ponto de vista molecular devem ser consideradas, pois esses resultados podem ser indicadores de possíveis alterações cardiovasculares com considerável importância fisiológica (Altan *et al.*, 2007).

Os mecanismos através dos quais o tratamento com SNAC pode induzir acoplamento de adrenoceptores β_2 a G_i precisam ser mais investigados. No entanto, os dados aqui apresentados sugerem fortemente que em tecido cardíaco de camundongos LDLr^{-/-} sob dieta aterogênica, adrenoceptores β_2 participam da resposta às catecolaminas e que o SNAC favorece o acoplamento destes adrenoceptores com G_i . Este efeito teria um papel protetor contra o desenvolvimento da arritmias causadas pela estimulação adrenérgica excessiva.

Conforme está mencionado acima, nós demonstramos que átrios esquerdos de camundongos CT e HC apresentam déficit contrátil e que os átrios de camundongos HC são supersensíveis à isoprenalina em relação ao átrio esquerdo de camundongos WT. O déficit contrátil não foi afetado pelo tratamento dos animais com SNAC, mas a supersensibilidade à isoprenalina foi abolida. Por outro lado, o tratamento com SA de camundongos do grupo HC resultou em correção do déficit contrátil em relação ao grupo WT, e da sensibilidade à isoprenalina. Estes parâmetros não foram alterados na presença de ICI118.551.

Átrios direitos de camundongos do grupo CT apresentam frequência basal de batimentos mais alta quando comparados com átrios de camundongos do grupo WT. Esta alteração na frequência basal de batimentos pode ser uma resposta adaptativa, no sentido de compensar o déficit contrátil observado em átrio esquerdo dos camundongos deste grupo. Quando estes camundongos são alimentados com dieta hiperlipídica, este processo adaptativo é perdido, uma vez que a frequência basal de batimentos dos átrios se torna similar à do grupo WT. O tratamento com SNAC não corrige este parâmetro, mas o tratamento com SA o faz. Considerando que o déficit contrátil não está mais presente nestes animais, a questão que surge é: seria este processo protetor ou deletério para o funcionamento cardíaco do ponto de vista da homeostase da pressão arterial e do funcionamento cardíaco?

Na presença do antagonista seletivo de adrenoceptores β_2 , camundongos do grupo HC+SA apresentaram supersensibilidade à isoprenalina quando comparados ao grupo HC. Estes dados sugerem que também o SA, assim como o SNAC induz o acoplamento de adrenoceptores β_2 com a proteína G_i , embora este efeito do SA seja menos pronunciado que o do SNAC. Esta conclusão se baseia no fato de que o bloqueio do adrenoceptores em átrios de camundongos tratados com SNAC resulta em arritmia, mas não naqueles tratados com SA, e também no fato de

que este suposto efeito do SA não se estende ao átrio esquerdo, como observado para o SNAC. Não podemos deixar de mencionar, no entanto, que o número amostral dos experimentos com SA é baixo (n=4) e que o aumento do número de experimentos será necessário para comprovar estas diferenças.

Os experimentos com átrio direito e esquerdo isolados destes camundongos permitem concluir que a deleção gênica do receptor de LDL resulta em déficit contrátil do miocárdio, o qual é compensado por aumento da frequência basal de batimentos, sem alterações na sensibilidade da resposta inotrópica e cronotrópica à isoprenalina, embora a expressão dos adrenoceptores esteja reduzida em tecido ventricular esquerdo. A associação de deleção gênica dos receptores de LDL com dieta hiperlipídica resulta em aumento de sensibilidade à isoprenalina em átrio esquerdo mas não em átrio direito e expressão de adrenoceptores semelhante à que ocorre em camundongos selvagens. O tratamento dos camundongos com SNAC ou com SA corrige o aumento de sensibilidade por meio da indução de acoplamento entre os adrenoceptores β_2 com proteína G inibitória. Este efeito exerce papel protetor contra o desenvolvimento de arritmias quando ocorre aumento do tônus simpático. O SA corrige também o déficit contrátil, mas mantém a taquicardia sinusal, o que pode representar um efeito deletério importante sobre a fisiologia cardíaca deste animal. Por outro lado, em tecido ventricular de camundongos tratados com SNAC houve diminuição da expressão gênica de adrenoceptores β_1 e β_2 , ou alteração estrutural destes receptores que impediu seu reconhecimento pelo *primer* utilizado.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que:

