

***FERNANDA BRUSCHI MARINHO PRIVIERO***

***MECANISMO DE AÇÃO DE ANTAGONISTAS DE  
ADRENOCEPTORES  $\beta$  NA REATIVIDADE VASCULAR EM  
RATOS***

***CAMPINAS***

***2006***

***FERNANDA BRUSCHI MARINHO PRIVIERO***

***MECANISMO DE AÇÃO DE ANTAGONISTAS DE  
ADRENOCEPTORES  $\beta$  NA REATIVIDADE VASCULAR EM  
RATOS***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de  
Doutor em Farmacologia.*

***ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Antunes***

***CAMPINAS***

***2006***

*FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA*

*BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP*

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8<sup>a</sup> / 6044

P939m

Priviero, Fernanda Bruschi Marinho  
Mecanismo de ação de antagonistas de adrenoceptores  $\beta$  na reatividade vascular em ratos / Fernanda Bruschi Marinho Priviero. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Edson Antunes  
Dissertação ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hipertensão. 2. Óxido Nítrico. 3. L-Name. 4. Propanolol.  
I. Antunes, Edson. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : Mechanism of action of  $\beta$ -adrenoceptor antagonists in the vascular reactivity in rats**

**Keywords:** • Hypertension  
• Nitric Oxide  
• L-NAME  
• Propanolol

Titulação: Doutorado

Banca examinadora: Prof Dr Edson Antunes

**Prof Dr Heitor Moreno Júnior**  
**Profa. Dra. Alice Aparecida de Olim Bricola**  
**Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni**  
**Profa. Dra. Sandra Cordellini**

Data da defesa: 10/03/2006



## **Banca Examinadora da Tese de Doutorado**

---

### **Orientador:**

**Prof. Dr. Edson Antunes**

### **Membros:**

**Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior**

**Profa. Dra. Alice Aparecida de Olim Bricola**

**Profa. Dra. Luciana Rossoni**

**Profa. Dra. Sandra Cordellini**

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

**Data: 10/03/2006**

---

---

*DEDICATÓRIA*

---

---

---

---

*Aos grandes responsáveis por cada degrau por mim alcançado, que  
são os meus maiores incentivadores, que são aqueles que eu chamo  
de meu porto seguro, meus pais,*

***ROLANDO E LEILA,***

*Dedico este trabalho.*

---

---

***AGRADECIMENTOS***

---

---

*Aos meus grandes amigos,*

*Profa. Dra. Angelina Zanesco e Cleber Evandro Teixeira,*

*meu agradecimento especial por todas as  
oportunidades que me ofereceram e pela valiosa  
colaboração na realização deste trabalho.*

---

---

*Ao meu orientador e amigo,*

*Prof. Dr. Edson Antunes,*

*Agradeço imensamente a confiança e a oportunidade  
de desenvolver este trabalho sob a tua orientação.*

*Agradeço a paciência nas nossas discussões em  
“diferentes frequências”. E principalmente, agradeço a  
tua amizade durante estes anos.*

---

---

## *Agradecimentos*

*Em primeiro lugar e acima de tudo, agradeço à Deus por ter selecionado e enviado à Terra tão especiais anjos da guarda para “olharem” por mim e guiarem meus caminhos. Cada um de vocês, MEUS VERDADEIROS AMIGOS, é um anjo da guarda enviado por Ele, indispensável na travessia das minhas provas nesta vida. Sem vocês, eu não seria nada!*

*Agradeço aos meus familiares, meu irmão Júnior e minha cunhada Luciana, minha madrinha Denise e meu padrinho Elvio, minhas tias Nádia e Ivette, meus tios Sidney e Zézinho, meu avô Alfredo (in memorium), meus primos e minha avó Rosa, pelo apoio de sempre, pelo carinho e por me incentivarem nesta caminhada.*

*Agradeço às minhas duas irmãzinhas de laboratório, duas amizades preciosas que vieram para alegrar os dias do nosso laboratório, Camila Moraes e Maria Andréia Delbin. E à minha terceira irmãzinha, Ana Paula Zanesco Salgado, pela amizade e pelas risadas. Vocês são especiais!*

*Aos amigos do departamento de farmacologia da UNICAMP, Alice Bricola, Aline Maziero, Ana Cecília, Carla Penteado, Clésio Pena, Cristiane Freitas, Elen Landucci, Enilton Camargo, Fabiola Monica, Fernanda Datti, Fernando Bau, Haroldo Flores, Ivani Souza, Juliana Baracat, Juliana Moreira, Leticia Lintomen, Marcelo Datti, Márcia Cardoso, Mario Angelo Claudino, Rafael Annovazzi, Rafael Prada, Raquel Lorenzetti, Sisi*

---

---

*Marcondes, Tatiane Ferreira, agradeço por toda a amizade e pela alegria compartilhada no dia-a-dia de trabalho.*

*Agradeço aos professores Dr. Gilberto De Nucci e Dr. R. Clinton Webb, pela oportunidade de desenvolver meu trabalho em seus laboratórios.*

*Aos meus amigos de longa distância, especialmente à Evelyn Slauta e ao Rosinildo Galdino, agradeço toda a força e amizade que me dá a certeza de poder contar sempre com vocês!*

*Aos funcionários do depto de farmacologia da UNICAMP, Francileuda, Elaine, Wanderlei, Marcos, Agnaldo, Adílson e Toninho, pela agradável convivência e pelos serviços prestados. E especialmente, agradeço ao Sr. Miguel Borges da Silva por dispensar tanto cuidado na criação dos ratos.*

*Um singelo agradecimento e o meu respeito aos ratos, que, ainda que involuntariamente, deram suas vidas à esta pesquisa.*

*Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado – 02/07181-6 (2002-2005).*

---

---

*Pedras no caminho? Guardo todas. Um*

*dia vou construir um castelo!*

*(Fernando Pessoa)*

---

---

*SUMÁRIO*

---

---

<b>LISTA DE DROGAS.....</b>	<b>xxv</b>
<b>LISTA DE ABREVIACOES.....</b>	<b>xxix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xxiii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xxxix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xliii</b>
<b>1.INTRODUÇAO.....</b>	<b>47</b>
1.1 REGULACAO DO TONUS DA MUSCULATURA LISA VASCULAR.....	51
▪ <i>xido Nítrico (NO)</i> .....	52
▪ <i>Fator de Hiperpolarizaco Derivado do Endotélio (EDHF)</i> .....	55
▪ <i>Canais para cálcio no controle do tonus muscular</i> .....	57
1.2 ADRENOCEPTORES.....	59
▪ <i>Adrenoceptores <math>\alpha_1</math> e <math>\alpha_2</math></i> .....	60
▪ <i>Adrenoceptores <math>\beta</math></i> .....	61
▪ <i>Vias de sinalizaco</i> .....	62
▪ <i><math>\beta</math>-adrenoceptores e a musculatura lisa vascular</i> .....	63
▪ <i><math>\beta</math>-adrenoceptores endoteliais</i> .....	64
1.3 ANTAGONISTAS DE ADRENOCEPTORES $\beta$ .....	66
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>69</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>71</b>
2.1 ANIMAIS.....	73
2.2 AORTA E ARTÉRIA MESENTÉRICA ISOLADAS.....	73
2.3 ESTUDOS <i>IN VITRO</i> .....	75
▪ <i>Avaliaco dos efeitos relaxantes diretos dos isômeros do propranolol em aorta e artéria mesentérica isoladas de rato</i> .....	75
▪ <i>Resposta contrátil ao <math>CaCl_2</math></i> .....	75
▪ <i>Dosagem de GMPc e AMPc tecidual</i> .....	76
2.4 ESTUDOS <i>EX VIVO</i> .....	77
▪ <i>Medida de Pressão Arterial e de Freqncia Cardíaca</i> .....	77
▪ <i>Avaliaco funcional das aortas e artérias mesentéricas isoladas de ratos tratados por 4 semanas com L-NAME e/ou propranolol</i> .....	77
▪ <i>Dosagem dos níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx) e atividade plasmática da superóxido dismutase (SOD)</i> .....	79
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	80

---

---

---

---

<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
3.1 Estudo <i>in vitro</i> : Efeitos diretos dos antagonistas $\beta$ -adrenérgicos em aorta e artéria mesentérica de ratos	
▪ <i>Relaxamento induzido pelos antagonistas <math>\beta</math>-adrenérgicos.....</i>	<b>83</b>
▪ <i>Relaxamento induzido pelos isômeros R(+) e S(-)-propranolol.....</i>	<b>86</b>
▪ <i>Relaxamento induzido pelos isômeros do propranolol em artéria mesentérica pré-contráidas com ET-1 ou o U-46619.....</i>	<b>87</b>
▪ <i>Efeito da remoção do endotélio.....</i>	<b>88</b>
▪ <i>Efeito do L-NAME e ODQ nos relaxamentos induzidos pelos isômeros do propranolol.....</i>	<b>90</b>
▪ <i>Efeito da indometacina.....</i>	<b>93</b>
▪ <i>Níveis teciduais de nucleotídeos cíclicos.....</i>	<b>95</b>
▪ <i>Curvas concentração-efeito ao CaCl<sub>2</sub> em anéis de aorta, na presença do DL(<math>\pm</math>)-propranolol.....</i>	<b>98</b>
▪ <i>Efeito da adição concomitante de DL(<math>\pm</math>)-propranolol e nifedipina na resposta contrátil ao CaCl<sub>2</sub>.....</i>	<b>101</b>
3.2 Estudos <i>ex vivo</i> : Tratamento crônico com L-NAME e efeito do DL( $\pm$ )-propranolol	
▪ <i>Peso Corporal e Ingestão Hídrica.....</i>	<b>102</b>
▪ <i>Pressão arterial média e Frequência Cardíaca.....</i>	<b>102</b>
▪ <i>Reatividade da aorta à acetilcolina.....</i>	<b>104</b>
▪ <i>Reatividade da artéria mesentérica à acetilcolina.....</i>	<b>105</b>
▪ <i>Reatividade da aorta e da artéria mesentérica ao gliceriltrinitrato (GTN).....</i>	<b>107</b>
▪ <i>Resposta contrátil ao CaCl<sub>2</sub>.....</i>	<b>109</b>
▪ <i>Níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx) e atividade plasmática da superóxido dismutase (SOD) .....</i>	<b>111</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>113</b>
▪ <i>Efeitos diretos dos antagonistas dos adrenoceptores <math>\beta</math>.....</i>	<b>115</b>
▪ <i>Tratamento crônico com L-NAME.....</i>	<b>121</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>127</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>163</b>

---

---

---

---

***LISTA DE DROGAS***

---

---

***LISTA DE ABREVIACOES***

## LISTA DE ABREVIACOES

ACh: acetilcolina  
AMPc: monofosfato cíclico de adenosina  
ATP: trifosfato de adenosina  
CaM: calmodulina  
COX: ciclooxigenase  
CPA: cido ciclopiazônico  
CTL: controle  
DAG: diacilglicerol  
E.P.M.: erro padrão da média  
EDHF: fator de hiperpolarizao derivado do endotélio  
EDTA: cido etilenodiaminotetra acético  
EGTA: cido etilenoglicol bis(2-aminoetileter) tetra acético  
eNOS: sintase do óxido nítrico endotelial  
ET-1: endotelina 1  
GDP: difosfato de guanosina  
GMPc: monofosfato cíclico de guanosina  
GTN: gliceriltrinitrato  
GTP: trifosfato de guanosina  
iNOS: sintase do óxido nítrico induzível  
IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato  
LN: L-NAME  
LN+P: L-NAME + propranolol  
L-NAME: N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil ster  
MLCK: quinase da cadeia leve de miosina  
nNOS: sintase do óxido nítrico neuronal  
NO: xido nítrico  
NOS: sintase do óxido nítrico  
NOx: nitrito/nitrato  
ODQ: 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-one

pEC<sub>50</sub>: antilog da concentração de droga necessária para produzir 50% do efeito máximo

PKA: proteína quinase A

PKG: proteína quinase G

PROP: propranolol

RNA<sub>m</sub>: ácido ribonucleíco mensageiro

SHR: ratos espontaneamente hipertensos

SOD: superóxido dismutase

---

---

*LISTA DE FIGURAS*

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Efeito do atenolol, metoprolol e DL( $\pm$ )-propranolol (10 – 100  $\mu$ M) em anéis de aorta isolada de ratos, com endotélio íntegro.....**84**
- FIGURA 2.** Efeito do atenolol, metoprolol e DL( $\pm$ )-propranolol (10 – 100  $\mu$ M) em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos, com endotélio íntegro.....**85**
- FIGURA 3.** Efeito dos isômeros do propranolol, DL( $\pm$ ), R(+), S(-)-propranolol (10 – 100  $\mu$ M) em anéis de aorta e de artéria mesentérica com endotélio íntegro.....**86**
- FIGURA 4.** Efeito dos isômeros do propranolol, DL( $\pm$ ), R(+), S(-)-propranolol (10 – 100  $\mu$ M) em anéis de artéria mesentérica com endotélio íntegro, pré-contraídos com fenilefrina, endotelina-1 ou com U-46619.....**87**
- FIGURA 5.** Efeito dos isômeros do propranolol, DL( $\pm$ ), R(+), S(-) -propranolol (10 – 100  $\mu$ M) em anéis de aorta ou artéria mesentérica com endotélio removido.....**89**
- FIGURA 6.** Efeito da adição de L-NAME (100  $\mu$ M) ou ODQ (1  $\mu$ M) no relaxamento induzido pelos isômeros DL( $\pm$ ), S(-) e R(+)-propranolol (10 – 100  $\mu$ M) em anéis de aorta com endotélio íntegro.....**91**
- FIGURA 7.** Efeito da adição de L-NAME (100  $\mu$ M) ou ODQ (1  $\mu$ M) no relaxamento induzido pelos isômeros DL( $\pm$ ), S(-) e R(+)-propranolol (10 – 100  $\mu$ M) em anéis de artéria mesentérica com endotélio íntegro.....**92**
- FIGURA 8.** Efeito da indometacina (6  $\mu$ M) no relaxamento provocado pelos isômeros do propranolol, DL( $\pm$ ), S(-) e R(+)-propranolol (10 – 100  $\mu$ M) em anéis de aorta com endotélio íntegro.....**93**

<b>FIGURA 9.</b> Efeito da adição de indometacina (6 $\mu\text{M}$ ) no relaxamento provocado pelos isômeros do propranolol, DL( $\pm$ ), S(-) e R(+)-propranolol (10 – 100 $\mu\text{M}$ ) em anéis de aorta com endotélio removido.....	<b>94</b>
<b>FIGURA 10.</b> Concentração de GMPc em anéis de aorta e de artéria mesentérica com endotélio intacto (E+) ou removido (E-), estimulados com DL( $\pm$ )-propranolol.....	<b>96</b>
<b>FIGURA 11.</b> Concentração de AMPc em anéis de aorta e de artéria mesentérica com endotélio intacto (E+) ou removido (E-), estimulados com DL( $\pm$ )-propranolol.....	<b>97</b>
<b>FIGURA 12.</b> Efeito do DL( $\pm$ )- propranolol (10 - 100 $\mu\text{M}$ ) na resposta contrátil do $\text{CaCl}_2$ (0.3 – 30 mM) em anéis de aorta com endotélio intacto ou removido.....	<b>99</b>
<b>FIGURA 13.</b> Efeito do DL( $\pm$ )- propranolol (10 - 100 $\mu\text{M}$ ) na resposta contrátil do $\text{CaCl}_2$ (0.3 – 30 mM) em anéis de artéria mesentérica com endotélio intacto ou removido.....	<b>100</b>
<b>FIGURA 14.</b> Efeito da adição concomitante do DL( $\pm$ )- propranolol (100 $\mu\text{M}$ ) e nifedipina (1 $\mu\text{M}$ ) na resposta contrátil do $\text{CaCl}_2$ (0.3 – 30 mM) em anéis de aorta e de artéria mesentérica com endotélio removido.....	<b>101</b>
<b>FIGURA 15.</b> Pressão arterial e frequência cardíaca de animais Controles ou submetidos ao tratamento crônico com L-NAME (20 mg/rato/dia) e/ou propranolol.....	<b>103</b>
<b>FIGURA 16.</b> Relaxamentos induzidos pela acetilcolina em aorta de ratos Controles ou submetidos ao tratamento crônico com L-NAME e/ou propranolol.....	<b>104</b>
<b>FIGURA 17.</b> Relaxamento induzido pela acetilcolina em artéria mesentérica de animais tratados cronicamente com L-NAME e/ou propranolol em tecidos pré-contraídos com fenilefrina ou com KCl 80 mM.....	<b>106</b>

**FIGURA 18.** Curvas concentração-efeito ao gliceriltrinitrato (GTN) em anéis de aorta e de artéria mesentérica de ratos Controles ou submetidos ao tratamento crônico com L-NAME e/ou propranolol.....**108**

**FIGURA 19.** Efeito do tratamento crônico de 4 semanas com L-NAME, L-NAME + propranolol e propranolol, na contração evocada pelo CaCl<sub>2</sub> (1 – 10 mM) em anéis de aorta e anéis de artéria mesentérica de ratos. Os animais controles estão representados pelas barras pretas.....**110**

**FIGURA 20.** Concentração plasmática de nitrito/nitrato (NO<sub>x</sub>) e atividade plasmática da superóxido dismutase (SOD) em animais Controles (CTL) ou tratados com L-NAME (LN), propranolol (PROP) e L-NAME + propranolol (LN+P).....**112**

---

---

*RESUMO*

---

---

## RESUMO

Os antagonistas de adrenoceptores  $\beta$  são usados com sucesso no tratamento de desordens cardiovasculares, mas os mecanismos de ação destas drogas não são ainda claros. Os objetivos deste trabalho foram: 1) Avaliar os efeitos relaxantes diretos dos  $\beta$ -bloqueadores atenolol, metoprolol e propranolol em anéis de aorta e de artéria mesentérica de ratos; 2) Avaliar a influência do tratamento com propranolol *in vivo* sobre a reatividade de anéis de aorta e de artéria mesentérica de ratos tornados hipertensos pelo bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico. Foram utilizados ratos Wistar machos (200-250 g) procedentes do CEMIB-UNICAMP. Os animais foram anestesiados com halotano, após o qual a aorta e a artéria mesentérica foram removidas. Anéis de aorta e de artéria mesentérica foram montados em banho para órgãos isolados contendo solução de Krebs (37°C, 95 % O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>). Os anéis foram ligados a transdutores isométricos, os quais, por sua vez, estavam conectados a um sistema Powerlab<sup>®</sup> de aquisição de dados. Para atingir o primeiro objetivo, curvas concentração-efeito aos  $\beta$ -bloqueadores foram construídas em anéis pré-contraídos com fenilefrina, com endotélio íntegro ou removido, na ausência ou na presença de L-NAME, ODQ ou indometacina (inibidores da sintase do óxido nítrico, da guanilil ciclase solúvel e da ciclooxigenase, respectivamente). O DL( $\pm$ )-propranolol promoveu relaxamento dependente da concentração nos anéis de aorta e de artéria mesentérica, ao passo que o metoprolol e o atenolol causaram discreto ou nenhum relaxamento. Os isômeros S- e R- do propranolol relaxaram ambas as preparações, na mesma magnitude que a mistura racêmica. Estes relaxamentos foram reduzidos após a remoção do endotélio ou adição de L-NAME ou ODQ, mas não foi afetado pela indometacina. Em anéis de aorta e de artéria mesentérica com endotélio íntegro, a incubação com propranolol aumentou os níveis teciduais de GMPc (mas não AMPc). A adição de CaCl<sub>2</sub> (1-10 mM) em meio desprovido de cálcio resultou em contração dependente da concentração nos anéis de aorta e de artéria mesentérica. Estas contrações foram significativamente reduzidas na presença do propranolol, e abolidas na presença concomitante de propranolol e nifedipina. Para atingir o segundo objetivo deste estudo, os ratos foram submetidos a tratamento por 4 semanas com L-NAME e/ou propranolol, após o qual a aorta e a artéria mesentérica foram isoladas. Curvas concentração-efeito à acetilcolina, gliceriltrinitrato e ao cloreto de cálcio foram construídas. O tratamento

crônico com o L-NAME aumentou a pressão arterial dos animais, sendo este aumento prevenido nos ratos co-tratados com propranolol. O relaxamento induzido pela acetilcolina foi praticamente abolido na aorta e na artéria mesentérica dos animais tratados com L-NAME. No entanto, somente na artéria mesentérica, o propranolol foi capaz de reverter (parcialmente) o relaxamento induzido pela acetilcolina. Esta reversão não foi observada em artéria mesentérica pré-contraída com KCl (80 mM). Na artéria mesentérica (mas não na aorta), o relaxamento induzido pelo gliceriltrinitrato foi potencializado em todos os tratamentos. A contração induzida pelo  $\text{CaCl}_2$  foi maior nos vasos dos animais tratados com L-NAME, sendo este aumento prevenido nos animais co-tratados com propranolol. Os níveis plasmáticos de nitrito/nitrato e a atividade plasmática da SOD aumentaram no grupo L-NAME, e o co-tratamento com propranolol preveniu este aumento. Em conclusão, nossos resultados mostraram que o propranolol age no músculo liso vascular, promovendo relaxamento através de mecanismo parcialmente dependente do endotélio, aumentando os níveis de GMPc, e através do bloqueio do influxo de cálcio. Na hipertensão arterial induzida pelo L-NAME, o propranolol preservou a função endotelial, associado à liberação de EDHF e/ou prostaciclina. Os efeitos relaxantes do propranolol podem estar contribuindo para os efeitos antihipertensivos deste composto, melhorando a reatividade vascular, principalmente da artéria mesentérica.

---

---

*ABSTRACT*

---

---

## ABSTRACT

$\beta$ -adrenoceptor antagonists are largely and successfully prescribed to patients with arterial hypertension and other cardiovascular diseases, but the exact mechanisms of their long-term antihypertensive effects are not completely understood. The aim of this work was: 1) To evaluate the relaxing effects of the  $\beta$ -blockers atenolol, metoprolol and propranolol in the rat aortic and mesenteric artery ring; 2) To evaluate the influence of the propranolol, administered chronically, in the aorta and mesenteric arteries reactivity in hypertensive rats induced by chronic blockade of nitric oxide synthase. Male Wistar rats (200-250g) were anaesthetized with halothane and sacrificed. The aortae and the mesenteric artery were excised, cut in rings and mounted in a 10-ml organ bath containing Krebs solution (37°C, 95 % O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>). Each ring was connected to an isometric transducer which was connected to a data acquisition system Powerlab<sup>®</sup>. In order to investigate the first aim, concentration-response curves were obtained in aortic or mesenteric rings with intact or denuded endothelium, in the absence or in the presence of L-NAME, ODQ or indomethacin (nitric oxide synthase, guanylyl cyclase and cyclooxygenase inhibitors, respectively). DL(±)-propranolol relaxed, in a concentration-dependent manner, the aortic and the mesenteric rings, while metoprolol and atenolol caused a slight or none relaxation. The S- and R- propranolol isomers relax both preparation, with the same magnitude of racemic mixture. These relaxing effects were reduced after endothelium denudation or in the presence of L-NAME or ODQ, but they were not affected by indomethacin. In intact-endothelium aortic and mesenteric rings, after incubation with propranolol it was seen an increase in the tecidual cGMP (but not cAMP) levels. Addition of the CaCl<sub>2</sub> (1-10 mM) in a Ca<sup>2+</sup>-free medium induced a concentration-dependent contractions of aortic and mesenteric rings. These contractions were significantly reduced in the presence of propranolol and abolished when nifedipine was added concomitantly to propranolol. In order to investigate the second aim of this work, rats were chronically treated with L-NAME and/or propranolol, during 4 weeks, and then, the aortae and the mesenteric artery were isolated. Concentration-response curves for acetylcholine, glyceriltrinitrate and CaCl<sub>2</sub> were obtained. Chronic administration of L-NAME increased the mean arterial pressure and this increase was prevented in rats co-treated with propranolol. Relaxing responses to acetylcholine was

abolished in the aortic and mesenteric rings from L-NAME treated rats. However, in the mesenteric arteries, propranolol was able to restore (partially) the relaxing response for acetylcholine. This restoration was not seen when tissues were precontracted with KCl (80 mM). In the mesenteric artery (but not in the aorta), the potency of glyceriltrinitrate-induced relaxation was higher in all treated groups. The contractions induced by CaCl<sub>2</sub> were higher in vessels from L-NAME-treated rats and this increase was prevented in vessels from animals co-treated with propranolol. Plasma levels of nitrite/nitrate and SOD activity were reduced L-NAME group, and the co-treatment with propranolol prevented this decrease. In conclusion, our results showed that propranolol acts through the vascular smooth muscle, inducing relaxation by a mechanism which involves the endothelium integrity and increasing cGMP levels and blocking the calcium influx. In the arterial hypertension induced by L-NAME, propranolol improves the endothelial function associated to EDHF or prostacyclin release. The antioxidant or the relaxing effects of the propranolol could be contributing to its antihypertensive effects, improving the vascular reactivity, mainly in the mesenteric artery.