- O SNAC é 10 vezes mais potente do que o Sal de Angelis em causar hipotensão.
- Camundongos com deleção do gene que codifica o receptor de LDL apresentam hipertensão e quando alimentados com dieta hiperlipídica além da hipertensão, desenvolvem aterosclerose e hipertrofia ventricular esquerda.
- O tratamento com SNAC e SA previne o processo hipertensivo apenas nos camundongos LDLr-/- alimentados com dieta convencional.
- O tratamento com SNAC e SA previne o processo hipertrófico nos camundongos LDLr-/- alimentados com dieta aterogênica .
- A deleção gênica do receptor de LDL resultou em déficit contrátil atrial, contudo não detectamos alteração na população de adrenoceptores β .
- A deleção gênica do receptor de LDL associada à dieta hiperlipídica produz alteração da sensibilidade aos efeitos inotrópico e cronotrópico da isoprenalina, que pode ser atribuída a alterações na população de adrenoceptores β , induzindo participação de adrenoceptores β_2 .
- O tratamento com SNAC nos camundongos tratados com dieta aterogênica preveniu o aumento da sensibilidade às catecolaminas. Tal fenômeno parece ocorrer mediante o acoplamento do adrenoceptor β_2 com a proteína Gi.
- O Sal de Angelis é capaz de corrigir o déficit contrátil e, provavelmente, induz o acoplamento do adrenoceptor β_2 com a proteína Gi.

Estes dados permitem concluir que camundongos com deleção gênica do receptor de LDL, associado com uma dieta aterogênica podem ser um interessante modelo de alterações cardíacas e hemodinâmicas, especialmente quando enfocamos alterações das respostas a agonistas beta adrenérgicos. Assim, drogas doadoras de NO e seus congêneres podem se tornar uma alternativa para prevenir tais alterações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altan V, Arioglu E, Guner S, Ozcelikay AT. The influence of diabetes on cardiac beta-adrenoceptor subtypes. **Heart Fail Rev** 12(1):58-65, 2007.
- Arnett DK, De Las Fuentes L, Broeckel U. Genes for left ventricular hypertrophy. **Curr Hypertens Rep** 6(1):36-41, 2004.
- Bauersachs J, Bouloumié A, Mülsch A, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. **Cardiovasc Res** 37(3):772-9, 1998.
- Besse JC e Furchgott RF. Dissociation constants and relative efficacies of agonists acting on alpha adrenergic receptors in rabbit aorta. **J Pharmacol Exp Ther** 197(1):66-78, 1976.
- Bilski AJ, Halliday SE, Fitzgerald JD, Wale JL. The pharmacology of a beta 2-selective adrenoceptor antagonist (ICI 118,551). **J Cardiovasc Pharmacol** 5(3):430-7, 1983.
- Blinks JR. Convenient apparatus for recording contractions of isolated heart muscle. **J Appl Physiol** 20(4):755-7, 1965.
- Bohm M, Kirchmayr R, Erdmann E. Myocardial Gi alpha-protein levels in patients with hypertensive cardiac hypertrophy, ischemic heart disease and cardiogenic shock. **Cardiovasc Res** 30(4):611-8, 1995.
- Bohm M, Moll M, Schmid B, Paul M, Ganten D, Castellano M, Erdmann E. Beta-adrenergic neuroeffector mechanisms in cardiac hypertrophy of renin transgenic rats. **Hypertension** 24(6):653-62, 1994.
- Bohm M; Mittmann C; Schwinger R H; Erdmann E. Effects of xamoterol on inotropic and lusitropic properties of the human myocardium and on adenylate cyclase activity. **Am Heart J** 120 (6): 1381-1392, 1990.

Bonisch H, Uhlig W, Trendelenburg U. Analysis of the compartments involved in the extraneuronal storage and metabolism of isoprenaline in the perfused heart. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 283(3):223-44, 1974.

Breslow e Jan L. Mouse models of atherosclerosis. **Science** 272 (2): 685-88, 1996.

Brodde O E. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. **Pharmacol Rev** 43: 203-24, 1991.

Brodde O E, Zerkowski H R, Schranz D, Broede-Sitz A, Michel-Reher M, Schafer-Beisenbusch E, Piotrowski J A, Oelert H. Age-dependent changes in the beta-adrenoceptor-G-protein(s)-adenylyl cyclase system in human right atrium. **J Cardiovasc Pharmacol** 26(1): 20-26, 1995.

Brodde OE, Bruck H, Leinewebwe K. Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. **J Pharmacol Sci** 100(5): 323-37, 2006.

Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. **Pharmacol Rev** 51(4):651-90, 1999.

Brutsaert DL. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. **Physiol Rev** 83(1):59-115, 2003.

Camara G, Souza RCM, Freitas UM, Garrido J. SPRING: Integrating remote sensing and GIS by object-oriented data modelling. **Computers & Graphics** 20(3): 395-403, 1996.

Casadei B, Sears CE. Nitric-oxide-mediated regulation of cardiac contractility and stretch responses. **Prog Biophys Mol Biol** 82(1-3): 67-80, 2003.

Shizukuda Y e Buttrick PM. Subtype specific roles of beta-adrenérgic receptors in apoptosis of adult rat ventricular myocytes. **J Moll Cell Cardiol** 34(7): 823-31, 2002.

Chen-Izu Y, Xiao RP, Izu LT, Cheng H, Kuschel M, Spurgeon H, Lakatta EG. G(i)-dependent localization of beta(2)-adrenergic receptor signaling to L-type Ca(2+) channels. **Biophys J** 79(5): 2547-56, 2000.

Chesley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao RP, Ohtani S, Lakatta EG, Crow MT. The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. **Circ Res** 87(12): 1172-9, 2000.

Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. **Circulation** 100(22):2210-2, 1999.

Crandall DL, Lai FM, Huggins FJ, Tanikella TK, Cervoni P. Effects of caloric restriction on cardiac reactivity and - β adrenoceptor concentration. **Am. J. Physiol.**, 244: H444-H448, 1983.

Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. **Nature** 390(6655): 88-91, 1997.

Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Ferguson SS, Caron MG, Lefkowitz RJ. Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. **J Biol Chem** 273(2): 685-8, 1998.

Dorian P. Antiarrhythmic action of beta-blockers: potential mechanisms. **J Cardiovasc Pharmacol Ther** 10(1): 15-22, 2005.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev** 82(1): 47-95, 2002.

Eiserich JP, Patel RP, O'donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Mol Aspects Med** 19(4-5): 221-357, 1998.

Elahi M, Asopa S, Matata B. NO-cGMP and TNF-alpha counter regulatory system in blood: understanding the mechanisms leading to myocardial dysfunction and failure. **Biochim Biophys Acta** (1): 5-14, 2007.

Eschenhagen T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Haverich A, Hirt S, Doring V, Kalmar P, Hoppner W, Increased messenger RNA level of the inhibitory G protein alpha subunit Gi alpha-2 in human end-stage heart failure. **Circ Res** 70(4): 688-96, 1992.

Escobar AL, Fernandez-Gomez R, Peter JC, Mobini R, Hoebeke J, Mijares A. IgGs and Mabs against the beta2-adrenoreceptor block A-V conduction in mouse hearts: A possible role in the pathogenesis of ventricular arrhythmias. **J Mol Cell Cardiol** 40(6): 829-37, 2006.

Fabiato A, Fabiato F. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. **Annu Rev Physiol** 41: 473-84, 1979.