## LISTA DE DROGAS

<b>DROGAS</b>	<b>PROCEDÊNCIA</b>
ACETILCOLINA	SIGMA (St. Louis, EUA)
ATENOLOL	SIGMA (St. Louis, EUA)
CaCl <sub>2</sub>	MERCK (Darmstadt, Alemanha)
CPA	SIGMA (St. Louis, EUA)
DL(±)-PROPRANOLOL	LAB. CRISTÁLIA (Itapira, Brasil)
EGTA	SIGMA (St. Louis, EUA)
ENDOTELINA-1	SIGMA (St. Louis, EUA)
GLICERILTRINITRATO	SIGMA (St. Louis, EUA)
HALOTANO	LAB. CRISTÁLIA (Itapira, Brasil)
INDOMETACINA	SIGMA (St. Louis, EUA)
L-NAME	SIGMA (St. Louis, EUA)
METOPROLOL	SIGMA (St. Louis, EUA)
NIFEDIPINA	SIGMA (St. Louis, EUA)
ODQ	SIGMA (St. Louis, EUA)
PENTOBARBITAL SÓDICO	LAB. CRISTÁLIA (Itapira, Brasil)
R(+)-PROPRANOLOL	SIGMA (St. Louis, EUA)
S(-)-PROPRANOLOL	SIGMA (St. Louis, EUA)
U-46619	SIGMA (St. Louis, EUA)

---

---

## *INTRODUÇÃO*

## 1. INTRODUÇÃO

Os antagonistas de adrenoceptores  $\beta$  são amplamente prescritos a pacientes com hipertensão arterial e outras doenças cardiovasculares, mas os mecanismos de ação destes fármacos são pouco compreendidos. Diversos estudos mostram que a redução da pressão arterial em resposta aos  $\beta$ -bloqueadores é associada à liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio, particularmente de óxido nítrico (NO), mas redução na produção de ânion superóxido e efeitos antioxidantes têm sido também apontados para se explicar os efeitos anti-hipertensivos dos  $\beta$ -bloqueadores (Mostaghim *et al.*, 1986; Gao *et al.*, 1991; Broeders *et al.*, 2000; Kurosaki *et al.*, 2000; Arumanayagam *et al.*, 2001). Outros mecanismos como aumento da produção de prostaglandina vasodilatadora pelo rim e vasos, redução da liberação de fatores contráteis pelo endotélio, aumento da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase vascular e aumento da habilidade do músculo liso vascular em sequestrar cálcio para os estoques intracelulares parecem também contribuir para os efeitos terapêuticos dos  $\beta$ -bloqueadores (Hirawa *et al.*, 1991; Kahonen *et al.*, 1994; Pacca *et al.*, 2002). Embora a terceira geração de  $\beta$ -bloqueadores (nebivolol e carvedilol) tenha sido introduzida, com sucesso, na clínica, para o tratamento da hipertensão arterial, doenças cardíacas isquêmicas e arritmias cardíacas (Abraham & Iyengar, 2004; Greenberg, 2004; Puddu *et al.*, 2004), a terapia convencional com o propranolol ( $\beta$ -bloqueador não seletivo), é ainda largamente utilizada devido ao baixo-custo e alta eficácia (Rokutanda *et al.*, 1983). Entretanto, os mecanismos envolvidos no efeito anti-hipertensivo do propranolol ainda não foram esclarecidos. Além de bloquear os adrenoceptores  $\beta$  em diversos órgãos-alvo, sabe-se que o propranolol atua por mecanismos independentes de receptor, chamados de “atividade estabilizadora de membrana”, os quais também

parecem contribuir para os seus efeitos terapêuticos (Daugherty *et al.*, 1986; Doggrel, 1999; Marano *et al.*, 2002). Estudos experimentais recentes demonstraram que o propranolol é capaz de prevenir a hipertrofia ventricular esquerda induzida por bandagem da aorta em ratos, por um mecanismo independente do bloqueio do adrenoceptor  $\beta$  (Marano *et al.*, 2002). Em modelo experimental de hipertensão arterial induzida pela inibição crônica de NO em ratos, demonstrou-se também que o propranolol é capaz de prevenir a hipertensão arterial e de atenuar a hipertrofia ventricular esquerda e a fibrose miocárdica (Pacca *et al.*, 2002). No presente estudo, procuramos aprofundar o entendimento do mecanismo de ação do propranolol na redução da resistência vascular em ratos. Para tanto, investigamos os efeitos diretos do propranolol na musculatura lisa vascular de ratos, bem como a influência do propranolol sobre as alterações de reatividade vascular em ratos submetidos à inibição crônica da síntese de NO.

## 1.1 REGULAÇÃO DO TÔNUS DA MUSCULATURA LISA VASCULAR

A contração e o relaxamento do músculo liso vascular são controlados pela concentração citoplasmática de cálcio ( $[Ca^{2+}]_c$ ) que, em condições basais, é de aproximadamente 100 nM, enquanto que no meio extracelular é de 1 a 3 mM. É este gradiente químico de cerca de 10.000 vezes entre o meio intracelular e extracelular que favorece o influxo de  $Ca^{2+}$ . Além disso, o meio intracelular é mais eletronegativo que o meio extracelular, favorecendo o influxo de  $Ca^{2+}$  (Missiaen *et al*, 1991). Para manter essa concentração de  $Ca^{2+}$  em níveis basais, a célula possui mecanismos de controle, como a troca de  $Na^+-Ca^{2+}$  e a  $Ca^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática e do retículo sarcoplasmático.

O principal determinante do tônus vascular é o nível de fosforilação da cadeia leve da miosina, que é controlado pela quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), dependente de  $Ca^{2+}$ -calmodulina, e pela fosfatase da cadeia leve da miosina (Hartshorne, 1987). A contração das células do músculo liso vascular inicia com o aumento da  $[Ca^{2+}]_c$ , que pode ocorrer por aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  do espaço extracelular através dos canais para  $Ca^{2+}$  operados por receptores ou da liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques do retículo sarcoplasmático. Subsequentemente, ocorre a ligação do  $Ca^{2+}$  à calmodulina, formando o complexo  $Ca^{2+}$ -calmodulina, que leva à ativação da MLCK, a enzima responsável pela fosforilação da cadeia leve da miosina. A fosforilação da cadeia leve da miosina permite que a miosina interaja com a actina e o trifosfato de adenosina (ATP), resultando na ligação da ponte cruzada da miosina com a actina. Isto gera um estado de ligação forte entre essas duas proteínas, produzindo a contração vascular. A redução da  $[Ca^{2+}]_c$  desfaz o complexo  $Ca^{2+}$ -calmodulina, que inativa a MLCK, e ativa a fosfatase da miosina, que é

a enzima que desfosforila a cadeia leve da miosina, removendo os fosfatos de alta energia, promovendo assim o relaxamento muscular (Webb, 2003).

O aumento da fosforilação da cadeia leve da miosina e a capacidade da célula em produzir tensão em níveis sub-ótimos de  $\text{Ca}^{2+}$  é um mecanismo conhecido como sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo a inibição da fosfatase da miosina o principal fator que contribui para este fenômeno (Kubota *et al.*, 1992; Somlyo & Somlyo, 1994; 2000).

Acredita-se que a ativação da fosfatase da miosina ocorra pela via do NO/GMPc, reduzindo a fosforilação da cadeia leve da miosina, levando à dessensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Wu *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997). Entretanto, a base molecular para a ativação da fosfatase da miosina não é completamente entendida.

### ***Óxido Nítrico (NO)***

O NO está envolvido em uma série de funções fisiológicas, incluindo relaxamento de músculo liso e neurotransmissão no sistema nervoso central e autônomo (Moncada *et al.*, 1991; Garthwaite, 1995), sendo a maior parte de seus efeitos mediada pela estimulação direta da guanilil ciclase solúvel (Lucas *et al.*, 2000).

As enzimas responsáveis pela geração de NO são conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS) e catalizam a oxidação do nitrogênio do grupamento guanidino da L-Arginina (L-Arg), formando NO e L-citrulina em duas etapas, com a formação do intermediário  $\text{N}^0$ -hidroxi-L-arginina (Marletta, 1988, 1993; Marletta *et al.*, 1988; Feldman *et al.*, 1993; Fukuto & Chaudhuri, 1995; Ignarro & Murad, 1995; Kerwin *et al.*, 1995).

Três isoformas de NOS (NOS I, II e III) são codificadas por três genes diferentes e podem ser classificadas em duas famílias: NOS constitutiva (NOS I e NOS III) e NOS induzível (NOS II). As NOS constitutivas foram primeiramente caracterizadas em neurônios (NOS I ou nNOS) e em células endoteliais (NOS III ou eNOS), respectivamente, sendo reguladas pelo complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaM). Estas isoformas produzem pequenas quantidades de NO por curtos períodos de tempo (segundos a minutos), e, neste caso, o NO parece desempenhar funções regulatórias na neurotransmissão e no sistema cardiovascular. A NOS II (iNOS) foi primeiramente isolada de macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo e interferon- $\gamma$ . Esta enzima é essencialmente  $\text{Ca}^{2+}$ -independente e pode produzir NO por longos períodos (horas a dias) após sua expressão (Knowles & Moncada, 1994; Förstermann *et al.*, 1994; 1998; Förstermann & Kleinert, 1995; Ignarro & Murad, 1995).

As NOS são ativas na forma de homodímeros de pesos moleculares entre 250-300 kDa. A ligação da CaM reforça a transferência de elétrons no domínio redutase e permite a redução do grupamento heme com conseqüente ativação da NOS (Matsuoka *et al.*, 1994; Abu-Soud *et al.*, 1994).

O L-NAME, um análogo da L-Arg substituído no grupamento guanidino ( $\text{N}^{\ominus}$ ), inibe todas as isoformas da NOS. Outros análogos da L-Arg substituídos no mesmo grupamento também são capazes de inibir a atividade da NOS. Neste caso, a inibição ocorre em graus variáveis e mecanismos distintos, porém todos envolvem a ocupação do sítio ligante para o substrato (Mayer & Andrew, 1998; Boucher *et al.*, 1999).

A guanilil ciclase solúvel é expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos e medeia várias funções, como inibição da agregação plaquetária, relaxamento

do músculo liso, vasodilatação, transdução de sinais em neurônios e imunomodulação (Collier & Vallance, 1989). A guanilil ciclase solúvel é um heterodímero composto de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , com massas moleculares de 77 e 70 kDa, respectivamente (Koesling *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 1991; Hobbs, 1997). Cada subunidade contém um domínio regulatório N-terminal (grupo prostético heme e região de dimerização) e um domínio catalítico C-terminal. A expressão das duas subunidades é necessária para atividade catalítica (Harteneck *et al.*, 1990; Buechler *et al.*, 1991).

A presença do grupo prostético heme é necessária para ativação da guanilil ciclase solúvel pelo NO (Gerzer *et al.*, 1982; Ignarro *et al.*, 1982; Ohlstein *et al.*, 1982). O grupo heme corresponde a um anel de cinco membros, contendo quatro átomos de nitrogênio que circundam um átomo de ferro na posição central, o qual pode encontrar-se como  $\text{Fe}^{2+}$  (forma reduzida) ou  $\text{Fe}^{3+}$  (forma oxidada). O quinto membro do anel na guanilil ciclase solúvel é um ligante axial imidazólico na posição His105 (Stone & Marletta, 1994). A mutação deste aminoácido, localizado próximo ao N-terminal da subunidade  $\beta_1$ , determina a incapacidade da guanilil ciclase solúvel de se ligar ao grupo heme, resultando em uma enzima insensível ao NO (Wedel *et al.*, 1994).

O NO ativa a guanilil ciclase solúvel por ligar-se diretamente ao grupo heme formando um complexo heme-ferrosnitrosil. A ligação do NO promove a quebra da ligação entre a His105 axial e o ferro, resultando em um anel onde o NO está presente na quinta posição, criando assim uma mudança conformacional capaz de ativar a guanilil ciclase solúvel (Traylor & Sharma, 1992; Stone *et al.*, 1995; Lucas *et al.*, 2000). Esta ativação causa elevação nos níveis de GMPc, o qual é clivado a partir do GTP pela guanilil ciclase solúvel (Rapoport & Murad, 1983; Lucas *et al.*, 2000). São propostos

vários mecanismos para explicar a atividade relaxante resultante de um aumento nos níveis de GMPc induzido pelo NO (Waldman & Murad, 1987; Lucas *et al.*, 2000). Estes incluem: (1) inibição da geração de IP<sub>3</sub>; (2) aumento do seqüestro de Ca<sup>2+</sup> citossólico; (3) desfosforilação da cadeia leve da miosina; (4) inibição do influxo de Ca<sup>2+</sup>; (5) ativação de proteínas quinases; (6) estimulação da Ca<sup>2+</sup>-ATPase de membrana e (7) abertura de canais para K<sup>+</sup>.

### ***Fator de Hiperpolarização Derivado do Endotélio (EDHF)***

As células endoteliais liberam diferentes substâncias que regulam o tônus das células do músculo liso vascular. Dependendo do leito vascular, o NO, a prostaciclina, os ácidos epoxieicosatrienóico e o EDHF podem agir como mediadores da hiperpolarização dependente do endotélio.

Em 1984, foi demonstrado, em artéria mesentérica de cobaia, que o agonista muscarínico carbacol causa hiperpolarização dependente do endotélio (Bolton *et al.*, 1984). Este fenômeno foi confirmado em outros leitos vasculares de diferentes espécies animais. Logo surgiram estudos demonstrando que o efeito hipor polarizante podia ser parcial ou totalmente resistente aos inibidores da ciclooxigenase (COX) e da NOS, e que estas respostas não eram acompanhadas por aumento dos níveis de AMPc ou GMPc nas células do músculo liso vascular (Bény & Brunet, 1988; Taylor *et al.*, 1988a; Richard *et al.*, 1990; Cowan & Cohen, 1991; Mügge *et al.*, 1991; Illiano *et al.*, 1992; Nagao *et al.*, 1992; Nagao & Vanhoutte, 1992a,b; Zygmunt *et al.*, 1994; Garcia-Pascual *et al.*, 1995). Surgiu, assim, o conceito da existência de um *Fator Hiperpolarizante Derivado do*

*Endotélio*, denominado EDHF, diferente do NO e da prostaciclina, capaz de promover hiperpolarização do músculo liso e relaxamento vascular.

A hiperpolarização envolve o aumento da condutância ao potássio, sendo o grau de hiperpolarização inversamente proporcional à concentração extracelular dos íons potássio (Nagao & Vanhoutte, 1992a,b; Van de Voorde *et al.*, 1992). Além disso, postula-se que o EDHF seja importante no início do relaxamento do músculo liso por reduzir indiretamente o movimento do cálcio através dos canais para cálcio dependentes de voltagem. Desta forma, sugere-se que o EDHF tem um papel predominante nas artérias de pequeno calibre onde, comparados às artérias de maior calibre, as células do músculo liso são mais dependentes do influxo do cálcio extracelular durante a contração (Nilsson *et al.*, 1994).

Sabe-se que o EDHF é de grande importância no controle do tônus vascular, uma vez que pequenas mudanças (poucos mV) no potencial de membrana podem resultar numa alteração substancial do diâmetro do vaso (Nelson & Quayle, 1995; Brayden & Nelson, 1992). Entretanto, os tipos de canais para potássio envolvidos na resposta mediada pelo EDHF ainda não foram bem caracterizados. Em leito mesentérico de rato (Adeagbo & Triggle, 1993), artéria coronária bovina e de porco (Hecker *et al.*, 1994), artéria oviductal bovina (Garcia-Pascual *et al.*, 1995) e em artéria mesentérica de coelho (Murphy & Brayden, 1995), o efeito do EDHF é bloqueado pela apamina, sugerindo o envolvimento dos canais para potássio dependentes de cálcio. Por outro lado, em artéria carótida de cobaia, mesentérica de rato e coronária de porco, a combinação da apamina com a caribdotoxina (inibidores dos canais para potássio dependentes de cálcio de baixa e de alta condutância, respectivamente) foi necessária para abolir a hiperpolarização

resistente aos inibidores da NOS e da COX (Corriu *et al.*, 1996; Chataigneau *et al.*, 1998 a, b).

### ***Canais para cálcio no controle do tonus muscular***

A disfunção endotelial leva à redução da biodisponibilidade do NO que resulta em aumento na ativação dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  nas células do músculo liso vascular. Níveis elevados de GMPc promovem um relaxamento que, em parte, é devido à redução do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependente do tipo L. O NO inibe estes canais para uma maneira indireta e direta. A primeira se dá pela ativação da proteína quinase G, que causa a abertura dos canais para  $\text{K}^+$  e polariza a célula, resultando em desativação dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependente. A maneira direta ocorre através da fosforilação da PKG ou das fosfoproteínas regulatórias, no próprio canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , diminuindo a abertura destes canais, independentemente de voltagem (Blatter & Wier, 1994; Clapp & Gurney, 1991; Tewari & Simard, 1997).

Diversos estudos têm associado a hipertensão arterial e a disfunção do endotélio com alterações no aparato contrátil e na sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Em 1998, Simard *et al.* demonstraram que as correntes geradas pela abertura dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  estão aumentadas em células de músculo liso cerebral de ratos hipertensos, e atribuíram este efeito à diminuição da biodisponibilidade do NO, diminuindo o antagonismo fisiológico entre NO e os canais para  $\text{Ca}^{2+}$ . No entanto, o mesmo grupo demonstrou que, na vigência de dano endotelial, além de aumento das correntes de  $\text{Ca}^{2+}$ , há um aumento na densidade dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$ , indicando que a integridade do endotélio é fundamental na regulação da disponibilidade destes canais em células de músculo liso (Simard & Li,

2000). Similarmente, Xiao & MacArdle (1994) demonstraram um aumento da densidade e alteração das propriedades farmacológicas das correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L em cardiomiócitos ventriculares de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) durante o desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda.

Em modelo experimental, a bandagem da aorta leva à hipertrofia ventricular esquerda, a qual é atenuada pelo tratamento crônico com propranolol. Neste modelo, a bandagem da aorta leva a alterações hemodinâmicas e diminui a atividade da ATPase de  $\text{Ca}^{2+}$  da miosina, além de reduzir tanto a liberação como a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático. Estes efeitos estão relacionados com aumento do RNAm da cadeia pesada da miosina e diminuição da SERCA2, a proteína responsável pela captação do cálcio do meio intracelular para o retículo sarcoplasmático (Takeo *et al.*, 2000). Neste estudo, o tratamento crônico com o propranolol e verapamil promove uma “melhora” da função cardíaca e normaliza a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da miosina e a expressão do RNAm da cadeia pesada da miosina e da SERCA2. Isto sugere que, além do  $\beta$ -adrenoceptor, os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L desempenham um papel importante na modulação da transição do  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático e distribuição da miosina através da regulação da expressão do gene no coração. Além disso, Marano *et al.* (2002) demonstraram que o mecanismo pelo qual o propranolol previne a hipertrofia é independente do bloqueio do adrenoceptor  $\beta$ , uma vez que os enantiômeros D e L do propranolol, isômeros inativo e ativo do propranolol, respectivamente, também são capazes de prevenir a hipertrofia ventricular esquerda. Os efeitos do tratamento com os enantiômeros do propranolol foram similares aos efeitos do tratamento com a disopiramida, uma droga anti-arrítmica com propriedade estabilizadora de membrana.

## 1.2 ADRENOCEPTORES

Os adrenoceptores são receptores de membrana ativados pelas catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), liberadas dos terminais nervosos pós-ganglionares e da medula adrenal, sendo considerados mediadores endógenos do sistema nervoso simpático (Ahlquist, 1948). A ocupação dos adrenoceptores pelas catecolaminas é rápida, reversível, saturável, estereoseletiva e leva à formação de segundos-mensageiros intracelulares que desencadeiam a resposta fisiológica.

Inicialmente, os adrenoceptores foram divididos em duas grandes categorias,  $\alpha$  e  $\beta$ , e posteriormente subdivididos em  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ . Atualmente, postula-se também a existência de receptores do subtipo  $\beta_4$  ou receptores  $\beta$ -atípicos (Lands *et al.*, 1967; Langer, 1974; Berthelson & Pettinger, 1977; Starke, 1981; Han *et al.*, 1987; MacGrath & Wilson, 1988; Regan *et al.*, 1988; Han *et al.*, 1990; Ford *et al.*, 1994; Kaumann *et al.*, 1998; Guimarães & Moura, 2001).

Os adrenoceptores pertencem à família de receptores de membrana acoplados às proteínas G, as quais compartilham uma estrutura peptídica comum na qual a porção amino terminal na face extracelular da membrana é ligada a uma cadeia carboxílica terminal na face intracelular da membrana, por sete domínios transmembrânicos. O tamanho relativo dos grupamentos N e C-terminais, bem como da terceira alça intracelular, varia consideravelmente de receptor para receptor. A terceira alça intracelular dos adrenoceptores  $\beta$  é o sítio de acoplamento desses receptores à proteína G (Raymond *et al.*, 1990; Birnbaumer, 1992). As proteínas G são heterotrímeros que consistem de uma subunidade hidrofílica  $\alpha$  e duas subunidades hidrofóbicas  $\beta$  e  $\gamma$  (Robison *et al.*, 1967). Baseadas na presença de isoformas da subunidade  $\alpha$ , foram

identificadas 25 proteínas G distintas, sendo 4 isoformas de Gs, 3 de Gi, 2 de Go, 1 de Gz, 5 de Gq e 2 transducinas. Na ausência de agonista, quando a proteína G está inativa, uma molécula de guanosina difosfato (GDP) encontra-se ligada à subunidade  $\alpha$ , formando um complexo associado às subunidades  $\beta$  e  $\gamma$ . Na presença do agonista, o receptor ativado interage com a proteína G e induz a troca de GDP por guanosina trifosfato (GTP) na subunidade  $\alpha$ . Após ligar-se ao GTP, a subunidade  $\alpha$  dissocia-se das subunidades  $\beta\gamma$ , tornando-se ativada. A subunidade  $\alpha$  permanece livre até que ocorra a hidrólise de GTP e, novamente, a formação de GDP, levando à sua reassociação com as subunidades  $\beta\gamma$  (Birnbaumer, 1992).

#### ***Adrenoceptores $\alpha_1$ e $\alpha_2$***

A existência de subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos foi sugerida, inicialmente, em ensaios funcionais *in vitro* onde se mostrou diferenças de potência para os antagonistas prazosin e fenoxibenzamina (Coates *et al.*, 1982; Medgett & Langer, 1984; Flavahan & Vanhoutte, 1986). Estudos moleculares e de *binding* levaram à identificação de vários subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$ , todos exibindo alta afinidade pelo prazosin. A subdivisão inicial dos receptores  $\alpha_1$  em  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1B}$  foi baseada na afinidade diferencial do antagonista competitivo, WB 4101, e do agente alquilante, cloroetilclonidina (Johnson & Minneman, 1987). Todos os subtipos de  $\alpha_1$ -adrenoceptores são ativados pela adrenalina e noradrenalina e as respostas mediadas por estes adrenoceptores são reduzidas pelo prazosin. Os adrenoceptores  $\alpha_1$  apresentam baixa afinidade para antagonistas adrenérgicos seletivos  $\alpha_2$  (como a ioimbina e a rauwolscina), e quando acoplados à proteína Gq, ativam a fosfolipase C levando à formação dos segundos-mensageiros

inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG), que resulta no aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular e na ativação da proteína quinase C (Exton, 1985).

A subclassificação dos receptores  $\alpha_2$  foi baseada, inicialmente, na capacidade do prazosin de inibir a ligação da [<sup>3</sup>H]-ioimibina ou [<sup>3</sup>H]-rauwolscina em tecidos isolados (Bylund, 1985; Nahorski *et al.*, 1985; Petrash & Bylund, 1986). Os antagonistas  $\alpha_1$ , prazosin e ARC 239, apresentam alta afinidade por adrenoceptores  $\alpha_{2B}$ , e baixa afinidade por adrenoceptores  $\alpha_{2A}$ . Embora alguns estudos funcionais dêem suporte a esta subdivisão (Bylund & Ray-Prenger, 1989), ainda é difícil demonstrar um perfil farmacológico para receptores  $\alpha_{2B}$ . Tanto a noradrenalina quanto a adrenalina ativam os subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , cujo principal mecanismo de ação está ligado à inibição da adenilil ciclase.

### ***Adrenoceptores $\beta$***

Os adrenoceptores  $\beta$  foram inicialmente divididos em dois subtipos,  $\beta_1$  e  $\beta_2$ . Esta divisão tornou-se possível graças ao desenvolvimento de agonistas e antagonistas seletivos para cada subtipo de receptor  $\beta$  e à aplicação terapêutica de vários destes agentes (antagonistas seletivos  $\beta_1$  e agonistas seletivos  $\beta_2$ ). Uma terceira classe de receptores foi descrita e classificada como  $\beta_3$  após a identificação de agonistas e antagonistas seletivos. Existem também evidências da existência de  $\beta$ -adrenoceptores atípicos, cujos receptores são insensíveis aos antagonistas clássicos (Bylund *et al.*, 1994; Tamaoki *et al.*, 1998; Shafiei & Mahmoudian, 1999).

O gene que codifica os receptores  $\beta$  adrenérgicos humanos está situado no braço longo do cromossomo 5 (Kobilka *et al.*, 1987). A partir da clonagem do cDNA do

receptor  $\beta_2$  presente em pulmão de hamster, determinou-se a estrutura completa deste receptor. Sabe-se que o mesmo é composto de 413 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 46 kDa. Os receptores  $\beta$  adrenérgicos são membros da família de receptores de sete domínios transmembrânicos. O estudo das estruturas dos receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  humanos revelaram que são compostos por 477, 413 e 446 resíduos de aminoácidos, respectivamente (Kobilka *et al.*, 1987; Frielle *et al.*, 1987). Além disso, foi descrita a existência do receptor  $\beta_4$  no coração (Kaumann & Molenaar, 1997; Molenaar *et al.*, 1998; Kaumann *et al.*, 1998).

Os receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  podem ser ativados pela noradrenalina e pela adrenalina. Existe equipotência entre ambas catecolaminas para os receptores  $\beta_1$ , mas para o  $\beta_2$ , a adrenalina é cerca de 100 vezes mais potente do que a noradrenalina. Por outro lado, em receptores  $\beta_3$ , a noradrenalina é mais potente do que a adrenalina. O propranolol (e seus vários análogos) são potentes antagonistas de receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$ ; entretanto, as respostas mediadas por receptores  $\beta_3$  são resistentes a este antagonista.

### ***Vias de sinalização***

As respostas dos adrenoceptores  $\beta$  são mediadas através da ativação da adenilil ciclase, a qual é acoplada ao  $\beta$ -adrenoceptor através de uma proteína  $G_s$  (Emorine *et al.*, 1989, 1994). Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos existem em duas formas, ativa e inativa, e, na ausência de estimulação, estas duas formas estão em equilíbrio, com certa predominância do estado inativo (Onaran *et al.*, 1993). O adrenoceptor  $\beta$  está em seu estado ativo quando associado à subunidade  $\alpha$  da proteína G, em conjunto com uma molécula de GTP, sendo através desta subunidade que o receptor se acopla à adenilil ciclase. A

substituição do GTP pelo GDP catalisa a conversão de ATP em AMPc pela adenilil ciclase, reduzindo a afinidade da subunidade  $\alpha$  pelo receptor, causando assim a dissociação e o retorno do receptor à sua forma inativa. Os antagonistas de adrenoceptores  $\beta$  se ligam com alta afinidade ao estado inativo do receptor, pois a adição de GDP inibe a capacidade dos agonistas  $\beta$  de se ligar ao receptor, reforçando a ligação dos antagonistas (Costa *et al.*, 1992).

O AMPc formado após ativação da adenilil ciclase se liga à subunidade regulatória da proteína quinase A (Brodde, 1993), induzindo mudanças conformacionais que liberam a subunidade catalítica ativa da enzima. A subunidade catalítica passa a desencadear as respostas funcionais após fosforilar proteínas regulatórias como as fosfolambam da membrana do retículo sarcoplasmático, proteínas dos miofilamentos e a quinase da glicogênio fosforilase, mudando assim a sua atividade. Na remoção do agonista, a via é inativada por ações coordenadas de dois grupos de enzimas: as fosfodiesterases (PDEs), que inativam o AMPc, e as fosfatases, que desfosforilam fosfoproteínas. Em determinadas condições, o adrenoceptor  $\beta_2$  pode também se acoplar à proteína Gi, que inibe a adenilil ciclase (Daaka *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1999).

### ***$\beta$ -adrenoceptores e a musculatura lisa vascular***

Entre os adrenoceptores  $\beta$ , o subtipo  $\beta_2$  é o predominante na maioria dos leitos vasculares. O subtipo  $\beta_1$  predomina em certos leitos como artérias coronárias (O'Donnel & Wanstall, 1985; Begonha *et al.*, 1995) e cerebrais (Edvinsson & Owman, 1974). A partir de estudos *in vitro* realizados em artéria mesentérica de cães e aorta de ratos (Clark & Bertholet, 1983; Doggrell, 1990), postulou-se ainda a existência de um terceiro subtipo

de receptores  $\beta$ -adrenérgicos,  $\beta_3$ , cuja ativação resulta em relaxamento resistente ao propranolol (Oriowo, 1994, 1995; MacDonald *et al.*, 1999; Souch & Marshall, 1995, 1996, 1997; Gray & Marshall, 1992; Dumas *et al.*, 1998; Tamaoki *et al.*, 1998; Tagaya *et al.*, 1999). A presença dos adrenoceptores  $\beta_3$  na musculatura lisa vascular foi posteriormente confirmada pela utilização de agonistas e antagonistas seletivos (MacDonald *et al.*, 1999; Tagaya *et al.*, 1999).

Estudos *in vivo* mostram que os  $\beta$ -adrenoceptores têm grande importância para a regulação fisiológica do tônus vascular. Ou seja, a estimulação dos  $\beta$ -adrenoceptores periféricos leva a relaxamento do músculo liso vascular, controlando assim a resistência vascular periférica e conseqüentemente a distribuição do sangue para diferentes órgãos.

### ***$\beta$ -adrenoceptores endoteliais***

De modo geral, a ativação de adrenoceptores no músculo liso vascular promove relaxamento por mecanismo independente do endotélio, uma vez que a ausência do mesmo não modifica a resposta relaxante à isoprenalina em aorta e carótida de ratos (Konishi & Su, 1983; Oriowo, 1994), artéria coronária de cães (Cohen *et al.*, 1983, 1984; White *et al.*, 1986; Macdonald *et al.*, 1987), e artéria mamária interna de humanos (Molenaar *et al.*, 1998). No entanto, em algumas preparações, os relaxamentos mediados por receptores  $\beta$ -adrenérgicos são parcialmente dependentes do endotélio; estas incluem a veia umbilical humana (Ferro *et al.*, 1999), artéria coronária de cães (Rubanyi & Vanhoutte, 1985) e artérias mesentérica (Graves & Poston, 1993; Blanckesteijn & Thien, 1993), basilar (Hempelmann & Ziegler, 1993), pulmonar (Priest *et al.*, 1997) e aorta torácica de ratos (Grace *et al.*, 1988; Kamata *et al.*, 1989; Delpy *et al.*, 1996; Toyoshima

*et al.*, 1998; Trochu *et al.*, 1999). Nestes tecidos, a remoção do endotélio ou a inibição da síntese de NO reduz o relaxamento induzido pela isoprenalina (Rubanyi & Vanhoutte, 1985; Gray & Marshall, 1992; Priest *et al.*, 1997; Ferro *et al.*, 1999). Estudos *in vivo* também demonstram que o endotélio vascular contribui para a vasodilatação dependente de estimulação  $\beta$ -adrenérgica (Parent *et al.*, 1993; Chang, 1997; Xu *et al.*, 2000).

Alguns estudos mostraram que a participação do endotélio no relaxamento induzido pelos agonistas  $\beta$ -adrenérgicos é devida à formação de prostaciclina (prostanóide vasodilatador derivado do endotélio) e consequente ativação da adenilil ciclase, levando à grande produção de AMPc (Grace *et al.*, 1988; Shimokawa *et al.*, 1988; Nakhostine *et al.*, 1995). Outros estudos, realizados em cultura de célula endotelial, mostraram a existência de sítios ligantes  $\beta$ -adrenérgicos acoplados à liberação de NO (Howell *et al.*, 1988; Steinberg *et al.*, 1984). O NO basal liberado do endotélio leva à ativação da guanilil ciclase solúvel no músculo liso vascular, levando à formação de GMPc, que, por sua vez, inibe a PDE3; esta enzima converte o AMPc à sua forma inativa, o AMP5' (Maurice & Haslam, 1990; Maurice *et al.*, 1991; Miyata *et al.*, 1992). Postula-se também que o isoproterenol aumenta a atividade da NOS em cultura de célula endotelial de veia umbilical humana (Ferro *et al.*, 1999). Além da prostaciclina e do NO, o EDHF tem sido apontado como responsável pela resposta relaxante a agonistas  $\beta$ -adrenérgicos na presença de inibidores do citocromo P450 e bloqueadores dos canais para potássio (Satake *et al.*, 1997; Van der Zyppe *et al.*, 2000).

Quanto ao subtipo de adrenoceptor  $\beta$  presente no endotélio vascular, sabe-se que o subtipo  $\beta_1$  predomina em vasos pulmonares e artéria mesentérica, enquanto que em artéria carótida, há um misto de  $\beta_1$  e  $\beta_2$ . Por outro lado, os três subtipos,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  estão

presentes no endotélio da aorta (Graves & Poston, 1993; Priest *et al.*, 1997; MacDonald *et al.*, 1999; Brawley *et al.*, 2000).

### 1.3 ANTAGONISTAS DE ADRENOCEPTORES $\beta$

Os antagonistas de adrenoceptores  $\beta$  têm sido usados com sucesso no tratamento de desordens cardiovasculares, como a doença cardíaca isquêmica, arritmias cardíacas e hipertensão essencial. Embora o mecanismo de ação destas drogas não seja ainda claro, sugere-se que estejam relacionados à redução da atividade adrenérgica, do débito cardíaco e da liberação de renina (van den Meiracker *et al.*, 1989; Kahönen *et al.*, 1996). Sabe-se também que os  $\beta$ -bloqueadores apresentam propriedades independentes do bloqueio dos adrenoceptores  $\beta$ , os quais parecem contribuir para os efeitos benéficos destes agentes no tratamento das desordens cardiovasculares (Taylor, 1988a,b; Marano *et al.*, 2002). Por exemplo, o carvedilol (antagonista não-seletivo de adrenoceptores  $\beta$ ), apresenta atividade antioxidante e inibe a infiltração de células inflamatórias no miocárdio isquêmico, o remodelamento do músculo liso vascular, a migração e proliferação das células do músculo liso vascular e o progresso da arteriosclerose em modelos de hiperlipidemia, através de mecanismos independentes do bloqueio do adrenoceptor  $\beta$  (Gellai *et al.*, 1990; Feuerstein *et al.*, 1992; Lysko *et al.*, 1992; Ohlstein *et al.*, 1993; Feuerstein & Ruffolo, 1995). Por outro lado, o carvedilol induz vasodilatação através do bloqueio de adrenoceptores  $\alpha_1$  (Ruffolo *et al.*, 1990; Nichols *et al.*, 1991; Yue *et al.*, 1992).

Ainda neste aspecto, o nipradilol é uma droga de efeito farmacológico duplo, ou seja, bloqueia o adrenoceptor  $\beta$  não-seletivamente (com atividade aproximadamente 2

vezes maior que a do propranolol) e estimula a NOS nas células endoteliais, promovendo a liberação de NO. Demonstrou-se também que o nipradilol aumenta a expressão da NOS endotelial *in vitro* (Jayachandran *et al.*, 2001).

Ainda como exemplo de  $\beta$ -bloqueadores com propriedades farmacológicas independentes do bloqueio do receptor, podemos citar o nebivolol, um antagonista seletivo de adrenoceptores  $\beta_1$ . Em concentrações acima de 50  $\mu\text{M}$ , o nebivolol promove vasodilatação dos vasos do antebraço humano e artéria coronária de cães, a qual é reduzida pelo bloqueio da NOS ou da guanilil ciclase solúvel. Isto sugere que o efeito vasodilatador do nebivolol é modulado pela produção endógena de NO endotelial (Gao *et al.*, 1991; Cockcroft *et al.*, 1995). No entanto, o mecanismo pelo qual o nebivolol estimula a NOS endotelial e aumenta a produção de NO, bem como os receptores que medeiam este fenômeno, ainda são desconhecidos. Sabe-se que a atividade da NOS endotelial é aumentada por mecanismos dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina ou dependentes de quinases. Em células endoteliais de vênulas bovinas, demonstrou-se que o nebivolol ativa a via de transdução dependente de  $\text{IP}_3$ . Entretanto, antagonistas de calmodulina não foram capazes de inibir a vasodilatação induzida pelo nebivolol em artéria coronária de cães, sugerindo que o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina não está envolvido neste fenômeno (Illiano *et al.*, 1992; Parenti *et al.*, 2000).

Em ratos, a hipertensão arterial induzida pela inibição crônica da síntese de NO é atenuada pelo tratamento concomitante com o metoprolol (antagonista seletivo de adrenoceptores  $\beta_1$ ; Erley *et al.*, 1995), propranolol (antagonista não seletivo de adrenoceptores  $\beta$ ) e o atenolol (antagonista seletivo de adrenoceptores  $\beta_1$ ), sendo estes dois últimos também capazes de atenuar a hipertrofia do cardiomiócito e a fibrose

ventricular induzidas pelo tratamento crônico com L-NAME (Pacca *et al.*, 2002). Similarmente, o remodelamento cardíaco observado no modelo de hipertensão induzida pela bandagem da aorta é prevenido pelo propranolol, e isto ocorre por um mecanismo independente do bloqueio do adrenoceptor  $\beta$ , uma vez que o isômero inativo (R(+)-propranolol), tem efeito similar ao do isômero ativo (S(-)-propranolol) ou do racêmico (DL( $\pm$ )-propranolol). Desta forma, não somente os  $\beta$ -bloqueadores desenvolvidos mais recentemente, mas também os  $\beta$ -bloqueadores de primeira geração, parecem atuar por mecanismos independentes do bloqueio do adrenoceptor  $\beta$ .

Apesar do desenvolvimento de novos  $\beta$ -bloqueadores e outros fármacos antiipertensivos, antagonistas de adrenoceptores  $\beta$  como o propranolol, atenolol e metoprolol, continuam sendo amplamente prescritos na clínica. No entanto, poucos estudos têm sido realizados para esclarecer os mecanismos envolvidos na redução de resistência vascular periférica causada pelos  $\beta$ -bloqueadores.

## OBJETIVO

### Objetivo Geral:

Investigar o mecanismo de ação dos antagonistas de adrenoceptores  $\beta$  na reatividade da aorta e artéria mesentérica de ratos.

### Objetivos Específicos:

1. Investigar os efeitos relaxantes diretos do propranolol (DL( $\pm$ ), S(-) e R(+)-propranolol), atenolol e metoprolol em aorta e artéria mesentérica isoladas de ratos, através da obtenção de curvas concentração-efeito a estes compostos.

2. Investigar a participação do endotélio e da via NO/GMPc no relaxamento induzido pelo propranolol e seus isômeros, através do uso de preparações com endotélio íntegro ou removido, e de inibidores da NOS (L-NAME), da guanilil ciclase (ODQ) e da ciclooxigenase (indometacina), assim como através da medida dos níveis teciduais de AMPc ou GMPc.

3. Investigar o efeito *ex vivo* do propranolol na reatividade da aorta e da artéria mesentérica de ratos tornados hipertensos pelo bloqueio crônico de NO, através da obtenção de curvas concentração efeito à acetilcolina, gliceriltrinitrato e curvas de contração ao cloreto de cálcio

4. Avaliar os níveis plasmáticos de nitrito/nitrato e da atividade da SOD em ratos tratados com L-NAME e/ou propranolol.

---

---

***MATERIAIS E MÉTODOS***

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Foram usados ratos Wistar machos entre 7 e 8 semanas de vida, pesando entre 200 e 250 g, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP, Campinas, SP). Os ratos ficaram alojados ao menos uma semana no biotério de manutenção do Departamento de Farmacologia – UNICAMP, mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h), a uma temperatura de 25°C, em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*.

### 2.2 Aorta e Artéria Mesentérica Isoladas

Para o isolamento da aorta e da artéria mesentérica, os animais foram anestesiados com halotano e exsangüinados por secção dos vasos cervicais. Em seguida, a aorta e a artéria mesentérica foram rapidamente removidas e colocadas em solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição em mM: NaCl, **118**; NaHCO<sub>3</sub>, **25**; glicose, **5,6**; KCl, **4,7**; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, **1,2**; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, **1,17** e CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, **2,5**. Em seguida, a aorta e a artéria mesentérica isoladas foram dissecadas para remoção de tecidos conectivos, e então divididas em 4 anéis de aproximadamente 0,5 cm e 0,2 cm, respectivamente. Os anéis foram montados em câmaras de incubação de tecido (10 ml volume) preenchidas com a solução Krebs-Henseleit, continuamente gaseificadas com O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5 %), mantidas à temperatura de 36,5°C e pH entre 7,3 a 7,5.

Os anéis foram então suspensos entre duas pontas de metal em “L”, sendo que uma das pontas foi conectada a um transdutor de força, enquanto a outra foi fixada a uma

unidade móvel, permitindo, assim, o ajuste preciso da tensão. A tensão aplicada aos tecidos (10 mN) foi periodicamente ajustada até estabilização, e a solução nutritiva trocada a cada 15 minutos durante este período. As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (Ugo-Basile, Varese, Itália) e registradas em sistema PowerLab 400™ de aquisição de dados (software versão 4.0, AD Instruments, MA, EUA).

Nos estudos em que se avaliou os efeitos diretos dos  $\beta$ -bloqueadores, curvas concentração-efeito foram construídas usando-se anéis com endotélio íntegro ou desprovidos de endotélio, removidos mecanicamente. Nos experimentos aonde o endotélio não foi removido, a integridade do mesmo foi confirmada pelo relaxamento causado pela acetilcolina (1  $\mu$ M).

O relaxamento aos agonistas (ou antagonistas) foi avaliado em anéis de aorta e de artéria mesentérica pré-contraídos com o agonista de adrenoceptores  $\alpha_1$  fenilefrina (1  $\mu$ M), que representa uma contração submáxima (75 a 80% da contração máxima). Após atingir a resposta contrátil máxima, curvas concentração-efeito aos  $\beta$ -bloqueadores (ou aos agonistas) foram construídas. Em algumas preparações de artéria mesentérica, utilizou-se a endotelina-1 (ET-1; 10 nM) ou o U-46619 (análogo da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ; 10 nM) para induzir pré-contração dos tecidos.

## **2.3 Estudos *in vitro***

### **2.3.1 Avaliação dos efeitos relaxantes diretos dos isômeros do propranolol em aorta e artéria mesentérica isoladas de rato**

Os anéis de aorta e artéria mesentérica foram inicialmente pré-contraídos com fenilefrina (1  $\mu$ M), conforme descrito acima. Os efeitos relaxantes do propranolol e isômeros (10 – 100  $\mu$ M) foram investigados na ausência ou presença de L-NAME (100  $\mu$ M; inibidor não seletivo da NOS), ODQ (1  $\mu$ M; inibidor da guanilil ciclase solúvel) ou indometacina (6  $\mu$ M; inibidor da COX). Após a construção de curvas concentração-efeito em resposta aos antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos, cada inibidor/bloqueador foi adicionado às cubas por 30 minutos antes da construção da segunda curva concentração-efeito ao mesmo agente. Os inibidores/bloqueadores permaneceram no banho durante todo o protocolo experimental.

Nos vasos dos animais controles ou submetidos ao tratamento crônico com L-NAME e/ou propranolol, não fizemos a remoção mecânica do endotélio em nenhum dos protocolos realizados.

### **2.3.2 Resposta contrátil ao $\text{CaCl}_2$**

Para a avaliação dos efeitos diretos do  $\text{CaCl}_2$ , utilizou-se o protocolo experimental descrito por Lagaud *et al.* (1999). Inicialmente, os tecidos foram contraídos com KCl (80 mM) para determinação da contração máxima dos mesmos. Em seguida, a solução nutritiva de Krebs foi substituída por Krebs desprovido de cálcio, em presença de EGTA

(1 mM) para a total remoção do cálcio do meio. Em seguida, foi adicionado ao banho 1  $\mu$ M de fenilefrina para a remoção do cálcio do retículo sarcoplasmático. Os tecidos foram novamente lavados com Krebs desprovido de cálcio contendo EGTA, e em seguida foram incubados por 20 minutos com o inibidor da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, o ácido ciclopiazônico (CPA; 10  $\mu$ M). Ao banho, em cada cuba foi adicionada uma única concentração dos isômeros do propranolol (10, 30 ou 100  $\mu$ M) ou de nifedipina (1  $\mu$ M), por 30 minutos, após o qual o Krebs foi substituído por uma solução de KCl (80 mM) desprovida de cálcio. O CPA e os isômeros do propranolol foram adicionados novamente ao banho, e após 15 minutos, curvas concentração-efeito ao  $\text{CaCl}_2$  (0,3 – 30 mM) foram construídas.

### ***2.3.3 Dosagem de GMPc e AMPc tecidual***

Para a dosagem dos nucleotídeos cíclicos nos tecidos vasculares, os tecidos foram removidos, conforme descrito anteriormente. A quantificação de GMPc e AMPc tecidual foi avaliada em anéis de aorta e de artéria mesentérica com endotélio intacto ou removido. Após o período de estabilização de 30 minutos em Krebs gaseificado, os tecidos foram expostos à fenilefrina (1  $\mu$ M) por 10 minutos, e então estimulados com DL( $\pm$ )-propranolol ou forskolin (utilizado como controle positivo para dosagem dos níveis de AMPc), por 20 minutos. Em seguida, os tecidos foram imediatamente coletados e congelados em nitrogênio líquido. Os anéis de aorta e de artéria mesentérica congelados foram então pulverizados, homogeneizados em 66% de etanol e centrifugados a 10 000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a medida do GMPc e AMPc por ELISA. O peso do *pellet* seco foi utilizado para padronizar as diferenças das amostras. O preparo do marcador, das amostras, dos padrões e a incubação com o anticorpo foi

realizado de acordo com a descrição dos kits (Cyclic GMP EIA Kit e Cyclic AMP EIA Kit; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicatas usando diferentes diluições da amostra.

## **2.4 Estudos *Ex Vivo***

### **2.4.1 Medida de Pressão Arterial e de Frequência Cardíaca**

As medidas de pressão arterial e de frequência cardíaca foram avaliadas em cinco ratos de cada grupo experimental no final do tratamento com L-NAME e/ou propranolol. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/Kg, i.p.) e a artéria femoral esquerda de cada rato foi canulada, usando tubos de PE-50. A pressão arterial e a frequência cardíaca foram avaliadas nos animais anestesiados, conectando-se o catéter a um transdutor de pressão acoplado a um sistema PowerLab 400™ de aquisição de dados (software versão 4.0, AD Instruments, MA, EUA).

### **2.4.2 Avaliação funcional das aortas e artérias mesentéricas isoladas de ratos tratados por 4 semanas com L-NAME e/ou propranolol.**

O tratamento crônico com L-NAME, concomitante ou não ao propranolol, foi conduzido de acordo com Ribeiro *et al.* (1992) e Pacca *et al.* (2002). O L-NAME e o propranolol foram dissolvidos em água a uma concentração de 400 mg/mL e 600 mg/mL, respectivamente, e oferecidos, através da ingestão hídrica, em uma dose aproximada de 20 mg/rato/dia (L-NAME) ou 30 mg/rato/dia (propranolol) por 4 semanas. Foram controladas a ingestão líquida, os pesos corpóreos, pressão arterial e a frequência cardíaca em todos os grupos estudados. No geral, este estudo consistiu dos seguintes subgrupos experimentais:

- a) Grupo Controle – animais que ingeriram apenas água de torneira;
- b) Grupo L-NAME – animais que ingeriram 20 mg/dia/rato de L-NAME na ingestão hídrica;
- c) Grupo propranolol – animais que ingeriram 30 mg/dia/rato de propranolol na ingestão hídrica;
- d) Grupo propranolol + L-NAME – animais que ingeriram 30 e 20 mg/dia/rato de propranolol e L-NAME, respectivamente, na ingestão hídrica.

Para o estudo da reatividade vascular, ao final das quatro semanas de tratamento, os ratos foram anestesiados e exsanguinados. A aorta e a artéria mesentérica foram isoladas e dissecadas para remoção de tecidos conectivos. Os anéis de aorta e artéria mesentérica foram montados em banho e pré-contraídos com fenilefrina (1  $\mu$ M). Em seguida, foram construídas curvas concentração-efeito à acetilcolina (0,01 – 10  $\mu$ M) e ao gliceriltrinitrato (0,01 – 10  $\mu$ M).

Similarmente às curvas de contração para o  $\text{CaCl}_2$  descrito anteriormente, os anéis de aorta e artéria mesentérica dos animais tratados cronicamente passaram pelo mesmo processo de substituição do meio nutritivo e tratamento do tecido. No entanto, não foram adicionados ao banho os isômeros do propranolol, uma vez que este  $\beta$ -bloqueador já é adicionado à ingestão hídrica dos ratos. Após o processo de tratamento dos tecidos, o Krebs foi substituído por uma solução de KCl (80 mM) desprovido de cálcio. O CPA foi adicionado ao banho, e após 15 minutos, foram construídas as curvas concentração-efeito ao  $\text{CaCl}_2$  (0,1 – 10 mM).

### ***2.4.3 Dosagem dos níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx) e atividade plasmática da superóxido dismutase (SOD)***

#### ***Separação do plasma***

Antes da morte dos animais controles ou tratados cronicamente com L-NAME e/ou propranolol, amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal, em tubos contendo citrato ou EDTA (conforme instrução do fabricante), centrifugados a 1.000 g por 10 minutos, à 4°C, para separação do plasma. As amostras de plasma foram aliqüotadas e armazenadas em freezer -80°C até a realização das dosagens.

#### ***Nitrito/Nitrato (NOx)***

As amostras de plasma foram ultra-filtradas usando-se tubos de ultra-filtração (Millipore) que permitem que moléculas com peso molecular entre 10 a 30 kDa sejam filtradas. Os filtros foram lavados com água ultra-pura antes da filtração. A ultrafiltração reduz a absorbância devido à presença de hemoglobina e “melhora” a formação da cor usando o reagente de Griess. O preparo das amostras, dos padrões, dos cofatores e do reagente de Griess foi realizado de acordo com a descrição dos kits comercialmente disponíveis (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicatas usando-se diferentes diluições da amostra.

#### ***Atividade da SOD***

Para a dosagem da atividade da SOD, a camada branca contendo leucócitos foi desprezada. Os eritrócitos foram lisados em água ultrapura gelada, em volume 4 vezes

maior do que o volume do plasma, e então centrifugados à 10.000 g, por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante contendo o eritrócito lisado foi coletado e estocado em gelo e utilizado para a dosagem da atividade da SOD. O preparo das amostras, dos padrões, da xantina oxidase e do detector do radical foi realizado de acordo com a descrição dos kits comercialmente disponíveis (Superoxide Dismutase Assay Kit; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicatas usando-se diferentes diluições da amostra.

## **2.5 Análise estatística**

Os relaxamentos provocados pelos antagonistas de adrenoceptores  $\beta$  foram calculados como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (1  $\mu$ M). Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão das médias. Para comparações múltiplas de variáveis independentes foi usado o teste de análise de variância (ANOVA-*two way*), seguido pelo teste de Bonferroni. O programa InStat (GraphPad Software) foi usado para as análises. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

---

---

## ***RESULTADOS***

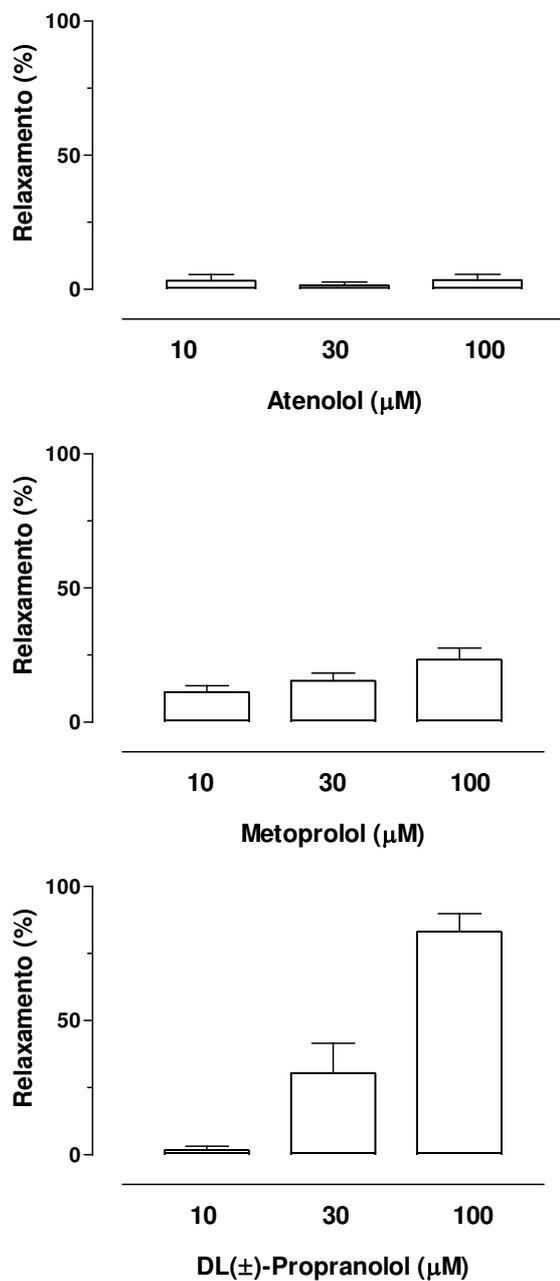
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Estudo *in vitro*: Efeitos diretos dos antagonistas $\beta$ -adrenérgicos em aorta e artéria mesentérica de ratos

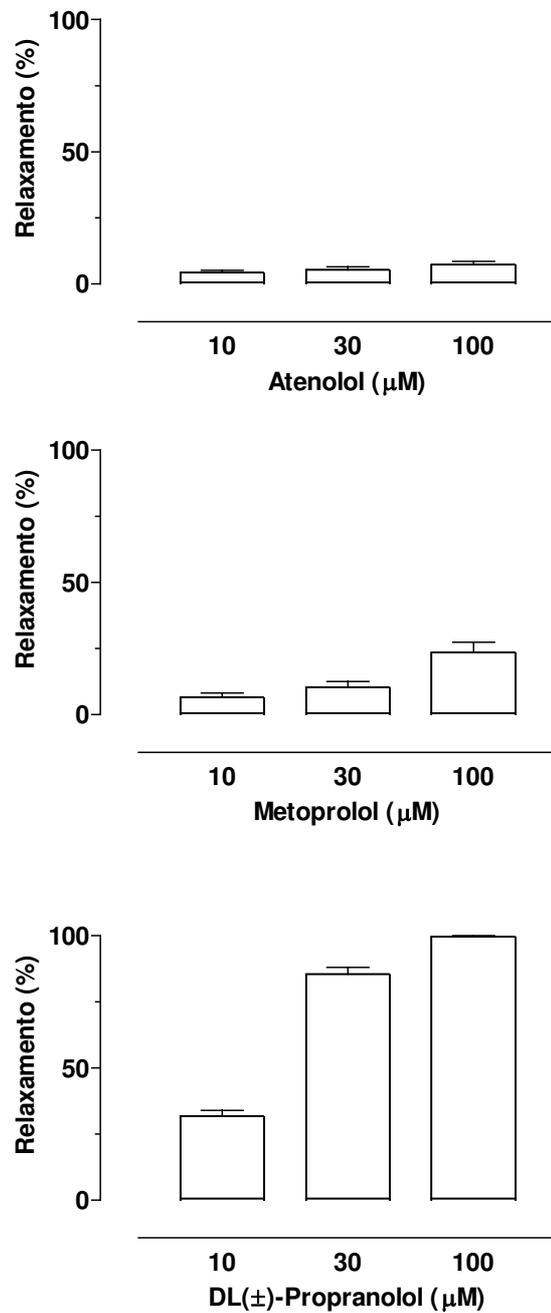
##### *Relaxamento induzido pelos antagonistas $\beta$ -adrenérgicos*

O efeito relaxante do atenolol, metoprolol e DL( $\pm$ )-propranolol (10 a 100  $\mu$ M) foi avaliado através da adição cumulativa destes antagonistas em anéis de aorta e de artéria mesentérica, ambos com endotélio íntegro. As figuras 1 e 2 mostram que na concentração mais alta (100  $\mu$ M), o atenolol e o metoprolol provocaram um discreto relaxamento em anéis de aorta ( $4 \pm 2\%$  e  $23 \pm 4\%$ , respectivamente) e de artéria mesentérica ( $7 \pm 1\%$  e  $24 \pm 4\%$ , respectivamente). Por outro lado, o DL( $\pm$ )-propranolol produziu um relaxamento dependente de concentração em ambos os vasos, cujas respostas máximas foram  $92 \pm 3\%$  e  $100 \pm 1\%$ , para aorta e artéria mesentérica, respectivamente. Para os próximos experimentos, passamos a empregar apenas o propranolol.