Failli P, Fazzini A, Ruocco C, Mazzetti L, Cecchi E, Giovannelli L, Marra F, Milani S, Giotti A. Lack of nitric oxide- and guanosine 3':5'-cyclic monophosphate-dependent regulation of alpha-thrombin-induced calcium transient in endothelial cells of spontaneously hypertensive rat hearts. **Br J Pharmacol** 130(7):1468-76, 2000.

Fukuto JM, Bartberger MD, Dutton AS, Paolocci N, Wink DA, Houk KN. The physiological chemistry and biological activity of nitroxyl (HNO): the neglected, misunderstood, and enigmatic nitrogen oxide. **Chem Res Toxicol** 18(5):790-801, 2005.

Fukuto JM, Hobbs AJ, Ignarro LJ. Conversion of nitroxyl (HNO) to nitric oxide (NO) in biological systems: the role of physiological oxidants and relevance to the biological activity of HNO. **Biochem Biophys Res Commun** 196(2):707-13, 1993.

Furchgott RF. The pharmacological differentiation of adrenergic receptors. **Ann N Y Acad Sci** 139(3):553-70, 1967.

Garcia JAD, Santos L, Moura A L, Ricardo KFS, Wanschel ACBA, Shishido SM, Spadari-Bratfisch RC, Souza HP, Krieger MH. S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents left ventricular hypertrophy in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by anti-inflammatory action. **Journal of Cardiovascular Pharmacology** 51(1):78-85, 2008.

Genda S, Miura T, Miki T, Ichikawa Y, Shimamoto K. K(ATP) channel opening is an endogenous mechanism of protection against the no-reflow phenomenon but its function is compromised by hypercholesterolemia. **J Am Coll Cardiol** 40(7):1339-46, 2002.

Hardt SE, Geng YJ, Montagne O, Asai K, Hong C, Yang GP, Bishop SP, Vatner DE, Seidman CE, Seidman JG, Homcy CJ, Vatner SE. Accelerated cardiomyopathy in mice with overexpression of cardiac G(s)alpha and a missense mutation in the alpha-myosin heavy chain. **Circulation** 105(5):614-20, 2002.

Heger J, Godecke A, Flogel U, Merx MW, Molojavyy A, Kuhn-Velten WN, Schrader J. Cardiac-specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunction. **Circ Res** 90(1):93-9, 2002.

Heubach J F; Trebess I; Wettwer E; Himmel H M; Michel M C; Kaumann A J; Koch W J; Harding S E; Ravens U. L-type calcium current and contractility in ventricular myocytes from mice overexpressing the cardiac beta 2-adrenoceptor. **Cardiovasc Res** 42(1): 173-182, 1999.

Heubach JF, Rau T, Eschenhagen T, Ravens U, Kaumann AJ. Physiological antagonism between ventricular beta 1-adrenoceptors and alpha 1-adrenoceptors but no evidence for beta 2- and beta 3-adrenoceptor function in murine heart. **Br J Pharmacol** 136(2):217-29, 2002.

Houle MS, Altschuld RA, Billman GE. Enhanced in vivo and in vitro contractile responses to beta(2)-adrenergic receptor stimulation in dogs susceptible to lethal arrhythmias. **J Appl Physiol** 91(4):1627-37, 2001.

Huang MH, Knight PR, Izzo JL. Ca²⁺-induced Ca²⁺ release involved in positive inotropic effect mediated by CGRP in ventricular myocytes. **Am J Physiol** 276(1 - 2):259-64, 1999.

Irvine JC, Favaloro JL, Kemp-Harper BK. NO- activates soluble guanylate cyclase and Kv channels to vasodilate resistance arteries. **Hypertension** 41(6):1301-7, 2003.

Iversen LL e Salt PJ. Inhibition of catecholamine Uptake-2 by steroids in the isolated rat heart. **Br J Pharmacol** 40(3):528-30, 1970.