Também observamos que o relaxamento induzido pelo DL( $\pm$ )-propranolol é significativamente maior nos anéis de artéria mesentérica comparado à aorta.



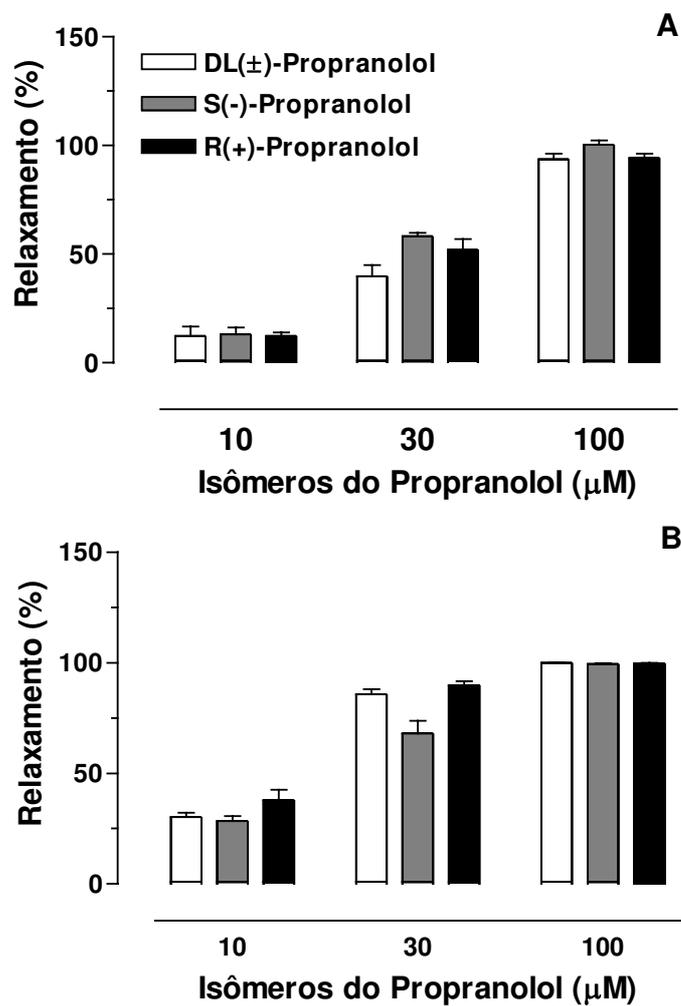
**Figura 1.** Efeito do atenolol, metoprolol e DL(±)-propranolol (10 – 100 μM) em anéis de aorta isolada de ratos com endotélio íntegro, pré-contraídos com fenilefrina (1 μM). Os dados representam as médias ± E.P.M. para 5 - 6 experimentos.



**Figura 2.** Efeito do atenolol, metoprolol e DL(±)-propranolol (10 – 100 μM) em anéis de artéria mesentérica com endotélio íntegro, pré-contraídos com fenilefrina (1 μM). Os dados representam as médias ± E.P.M. para 5 - 6 experimentos.

### *Relaxamento induzido pelos isômeros R(+) e S(-)-propranolol*

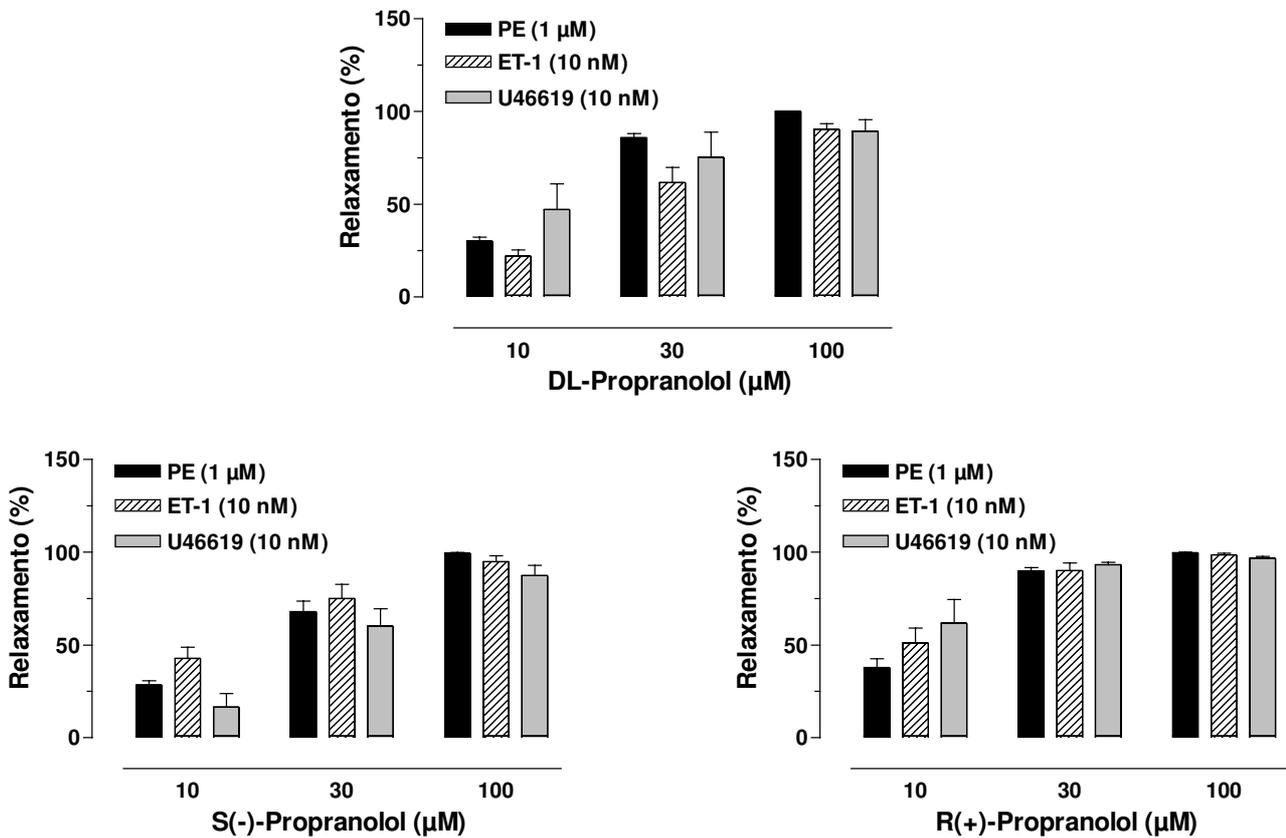
Os efeitos relaxantes da mistura racêmica DL( $\pm$ )-propranolol foram comparados com os dos isômeros inativo, (R(+)-propranolol), e ativo, (S(-)-propranolol), em anéis de aorta e de artéria mesentérica com endotélio íntegro. A figura 3 mostra que tanto o S(-)-propranolol quanto o R(+)-propranolol apresentou curvas concentração-efeito semelhantes à da mistura racêmica DL( $\pm$ )-propranolol (Figura 3).



**Figura 3.** Efeito dos isômeros do propranolol, DL( $\pm$ ), R(+), S(-)-propranolol (10 – 100  $\mu$ M) em anéis de aorta (painel A) e de artéria mesentérica (painel B) com endotélio íntegro, pré-contraídos com fenilefrina (1  $\mu$ M). Os dados representam as médias  $\pm$  E.P.M. para 4 - 9 experimentos.

*Relaxamento induzido pelos isômeros do propranolol em artéria mesentérica pré-contraídas com ET-1 ou o U-46619*

As curvas concentração-efeito ao propranolol e seus enantiômeros foram realizadas em anéis de artéria mesentérica com endotélio íntegro, pré-contraídos com endotelina (ET-1; 10 nM) ou com o análogo da prostaglandina, o U-46619 (10 nM). Observamos que o relaxamento induzido pelo propranolol e seus enantiômeros foi similar em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com ET-1 ou U-46619, comparado ao relaxamento observado nos tecidos pré-contraídos com fenilefrina (Figura 4).



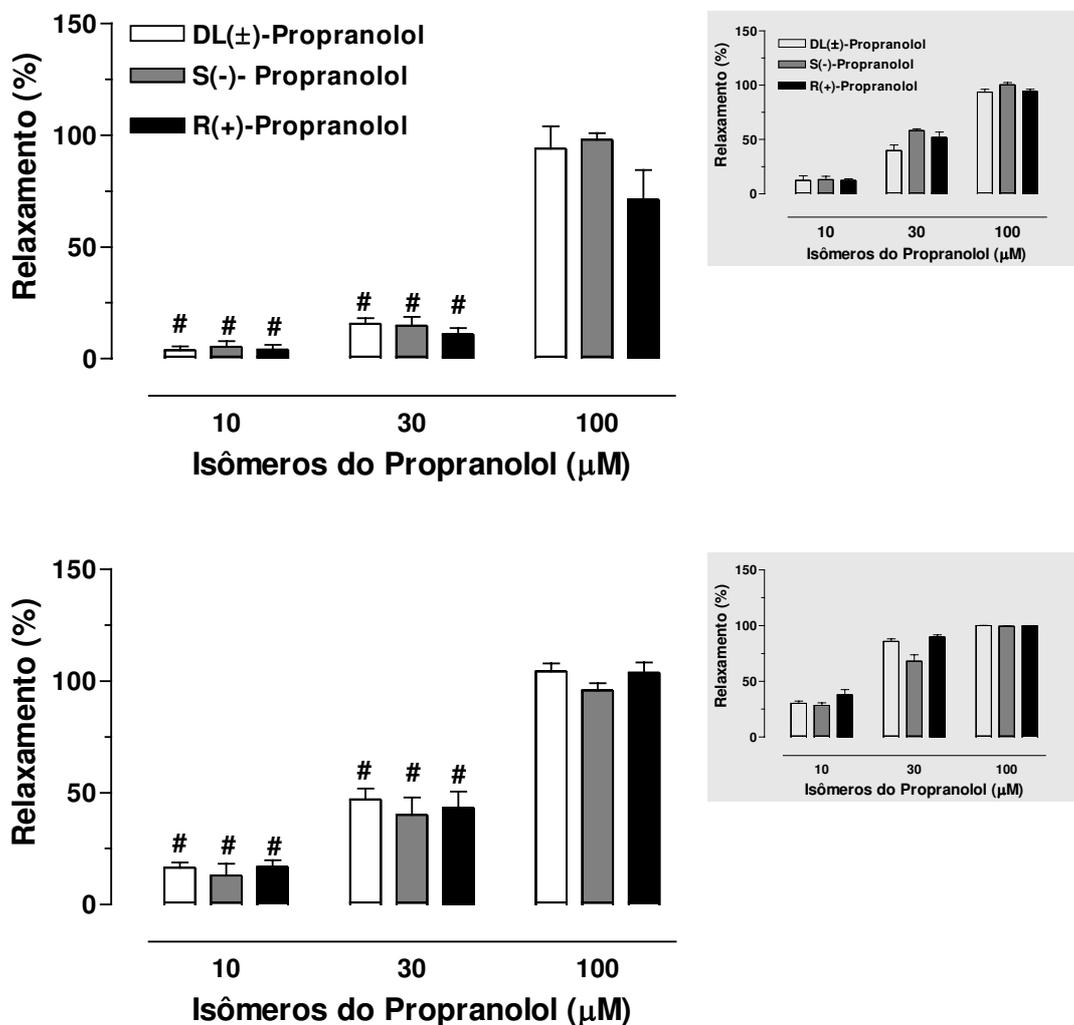
**Figura 4.** Efeito dos isômeros do propranolol, DL(±), R(+), S(-)-propranolol (10 – 100 μM) em anéis de artéria mesentérica com endotélio íntegro, pré-contraídos com fenilefrina (1 μM), endotelina-1 (10 nM) ou com U-46619 (10 nM). Os dados representam as médias ± E.P.M. para 5 - 9 experimentos.

### *Efeito da remoção do endotélio*

Em anéis de aorta, a remoção do endotélio diminuiu significativamente o relaxamento induzido pelas concentrações de 10 e 30  $\mu\text{M}$  do DL( $\pm$ )-, S(-)- e R(+)-propranolol, mas não afetou o relaxamento máximo (Figura 5, painel superior).

Resultados semelhantes foram observados em anéis de artéria mesentérica, onde os relaxamentos induzidos pelas concentrações de 10 e 30  $\mu\text{M}$  do DL( $\pm$ ), S(-) e R(+)-propranolol foram significativamente reduzidos pela remoção do endotélio. A resposta máxima não foi modificada (Figura 5, painel inferior).

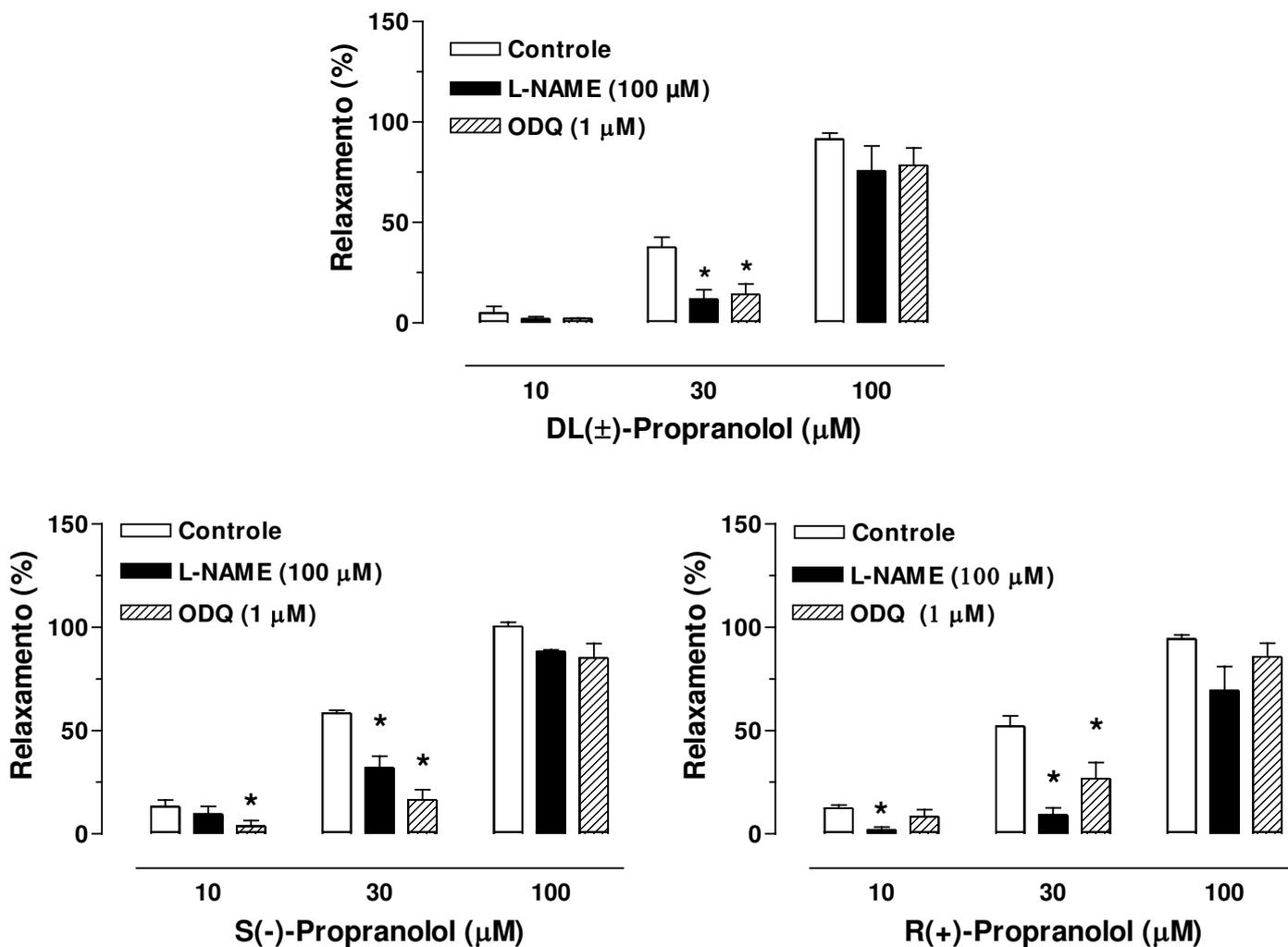
Entretanto, em ambas preparações, independentemente da remoção do endotélio, as respostas relaxantes para os três isômeros foram semelhantes.



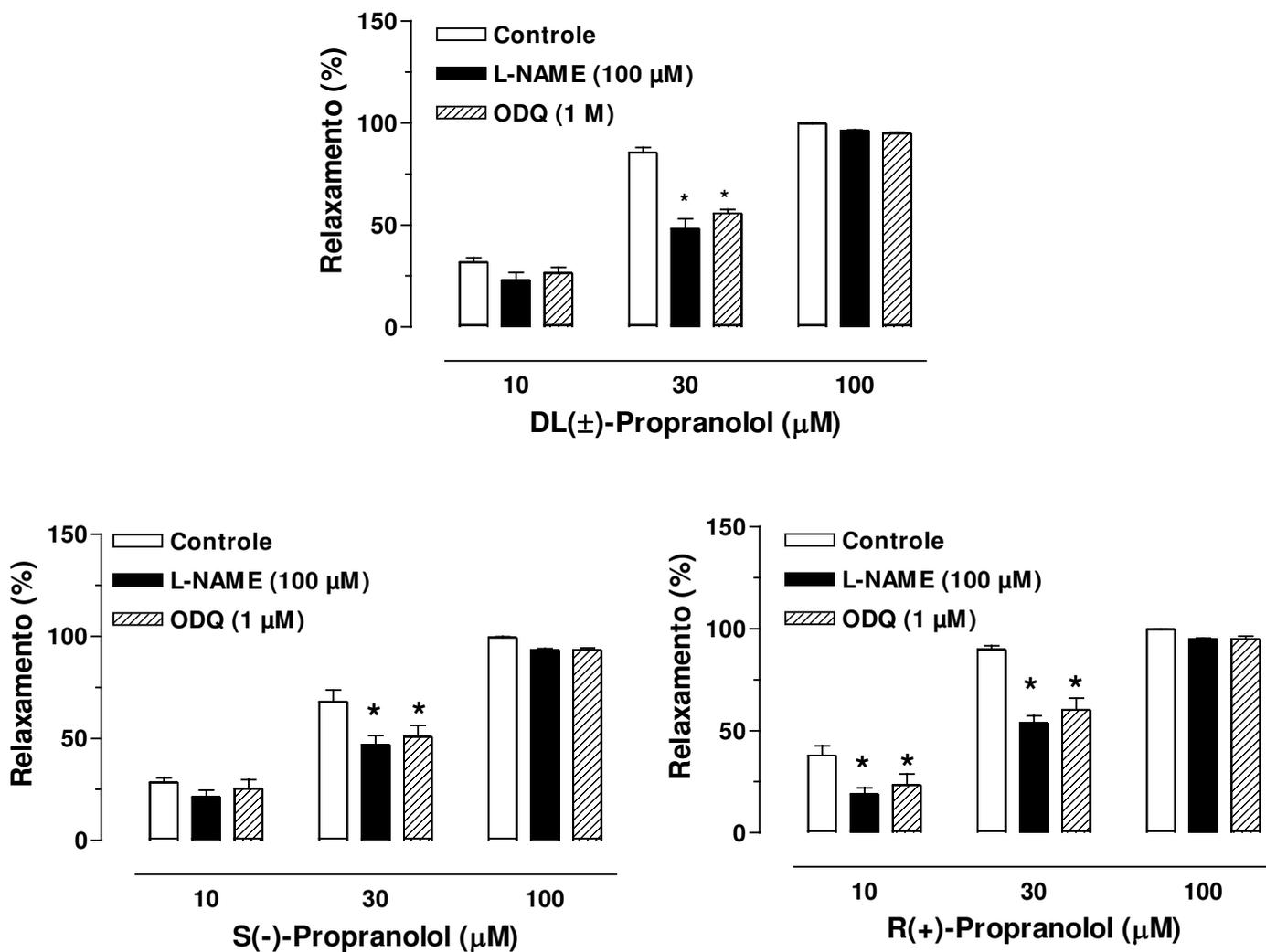
**Figura 5.** Efeito dos isômeros do propranolol, DL(±), R(+), S(-) -propranolol (10 – 100 μM) em anéis de aorta (painel superior) ou artéria mesentérica (painel inferior) com endotélio removido, pré-contraídos com fenilefrina (1 μM). Dados representam a média ± E.P.M. para 4 - 9 experimentos. #P<0,05, comparado com a mesma concentração do isômero, em anéis com endotélio íntegro (representados no destaque).

*Efeito do L-NAME e ODQ nos relaxamentos induzidos pelos isômeros do propranolol*

As curvas ao DL( $\pm$ )-, S(-)- e R(+)-propranolol foram repetidas em anéis de aorta (Figura 6) e de artéria mesentérica (Figura 7) com endotélio íntegro, na presença de L-NAME (100  $\mu$ M) ou de ODQ (1  $\mu$ M). Nossos resultados mostraram que, tanto em aorta como em artéria mesentérica, a adição do L-NAME ou do ODQ promoveu redução significativa da resposta induzida por 30  $\mu$ M dos isômeros do propranolol, sem alterar o relaxamento máximo.



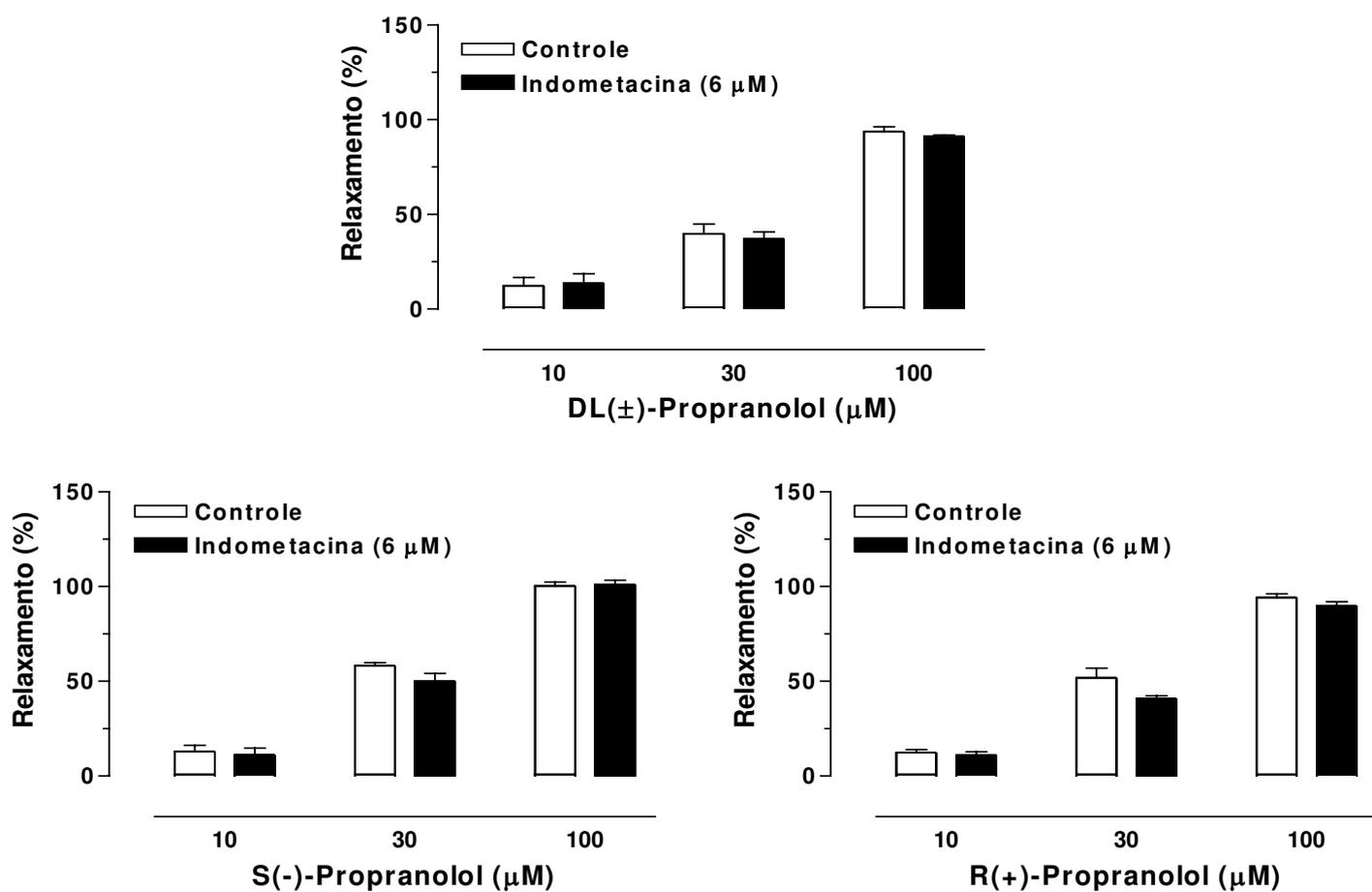
**Figura 6.** Efeito da adição de L-NAME (100 μM) ou ODQ (1 μM) no relaxamento induzido pelos isômeros DL(±), S(-) e R(+)-propranolol (10 – 100 μM) em anéis de aorta com endotélio íntegro, pré-contraídos com fenilefrina (1 μM). Os dados representam as médias ± E.P.M. para 4 - 9 experimentos. \*P < 0,05, comparado aos respectivos controles.