Iversen LL, Salt PJ, Wilson HA. Inhibition of catecholamine uptake in the isolated rat heart by haloalkylamines related to phenoxybenzamine. **Br J Pharmacol** 46(4):647-57, 1972.

Kamataki A, Takahashi S, Masamura K, Iwasaki T, Hattori H, Naiki H, Yamada K, Suzuki J, Miyamori I, Sakai J, Fujino T, Yamamoto TT. Remnant lipoprotein particles are taken up into myocardium through VLDL receptor--a possible mechanism for cardiac fatty acid metabolism. **Biochem Biophys Res Commun** 293(3):1007-13, 2002.

Katori T, Hoover DB, Ardell JL, Helm RH, Belardi DF, Tocchetti CG, Forfia PR, Kass DA, Paolucci N. Calcitonin gene-related peptide in vivo positive inotropy is attributable to regional sympatho-stimulation and is blunted in congestive heart failure. **Circ Res** 96(2):234-43, 2005.

Kaufman LN, Peterson MM, Smith SM. Hypertension and sympathetic hyperactivity induced in rats by high fat or glucose diets. **Am. J. Physiol** E95-E100, 1991.

Kaumann AJ e Molenaar P. Differences between the third cardiac beta-adrenoceptor and the colonic beta 3-adrenoceptor in the rat. **Br J Pharmacol** 118(8):2085-98, 1996.

Kaumann AJ. Four beta-adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. **Trends Pharmacol Sci** 18(3):70-6, 1997.

Kempf T, Wollert KC. Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. **Bioessays**. 26(6):608-15, 2004.

Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwinn DA, Kwatra MM. Beta(2)-adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G(s) and G(i). **Circ Res** 87(8):705-9, 2000.

- Kokkola T, Savinainen JR, Monkkonen KS, Retamal MD, Laitinen JT. S-nitrosothiols modulate G protein-coupled receptor signaling in a reversible and highly receptor-specific manner. **BMC Cell Biol** 25;6(1):21, 2005.
- Koss KL, Kranias EG. Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. **Circ Res** 79(6):1059-63, 1996.
- Kozłowska H, Szymaska U, Schlicker E, Malinowska B. Atypical beta-adrenoceptors, different from beta 3-adrenoceptors and probably from the low-affinity state of beta 1-adrenoceptors, relax the rat isolated mesenteric artery. **Br J Pharmacol** 140(1):3-12, 2003.
- Krieger MH, Santos KF, Shishido SM, Wanschel AC, Estrela HF, Santos L, De Oliveira MG, Franchini KG, Spadari-Bratfisch RC, Laurindo FR. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. **Nitric Oxide** 14(1):12-20, 2006.
- Kuschel M, Zhou YY, Cheng H, Zhang SJ, Chen Y, Lakatta EG, Xiao RP. G(i) protein-mediated functional compartmentalization of cardiac beta(2)-adrenergic signaling. **J Biol Chem** 274(31):22048-52, 1999.
- Lee TM, Lin MS, Chou TF, Chang NC. Effect of simvastatin on left ventricular mass in hypercholesterolemic rabbits. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 288(3):1352-8, 2005.
- Lewin B. **Genes VI**, Oxford: Oxford University, 1997.
- Li YJ, Peng J. The cardioprotection of calcitonin gene-related peptide-mediated preconditioning. **Eur J Pharmacol** 442(3):173-7, 2002.
- Lopez BE, Shinyashiki M, Han TH, Fukuto JM. Antioxidant actions of nitroxyl (HNO). **Free Radic Biol Med** 42(4):482-91 2006.

Ma XL, Gao F, Liu GL, Lopez BL, Christopher TA, Fukuto JM, Wink DA, Feelisch M. Opposite effects of nitric oxide and nitroxyl on postischemic myocardial injury. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96(25):14617-22, 1999.

Marín J, Martínez MAR. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacol Ther** 75:111-134, 1997.

Massion PB, Balligand JL. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. **J Physiol.** 546(1):63-75, 2003.

Meissner G. Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. **Annu Rev Physiol** 56:485-508, 1994.