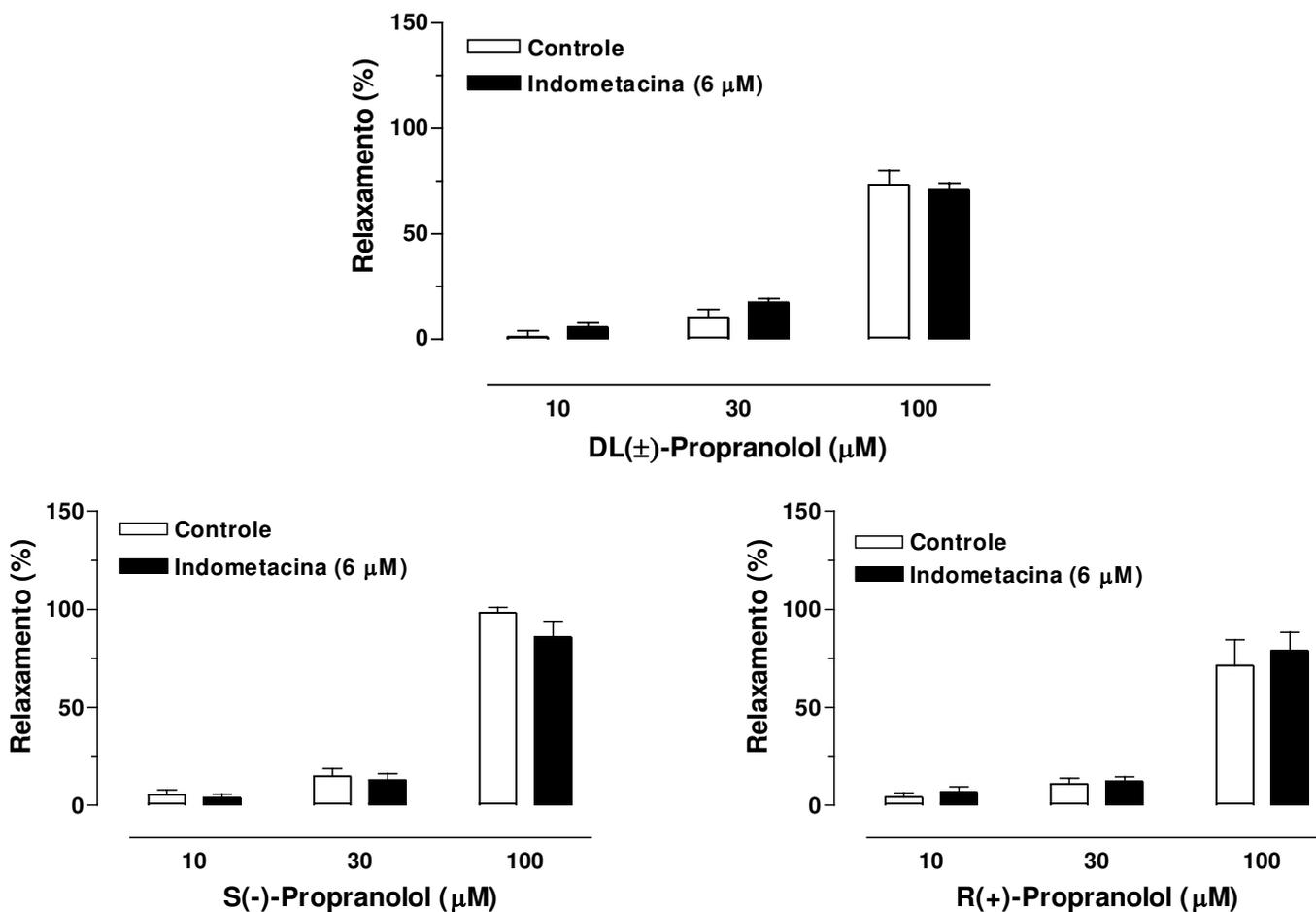
**Figura 7.** Efeito da adição de L-NAME (100 μM) ou ODQ (1 μM) no relaxamento induzido pelos isômeros DL(±), S(-) e R(+)-propranolol (10 – 100 μM) em anéis de artéria mesentérica com endotélio íntegro, pré-contraídos com fenilefrina (1 μM). Os dados representam as médias ± E.P.M. para 4 - 9 experimentos. \*P < 0,05, comparado aos respectivos controles.

### *Efeito da indometacina*

As curvas concentração-efeito ao DL( $\pm$ )-, S(-)- e R(+)-propranolol foram realizadas em anéis de aorta com endotélio intacto (Figura 8) ou com endotélio removido (Figura 9), na presença de indometacina (6  $\mu$ M). O relaxamento induzido pelo DL( $\pm$ )-, S(-)- e R(+)-propranolol não foi alterado pela indometacina nem em anéis de aorta com endotélio íntegro, nem em anéis com endotélio removido.



**Figura 8.** Efeito da indometacina (6  $\mu$ M) no relaxamento provocado pelos isômeros do propranolol, DL( $\pm$ ), S(-) e R(+)-propranolol (10 – 100  $\mu$ M) em anéis de aorta com endotélio íntegro, pré-contraídos com fenilefrina (1  $\mu$ M). Os dados representam as médias  $\pm$  E.P.M. para 3 - 5 experimentos.

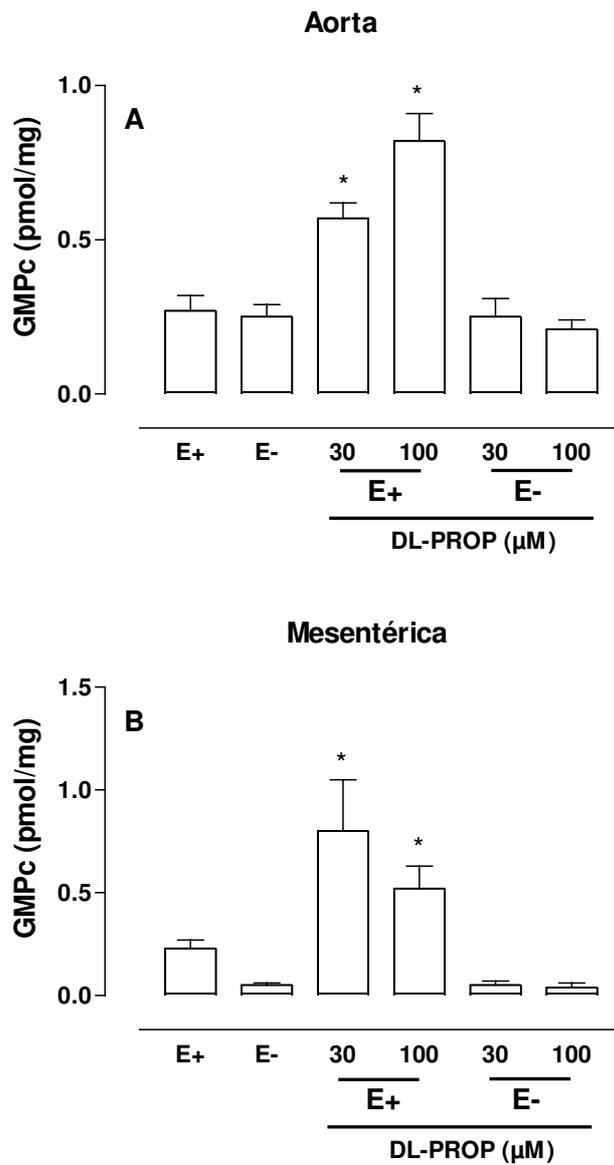


**Figura 9.** Efeito da adição de indometacina (6 μM) no relaxamento provocado pelos isômeros do propranolol, DL(±), S(-) e R(+)-propranolol (10 – 100 μM) em anéis de aorta com endotélio removido, pré-contraídos com fenilefrina (1 μM). Os dados representam as médias ± E.P.M. para 4 - 9 experimentos.

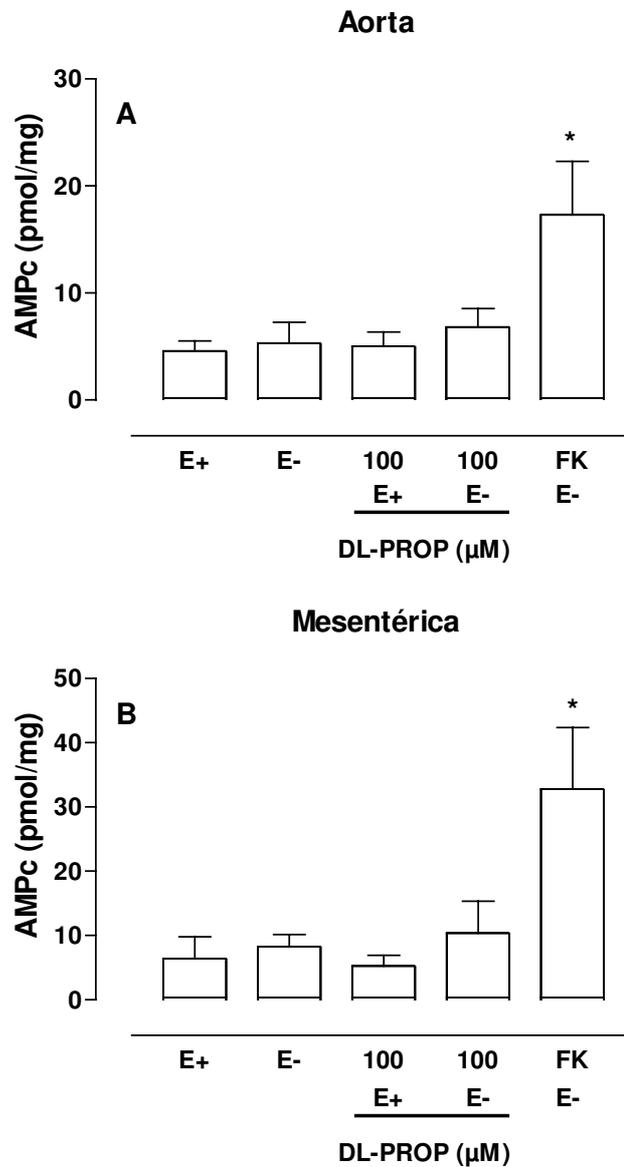
### *Níveis teciduais de nucleotídeos cíclicos*

O conteúdo dos nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc foi determinado em anéis de aorta e de artéria mesentérica com endotélio íntegro ou removido. A figura 10 mostra que em preparações com endotélio íntegro, o estímulo com 30 ou 100  $\mu$ M de propranolol provoca um aumento dos níveis teciduais de GMPc, tanto em aorta como em artéria mesentérica, comparados aos respectivos tecidos controles com endotélio íntegro. Quando o endotélio foi removido, não observamos aumento dos níveis de GMPc em nenhuma das preparações, comparado aos seus respectivos controles.

Os níveis teciduais de AMPc não foram alterados em nenhuma das preparações, com ou sem endotélio (Figura 11). O forskolin, usado como controle positivo, promoveu aumento significativo dos níveis teciduais de AMPc em tecidos sem endotélio (Figura 11).



**Figura 10.** Concentração de GMPc em anéis de aorta (painel A) e de artéria mesentérica (painel B) com endotélio intacto (E+) ou removido (E-), em condições basais (Controle) ou estimulados com DL(±)-propranolol. Os dados representam a média  $\pm$  o erro padrão das médias para 4 – 6 experimentos. \*P<0,05, comparado ao respectivo Controle.

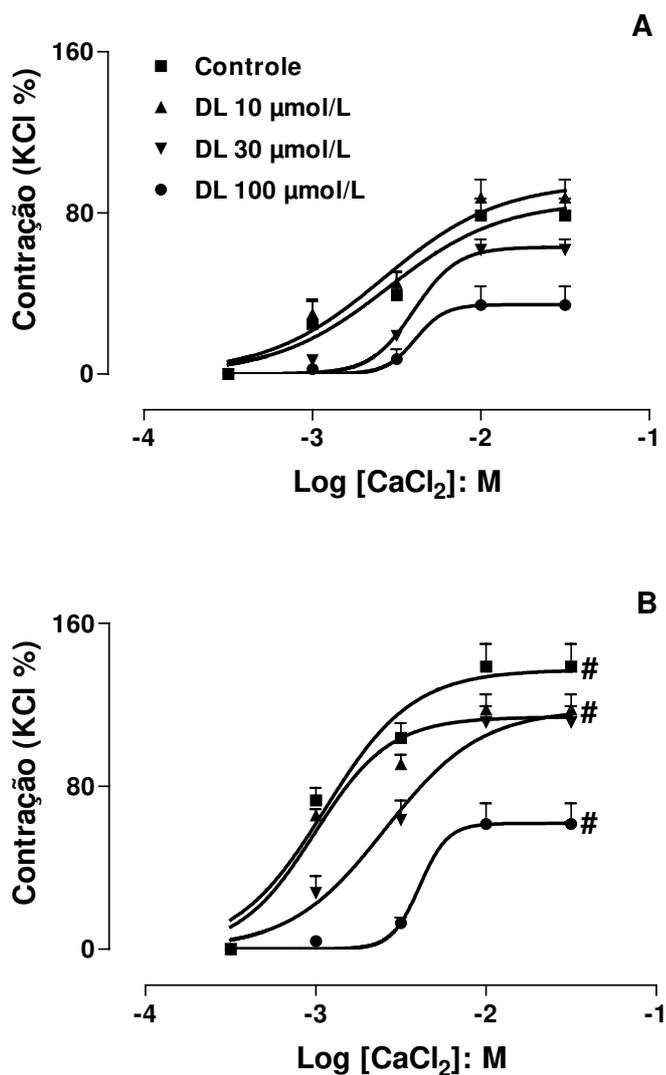


**Figura 11.** Concentração de AMPc em anéis de aorta (painel A) e de artéria mesentérica (painel B) com endotélio intacto (E+) ou removido (E-), em condições basais (Controle) ou estimulados com DL(±)-propranolol ou forskolin (FK). Os dados representam a média  $\pm$  o erro padrão das médias para 4 – 6 experimentos. \*P<0,05, comparado ao respectivo Controle.

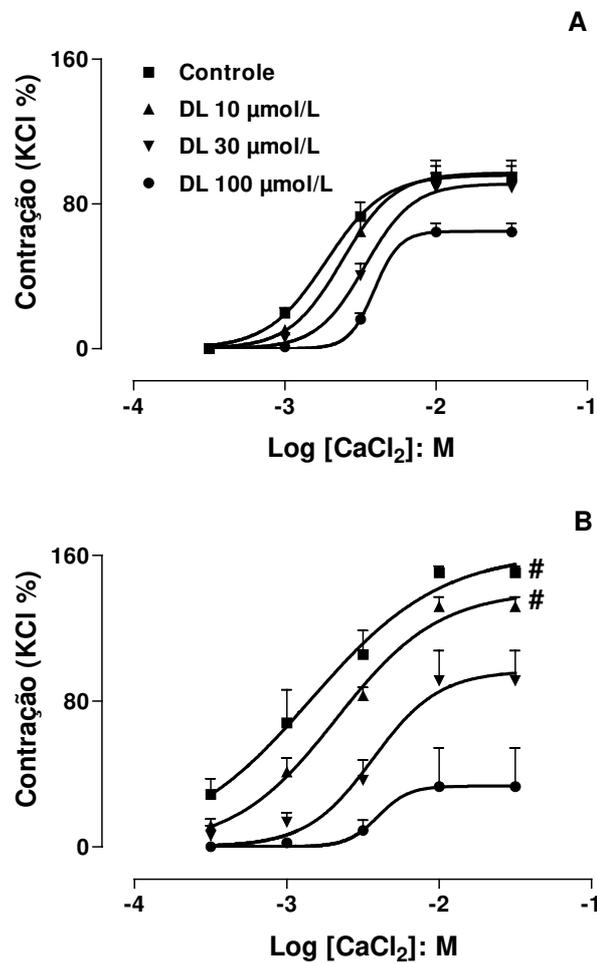
*Curvas concentração-efeito ao CaCl<sub>2</sub> em anéis de aorta, na presença do DL(±)-propranolol*

Curvas de contração ao CaCl<sub>2</sub> (0,3 – 30 mM) foram realizadas em anéis de aorta e de artéria mesentérica com endotélio íntegro ou removido, na ausência ou na presença de 3 concentrações de DL(±)-propranolol (10, 30 e 100 µM), conforme descrito em Materiais e Métodos. O CaCl<sub>2</sub> promoveu contração dos anéis de aorta e de artéria mesentérica de maneira dependente de concentração, sendo, na ausência do propranolol, a contração significativamente maior em anéis desprovidos de endotélio, comparado com os anéis com endotélio íntegro (Figuras 12 e 13).

A adição prévia de DL(±)-propranolol promoveu diminuição da contração causada pelo CaCl<sub>2</sub>, em anéis de aorta e de artéria mesentérica com endotélio intacto e em anéis com endotélio removido.



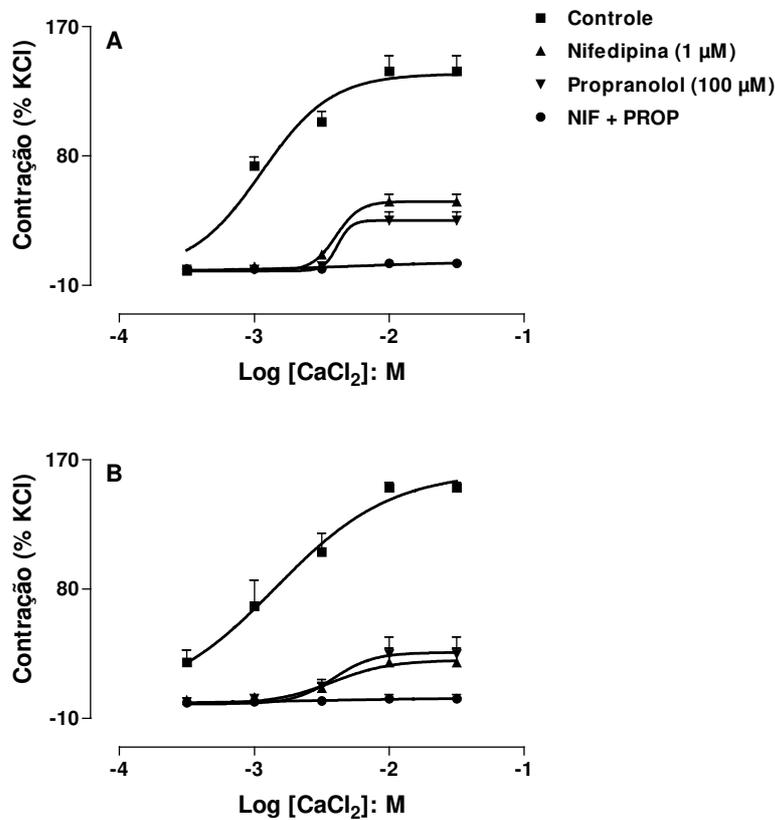
**Figura 12.** Efeito inibitório do DL(±)- propranolol (10 - 100 μM) na resposta contrátil do CaCl<sub>2</sub> (0,3 - 30 mM) em anéis de aorta com endotélio intacto (painel superior) ou removido (painel inferior). Os dados representam as médias ± E.P.M. para 4 - 5 experimentos. #P<0,05, comparado à mesma concentração, em anéis com endotélio íntegro.



**Figura 13.** Efeito inibitório do DL(±)- propranolol (10 - 100 μM) na resposta contrátil do CaCl<sub>2</sub> (0,3 – 30 mM) em anéis de artéria mesentérica com endotélio intacto (painel A) ou removido (painel B). Os dados representam as médias ± E.P.M. para 4 - 5 experimentos. #P<0,05, comparado à mesma concentração, em anéis com endotélio íntegro.

***Efeito da adição concomitante de DL(±)-propranolol e nifedipina na resposta contrátil ao CaCl<sub>2</sub>***

As curvas de contração ao CaCl<sub>2</sub> (0,3 – 30 mM) foram obtidas em anéis de aorta (Figura 14, painel A) e de artéria mesentérica (Figura 14, painel B) com endotélio removido, na presença do DL(±)-propranolol (100 µM) e/ou do bloqueador dos canais para cálcio do tipo L, a nifedipina (1 µM). Em ambas preparações, a adição isolada do DL(±)-propranolol ou da nifedipina promoveu similar redução da contração ao CaCl<sub>2</sub>, enquanto que a incubação concomitante destes compostos aboliu a contração.



**Figura 14.** Efeito da adição concomitante do DL(±)- propranolol (100 µM) e nifedipina (1 µM) na resposta contrátil do CaCl<sub>2</sub> (0,3 – 30 mM) em anéis de aorta (painel A) e de artéria mesentérica (painel B) com endotélio removido. Os dados representam as médias ± E.P.M. para 3 - 7 experimentos.

### **3.2 Estudos *ex vivo*: Tratamento crônico com L-NAME e efeito do DL(±)-propranolol**

#### ***Peso Corporal e Ingestão Hídrica***

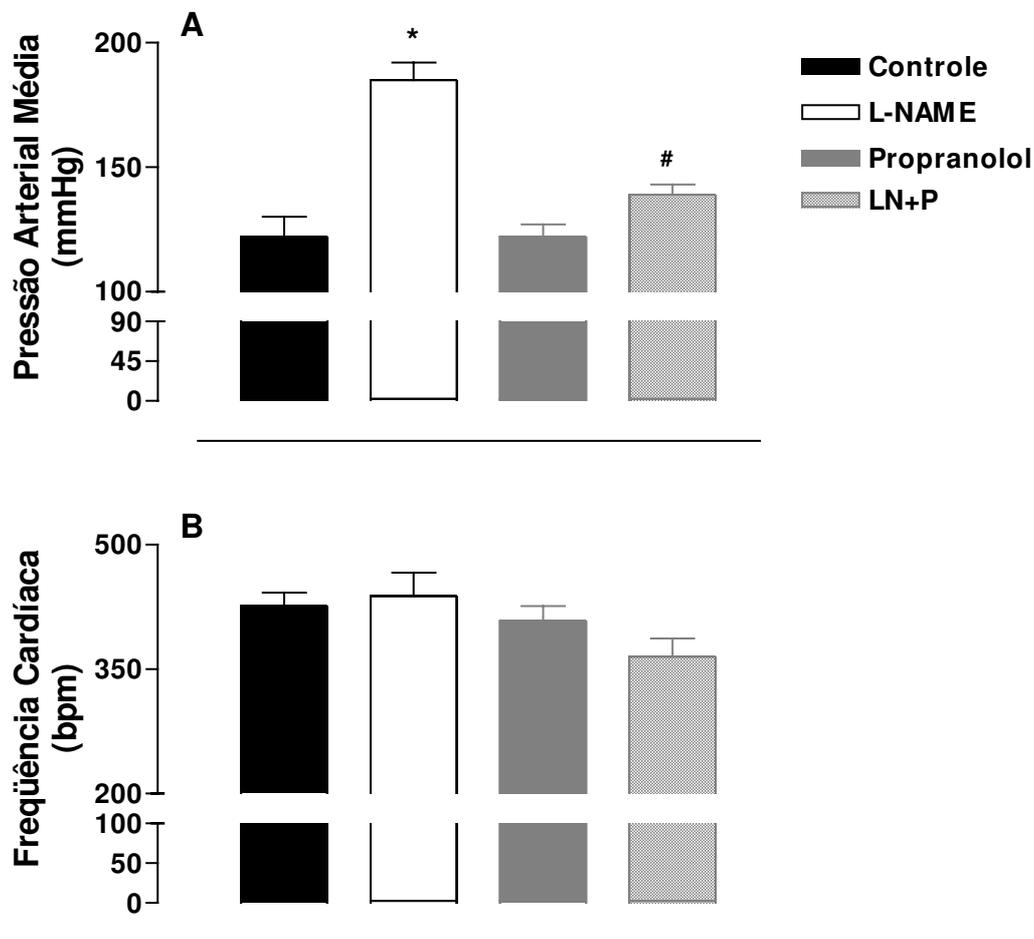
Ao final das 4 semanas de tratamento, o peso corporal dos animais tratados cronicamente com L-NAME e/ou propranolol não foi significativamente diferente do peso corporal dos animais controle (CTL:  $318 \pm 13$  g,  $n = 15$ ; LN:  $295 \pm 12$  g,  $n = 14$ ; LN+P:  $327 \pm 9$  g,  $n = 19$ ; PROP:  $319 \pm 8$  g,  $n = 15$ ).

A ingestão hídrica foi controlada durante 4 semanas. Observamos que o consumo diário de água contendo L-NAME e/ou Propranolol ou somente água não foi significativamente diferente entre os grupos (CTL:  $59 \pm 7$  mL de água/rato/dia; LN:  $58 \pm 14$  mL de água contendo L-NAME/dia; LN+P:  $54 \pm 5$  mL de água contendo L-NAME + Propranolol/rato/dia; PROP:  $53 \pm 3$  mL de água contendo Propranolol/rato/dia).

#### ***Pressão arterial média e Frequência cardíaca***

O tratamento crônico com L-NAME (20 mg/dia/rato) aumentou em aproximadamente 60 mmHg a pressão arterial média dos animais (Figura 15A). O tratamento concomitante com DL(±)-propranolol (30 mg/dia/rato) preveniu o aumento da pressão arterial, mantendo os valores de pressão arterial média em  $139 \pm 4$  mmHg. O tratamento com DL(±)-propranolol individualmente não alterou a pressão arterial média em relação aos animais do grupo Controle (Figura 15A)

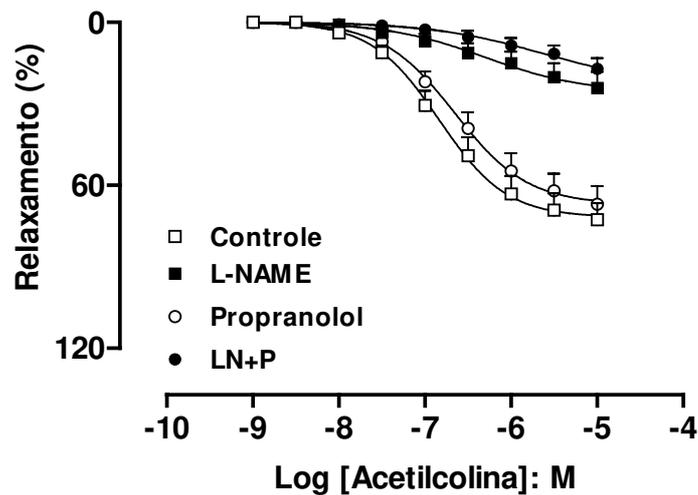
A figura 15B mostra que a frequência cardíaca dos animais dos grupos L-NAME ( $n = 5$ ), L-NAME + propranolol ( $n = 4$ ) e propranolol ( $n = 5$ ) não foi alterada quando comparada ao grupo Controle ( $n = 5$ ).



**Figura 15.** Pressão arterial (painel A) e frequência cardíaca (painel B) de animais Controles ou submetidos ao tratamento crônico com L-NAME (20 mg/rato/dia) e/ou propranolol (30 mg/dia/rato). Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão das médias para 4 – 5 experimentos. \* $P < 0,05$ , comparado ao grupo Controle; # $P < 0,05$ , comparado ao grupo L-NAME.

### *Reatividade da aorta à acetilcolina*

Em animais tratados cronicamente com L-NAME, o relaxamento provocado pela acetilcolina nos anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina foi marcadamente reduzido ( $24 \pm 6\%$ ,  $p < 0,01$ ) comparado com ratos Controles ( $73 \pm 6\%$ ). O tratamento concomitante com o DL( $\pm$ )-propranolol não foi capaz de restaurar de modo significativo a resposta relaxante da acetilcolina nos anéis de aorta ( $17 \pm 4\%$ ). O tratamento com DL( $\pm$ )-propranolol individualmente não afetou o relaxamento induzido pela acetilcolina ( $67 \pm 7\%$ ) nos anéis de aorta (Figura 16).

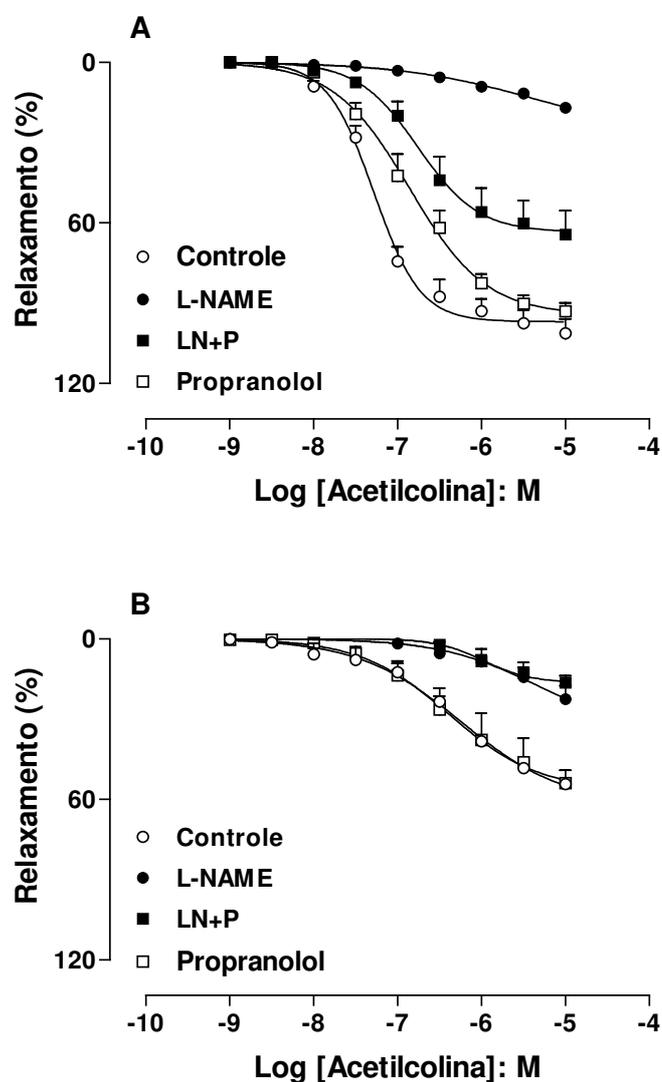


**Figura 16.** Relaxamento induzido pela acetilcolina em aorta de ratos Controles ou submetidos ao tratamento crônico com L-NAME e/ou propranolol. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão das médias para 4 – 5 experimentos.

### ***Reatividade da artéria mesentérica à acetilcolina***

A figura 17A mostra que em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com fenilefrina, o tratamento crônico com L-NAME reduziu marcadamente a resposta máxima de relaxamento induzida pela acetilcolina ( $17 \pm 1,4\%$ ) comparado com anéis de ratos Controles ( $101 \pm 5\%$ ). O tratamento concomitante com o DL( $\pm$ )-propranolol restaurou parcialmente a redução da resposta à acetilcolina no tratamento com L-NAME ( $65 \pm 9\%$ ; Figura 17A). O tratamento com o DL( $\pm$ )-propranolol individualmente não afetou o relaxamento máximo induzido pela acetilcolina ( $93 \pm 3\%$ ). A potência da acetilcolina foi significativamente reduzida nos grupos L-NAME ( $pEC_{50}$ :  $5,41 \pm 0,34$ ), LN+P ( $pEC_{50}$ :  $6,76 \pm 0,03$ ) e Propranolol ( $pEC_{50}$ :  $6,85 \pm 0,04$ ) comparados ao grupo Controle ( $pEC_{50}$ :  $7,28 \pm 0,03$ ).

Com o objetivo de investigar se a proteção exercida pelo propranolol sobre a inibição do L-NAME envolve a liberação de EDHF, realizamos experimentos contraindo-se as artérias mesentéricas com KCl (80 mM). Como esperado, na vigência de KCl (80 mM), as respostas à acetilcolina foram marcadamente reduzidas nos grupos Controle ( $54 \pm 1\%$ ) e Propranolol ( $54 \pm 5\%$ ). Entretanto, nestas condições, o tratamento com propranolol não reverteu a redução do relaxamento à acetilcolina frente ao L-NAME (L-NAME:  $23 \pm 5\%$ ; LN+P:  $17 \pm 3\%$ ; Figuras 17B). Comparado à potência da acetilcolina em tecidos pré-contraídos com fenilefrina, houve redução significativa da potência desta droga em todos os grupos (CTL:  $6,24 \pm 0,09$ ; LN:  $5,36 \pm 0,44$ ; LN+P:  $5,97 \pm 0,16$ ; PROP:  $6,38 \pm 0,05$ ).

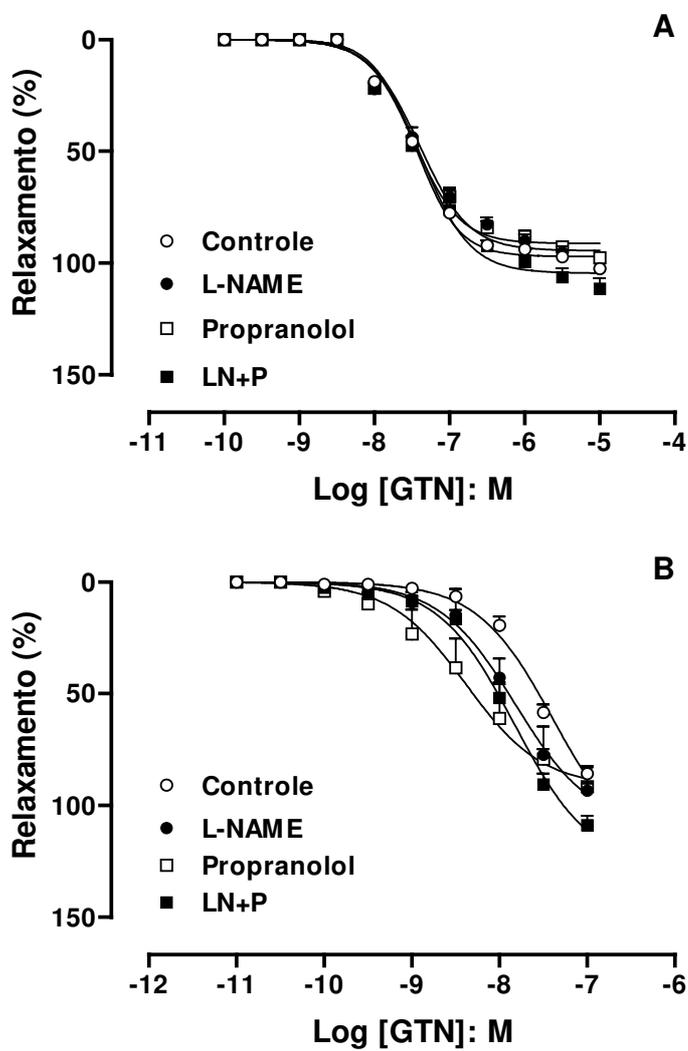


**Figura 17.** Relaxamento induzido pela acetilcolina em artéria mesentérica de animais Controles ou tratados cronicamente com L-NAME e/ou propranolol. No painel A, estão representadas as curvas concentração-efeito à acetilcolina em tecidos pré-contraídos com fenilefrina. No painel B, as curvas concentração-efeito à acetilcolina foram construídas em tecidos pré-contraídos com KCl 80 mM. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão das médias para 3 – 7 experimentos.

### ***Reatividade da aorta e da artéria mesentérica ao gliceriltrinitrato (GTN)***

A figura 18A mostra que em anéis de aorta de ratos tratados com L-NAME ( $pEC_{50}$ :  $7,40 \pm 0,08$ ), L-NAME + DL( $\pm$ )-propranolol ( $pEC_{50}$ :  $7,38 \pm 0,07$ ) e DL( $\pm$ )-propranolol ( $pEC_{50}$ :  $7,48 \pm 0,07$ ) não houve alteração da potência do GTN comparado ao grupo Controle ( $pEC_{50}$ :  $7,45 \pm 0,05$ ). A resposta máxima ao gliceriltrinitrato não foi modificada em nenhum dos tratamentos estudados (Figura 18A).

A figura 18B mostra que em artéria mesentérica houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da potência do GTN em ratos tratados com L-NAME ( $pEC_{50}$ :  $7,82 \pm 0,05$ ), L-NAME + DL( $\pm$ )-propranolol ( $pEC_{50}$ :  $7,83 \pm 0,05$ ) e DL( $\pm$ )-propranolol individualmente ( $pEC_{50}$ :  $8,38 \pm 0,06$ ), comparado ao grupo Controle ( $pEC_{50}$ :  $7,39 \pm 0,07$ ). No entanto, não houve alteração da resposta máxima ao gliceriltrinitrato em nenhum dos tratamentos estudados (Figura 18B).



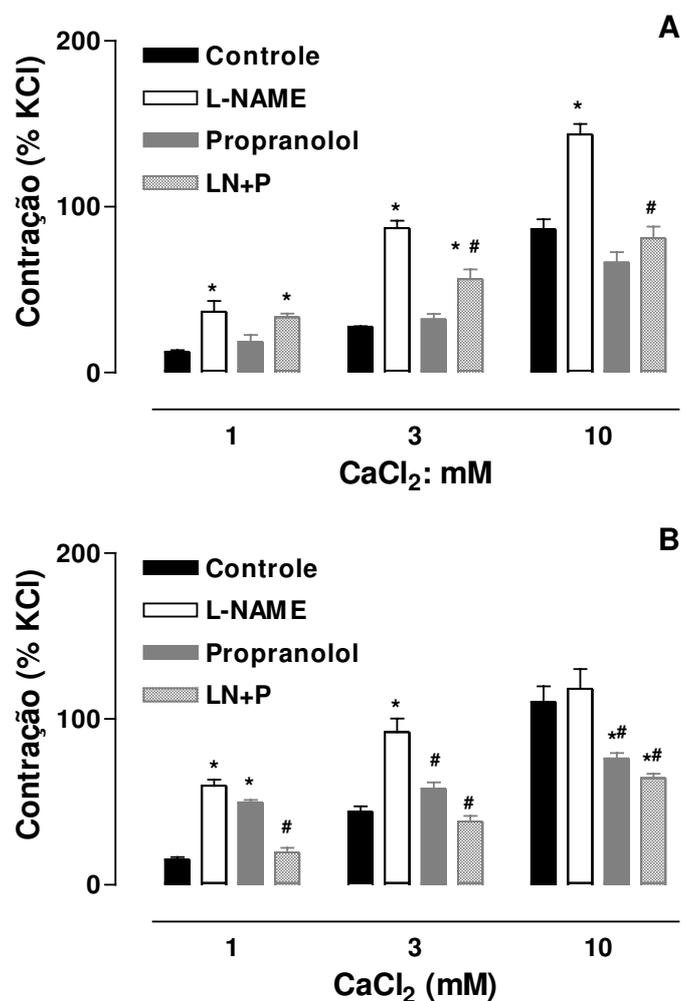
**Figura 18.** Curvas concentração-efeito ao gliceriltrinitrato (GTN) em anéis de aorta (painel A) e de artéria mesentérica (painel B) de ratos Controles ou submetidos ao tratamento crônico com L-NAME e/ou propranolol. Os dados representam as médias  $\pm$  o erro padrão das médias para 4-5 experimentos.

### ***Resposta contrátil ao CaCl<sub>2</sub>***

Curvas concentração-efeito ao CaCl<sub>2</sub> (1 – 10 mM) foram obtidas em anéis de aorta e de artéria mesentérica de ratos tratados por 4 semanas com L-NAME, L-NAME + DL(±)-propranolol e DL(±)-propranolol (Figura 19).

Em anéis de aorta (figura 19A), as respostas contráteis ao CaCl<sub>2</sub> (1, 3 e 10 mM) foram maiores nos animais tratados com L-NAME comparados ao grupo Controle. Este aumento foi prevenido pelo tratamento concomitante com o propranolol. A contração ao CaCl<sub>2</sub> em anéis de aorta dos animais tratados com propranolol individualmente não foi modificada, comparada ao grupo Controle.

Em anéis de artéria mesentérica (figura 19B) de animais tratados com L-NAME, foi observado uma potencialização da resposta contrátil ao CaCl<sub>2</sub> nas concentrações de 1 e 3 mM comparado ao grupo controle. Essa potencialização foi prevenida nos animais tratados com L-NAME + DL(±)-propranolol. Além disso, neste grupo observou-se redução significativa da resposta máxima ao CaCl<sub>2</sub>. O grupo tratado apenas com DL(±)-propranolol apresentou um aumento da resposta contrátil ao CaCl<sub>2</sub> na concentração menor (1 mM) mas mostrou um perfil de resposta similar à do grupo L-NAME + DL(±)-propranolol, onde a resposta máxima ao CaCl<sub>2</sub> foi significativamente reduzida comparada aos grupos Controle e L-NAME.

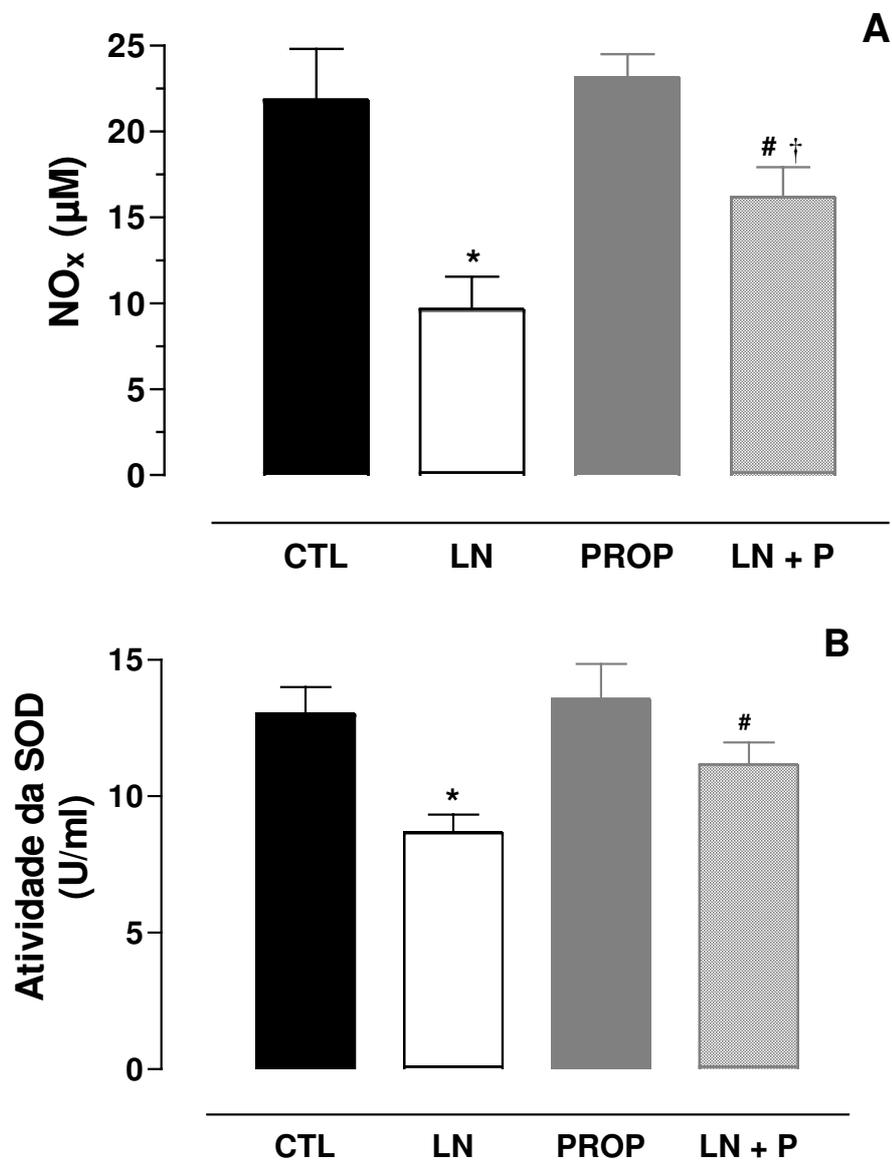


**Figura 19.** Efeito do tratamento crônico de 4 semanas com L-NAME, L-NAME + propranolol e propranolol, na contração induzida pelo CaCl<sub>2</sub> (1 – 10 mM) em anéis de aorta (painel A) e anéis de artéria mesentérica (painel B) de ratos. Os animais Controles estão representados pelas barras pretas. Dados representam as médias ± E.P.M, para 4 - 5 experimentos. \*P<0,05 comparado ao grupo controle; #P<0,05, comparado ao grupo L-NAME.

*Níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx) e atividade plasmática da superóxido dismutase (SOD)*

Os níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx) foram dosados no plasma de animais Controles e submetidos ao tratamento crônico com L-NAME, L-NAME + propranolol e propranolol. Observamos redução dos níveis plasmáticos de NOx em animais submetidos ao tratamento com L-NAME comparado ao grupo Controle. Nos animais tratados com L-NAME + propranolol, o nível plasmático de NOx aumentou significativamente em relação ao grupo L-NAME, porém significativamente reduzido quando comparado ao grupo propranolol. Não houve diferença significativa entre os níveis plasmáticos de NOx do grupo propranolol e o grupo Controle (Figura 20A).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida em plasma de animais Controles e submetidos ao tratamento crônico com L-NAME, L-NAME + propranolol e propranolol. Observamos redução da atividade da SOD no plasma de animais submetidos ao tratamento com L-NAME comparado ao grupo Controle. Nos animais tratados com L-NAME + propranolol, a atividade plasmática da SOD aumentou significativamente em relação ao grupo L-NAME. Não houve diferença significativa entre a atividade plasmática de SOD entre os grupos Propranolol e Controle (Figura 20B).



**Figura 20.** Concentração plasmática de nitrito/nitrato (NO<sub>x</sub>; painel A) e atividade plasmática da superóxido dismutase (SOD; painel B) em animais Controles (CTL) ou tratados com L-NAME (LN), propranolol (PROP) e L-NAME + propranolol (LN+P). Os dados representam as médias ± E.P.M. para 6 - 8 experimentos. \*P<0,05, comparado ao grupo Controle; <sup>#</sup>P<0,05, comparado ao grupo L-NAME; <sup>†</sup>P<0,05, comparado ao grupo propranolol.

---

---

*DISCUSSÃO*

## 4. DISCUSSÃO

### *Efeitos diretos dos antagonistas dos adrenoceptores $\beta$*

Os efeitos diretos do atenolol, metoprolol e propranolol foram avaliados em anéis de aorta e de artéria mesentérica com endotélio intacto, pré-contraídos com fenilefrina. O atenolol não apresentou resposta relaxante enquanto o metoprolol induziu um discreto relaxamento em ambas as preparações. Considerando que se trata de dois antagonistas seletivos para o adrenoceptor  $\beta_1$ , é possível que a diferença de resposta observada entre ambos resida no fato de o metoprolol ser lipossolúvel e, portanto, atravessar mais facilmente membranas celulares (Hoffman & Lefkowitz, 1996). Por outro lado, o propranolol induziu um relaxamento dependente de concentração dos anéis de aorta e de artéria mesentérica significativamente maior do que o metoprolol. Estes dados estão de acordo com estudo prévio onde o propranolol, mas não o atenolol, produziu relaxamento dependente de concentração de artérias coronárias de cães (Sakanashi & Takeo, 1983). É sabido que o propranolol e atenolol apresentam atividade idêntica quanto ao bloqueio do  $\beta$ -adrenoceptor, sendo a concentração necessária para produzir o bloqueio deste receptor da ordem de 1  $\mu$ M (Weiner, 1980). Assim, a ausência de resposta relaxante do atenolol, aliada à concentração elevada de propranolol necessária para induzir relaxamento dos vasos, sugerem que o mecanismo de ação do propranolol em aorta e artéria mesentérica não está relacionado ao bloqueio do adrenoceptor  $\beta$ .

O DL( $\pm$ )-propranolol é uma mistura racêmica de dois enantiômeros, S(-) e R(+)-propranolol, os quais possuem diferenças marcantes na farmacodinâmica (Mehvar & Brocks, 2001). Sabe-se também que a atividade  $\beta$ -bloqueadora cardíaca de antagonistas

racêmicos de adrenoceptores  $\beta$  reside nos S(-)-enantiômeros, sendo a proporção de atividade dos enantiômeros S:R propranolol de 100:1 (Barrett & Cullum, 1968). Apesar de menos potente como  $\beta$ -bloqueador, o isômero R(+) possui potência similar ao do S(-) como estabilizador de membrana (Howe & Shanks, 1966; Dohadwalla *et al.*, 1969). Assim, para verificar se o relaxamento induzido pelo propranolol em aorta e artéria mesentérica de ratos ocorre por mecanismo independente do bloqueio do adrenoceptor  $\beta$ , curvas concentração-efeito aos isômeros S(-) e R(+)-propranolol foram obtidas em ambos os vasos, com endotélio íntegro. Efeitos similares àqueles observados para o DL( $\pm$ )-propranolol foram obtidos para ambos os enantiômeros, reforçando a hipótese que o relaxamento induzido pelo propranolol, nas concentrações utilizadas, não está associado ao seu efeito  $\beta$ -bloqueador.

O relaxamento produzido por altas concentrações de propranolol poderia sugerir perda de seletividade do propranolol pelo adrenoceptor  $\beta$ , e que o relaxamento estaria ocorrendo pelo bloqueio dos adrenoceptores  $\alpha$ , uma vez que os tecidos foram pré-contraídos com fenilefrina, um agonista dos adrenoceptores  $\alpha_1$ . Assim, o relaxamento produzido pelo DL( $\pm$ )-propranolol foi também avaliado em tecidos pré-contraídos com a endotelina-1 e com o análogo do tromboxano, o U-46619. A magnitude do relaxamento produzido pelo propranolol nos tecidos pré-contraídos com endotelina-1 ou U-46619 foi similar à magnitude do relaxamento produzido nos tecidos pré-contraídos com fenilefrina, excluindo então a possibilidade de os efeitos relaxantes do propranolol estarem associados ao bloqueio do adrenoceptor  $\alpha$ .

A resposta relaxante às concentrações de 10 e/ou 30  $\mu$ M de DL( $\pm$ )-propranolol foi maior na artéria mesentérica, com endotélio intacto ou removido, em comparação à aorta,

indicando que esta diferença não reside na presença do endotélio. Sabe-se que a atividade intrínseca de uma determinada droga depende de características funcionais e estruturais dos tecidos biológicos (Kenakin, 1993). Assim, a maior sensibilidade dos anéis de artéria mesentérica ao DL( $\pm$ )-propranolol pode refletir uma maior eficiência do acoplamento estímulo-resposta ou a densidade maior de células musculares lisas neste tecido.

Para investigar a importância do endotélio e da via NO/cGMP no relaxamento induzido pelo propranolol, curvas concentração-efeito ao DL( $\pm$ ), S(-) e R(+) propranolol foram construídas em anéis de aorta e de artéria mesentérica após a remoção do endotélio, e na presença do L-NAME (inibidor da síntese de NO) ou do ODQ (inibidor da guanilil ciclase solúvel). Observamos que a remoção do endotélio, assim como a adição de L-NAME ou de ODQ, provocou uma diminuição do relaxamento nas concentrações menores dos isômeros do propranolol, em ambos os tecidos, indicando que a via do NO/GMPc está parcialmente envolvida no relaxamento induzido por este  $\beta$ -bloqueador.

A prostaciclina é um eicosanóide oriundo da via da COX capaz de relaxar o músculo liso vascular através da ativação da adenilil ciclase e consequente acúmulo de AMPc, que, por sua vez, ativa a proteína quinase A e a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático. Isto aumenta a captação do  $\text{Ca}^{2+}$  do meio intracelular para o interior do retículo sarcoplasmático, levando ao relaxamento do músculo liso vascular (Smith, 1986). Em nosso estudo, nos anéis de aorta com endotélio íntegro ou removido, a adição de indometacina, um inibidor inespecífico da COX, não afetou o relaxamento induzido pelo DL( $\pm$ ), S(-) e R(+)-propranolol, excluindo o envolvimento da prostaciclina e de outros metabólitos do ácido araquidônico nestas respostas.

Para confirmar a hipótese que o propranolol relaxa anéis de aorta e de artéria mesentérica de ratos por mecanismo parcialmente dependente do endotélio, quantificamos os níveis teciduais de AMPc e GMPc em ambas as preparações, com endotélio íntegro ou removido, após estimulação com propranolol. Observamos que em tecidos providos de endotélio, o propranolol aumentou os níveis de GMPc, não modificando os níveis desse segundo mensageiro nos tecidos cujo endotélio foi removido. Os níveis de AMPc não foram alterados em nenhuma das preparações. Esses dados excluem a possibilidade do propranolol estar agindo como um agonista parcial e promovendo o relaxamento da aorta e da artéria mesentérica por mecanismo associado a ativação do adrenoceptor  $\beta$ . Por outro lado, reforçam o envolvimento da via NO/GMPc no relaxamento induzido pelo propranolol. No entanto, o mecanismo pelo qual o propranolol aumenta os níveis de GMPc nos tecidos com endotélio intacto ainda não nos é claro. Sabe-se que alguns antagonistas de adrenoceptores  $\beta$  como celiprolol, nebivolol e nipradilol relaxam a musculatura lisa vascular através da doação de NO ou estimulando a liberação deste mediador nas células endoteliais (Uchida *et al.*, 1993; Hayashi *et al.*, 1997; Noda *et al.*, 2001; Ignarro *et al.*, 2002). O propranolol também é conhecido por apresentar uma propriedade antioxidante, que poderia prevenir a reação do NO com radicais livres, aumentando a biodisponibilidade deste mediador (Mak & Weglicki, 1988; Khaper *et al.*, 1997). No entanto, a hipótese que o propranolol possa estar doando NO é descartada, uma vez que o aumento dos níveis de GMPc não ocorreu em tecidos desprovidos de endotélio. Em resumo, embora seja claro o envolvimento da via do NO/GMPc no relaxamento induzido pelo propranolol, este não parece representar o principal mecanismo responsável pelo efeito relaxante, uma vez que o relaxamento

promovido por 30  $\mu\text{M}$  de propranolol é apenas parcialmente diminuído e a resposta máxima não é afetada após a inibição desta via.