Myslivescek J, Nováková M, Palkovits M, Krizanová O, Kvetnansky R. distribution of mRNA and binding sites of adrenoceptors and muscarinic receptors in the rat heart. **Life Sci** 79(2):112-20, 2006.

Moura, AM. **Sensibilidade a agonista β -adrenérgico em átrio esquerdo isolado de ratos submetidos a estresse.** Campinas, 2002. Dissertação – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

Nagasawa HT, Demaster EG, Redfern B, Shirota FN, Goon DJ. Evidence for nitroxyl in the catalase-mediated bioactivation of the alcohol deterrent agent cyanamide. **J Med Chem** 33(12):3120-2, 1990.

Nelli S, Hillen M, Buyukafsar K, Martin W. Oxidation of nitroxyl anion to nitric oxide by copper ions. **Br J Pharmacol** 131(2):356-62, 2000.

Neumann J, Boknik P, Depaoli-Roach AA, Field LJ, Rockman HA, Kobayashi YM, Kelley JS, Jones LR. Targeted overexpression of phospholamban to mouse atrium depresses Ca²⁺ transport and contractility. **J Mol Cell Cardiol** 30(10):1991-2002, 1998.

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. **Circ Res** 94(12):1543-53, 2004.

Oliveira HC, Cosso RG, Alberici LC, Maciel EN, Salerno AG, Dorighello GG, Velho JA, De Faria EC, Vercesi AE. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **FASEB J** 19(2):278-80, 2004.

Oostendorp J, Kaumann AJ. Pertussis toxin suppresses carbachol-evoked cardiodepression but does not modify cardiostimulation mediated through beta1- and putative beta4-adrenoceptors in mouse left atria: no evidence for beta2- and beta3-adrenoreceptor function. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 361(2):134-45, 2000.

Paolocci N, Katori T, Champion HC, St John Me, Miranda KM, Fukuto JM, Wink DA, Kass DA. Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO⁻ in failing hearts: independence from beta-adrenergic signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100(9):5537-42, 2003.

Paolocci N, Saavedra WF, Miranda KM, Martignani C, Isoda T, Hare JM, Espey MG, Fukuto JM, Feelisch M, Wink DA, Kass DA. Nitroxyl anion exerts redox-sensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98(18):10463-8, 2001.

Pinsky DJ, Patton S, Mesaros S, Brovkovich V, Kubaszewski E, Grunfeld S, Malinski T. Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. **Circ Res** 81(3):372-9, 1997.

Port JD, Bristow MR. Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. **J Mol Cell Cardiol** 33(5):887-905, 2001.

Reuter H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. **Nature** 301(5901):569-74, 1983.

Ricardo KF, Shishido SM, De Oliveira MG, Krieger MH. Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetylcysteine in normotensive and hypertensive conscious rats. **Nitric Oxide** 7(1):57-66, 2002.

Rubbo H, Parthasarathy S, Barnes S, Kirk M, Kalyanaraman B, Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **Arch Biochem Biophys** 324(1):15-25, 1995.

Sabri A, Pak E, Alcott SA, Wilson BA, Steinberg SF. Coupling function of endogenous alpha(1)- and beta-adrenergic receptors in mouse cardiomyocytes. **Circ Res** 86(10):1047-53, 2000.

Salt PJ. Inhibition of noradrenaline uptake 2 in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. **Eur J Pharmacol** 20(3):329-40, 1972.

Santos IN and Spadari-Bratfisch RC. Chronotropic response to (+/-)-CGP12177 in right atria of stressed rats. **Can J Physiol Pharmacol** 79(5):393-9, 2001.

Santos IN, Spadari-Bratfisch RC. Stress and cardiac beta adrenoceptors. **Stress** 9(2):69-84, 2006.

Schaap FG, Van Der Vusse GJ, Glatz JF. Fatty acid-binding proteins in the heart. **Moll Cell Biochem** 180(1-2):43-51, 1998.