O tonus vascular é controlado pela  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , sendo que a contração das células do músculo liso vascular inicia com o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Isto pode ocorrer pelo aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  do espaço extracelular através dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor, ou pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques do retículo sarcoplasmático. Neste estudo, investigamos a influência do DL( $\pm$ )-propranolol na contração induzida pelo influxo do  $\text{CaCl}_2$  do meio extracelular para o meio intracelular, em anéis de aorta e de artéria mesentérica com endotélio íntegro ou removido. Nossos resultados mostraram que, em ambas preparações, a contração induzida pelo  $\text{CaCl}_2$  em vasos desprovidos de endotélio é significativamente maior do que naqueles com endotélio íntegro, sugerindo que a liberação basal de NO endotelial modula a resposta contrátil ao  $\text{CaCl}_2$ . Em decorrência da ausência de NO nos tecidos desprovidos de endotélio, pode ter havido também aumento da sensibilidade dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$ , provocado pela menor ativação da fosfatase da miosina. Esta enzima, quando ativada, é responsável pela desfosforilação da cadeia leve da miosina, que leva ao relaxamento e o NO favorece a ativação da fosfatase da miosina (Webb, 2003). Ao avaliar estas contrações na presença de 3 diferentes concentrações do DL( $\pm$ )-propranolol, observamos que houve a inibição da contração induzida pelo  $\text{CaCl}_2$  em ambas preparações, tanto em anéis com endotélio intacto como em anéis com endotélio removido. O principal mecanismo de entrada de cálcio para o meio intracelular na musculatura lisa vascular se dá através da ativação da subunidade alfa dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L. Procuramos então verificar se a redução do influxo de cálcio pelo propranolol ocorreu através do bloqueio destes canais. Para

tanto, realizamos curvas de contração ao  $\text{CaCl}_2$  em anéis de aorta e de artéria mesentérica com endotélio removido, na presença concomitante de propranolol e nifedipina (bloqueador clássico dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L). Nossos resultados mostraram que, quando adicionados concomitantemente, a contração induzida pelo cálcio é abolida em ambas as preparações. Isto parece descartar a possibilidade de que o propranolol esteja atuando nos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, ou na subunidade alfa deste canal.

A perda da liberação basal de NO, através da remoção do endotélio ou da inibição da síntese de NO, assim como a redução dos níveis de GMPc pela inibição da guanilil ciclase solúvel, leva ao aumento da sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Wu *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997). Assim, acreditamos que o propranolol, assim como os seus isômeros, induzem relaxamento de anéis de aorta e de artéria mesentérica, por um mecanismo ligado ao bloqueio do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . O fenômeno de sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$  poderia explicar o menor relaxamento induzido pelo propranolol (na concentração de 30  $\mu\text{M}$ ) em tecidos com endotélio removido ou tratados com L-NAME ou ODQ. Ou seja, na vigência da inibição da via NO/GMPc, ocorreria um aumento das correntes de  $\text{Ca}^{2+}$ , dificultando o bloqueio dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  pelo propranolol, reduzindo portanto o relaxamento induzido por este  $\beta$ -bloqueador.

Em resumo, os resultados deste estudo *in vitro* mostraram que o propranolol promoveu relaxamento de aorta e de artéria mesentérica por mecanismo que envolve a via NO/GMPc e bloqueio do influxo de cálcio.

### ***Tratamento crônico com L-NAME***

O tratamento crônico com o inibidor da síntese de NO, L-NAME, leva à hipertensão arterial e alterações morfológicas cardiovasculares (Moreno-Jr *et al.*, 1996) sendo tais alterações reduzidas ou prevenidas pelo tratamento concomitante com propranolol (Pacca *et al.*, 2002). No presente estudo, confirmamos que o tratamento com propranolol reduz significativamente a hipertensão arterial induzida pela administração crônica de L-NAME. É sabido que a ativação dos adrenoreceptores  $\beta$  cardíacos leva ao aumento da frequência cardíaca e, assim, o uso prolongado do propranolol deveria teoricamente levar à bradicardia (Gulati & Liard, 1979; Tan & Summers, 1995). Foi demonstrado que o tratamento crônico com L-NAME leva à taquicardia e que a administração aguda do propranolol reduz estes efeitos numa magnitude maior que nos animais controles (Souza *et al.*, 2001). Entretanto, a frequência cardíaca não foi afetada nos grupos tratados cronicamente com L-NAME e/ou propranolol. No nosso estudo, a frequência cardíaca foi avaliada em animais anestesiados, sendo possível que as alterações na frequência cardíaca tenham sido mascaradas pelos efeitos do anestésico utilizado (pentobarbital sódico).

A reatividade vascular dos animais tratados cronicamente com L-NAME e propranolol foi avaliada *in vitro*, através da realização de curvas concentração-efeito à acetilcolina em anéis de aorta e de artéria mesentérica. Observamos que o relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta e de artéria mesentérica foi marcadamente reduzido nos animais tratados com L-NAME. Entretanto, apenas na artéria mesentérica, tal redução foi parcialmente restaurada pelo tratamento com propranolol. Vários estudos mostram que o relaxamento induzido pelo EDHF é reduzido nas doenças que levam à

disfunção endotelial, como hipertensão arterial e diabetes. Na artéria mesentérica de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), há redução de 50% da hiperpolarização induzida pelo EDHF (Fujii *et al.*, 1992), enquanto na artéria caudal destes ratos, a redução da hiperpolarização é de 28% (Sandow *et al.*, 2003). A hiperpolarização induzida pelo EDHF também é reduzida no leito mesentérico e na circulação renal de ratos diabéticos (Fukao *et al.*, 1997; Wigg *et al.*, 2001; Makino *et al.*, 2000; De Vriese *et al.*, 2000), assim como em artéria renal de ratos obesos (Lau & Reid, 2000). Levando-se em consideração que o relaxamento induzido pela acetilcolina é abolido em artéria mesentérica de animais tratados cronicamente com L-NAME e que o relaxamento é parcialmente restaurado pelo propranolol, é de se supor que o tratamento prolongado com este  $\beta$ -bloqueador reduza a disfunção endotelial. Assim, o relaxamento residual observado nestes grupos seria mediado por fatores derivados do endotélio diferentes do NO. Para investigar a contribuição do EDHF, curvas concentração-efeito à acetilcolina foram realizadas em tecidos pré-contraídos com KCl (80 mM). Nestes tecidos, houve redução significativa da resposta à acetilcolina em artéria mesentérica de animais controles, confirmando o envolvimento do EDHF no relaxamento induzido pela acetilcolina nesta preparação (Nagao *et al.*, 1992; Garland & McPherson, 1992). Além disso, a “proteção” exercida pelo propranolol na redução dos relaxamentos à acetilcolina em ratos tratados concomitantemente com L-NAME deixa de ser visualizada, reforçando a idéia que, na vigência do bloqueio do NO, o tratamento prolongado com o propranolol preserva a função endotelial, associada à prostaciclina e/ou EDHF.

O relaxamento induzido pelo GTN também foi avaliado em aorta e artéria mesentérica dos animais submetidos ao tratamento crônico com L-NAME e/ou

propranolol. O relaxamento provocado pelo GTN em anéis de aorta não foi diferente em nenhum dos grupos estudados. No entanto, em anéis de artéria mesentérica, o tratamento crônico com L-NAME e/ou propranolol provocou um aumento da potência do GTN, comparado ao grupo controle. O GTN age diretamente na guanilil ciclase solúvel, ativando-a e promovendo o relaxamento. Nos animais tratados com L-NAME, concomitante ou não com propranolol, a ausência da liberação basal de NO poderia tornar a guanilil ciclase solúvel mais sensível ao NO exógeno, explicando assim o aumento da potência do GTN. Estudo prévio mostrou que o relaxamento induzido pelo GTN não é afetado pela remoção do endotélio (Adami *et al.*, 1996). Outro estudo mostrou que o relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio é potencializado em camundongos nocautes para eNOS, sugerindo maior sensibilização da guanilil ciclase solúvel ao NO exógeno (Brandes *et al.*, 2000). Já nos animais tratados com propranolol individualmente, o deslocamento da curva do GTN pode ser explicado pelo bloqueio crônico do influxo de cálcio para o meio intracelular, resultando em menor sensibilidade dos canais para cálcio, facilitando os mecanismos de relaxamento. Apesar disso, não sabemos porque a resposta obtida na aorta é diferente daquela obtida na artéria mesentérica, mas, possivelmente, variações estruturais, morfológicas e funcionais entre os dois vasos possam explicar tais discrepâncias.

Avaliamos também o efeito do tratamento crônico com L-NAME e propranolol na resposta contrátil ao  $\text{CaCl}_2$  em anéis de aorta e de artéria mesentérica. Em ambas preparações, observamos um aumento significativo da contração do  $\text{CaCl}_2$  em tecidos de animais tratados com L-NAME. A Rho-A é uma pequena proteína G regulatória envolvida na ativação da Rho-Kinase, que é a enzima que fosforila a subunidade MYPT1

da fosfatase da miosina, inibindo a atividade catalítica desta subunidade (Kimura *et al.*, 1996; Hartshorne *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 1999). Kataoka *et al.* (2002) demonstraram que a deficiência crônica de NO aumenta a translocação da proteína Rho para a membrana, favorecendo o estado contrátil da célula. Isto poderia explicar o aumento da contração ao CaCl<sub>2</sub> observado no grupo tratado com L-NAME, sugerindo o aumento da sensibilidade dos canais para cálcio neste grupo. Entretanto, foi demonstrado que o tratamento com drogas inibidoras da atividade da Rho-kinase (entre elas o fasudil, hidroxifasudil e o Y-27632) inibe o remodelamento cardiovascular induzido pelo bloqueio prolongado de NO com o L-NAME (Ikegaki *et al.*, 2001). No nosso estudo, o tratamento concomitante com propranolol reverteu este aumento de contração ao CaCl<sub>2</sub>, bem como o tratamento individual com propranolol reduziu significativamente a contração máxima do CaCl<sub>2</sub>. Estes dados sugerem que o tratamento com L-NAME leva ao aumento da sensibilidade dos canais para cálcio e que o propranolol, ao promover o bloqueio destes canais, diminui a sensibilidade dos mesmos, como discutido anteriormente.

Nos animais tratados cronicamente com L-NAME e/ou propranolol, avaliamos os níveis plasmáticos de nitrito/nitrato, e a atividade plasmática da superóxido dismutase. Observamos que nos animais tratados com L-NAME, há redução, em torno de 50%, dos níveis de nitrito/nitrato, sendo esta redução parcialmente inibida pelo tratamento concomitante com propranolol. A atividade plasmática da SOD também diminuiu nos animais tratados com L-NAME, sendo também parcialmente inibida pelo propranolol. Estes efeitos podem estar relacionados aos efeitos antioxidantes do propranolol, uma vez que alguns estudos demonstraram que o propranolol apresenta atividade antioxidante relacionados à: (1) diminuição da geração dos produtos da peroxidação lipídica em

episódios de isquemia/reperfusão; (2) proteção contra a arterosclerose em animais tratados com dieta hipercolesterolêmica; e (3) redução da atividade peroxidativa da membrana, diminuindo a formação de radicais livres (Chobanian *et al.*, 1985; Mak & Weglicki, 1988; Khaper *et al.*, 1997). Estes efeitos podem estar associados ao principal metabólito do propranolol, o 4-hidroxi-propranolol, que apresenta atividade antioxidante 4 a 8 vezes maior que a vitamina E e 100 vezes maior que o propranolol (Mak & Weglicki, 2004).

Em conclusão, os resultados deste estudo *ex vivo* mostraram que o propranolol previne o aumento da pressão arterial induzida pelo L-NAME. Em artéria mesentérica, o propranolol restaura parcialmente o relaxamento reduzido à acetilcolina observado em animais tratados com L-NAME. Observamos também que, tanto em aorta como em artéria mesentérica, a resposta contrátil ao CaCl<sub>2</sub> aumentada em animais tratados com L-NAME é revertida nos tecidos dos animais tratados com propranolol. Além disso, a redução dos níveis plasmáticos de nitrito/nitrato e da atividade plasmática da SOD observada nos animais tratados com L-NAME também foi parcialmente restaurada nos animais tratados com propranolol.

---

---

*CONCLUSÃO*

## 5. CONCLUSÃO

### 1. Estudos *in vitro*

- O DL- R- e S-propranolol relaxam anéis de aorta e de artéria mesentérica, sendo este efeito parcialmente reduzido pela remoção do endotélio ou pela adição de L-NAME (ou ODQ);
- O DL( $\pm$ )-propranolol eleva os níveis de GMPc (mas não AMPc) em vasos com endotélio íntegro;
- O propranolol é capaz de reduzir significativamente as contrações induzidas pelo CaCl<sub>2</sub> em anéis de aorta e de artéria mesentérica, sendo este efeito potencializado pela nifedipina;

### 2. Estudos *ex vivo*

- O relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta e de artéria mesentérica é marcadamente reduzido pelo L-NAME crônico. Em artéria mesentérica (mas não em aorta), esta redução é significativamente atenuada pelo tratamento com propranolol em tecidos pré-contraídos com fenilefrina, mas não em tecidos pré-contraídas com KCl (80 mM);
- As contrações induzidas pelo CaCl<sub>2</sub> em anéis de aorta e de artéria mesentérica são significativamente reduzidas pelo tratamento com propranolol;
- O tratamento com propranolol atenuou significativamente a redução dos níveis plasmáticos de nitrito/nitrato e da atividade da SOD nos animais que receberam L-NAME.

3. Em conclusão, nossos resultados sugerem que os efeitos relaxantes do propranolol são independentes do bloqueio do adrenoceptor  $\beta$  e dependentes da via NO/GMPc e do bloqueio do influxo de cálcio. Estes efeitos do propranolol podem estar contribuindo para os efeitos antihipertensivos deste composto, melhorando a reatividade vascular, principalmente da artéria mesentérica.

---

---

***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM WT, IYENGAR S. (2004) Practical considerations for switching beta-blockers in heart failure patients. *Rev Cardiovasc Med.* 2004; **5**: S36-44.

ABU-SOUD HM, YOHO LL, STUEHR DJ (1994) Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. *J. Biol. Chem.*, **269**: 32047-32050.

ADAMI A, CUZZOLIN L, MINUZ P, CRIVELLENTI F, LECHI A, BENONI G. (1996) Vasodilating properties of a new non-steroidal anti-inflammatory drug, nitroflurbiprofen, on rat aortic rings. *Pharmacol. Res.*, **33**: 239-44.

ADEAGBO AS, TRIGGLE CR. (1993) Varying extracellular [K<sup>+</sup>]: a functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **21**: 423-9.

AHLQUIST, RP. (1948) A study of adrenergic receptors. *Am. J. Physiol.*, **153**: 586-600.

ARUMANAYAGAM M, CHAN S, TONG S, SANDERSON JE. (2001) Antioxidant properties of carvedilol and metoprolol in heart failure: a double-blind randomized controlled trial. *J Cardiovasc Pharmacol.* **37**: 48-54.

BARRETT AM, CULLUM VA. (1968) Lack of inter-action between propranolol and mebanazine. *J Pharm Pharmacol.*, **20**: 911-5.

BEGONHA R, MOURA D, GUIMARAES S. (1995) Vascular beta-adrenoceptor-mediated relaxation and the tone of the tissue in canine arteries. *J. Pharm. Pharmacol.*, **47**: 510-3.

- BENY JL, BRUNET PC. (1988) Neither nitric oxide nor nitroglycerin accounts for all the characteristics of endothelially mediated vasodilatation of pig coronary arteries. *Blood Vessels*, **25**: 308-11.
- BERTHELSON S, PETTINGER WA. (1977) A functional basis for classification of  $\alpha$ -adrenergic receptors. *Life Sci.*, **1**: 171-183.
- BIRNBAUMER L. (1992) G proteins and the modulation of potassium channels. In: *Potassium Channel Modulators*. Ed. By A.H.Weston e J.C.Hamilton. pp. 44-71, Blackell Scientific Publications, New York.
- BLANKESTEIJN WM, THIEN T (1993) Effect of NG-monomethyl-L-arginine on the beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat mesenteric resistance arteries. *Life Sci*, **52**: PL135- PL139.
- BLATTER LA, WIER WG. (1994) Nitric oxide decreases  $[Ca^{2+}]_i$  in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell Calcium*, **15**: 122-31.
- BOLTON TB, LANG RJ, TAKEWAKI T. (1984) Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J. Physiol.*, **351**: 549-72.
- BOUCHER JL, MOALI C, TENU JP (1999) Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol. Life Sci.*, **55**: 1015-1028.
- BRANDES RP, KIM D, SCHMITZ-WINNENTHAL FH, AMIDI M, GODECKE A, MULSCH A, BUSSE R. (2000) Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: role of soluble guanylyl cyclase. *Hypertension*, **35**: 231-6.

BRAWLEY L, SHAW AM, MACDONALD A. (2000) Role of endothelium/nitric oxide in atypical beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, **398**: 285-96.

BRAYDEN JE, NELSON MT. (1992) Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science*, **256**: 532-5.

BRODDE, OE. (1993) Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol. Ther.*, **60**: 405-30.

BROEDERS MA, DOEVENDANS PA, BEKKERS BC, BRONSAER R, VAN GORSEL E, HEEMSKERK JW, EGBRINK MG, VAN BREDA E, RENEMAN RS, VAN DER ZEE R (2000) Nebivolol: a third-generation beta-blocker that augments vascular nitric oxide release: endothelial beta(2)-adrenergic receptor-mediated nitric oxide production. *Circulation*. **102**: 677- 84.

BUECHLER WA, NAKANE M, MURAD F (1991) Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **174**: 351-357.

BYLUND DB (1985) Heterogeneity of alpha-2 adrenergic receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **22**: 835-843.

BYLUND DB, EIKENBERG DC, HIEBLE JP, LANGER SZ, LEFKOWITZ RJ, MINNEMAN KP, MOLINOFF PB, RUFFOLO RR JR, TRENDELENBURG U (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.*, **46**: 121-136.

BYLUND DB, RAY-PRENGER C (1989) Alpha-2A and alpha-2B adrenergic receptor subtypes: attenuation of cyclic AMP production in cell lines containing only one receptor subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **251**: 640-644.

CHANG HY (1997) Role of nitric oxide in vasodilator response induced by salbutamol in rat diaphragmatic microcirculation. *Am. J. Physiol.*, **272**: H2173-H2179.

CHATAIGNEAU T, FELETOU M, DUHAULT J, VANHOUTTE PM. (1998a) Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Br. J. Pharmacol.*, **123**: 574-80.

CHATAIGNEAU T, FELETOU M, THOLLON C, VILLENEUVE N, VILAINE JP, DUHAULT J, VANHOUTTE PM. (1998b) Cannabinoid CB1 receptor and endothelium-dependent hyperpolarization in guinea-pig carotid, rat mesenteric and porcine coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **123**: 968-74.

CHOBANIAN AV, BRECHER P, CHAN C. (1985) Effects of propranolol on atherogenesis in the cholesterol-fed rabbit. *Circ Res.*, **56**: 755-62.

CLAPP LH, GURNEY AM. (1991) Modulation of calcium movements by nitroprusside in isolated vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.*, **418**: 462-70.

CLARK BJ, BERTHOLET A. (1983) Effects of pindolol on vascular smooth muscle. *Gen. Pharmacol.*, **14**: 117-9.

COATES J, JAHN U & WEETMAN DF (1982) The existence of a new subtype of alpha-adrenoceptor on the rat anococcygeus is revealed by SGD 101/75 and phenoxybenzamine. *Br. J. Pharmacol.*, **75**: 549-552.

COCKCROFT JR, CHOWIENCZYK PJ, RITTER JM. (1995) Hyperlipidaemia, hypertension; and coronary heart disease. *Lancet.*, **345**: 862-3.

COHEN LG, ZIEMANN U, CHEN R. (1999) Mechanism, functional relevance and modulation of plasticity in the human central nervous system. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **51**: 174-182.

COHEN RA, SHEPHERD JT, VANHOUTTE PM. (1983) 5-Hydroxytryptamine can mediate endothelium-dependent relaxation of coronary arteries. *Am. J. Physiol.*, **245**: 1077-1080.

COHEN RA, SHEPHERD JT, VANHOUTTE PM. (1984) Neurogenic cholinergic prejunctional inhibition of sympathetic beta adrenergic relaxation in the canine coronary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **229**: 417-421.

COLLIER J, VALLANCE P (1989) Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**: 427-431.

CORRIU C, FELETOU M, CANET E, VANHOUTTE PM. (1996) Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.*, **119**: 959-64.

COSTA MR, CASNELLIE JE, CATTERALL WA (1982) Selective phosphorylation of the alpha subunit of the sodium channel by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **257**: 7918-7921.

COWAN CL, COHEN RA. (1991) Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. *Am. J. Physiol.*, **261**: H830-5.

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

DAUGHERTY A, FRAYN KN, REDFERN WS, WOODWARD B. (1986) The role of catecholamines in the production of ischaemia-induced ventricular arrhythmias in the rat in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol.*, **87**: 265-77.

DE VRIESE AS, VAN DE VOORDE J, BLOM HJ, VANHOUTTE PM, VERBEKE M, LAMEIRE NH. (2000) The impaired renal vasodilator response attributed to endothelium-derived hyperpolarizing factor in streptozotocin--induced diabetic rats is restored by 5-methyltetrahydrofolate. *Diabetologia*, **43**: 1116-25.

DELPY E, COSTE H, LE MONNIER DE GOUVILLE AC. (1996) Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br. J. Pharmacol.*, **119**: 471-478.

DOGGRELL SA. (1990) Relaxant and beta 2-adrenoceptor blocking activities of (+/-)-, (+)- and (-)-pindolol on the rat isolated aorta. *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**: 444-6.

DOGGRELL SA. (1999) The membrane stabilizing and  $\beta_1$ -adrenoceptor blocking activity of (+)- and (-)-propranolol on the rat left atria. *Gen. Pharmacol.*, **21**: 677-80.

DOHADWALLA AN, FREEDBERG AS, VAUGHAN WILLIAMS EM. (1969) The relevance of beta-receptor blockade to ouabain-induced cardiac arrhythmias. *Br J Pharmacol.*, **36**: 257-67.

DUMAS M, DUMAS JP, BARDOU M, ROCHETTE L, ADVENIER C, GIUDICELLI JF. (1998) Influence of beta-adrenoceptor agonists on the pulmonary circulation. Effects of a beta3-adrenoceptor antagonist, SR 59230A. *Eur. J. Pharmacol.*, **348**: 223-8.

EDVINSSON L, OWMAN C. (1974) Pharmacological characterization of adrenergic alpha and beta receptors mediating the vasomotor responses of cerebral arteries in vitro. *Circ. Res.*, **35**: 835-49.

EMORINE L, BLIN N, STROSBURG AD. (1994) The human  $\beta_3$ -adrenoceptor: the search for a physiological function. *Pharmacol. Rev.*, **48**: 532-556.

EMORINE LJ, MARULLO S, BRIEND-SUTREN MM, PATEY G, TATE K, DELAVIER-KLUTCHKO C, STROSBURG AD (1989) Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science*, **245**: 1118-1121.

ERLEY CM, REBMANN S, STROBEL U, SCHMIDT T, WEHRMANN M, OSSWALD H, RISLER T. (1995) Effects of antihypertensive therapy on blood pressure and renal function in rats with hypertension due to chronic blockade of nitric oxide synthesis. *Exp. Nephrol.*, **3**: 293-9.

EXTON JH. (1985) Mechanisms involved in alpha-adrenergic phenomena. *Am. J. Physiol.*, **248**: E663-668.

FELDMAN PL, GRIFFITH OW, HONG H & STUEHR DJ (1993) Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. *J. Med. Chem.*, **36**: 491-496.

FENG J, ITO M, NISHIKAWA M, OKINAKA T, ISAKA N, HARTSHORNE DJ, NAKANO T. (1999) Dephosphorylation of distinct sites on the 20 kDa myosin light chain by smooth muscle myosin phosphatase. *FEBS Lett.*, **448**: 101-4.

FERRO A, QUEEN LR, PRIEST RM, XU B, RITTER JM, POSTON L & WARD JP (1999) Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, **126**: 1872-1880.

FEUERSTEIN GZ, HAMBURGER SA, SMITH EF 3RD, BRIL A, RUFFOLO RR JR. (1992) Myocardial protection with carvedilol. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **19**: S138-41.

FEUERSTEIN GZ, RUFFOLO RR JR. (1995) Carvedilol, a novel multiple action antihypertensive agent with antioxidant activity and the potential for myocardial and vascular protection. *Eur. Heart J.*, **16**: 38-42.

FLAVAHAN NA, VANHOUTTE PM (1986) Alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor: response coupling in canine saphenous and femoral veins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **238**: 131-138.

FORD APDW, WILLIAMS TJ, BLUE DR, CLARKE DE. (1994)  $\alpha_1$ -adrenoceptor classification: sharpening Occam's razor. *Trends Pharmacol. Sci.*, **15**: 167-170.

FÖRSTERMANN U, BOISSEL JP, KLEINERT H (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.*, **12**: 773-790.

FÖRSTERMANN U, CLOSS EI, POLLOCK JS, NAKANE M, SCHWARZ P, GATH I & KLEINERT H (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, **23**: 1121-1131.

FÖRSTERMANN U, KLEINERT H (1995) Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **352**: 351-364.

FRIELLE T, COLLINS S, DANIEL KW, CARON MG, LEFKOWITZ RJ & KOBILKA BK (1987) Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 7920-7924.

FUJII K, TOMINAGA M, OHMORI S, KOBAYASHI K, KOGA T, TAKATA Y, FUJISHIMA M. (1992) Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.*, **70**: 660-9.

FUKAO M, HATTORI Y, KANNO M, SAKUMA I, KITABATAKE A. (1997) Evidence against a role of cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolites in endothelium-dependent hyperpolarization by acetylcholine in rat isolated mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.*, **120**: 439-46.

FUKUTO JM, CHAUDHURI G (1995) Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **35**: 165-194.

GAO YS, NAGAO T, BOND RA, JANSSENS WJ, VANHOUTTE PM. (1991) Nebivolol induces endothelium-dependent relaxations of canine coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17**: 964-9.

- GARCIA-PASCUAL A, LABADIA A, JIMENEZ E, COSTA G. (1995) Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in bovine oviductal arteries: mediation by nitric oxide and changes in apamin-sensitive K<sup>+</sup> conductance. *Br. J. Pharmacol.*, **115**: 1221-30.
- GARLAND JG, MCPHERSON GA. (1992) Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.*, **105**: 429-35.
- GARTHWAITE J (1995) Neural nitric oxide signalling. *Trends Neurosci.*, **18**: 51-52.
- GELLAI M, DEWOLF R, RUFFOLO RR JR. (1990) Effect of carvedilol on renal hemodynamics and renal excretory function in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology*, **41**: 200-6.
- GERZER R, RADANY EW, GARBERS DL (1982) The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**: 678-686.
- GRACE GC, MACDONALD OS, DUSTING GJ. (1988) Cyclic nucleotide interactions involved in endothelium-dependent dilatation in rat aortic rings. *Eur. J. Pharmacol.*, **148**: 17-24.
- GRAVES J & POSTON L (1993) Beta-adrenoceptor agonist mediated relaxation of rat isolated resistance arteries: a role for the endothelium and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, **108**: 631-637.
- GRAY DW, MARSHALL I. (1992) Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent beta-adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **107**: 684-90.

GREENBERG B. (2004) Nonselective versus selective beta-blockers in the management of chronic heart failure: clinical implications of the carvedilol or metoprolol: European Trial. *Rev Cardiovasc Med.*,**5**: S10-7.