Seyedi N, Maruyama R, Levi R. Bradykinin activates a cross-signaling pathway between sensory and adrenergic nerve endings in the heart: a novel mechanism of ischemic norepinephrine release? **J Pharmacol Exp Ther** 290: 656–663, 1999.

Sharma N, Okere IC, Duda MK, Chess DJ, O'shea KM, Stanley WC. Potential impact of carbohydrate and fat intake on pathological left ventricular hypertrophy. **Cardiovasc Res** 73(2):257-68, 2007.

- Shizukuda Y, Buttrick PM. Subtype specific roles of beta-adrenergic receptors in apoptosis of adult rat ventricular myocytes. **J Mol Cell Cardiol** 34(7):823-31, 2002.
- Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. **Proc Natl Acad Sci U S A** 89(1):444-8, 1992.
- Styś T, Styś A, Paczwa P, Szczepańska-Sadowska E, Lipkowski AW. Decreased hypotensive responsiveness to nitric oxide donor S-nitroso N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) in spontaneously hypertensive (SHR) rats. **J Physiol Pharmacol** 49(1):37-49, 1998.
- Sundström J, Lind L, Vessby B, Andrén B, Aro A, Lithell H. Dyslipidemia and an unfavorable fatty acid profile predict left ventricular hypertrophy 20 years later. **Circulation** 103(6):836-41, 2001.
- Tocchetti CG, Wang W, Froehlich JP, Huke S, Aon MA, Wilson GM, Di Benedetto G, O'Rourke B, Gao WD, Wink DA, Toscano JP, Zaccolo M, Bers DM, Valdivia HH, Cheng H, Kass DA, Paolocci N. Nitroxyl improves cellular heart function by directly enhancing cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling. **Circ Res** 100(1):96-104, 2007.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem Cell Biol** 122(4):339-52, 2005.
- Van Rossum JM. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. **Arch Int Pharmacodyn Ther** 143:299-330, 1963.
- Wanstall JC, Jeffery TK, Gambino A, Lovren F, Triggle CR. Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. **Br J Pharmacol** 134(3):463-72, 2001.

Whalen EJ, Foster MW, Matsumoto A, Ozawa K, Violin JD, Que LG, Nelson CD, Benhar M, Keys JR, Rockman HA, Koch WJ, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Stamler JS. Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2. **Cell** 129(3):511-22, 2007.

Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. **Anal Biochem** 270(1):41-9, 1999.

Wink DA, Miranda KM, Katori T, Mancardi D, Thomas DD, Ridnour L, Espey MG, Feelisch M, Colton CA, Fukuto JM, Pagliaro P, Kass DA, Paolocci N. Orthogonal properties of the redox siblings nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system: a novel redox paradigm. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 285(6):2264-76, 2003.

Xiao R P. Cell logic for dual coupling of a single class of receptors to G(s) and G(i) proteins. **Circ Res** 13-87(8): 635-637, 2000.

Xiao RP, Avdonin P, Zhou YY, Cheng H, Akhter SA, Eschenhagen T, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Lakatta EG. Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. **Circ Res** 84(1):43-52, 1999.

Xiao RP, Ji X, Lakatta EG. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. **Mol Pharmacol** 47(2):322-9, 1995.

Xiao RP, Tomhave ED, Wang DJ, Ji X, Boluyt MO, Cheng H, Lakatta EG, Koch WJ. Age-associated reductions in cardiac beta1- and beta2-adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases. **J Clin Invest** 101(6):1273-82, 1998.

Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Cao C, Zhang Y, Lakatta EG, Han Q. Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. **Trends Pharmacol Sci** 27(6):330-7, 2006.

Yang W, Xia SH Mechanisms of regulation and function of G-protein-coupled receptor kinases.

World J Gastroenterol 12(48):7753-7, 2006.

Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98(4):1607-12, 2001.

Zicha J, Kunes J, Devynck MA. Abnormalities of membrane function and lipid metabolism in hypertension: a review. **Am J Hypertens** 12(3):315-31, 1999.

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(14):9760-70, 1999.

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(14):9760-70, 1999.