GUIMARAES S, MOURA D. (2001) Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol. Rev.*, **53**: 319-56.

GULATI OP, LIARD JF. (1979) Effects of propranolol in chronic two-kidney Goldblatt hypertension in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **240**: 285-93.

HAN C, ABEL PW, MINNEMAN KP. (1987) Alpha<sub>1</sub> adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca<sup>2+</sup> in smooth muscle. *Nature*, **329**: 333-335.

HAN C, LI J, MINNEMAN KP. (1990) Subtypes of Alpha<sub>1</sub> adrenoceptors in rat blood vessels. *Eur. J. Pharmacol.*, **190**: 97-104.

HARTENECK C, KOESLING D, SOLING A, SCHULTZ G, BOHME E (1990) Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett.*, **272**: 221-223.

HARTSHORNE DJ, ITO M, ERDODI F. (1998) Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil.*, **19**: 325-41.

HARTSHORNE DJ. Biochemistry of the contractile process in smooth muscle. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York, NY: Raven Press, 1987: 432-482

HAYASHI T, YAMADA K, ESAKI T, MUTO E, IGUCHI A. (1997) The beta adrenoreceptor antagonist, nipradilol, preserves the endothelial nitric oxide response in atherosclerotic vessels of rabbit. *Life Sci.*, **61**: 1379-87.

HECKER M, BARA AT, BAUERSACHS J, BUSSE R. (1994) Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J. Physiol.*, **481**: 407-14.

HEMPELMANN RG, ZIEGLER A (1993) Endothelium-dependent noradrenaline-induced relaxation of rat isolated cerebral arteries: pharmacological characterization of receptor subtypes involved. *Br J Pharmacol*, **110**: 1321-1328.

HIRAWA N, UEHARA Y, NUMABE A, IKEDA T, YAGI S, SUGIMOTO T, ISHII M. (1991) Inhibitory effects of beta adrenoceptor antagonist, atenolol, on the thromboxane system in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **43**: 93-8.

HOBBS AJ (1997) Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**: 484-491.

HOFFMAN BB, LEFKOWITZ RJ (1996) Catecolaminas, Drogas Simpatomiméticas e Antagonistas dos Receptores Adrenérgicos. In: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. editado por Gilman AG, Goodman LS & Gilman A. 9 ed. p.175. Editora McGraw Hill: Rio de Janeiro, 1996.

HOWE R, SHANKS RG. (1966) Optical isomers of propranolol. *Nature*, **210**: 1336-8.

HOWELL RE, ALBELDA SM, DAISE ML, LEVINE EM. (1988) Characterization of beta-adrenergic receptors in cultured human and bovine endothelial cells. *J. Appl. Physiol.*, **65**: 1251-7.

IGNARRO LJ, BYRNS RE, TRINH K, SISODIA M, BUGA GM. (2002) Nebivolol: a selective beta(1)-adrenergic receptor antagonist that relaxes vascular smooth muscle by nitric oxide- and cyclic GMP-dependent mechanisms. *Nitric Oxide*. **7**: 75-82.

IGNARRO LJ, DEGNAN JN, BARICOS WH, KADOWITZ PJ, WOLIN MS (1982) Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim. Biophys. Acta*, **718**: 49-59.

IGNARRO LJ, MURAD F (eds), *Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications*. Advances in Pharmacology, Volume 34, pp. 1-516, Academic Press, 1995.

IKEGAKI I, HATTORI T, YAMAGUCHI T, SASAKI Y, SATOH SI, ASANO T, SHIMOKAWA H. (2001) Involvement of Rho-kinase in vascular remodeling caused by long-term inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Eur J Pharmacol.*, **427**: 69-75.

ILLIANO S, NAGAO T, VANHOUTTE PM. (1992) Calmidazolium, a calmodulin inhibitor, inhibits endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the canine coronary artery. *Br. J. Pharmacol.*, **107**: 387-92.

JAYACHANDRAN M, HAYASHI T, SUMI D, THAKUR NK, KANO H, IGNARRO LJ, IGUCHI A. (2001) Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase through  $\beta_2$ -

adrenergic receptor: the role of a  $\beta$ -blocker with NO-releasing action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**: 589-94.

JOHNSON RD, MINNEMAN KP (1987) Differentiation of alpha 1-adrenergic receptors linked to phosphatidylinositol turnover and cyclic AMP accumulation in rat brain. *Mol. Pharmacol.*, **31**: 239-246.

KAHÖNEN M, MAKYNEN H, ARVOLA P, PORSTI I. (1994) Enhancement of arterial relaxation by long-term atenolol treatment in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.*, **112**: 925-33.

KAHÖNEN M, MAKYNEN H, WU X, ARVOLA P, PEKKI A, PORSTI I. (1996) Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates arterial constrictor responses in experimental hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **277**:1701-9

KAMATA K, MIYATA N, KASUYA Y (1989) Involvement of endothelial cells in relaxation and contraction responses of the aorta to isoproterenol in naïve and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **249**: 890-894.

KATAOKA C, EGASHIRA K, INOUE S, TAKEMOTO M, NI W, KOYANAGI M, KITAMOTO S, USUI M, KAIBUCHI K, SHIMOKAWA H, TAKESHITA A. (2002) Important role of Rho-kinase in the pathogenesis of cardiovascular inflammation and remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension*, **39**: 245-50.

KAUMANN AJ, MOLENAAR P (1997) Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **355**: 667-681.

KAUMANN AJ, PREITNER F, SARSERO D, MOLENAAR P, REVELLI JP & GIACOBINO JP (1998) (-)-CGP 12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative beta 4-adrenoceptors in both wild-type and beta 3-adrenoceptor knockout mice. *Mol. Pharmacol.*, **53**: 670-675.

KENAKIN TP. *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction*, 2<sup>nd</sup> edn. Raven Press, New York. 1993.

KERWIN JF JR, LANCASTER JR JR, FELDMAN PL (1995) Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J. Med. Chem.*, **38**: 4343-4362.

KHAPER N, RIGATTO C, SENEVIRATNE C, LI T, SINGAL PK. Chronic treatment with propranolol induces antioxidant changes and protects against ischemia-reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **29**: 3335-44.

KIMURA K, ITO M, AMANO M, CHIHARA K, FUKATA Y, NAKAFUKU M, YAMAMORI B, FENG J, NAKANO T, OKAWA K, IWAMATSU A, KAIBUCHI K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, **273**: 245-8.

KNOWLES RG, MONCADA S (1994) Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem. J.*, **298**: 249-258.

KOBILKA BK, DIXON RA, FRIELLE T, DOHLMAN HG, BOLANOWSKI MA, SIGAL IS, YANG-FENG TL, FRANCKE U, CARON MG, LEFKOWITZ RJ (1987) cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with

that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 46-50.

KOESLING D, BOHME E, SCHULTZ G (1991) Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J.*, **5**: 2785-2791.

KONISH M, SU C. (1983) Role of endothelium in dilatator response of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension*, **5**: 881-886.

KUBOTA Y, NOMURA M, KAMM KE, MUMBY MC, STULL JT. (1992) GTP gamma S-dependent regulation of smooth muscle contractile elements. *Am J Physiol.*, **262**: C405-10.

KUROSAKI K, IKEDA U, MAEDA Y, SHIMADA K. (2000) Carvedilol stimulates nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **32**: 333-9.

LAGAUD GJ, RANDRIAMBOAVONJY V, ROUL G, STOCLET JC, ANDRIANTSITOHAINA R. (1999) Mechanism of Ca<sup>2+</sup> release and entry during contraction elicited by norepinephrine in rat resistance arteries. *Am J Physiol.*, **276**: H300-8.

LANDS AM, ARNOLD A, MCAULIFF JP, LUDUENA FP & BROWN TG JR (1967) Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, **214**: 597-598.

LANGER SZ (1974) History and nomenclature of alpha1-adrenoceptors. *Eur Urol.*, **36** Suppl 1: 2-6.

LEE MR, LI L, KITAZAWA T. (1997) Cyclic GMP causes Ca<sup>2+</sup> desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem.*, **272**: 5063-8.

LUCAS KA, PITARI GM, KAZEROUNIAN S, RUIZ-STEWART I, PARK J, SCHULZ S, CHEPENIK KP & WALDMAN SA (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.*, **52**: 375-414.

LYSKO PG, LYSKO KA, WEBB CL, FEUERSTEIN G. (1992) Neuroprotective effects of carvedilol, a new antihypertensive, at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neurosci. Lett.*, **148**: 34-8.

MACDONALD A, MCLEAN M, MACAULAY L, SHAW AM. (1999) Effects of propranolol and L-NAME on beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat carotid artery. *J. Auton. Pharmacol.*, **19**: 145-9.

MACDONALD PS, DUBBIN PN, DUSTING GJ. (1987)  $\beta$ -adrenoceptors on endothelial cells do not influence release of relaxing factor in dog coronary arteries. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **14**: 525-534.

MacGRATH J, WILSON V. (1988)  $\alpha$ -adrenoceptor subclassification classical and response-related methods: same or different answers. *Trends Pharmacol. Sci.*, **9**: 16-18.

MAK IT, WEGLIICKI WB. (1988) Protective effect of  $\beta$ -blocking agents against free radical-mediated sarcolemmal lipid peroxidation. *Circ Res.*, **63**: 262-266.

MAK IT, WEGLIICKI WB. (2004) Potent antioxidant properties of 4-hydroxyl-propranolol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **308**: 85-90.

MAKINO A, OHUCHI K, KAMATA K. (2000) Mechanisms underlying the attenuation of endothelium-dependent vasodilatation in the mesenteric arterial bed of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Br. J. Pharmacol.*, **130**: 549-56.

MARANO G, PALAZZESI S, FADDA A, VERGARI A, FERRARI AU. (2002) Attenuation of aortic banding-induced cardiac hypertrophy by propranolol is independent of beta-adrenoceptor blockade. *J Hypertens.*, **20**: 763-9.

MARLETTA MA (1988) Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem. Res. Toxicol.*, **1**: 249-257.

MARLETTA MA (1993) Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.*, **268**: 12231-12234.

MARLETTA MA, YOON PS, IYENGAR R, LEAF CD & WISHNOK JS (1988) Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, **27**: 8706-8711.

MATSUOKA A, STUEHR DJ, OLSON JS, CLARK P & IKEDA-SAITO M (1994) L-arginine and calmodulin regulation of the heme iron reactivity in neuronal nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **269**: 20335-20339.

MAURICE DH, CRANKSHAW D, HASLAM RJ. (1991) Synergistic actions of nitrovasodilators and isoprenaline on rat aortic smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **192**: 235-42.

MAURICE DH, HASLAM RJ. (1990) Nitroprusside enhances isoprenaline-induced increases in cAMP in rat aortic smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **191**: 471-5.

- MAYER B, ANDREW P (1998) Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **358**: 127-133.
- MEDGETT IC, LANGER SZ (1984) Heterogeneity of smooth muscle alpha adrenoceptors in rat tail artery in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **229**: 823-830.
- MEHVAR R, BROCKS DR. (2001) Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans. *J Pharm Pharm Sci.*, **4**: 185-200.
- MISSIAEN L, WUYTACK F, RAEYMAEKERS L, DE SMEDT H, DROOGMANS G, DECLERCK I, CASTEELS R. (1991) Ca<sup>2+</sup> extrusion across plasma membrane and Ca<sup>2+</sup> uptake by intracellular stores. *Pharmacol Ther.* **50**: 191-232.
- MIYATA N, YAMAURA H, TSUCHIDA K, OTOMO S. (1992) Effects of CD-349 and 8-BrcGMP on isoproterenol-induced relaxation in rabbit aorta precontracted with endothelin-1. *Am. J. Physiol.*, **263**: H1113-8.
- MOLENAAR P, MALTA E, JONES CR, BUXTON BF, SUMMERS RJ (1998) Autoradiographic localization and function of beta-adrenoceptors on the human internal mammary artery and saphenous vein. *Br. J. Pharmacol.*, **95**: 225-233.
- MONCADA S, PALMER RMJ & HIGGS EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**: 109-142.
- MORENO H JR, METZE K, BENTO AC, ANTUNES E, ZATZ R, DE NUCCI G. (1996) Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. *Basic Res. Cardiol.*, **91**(3): 248-55.

- MOSTAGHIM R, MADDOX YT, RAMWELL PW. (1986) Endothelial potentiation of relaxation response to beta adrenoceptor blocking agents. *J Pharmacol Exp Ther.* **239**: 797-801.
- MUGGE A, LOPEZ JA, PIEGORS DJ, BREESE KR, HEISTAD DD. (1991) Acetylcholine-induced vasodilatation in rabbit hindlimb in vivo is not inhibited by analogues of L-arginine. *Am. J. Physiol.*, **260**: H242-7.
- MURPHY ME, BRAYDEN JE. (1995) Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J. Physiol.*, **486**: 47-58.
- NAGAO T, ILLIANO S, VANHOUTTE PM. (1992) Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am. J. Physiol.*, **263**: H1090-4.
- NAGAO T, VANHOUTTE PM. (1992a) Characterization of endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the porcine coronary artery. *Br. J. Pharmacol.*, **107**: 1102-7.
- NAGAO T, VANHOUTTE PM. (1992b) Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J. Physiol.*, **445** :355-67.
- NAHORSKI SR, BARNETT DB, CHEUNG YD (1985) alpha-Adrenoceptor-effector coupling: affinity states or heterogeneity of the alpha 2-adrenoceptor? *Clin. Sci.*, **68**: 39s-42s.
- NAKHOSTINE N, LAURENT CE, NADEAU R, CARDINAL R, LAMONTAGNE D. (1995) Hypoxia-induced release of prostaglandins: mechanisms and sources of

production in coronary resistance vessels of the isolated rabbit heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**: 1742-9.

NELSON MT, QUAYLE JM. (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, **268**: C799-822.

NICHOLS AJ, GELLAI M, RUFFOLO RR JR. (1991) Studies on the mechanism of arterial vasodilation produced by the novel antihypertensive agent, carvedilol. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **5**: 25-38.

NILSSON H, JENSEN PE, MULVANY MJ. (1994) Minor role for direct adrenoceptor-mediated calcium entry in rat mesenteric small arteries. *J. Vasc. Res.*, **31**: 314-21.

NODA K, OKA M, MA FH, KITAZAWA S, UKAI Y, TODA N. (2001) Release of endothelial nitric oxide in coronary arteries by celiprolol, a beta(1)-adrenoceptor antagonist: possible clinical relevance. *Eur. J. Pharmacol.*, **415**: 209-16.

O'DONNELL SR, WANSTALL JC. (1985) Responses to the beta 2-selective agonist procaterol of vascular and atrial preparations with different functional beta-adrenoceptor populations. *Br. J. Pharmacol.*, **84**: 227-35.

OHLSTEIN EH, DOUGLAS SA, SUNG CP, YUE TL, LOUDEN C, ARLETH A, POSTE G, RUFFOLO RR JR, FEUERSTEIN GZ. (1993) Carvedilol, a cardiovascular drug, prevents vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and neointimal formation following vascular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **90**: 6189-93.

OHLSTEIN EH, WOOD KS, IGNARRO LJ (1982) Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme

activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch. Biochem. Biophys.*, **218**: 187-198.

ONARAN HO, COSTA T, RODBARD D (1993) Beta gamma subunits of guanine nucleotide-binding proteins and regulation of spontaneous receptor activity: thermodynamic model for the interaction between receptors and guanine nucleotide-binding protein subunits. *Mol. Pharmacol.*, **43**: 245-256.

ORIOWO MA. (1994) Atypical beta-adrenoceptor in the rat isolated common carotid artery. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 699-702.

ORIOWO MA. (1995) Different atypical beta-adrenoceptors mediate isoprenaline-induced relaxation in vascular and non-vascular smooth muscles. *Life Sci.*, **56**: PL269-75.

PACCA SR, DE AZEVEDO AP, DE OLIVEIRA CF, DE LUCA IM, DE NUCCI G, ANTUNES E. (2002) Attenuation of hypertension, cardiomyocyte hypertrophy, and myocardial fibrosis by beta-adrenoceptor blockers in rats under long-term blockade of nitric oxide synthesis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **39**: 201-7.

PARENT R, AL-OBAIDI M, LAVALLÉE M (1993) Nitric oxide formation contributes to  $\beta$ -adrenergic dilation of resistance coronary vessels in conscious dogs. *Circ. Res.*, **73**: 241-251.

PARENTI A, FILIPPI S, AMERINI S, GRANGER HJ, FAZZINI A, LEDDA F. (2000) Inositol phosphate metabolism and nitric-oxide synthase activity in endothelial cells are involved in the vasorelaxant activity of nebivolol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**: 698-703.

PETRASH AC, BYLUND DB (1986) Alpha-2 adrenergic receptor subtypes indicated by [3H]yohimbine binding in human brain. *Life Sci.*, **38**: 2129-2137.

PRIEST RM, HUCKS D, WARD JP. (1997) Noradrenaline, beta-adrenoceptor mediated vasorelaxation and nitric oxide in large and small pulmonary arteries of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **122**: 1375-84.

PUDDU P, PUDDU GM, CRAVERO E, MUSCARI A. (2004) Different effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction. *Acta Cardiol.*, **59**: 555-64.

RAPOPORT RM, MURAD F (1983) Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.*, **52**: 352-357.

RAYMOND JR, HNATOWICH M, LEFKOWITZ RJ, CARON MG. (1990) Models for regulation of signal transduction processes. *Hypertension*, **15**: 119-131.

REGAN JW, KOBILKA TS, YANG-FENG TL, CARON MG, LEFKOWITZ RJ, KOBILKA BK. (1988) Cloning and expression of kidney cDNA for an  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 6301-6305.

RIBEIRO MO, ANTUNES E, DE NUCCI G, LOVISOLO SM, ZATZ R. (1992) Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension*, **20**: 298-303.

RICHARD V, TANNER FC, TSCHUDI M, LUSCHER TF. (1990) Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin, and clonidine in coronary arteries. *Am. J. Physiol.*, **259**: H1433-9.

ROBISON GA, BUTCHER RW, SUTHERLAND EW. (1967) Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **139**: 703-723.

- ROKUTANDA M, ARAKI S, SAKANASHI M. (1983) A pharmacological investigation on a possible calcium antagonistic action of propranolol. *Arch Int Pharmacodyn Ther.*, **262**: 99-108.
- RUBANYI G, VANHOUTTE PM (1985) Endothelium-removal decreases relaxations of canine coronary arteries caused by beta-adrenergic agonists and adenosine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **7**: 139-144.
- RUFFOLO RR JR, GELLAI M, HIEBLE JP, WILLETTE RN, NICHOLS AJ. (1990) The pharmacology of carvedilol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **38**: S82-8.
- SAKANASHI M, TAKEO S. (1983) Characterization of propranolol-induced relaxation of coronary artery. *Jpn J Pharmacol.*, **33**: 603-10.
- SANDOW SL, BRAMICH NJ, BANDI HP, RUMMERY NM, HILL CE. (2003) Structure, function, and endothelium-derived hyperpolarizing factor in the caudal artery of the SHR and WKY rat. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**: 822-8.
- SATAKE N, SHIBATA M, SHIBATA S. (1997) Endothelium- and cytochrome P-450-dependent relaxation induced by isoproterenol in rat aortic rings. *Eur. J. Pharmacol.*, **319**: 37-41.
- SCHULZ S, YUEN OS, GARBERS DL (1991) The expanding family of guanylyl cyclases. *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**: 116-120.
- SHAFIEI M, MAHMOUDIAN M. (1999) Atypical  $\beta$ -adrenoceptors of rat thoracic aorta. *Gen. Pharmacol.*, **32**: 557-562.

- SHIMOKAWA H, FLAVAHAN NA, LORENZ RR, VANHOUTTE PM. (1988) Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *Br. J. Pharmacol.*, **95**: 1197-203.
- SIMARD JM, LI X, TEWARI K. (1998) Increase in functional Ca<sup>2+</sup> channels in cerebral smooth muscle with renal hypertension. *Circ Res.*, **82**: 1330-7.
- SIMARD JM, LI X. (2000) Functional integrity of endothelium determines Ca<sup>2+</sup> channel availability in smooth muscle: involvement of nitric oxide. *Pflugers Arch*, **439**: 752-8.
- SMITH WL. (1986) Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Annu Rev Physiol.*, **48**: 251-62.
- SOMLYO AP, SOMLYO AV. (1994) Smooth muscle: excitation-contraction coupling, contractile regulation, and the cross-bridge cycle. *Alcohol Clin Exp Res.*, **18**: 138-43.
- SOMLYO AP, SOMLYO AV. (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.*, **522**: 177-85.
- SOOCH S, MARSHALL I. (1995) An atypical  $\beta$ -adrenoceptor mediates relaxation of the rat isolated mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 22P
- SOOCH S, MARSHALL I. (1996) Evidence for atypical  $\beta$ -adrenoceptor in rat vasculature. *Br. J. Pharmacol.*, **117**: 261P
- SOOCH S, MARSHALL I. (1997) Atypical beta-adrenoceptors in the rat vasculature. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **812**: 211-2.

- SOUZA HC, BALLEJO G, SALGADO MC, DA SILVA VJ, SALGADO HC. (2001) Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-NAME hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*, **280**: H844-50.
- STARKE K. (1981)  $\alpha_1$ -adrenoceptor subclassification. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **88**: 199-236.
- STEINBERG SF, JAFFE EA, BILEZIKIAN JP. (1984) Endothelial cells contain beta adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **325**: 310-3.
- STONE JR, MARLETTA MA. (1994) Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, **33**: 5636-40.
- STONE JR, SANDS RH, DUNHAM WR, MARLETTA MA. (1995) Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinate nitrosyl-heme complex on soluble guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**: 572-7.
- TAGAYA E, TAMAOKI J, TAKEMURA H, ISONO K, NAGAI A. (1999) Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cyclic adenosine monophosphate-dependent pathway. *Lung*, **177**: 321-32.
- TAKEO S, ELMOSELHI AB, GOEL R, SENTEX E, WANG J, DHALLA NS. (2000) Attenuation of changes in sarcoplasmic reticular gene expression in cardiac hypertrophy by propranolol and verapamil. *Mol Cell Biochem.*, **213**: 111-8.

- TAMAOKI J, TAGAYA E, ISONO K, NAGAI A. (1998) Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cAMP-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248**: 722-7.
- TAN YY, SUMMERS RJ. (1995)  $\beta$ -Adrenoceptor regulation in rat heart, lung and skin after chronic treatment with (–)-terbutolol or (–)-propranolol. *J. Auton. Pharmacol.*, **15**: 421-36.
- TAYLOR SH. (1988a) Celiprolol in hypertension. *Am Heart J.*, **116**: 1426-34.
- TAYLOR SH. (1988b) Celiprolol and the heart. *Am. J. Cardiol.* **61**: 34C-40C.
- TEWARI K, SIMARD JM. (1997) Sodium nitroprusside and cGMP decrease Ca<sup>2+</sup> channel availability in basilar artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch.*, **433**: 304-11.
- TOYOSHIMA H, NASA Y, HASHIZUME Y, KOSEKI Y, ISAYAMA Y, KOHSAKA Y, YAMADA T, TAKEO S. (1998) Modulation of cAMP-mediated vasorelaxation by endothelial nitric oxide and basal cGMP in vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **32**: 543-551.
- TRAYLOR TG, SHARMA VS (1992) Why NO? *Biochemistry*, **31**: 2847-2849.
- TROCHU JN, LEBLAIS V, RAUTUREAU Y, BEVERELLI F, LE MAREC H, BERDEAUX A, GAUTHIER C. (1999) Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **128**: 69-76.
- UCHIDA W, SHIBASAKI K, ASANO M, TAKENAKA T. (1993) Antianginal effects of YM-16151-4 in various experimental angina models. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **21**: 701-8.

VAN DE VOORDE J, VANHEEL B, LEUSEN I. (1992) Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in aorta from control and renal hypertensive rats. *Circ. Res.*, **70**: 1-8.

VAN DEN MEIRACKER AH, MAN IN'T VELD AJ, BOOMSMA F, FISCHBERG DJ, MOLINOFF PB, SCHALEKAMP MA. (1989) Hemodynamic and  $\beta$ -adrenergic receptor adaptations during long-term  $\beta$ -adrenoceptor blockade. Studies with acebutolol, atenolol, pindolol, and propranolol in hypertensive patients. *Circulation*, **80**: 903-14.

VAN DER ZYPP A, KANG KB, MAJEWSKI H. (2000) Age-related involvement of the endothelium in beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, **397**: 129-38.

WALDMAN SA, MURAD F (1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.*, **39**: 163-196.

WEBB RC (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol. Educ.*, **27**: 201-6.

WEDEL B, HUMBERT P, HARTENECK C, FOERSTER J, MALKEWITZ J, BOHME E, SCHULTZ G & KOESLING D (1994) Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 2592-2596.

WEINER N. Drugs that inhibit adrenergic nerves and block adrenergic receptors. *In* The Pharmacological Basis of Therapeutics, editado por Gilman AG, Goodman LS & Gilman A. 6 ed. p.176-210. Editora McMillan: Nova Iorque, 1980.

- WIGG SJ, TARE M, TONTA MA, O'BRIEN RC, MEREDITH IT, PARKINGTON HC. (2001) Comparison of effects of diabetes mellitus on an EDHF-dependent and an EDHF-independent artery. *Am. J. Physiol.*, **281**: H232-40.
- WU X, SOMLYO AV, SOMLYO AP. (1996) Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate. *Biochem Biophys Res Commun.*, **220**: 658-63.
- XIAO RP, AVDONIN P, XHOW YY, CHENG H, AKHTER SA, ESCHENHANGEN T, LEFKOWITZ RJ, KOCH WJ, LKATTA EG. (1999) Coupling of beta-2 adrenoceptor to G proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ. Res.*, **84**: 43-52.
- XIAO YF, MCARDLE JJ. (1994) Elevated density and altered pharmacologic properties of myocardial calcium current of the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens.*, **12**: 783-90.
- XU B, LI J, GAO L, FERRO A (2000) Nitric oxide-dependent vasodilatation of rabbit femoral artery by beta(2)-adrenergic stimulation or cyclic AMP elevation in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, **129**: 969-974.
- YUE TL, MCKENNA PJ, RUFFOLO RR JR, FEUERSTEIN G. (1992) Carvedilol, a new beta-adrenoceptor antagonist and vasodilator antihypertensive drug, inhibits superoxide release from human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.*, **214**: 277-80.
- ZYGMUNT PM, GRUNDEMAR L, HOGESTATT ED. (1994) Endothelium-dependent relaxation resistant to N omega-nitro-L-arginine in the rat hepatic artery and aorta. *Acta Physiol. Scand.*, **152**: 107-14.

---

---

*ANEXO*



Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 764-1, sobre "**MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANTAGONISTAS DE ADRENOCEPTORES BETA NA REATIVIDADE VASCULAR EM RATOS**" sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Edson Antunes / Fernanda Bruschi Marinho Privero** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 17 de fevereiro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 764-1, entitled "**MECHANISMS UNDERLYING THE RELAXING EFFECTS OF BETA ADRENOCEPTOR ANTAGONISTS IN RAT MESENTERIC ARTERY AND AORTA**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 17, 2005.

Campinas, 17 de fevereiro de 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP