

Rodrigo Azevedo Loiola

**INFLUÊNCIA DA DELEÇÃO GENÉTICA DE RECEPTORES DE
CININAS NO METABOLISMO DE ÓXIDO NÍTRICO VASCULAR**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

São Paulo

2011

Rodrigo Azevedo Loiola

**INFLUÊNCIA DA DELEÇÃO GENÉTICA DE RECEPTORES DE
CININAS NO METABOLISMO DE ÓXIDO NÍTRICO VASCULAR**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Bosco Pesquero

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Liliam Fernandes

São Paulo

2011

Loiola, Rodrigo Azevedo.

Influência da deleção genética de receptores de cininas no metabolismo de óxido nítrico vascular – São Paulo, 2011.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

Título em inglês: Influence of targeted deletion of kinins receptors in the vascular nitric oxide metabolism.

1. Cininas; 2. Receptor B₁; 3. Óxido Nítrico; 4. Endotélio vascular; 5. Camundongos nocautes do receptor B₁.

Rodrigo Azevedo Loiola

**INFLUÊNCIA DA DELEÇÃO GENÉTICA DE RECEPTORES DE CININAS NO
METABOLISMO DE ÓXIDO NÍTRICO**

Presidente da banca: Prof. Dr. João Bosco Pesquero

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Poliselli Farsky

Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves

Prof^a. Dr^a. Teresa Feres

Prof^a. Dr^a. Viviane Louise Andree Nouailhetas

Prof. Dr. (suplente) Richard Landgraf

Prof. Dr. (suplente) Cristóforo Scavone

Aprovada em: / /

***À Profª. Drª. Liliam Fernandes, pela amizade
e por todos os ensinamentos que orientam minha caminhada.***

***Ao Prof. Dr. João Bosco Pequero,
pela oportunidade oferecida e pela confiança irrestrita.***

À minha esposa Juliana, pelo carinho, paciência e compreensão.

***Aos meus pais, Maria Aparecida e Gilberto,
e irmãos, Deborah e Rafael, pelo apoio incondicional.***

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos aos funcionários e colegas do Departamento de Biofísica, especialmente aos amigos Carolina Parise, Eliete Rodrigues, Jamile Bravo, Rafael Filippelli, Regiane Sabatini, Renan Martins, Lauro Thiago Turaça e Válber Teixeira pelos ensinamentos e companheirismo.

Agradecimentos a Elizabeth Naomi, Alessandro Guimarães, Élton Dias, Emanuel, Felipe Reis, Ivan Hariton, Valéria Brito, Eduardo Spitti Resende e Nelson Mora pela colaboração na realização deste trabalho.

À Universidade Federal de São Paulo, especialmente ao Departamento de Biofísica, pela oportunidade e condições concedidas para a realização do trabalho.

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para realização do trabalho.

*“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos
mantemos fiéis a nós mesmos”*

Friedrich Nietzsche

Resumo

A ativação de receptores B₁ de cininas no endotélio vascular desencadeia vias de sinalização que resultam na elevação do Ca⁺² intracelular e ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), seguido por produção de NO e vasodilatação. Embora a indução do receptor B₁ e sua função durante a inflamação tenha sido abordada por diversos estudos, a importância de receptores B₁ na homeostase vascular em condições fisiológicas não está totalmente elucidada. Para esclarecer essa questão, o presente estudo analisou a função endotelial e a produção de NO em camundongos nocaute do receptor B₁ (B₁^{-/-}) e selvagens (WT). O leito arteriolar mesentérico foi perfundido por solução Krebs e respostas vasculares para Acetil-colina (ACh), nitroprussiato de sódio (SNP) e norepinefrina (NE) foram analisadas por um sistema de aquisição de dados. Níveis plasmáticos de NO (µmol/L) foram analisados por detecção dos derivados nitritos/nitratos através de método de quimioluminescência e a produção vascular de NO foi avaliada em cortes histológicos de arteríolas mesentéricas incubadas com DAF-2 DA, um marcador fluorescente de NO (unidades arbitrárias, u.a.). A atividade da NOS (pmol/mg.min) foi mensurada através da conversão bioquímica de L-[³H]arginina para L-[³H]citrulina em homogenatos de vasos mesentéricos na presença de substrato e co-fatores. Células endoteliais primárias foram incubadas com DAF-2 DA e as imagens obtidas em microscópio confocal foram analisadas por densitometria óptica (u.a.). Células foram estimuladas com ACh [1 mmol/L] na presença ou ausência de L-arginina, o substrato da NOS, ou tetrahidrobiopterina (BH₄), co-fator da NOS, ou ácido ascórbico, composto antioxidante. Produção de ânion superóxido (u.a.) foi avaliada em células endoteliais incubadas com di-hidroetidina, um marcador fluorescente de ânion superóxido, na presença ou ausência de BH₄ ou ácido ascórbico. Arteríolas mesentéricas de B₁^{-/-} exibiram severo comprometimento da vasodilatação mediada por ACh, sem alterações na resposta ao NPS e NE. Os níveis circulantes de NO foram consideravelmente reduzidos em B₁^{-/-} (49,6 ± 10,5*; n=6) vs WT (141,9 ± 17,3; n=6), acompanhado por redução da produção basal de NO em arteríolas mesentéricas de B₁^{-/-} (0,16 ± 0,03*; n=6) quando comparado à WT (0,58 ± 0,08; n=4). A atividade da NOS foi elevada em amostras de B₁^{-/-} (3,4 ± 0,58*; n=4) em comparação a WT (1,9 ± 0,05; n=5). A produção de NO mediada por ACh foi significativamente reduzida em células endoteliais de B₁^{-/-} (35,8 ± 3,1*; n=4) quando comparado a células de WT (66,9 ± 3,2; n=4). A produção de NO em células endoteliais de B₁^{-/-} foi revertida por incubação com BH₄ (54,3 ± 1,7; n=4) e ácido ascórbico (101,8 ± 6,0; n=4), mas não por L-arginina, enquanto incubação de células endoteliais de WT com BH₄, ácido ascórbico ou L-arginina não teve efeito. A produção elevada de ânion superóxido em células endoteliais de B₁^{-/-} (77,1 ± 2,5*; n=4) quando comparado à WT (29,3 ± 6,9; n=4) foi revertida pela incubação com ácido ascórbico (35,3 ± 6,4; n=3). O severo comprometimento da vasodilatação mediada pelo endotélio acompanhado por redução da biodisponibilidade de NO, apesar do aumento da atividade da NOS, sugere a exacerbação da inativação de NO em endotélio de B₁^{-/-}. A produção elevada de ânion superóxido em endotélio de B₁^{-/-} provavelmente é responsável pela exacerbação da inativação de NO nestes animais. Adicionalmente, a inativação de BH₄ por peroxinitrito pode acarretar em desacoplamento da NOS e produção de anion superoxidado pela enzima.

Abstract

Activation of B₁ receptor in the vascular endothelium triggers diverse signaling pathways that results in elevation of intracellular Ca²⁺ and Nitric Oxide Synthase (NOS) activation, followed by NO production and vasodilation. Although much has been investigated about the B₁-induction and functionality during inflammation, the importance of B₁ subtype in normal vessels remains unclear. To clarify this question, the present study analyzed endothelial function and endothelial NO generation in B₁ receptor knockout (B₁^{-/-}) and Wild Type (WT) mice. Mesenteric arteriolar bed was perfused with Krebs solution and vascular responses to Acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (SNP) and norepinephrine (NE) were evaluated by a data acquisition system. Plasmatic NO levels (μmol/L) were analyzed by NO derivatives nitrate and nitrite using NO Analyzer (NOA^{TM280}, Sievers Instruments) and vascular NO generation was assessed in mesenteric arterioles slices using DAF -2 DA, a fluorescent cell permeable dye for NO (arbitrary units, a.u.). NOS activity (pmol/mg.min) was measured by the biochemical conversion of L-[³H] arginine to L-[³H] citrulline in homogenates of mesenteric vessels in the presence of optimal levels of substrate and co-factors. Primary endothelial cells were incubated with DAF-2 DA and images obtained in a confocal microscope were analyzed by optic densitometry (a.u.). Cells were stimulated with ACh [1 mmol/L] in presence or absence of the NOS substrate L-arginine, or the co-factor tetrahydrobiopterin (BH₄), or the antioxidant compound ascorbic acid. Production of superoxide anion (a.u.) was assessed in endothelial cells incubated with dihydroethidine, a fluorescent cell permeable dye for superoxide anion, in the presence or absence of BH₄ or ascorbic acid. Mesenteric arterioles from B₁^{-/-} exhibited a severe impairment of ACh-vasodilation for all tested doses, with no changes in the response to SNP and NE. Circulating NO was markedly decreased in B₁^{-/-} (49.6 ± 10.5*; n=6) vs WT (141.9 ± 17.3; n=6), accompanied by reduced basal NO release in mesenteric arterioles from B₁^{-/-} (0.16 ± 0.03*; n=6) when compared to WT (0.58 ± 0.08; n=4). NOS activity was elevated in mesenteric homogenates from B₁^{-/-} (3.4 ± 0.58*; n=4) in comparison to WT (1.9 ± 0.05; n=5). ACh-induced NO release was markedly reduced in primary cultured endothelial cells from B₁^{-/-} (35.8 ± 3.1*; n=4) in comparison to WT cells (66.9 ± 3.2; n=4). NO release in endothelial cells from B₁^{-/-} was reversed by incubation with BH₄ (54.3 ± 1.7; n=4) and ascorbic acid (101.8 ± 6.0; n=4), but not by L-arginine, while incubation of endothelial cells from WT with BH₄, ascorbic acid or L-arginine had no effect. Elevated production of superoxide anion in endothelial cells from B₁^{-/-} (77,1 ± 2,5*; n=4) in comparison to WT (29,3 ± 6,9; n=4) was reversed by incubation with ascorbic acid (35,3 ± 6,4; n=3). The severe impairment in the endothelial-mediated vasodilation accompanied by decreased NO bioavailability, despite the augmented NOS activity, strongly indicates an exacerbation of NO inactivation. Reduced NO availability may be preceded by exacerbation of NO inactivation by superoxide anion, which can leads to inactivation of BH₄ in vascular endothelium, resulting in NOS uncoupling and NOS derived production of superoxide anion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Sistema de formação de cininas.....	02
Figura 02. Receptores de cininas e vias de sinalização.....	06
Figura 03. Genotipagem de animais WT e B ₁ ^{-/-}	14
Figura 04. Explante pulmonar e células endoteliais primárias.....	19
Figura 05. Marcação de células endoteliais com Ulex europaeus.....	20
Figura 06. Marcação de células endoteliais com anticorpo anti-vWF.....	21
Figura 07. Expressão gênica de vWF e ECA em células endoteliais.....	22
Figura 08. Efeito de NE em arteríolas mesentéricas.....	25
Figura 09. Efeito de ACh e NPS em arteríolas mesentéricas.....	26
Figura 10. Níveis plasmáticos de NO.....	27
Figura 11. Produção de NO em arteríolas mesentéricas.....	27
Figura 12. Produção basal de NO em arteríolas mesentéricas.....	28
Figura 13. Atividade da NOS em leito vascular mesentérico.....	29
Figura 14. Fluorescência emitida por células incubadas com DAF-2 DA.....	30
Figura 15. Produção endotelial de NO após estímulo com ACh.....	32
Figura 16. Produção endotelial de NO na presença de L-arginina.....	33
Figura 17. Produção endotelial de NO na presença de BH ₄	34
Figura 18. Produção endotelial de NO na presença de ácido ascórbico.....	35
Figura 19. Geração endotelial de ânion superóxido.....	35
Figura 20. Geração endotelial de ânion superóxido.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – acetilcolina
Ang II – angiotensina II
B₁^{-/-} - camundongos nocaute do receptor B₁
B₂^{-/-} - camundongos nocaute do receptor B₂
BH₄ – tetrahidrobiopterina
BK – Bradicinina
CaM – calmodulina
CAT-1 - transportador catiônico de aminoácidos
cGMP - 3',5'- monofosfato de guanosina cíclico
DAF-2 DA - diacetato de 4,5 diaminofluoresceína
DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol
DBK – des-Arg⁹-BK
DKD – des-Arg¹⁰-BK
ECA – enzima conversora de angiotensina
FAD - flavina adenina dinucleotídeo
FMN - flavina mononucleotídeo
HK – cininogênio de alto peso molecular
IL – interleucina
IP₃ - 1,4,5 – trifosfato de inositol
KD – Calidina
LK – cininogênio de baixo peso molecular
LPS – lipopolisacarídeo bacteriano
NE – norepinefrina
NF- κB - Fator Nuclear-κB
NO – Óxido Nítrico
NOS – Óxido Nítrico Sintase
NPS – nitroprussiato de sódio
PLA₂ – fosfolipase A₂
vWF – fator de Von Willebrand
WT – camundongos Wild Type (C57Bl/6)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
2. Objetivo.....	12
3. Métodos.....	13
3.1 Animais.....	13
3.2 Expressão de receptores B ₁ em vasos mesentéricos de WT e B ₁ ^{-/-}	13
3.3 Reatividade em leito vascular mesentérico.....	15
3.4 Mensuração dos níveis plasmáticos de NO.....	16
3.5 Produção basal de NO em arteríolas mesentéricas.....	16
3.6 Detecção da atividade da NOS.....	17
3.7 Cultura primária de células endoteliais.....	18
3.8 Produção de NO em cultura primária de células endoteliais.....	22
3.9 Geração de ânion superóxido em células endoteliais.....	23
3.10 Drogas e reagentes.....	24
3.11 Análise estatística.....	24
4. Resultados.....	25
4.1 Reatividade em leito vascular mesentérico.....	25
4.2 Níveis plasmáticos de NO.....	26
4.3 Produção basal de NO em arteríolas mesentéricas.....	27
4.4 Atividade da NOS em vasos mesentéricos.....	28
4.5 Produção de NO em cultura primária de células endoteliais.....	29
4.6 Geração de ânion superóxido em células endoteliais.....	35
5. Discussão.....	37
6. Referências bibliográficas.....	51

1. INTRODUÇÃO

O Sistema Calicreína-Cininas é um importante modulador das funções cardiovasculares e suas ações têm sido alvo de uma série de estudos envolvendo a ação de drogas que afetam o coração, os rins e o sistema vascular. As cininas abrangem um grupo de peptídeos envolvidos numa série de processos fisiológicos e fisiopatológicos, como vasodilatação, liberação de autacóides do endotélio vascular, diurese e natriurese, inibição de proliferação celular, recrutamento celular, aumento de permeabilidade vascular e nocicepção (Bhoola *et al*, 1992).

As cininas são formadas em fluidos biológicos pela ação da enzima calicreína sobre o hormônio precursor cininogênio, presente em duas formas distintas: o cininogênio de baixo peso molecular (LK), capaz de atravessar a barreira capilar, e o cininogênio de alto peso molecular (HK), confinada ao compartimento sangüíneo. Classicamente são descritas duas vias de geração de cininas, uma plasmática e outra tecidual. A calicreína plasmática, produzida no fígado, pâncreas e intestino na forma do precursor inativo pré-calicreína, é ativada pelo fator de Hangeman quando o sangue entra em contato com superfícies carregadas positivamente, e promove a clivagem de HK para liberação de bradicinina (BK). A geração tecidual de cininas ocorre através da ação da calicreína produzida por glândulas exócrinas contidas em diversos tecidos, incluindo vasos, rim e sistema nervoso central. A calicreína tecidual é sintetizada na forma de pró-calicreína e convertida a calicreína intracelularmente por enzimas não estabelecidas, ou no meio extracelular, pela calicreína plasmática e plasmina. A calicreína tecidual difere da forma plasmática e promove preferencialmente a conversão de LK em calidina (KD) (Regoli, 1980).

Os efeitos biológicos exercidos pela BK e KD duram poucos segundos devido à sua rápida metabolização por enzimas denominadas cininases. A cininase II, a

principal via de metabolização de BK e KD, promove a remoção do dipeptídeo C-terminal, tornando-as inativas. A cininase II também é conhecida como Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), pois cataliza a conversão de angiotensina I (Ang I) em angiotensina II (Ang II) (Erdös, 1975). Por sua vez, as carboxipeptidases N e M (CPN e CPM), metalopeptidases com 41% de homologia entre si, promovem a clivagem do aminoácido arginina C-terminal da BK e KD, gerando os metabólicos ativos des-Arg⁹-BK (DBK) e des-Arg¹⁰-KD (DKD), respectivamente (Moreau *et al*, 2005; Sangsree *et al*, 2003).

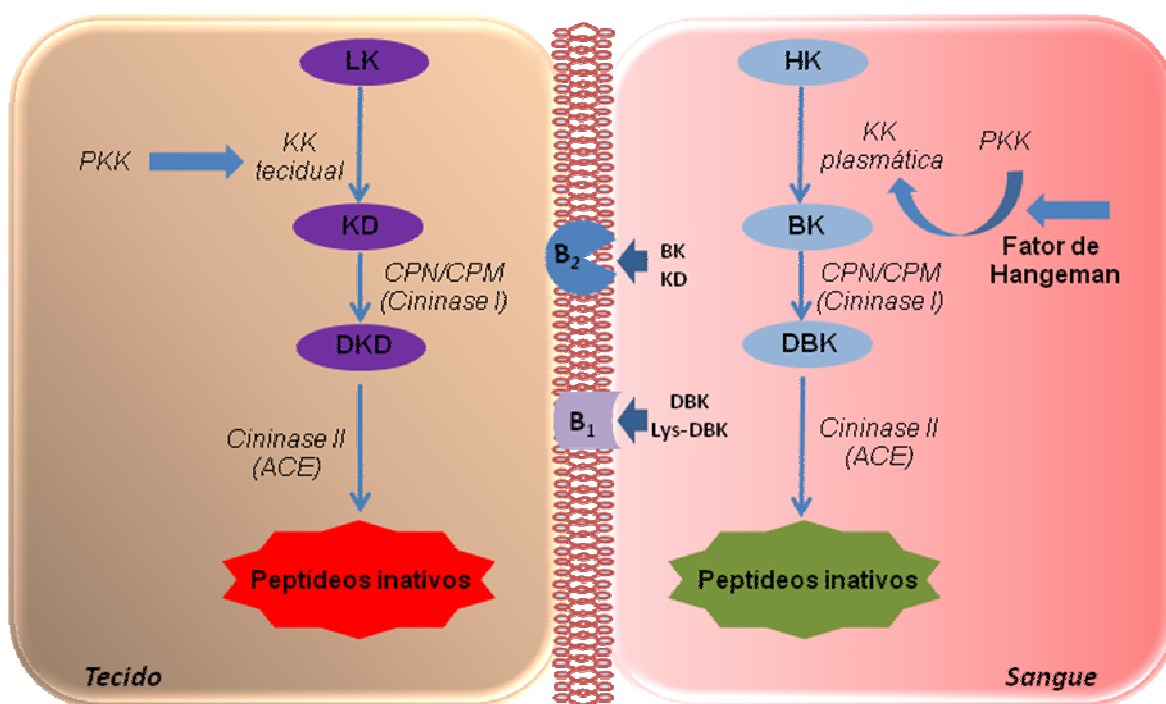


Figura 1: Sistema de formação de cininas. HK: cininogênio de alto peso molecular; LK: cininogênio de baixo peso molecular; PKK: pré-caliceína; KK: calicreína; CPN/CPM: carboxipeptidase N e M; BK: bradicinina; KD: calidina; DBK: des-Arg⁹-BK; DKD: des-Arg¹⁰-KD.

As ações biológicas das cininas são mediadas através da ativação seletiva dos receptores B₁ e B₂, pertencentes à superfamília de receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrânicos. Estes receptores diferem quanto à afinidade pelas diferentes cininas, sendo o receptor B₂ ativado preferencialmente por

BK e KD, enquanto os metabólitos ativos DBK e DKD são agonistas seletivos do receptor B₁ (Marceau, 1995). Apesar de apresentarem afinidade por agonistas semelhantes, razão pela qual são classificados farmacologicamente como subtipos de receptores, há uma baixa homologia (36%) entre os receptores B₁ e B₂ (Leeb-Lundberg *et al*, 2005). A resposta mediada pelo receptor B₂ é transitória e rapidamente induz taquifilaxia após estímulo contínuo. Isto se deve à presença de um *cluster* de serinas e treoninas no domínio intracelular C-terminal do receptor, sítios importantes para a fosforilação e a internalização do receptor (Leeb-Lundberg *et al*, 2005). Em contrapartida, a ausência destes aminoácidos no domínio C-terminal do receptor B₁ confere um baixo grau de dessensibilização e atividade constitutiva independente de agonista para este receptor (Leeb-Lundberg *et al*, 2001). Esses fatores, associados ao padrão de expressão dos receptores B₁ (induzível) e B₂ (constitutivo), são coerentes com o papel exercido por esses receptores no contexto inflamatório. Nesse sentido, acredita-se que o receptor B₂ seja o principal mediador dos efeitos biológicos das cininas em condições fisiológicas e durante o estágio agudo do processo inflamatório, enquanto que o receptor B₁ estaria envolvido principalmente na regulação da resposta inflamatória crônica (Calixto *et al*, 2004).

A expressão funcional de receptores B₂ foi descrita em diversos tecidos, incluindo vasos, coração e rins. As vias de sinalização ativadas pelo receptor B₂ são bem elucidadas e envolvem a estimulação da fosfolipase C e a produção intracelular de trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol via ativação de proteínas G_{αq} e G_{αi} (Dendorfer *et al*, 1998). Por sua vez, o IP₃ ativa receptores específicos no retículo endoplasmático, promovendo a liberação intracelular de Ca⁺² seguido por influxo de Ca⁺² extracelular através da abertura de canais de Ca⁺². No endotélio vascular, o

aumento dos níveis intracelulares de Ca^{+2} promove a ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e fosfolipase A_2 (PLA_2), resultando em produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, respectivamente (Leeb-Lundberg *et al*, 2005).

O receptor B_1 é ausente ou pouco expresso em condições fisiológicas, porém é rapidamente induzido por injúria tecidual ou estímulo inflamatório. Classicamente, a indução do receptor B_1 foi previamente descrita em aorta (Regoli *et al*, 1977) e veia mesentérica (Regoli *et al*, 1978) de coelho, onde a resposta vascular induzida pela DBK aumentou progressivamente em função do tempo de incubação das preparações isoladas *in vitro*. Posteriormente, um comportamento semelhante foi observado em preparações isoladas de anéis de veia porta de rato (Campos *et al*, 1994). Adicionalmente, foi descrita a indução do receptor B_1 em resposta a administração de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Passos *et al*, 2004, McLean *et al*, 1999) e exposição a radiação ultra-violeta (Perkins *et al*, 1993, Perkins *et al*, 1995) através de mecanismos que envolvem a ação conjunta de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas (IL) 1, 2 e 8 (Perkins *et al*; 1993; Perkins *et al*, 1995), IL1_B (McLean *et al*, 1999; Passos *et al*, 2004) e $\text{TNF-}\alpha$ (Passos *et al*, 2004). Foi reportado ainda que a Ang II, principal componente do Sistema Renina-Angiotensina, promoveu a indução de receptores B_1 em células de músculo liso vascular (Kintsurashvili *et al*, 2001). Esse efeito também pode ocorrer sistemicamente, já que a indução do receptor B_1 foi observada em ratos submetidos à hipertensão renovascular (2 rins – 1 clip), modelo com altos níveis endógenos de Ang II (Fernandes *et al*, 2006). Posteriormente, foi observado que a indução de receptores B_1 por Ang II é mediada através da estimulação de receptores AT_1 e está relacionada à geração de ânion superóxido, através da enzima NADPH oxidase (Ceravolo *et al*, 2007). Surpreendentemente, foi reportado ainda que o tratamento

crônico com inibidores da ECA resulta em indução vascular e renal de receptores B₁, fenômeno que pode estar envolvido nas propriedades cardioprotetoras destes fármacos (Marin-Castaño *et al*, 2002; Duguay *et al*, 2004). Nos casos descritos anteriormente, a indução do receptor B₁ depende da fosforilação e degradação da proteína inibitória IκBα seguido por ativação e translocação do Fator Nuclear-κB (NF- κB) para o núcleo (Calixto *et al*, 2004; Sabourin *et al*, 2001; Medeiros *et al*, 2004).

Apesar de sua propriedade induzível, a expressão funcional de receptores B₁ foi demonstrada em uma série de leitos vasculares, e sua distribuição foi descrita em células endoteliais e músculo liso vascular de veias e artérias de diferentes espécies (McLean *et al*, 2000). Inicialmente foi reportado que a ativação de receptores B₁ por DBK e DKD promove consistente vasoconstrição em preparações isoladas de aorta de coelho (Regoli e Barabé, 1980). No endotélio vascular, o receptor B₁ interage diretamente com as proteínas G_q e G_α, promovendo a ativação da fosfolipase C e geração de IP₃, resultando em elevação dos níveis de Ca⁺² intracelular. Conseqüentemente, a ativação de enzimas dependentes de Ca⁺², especialmente a NOS endotelial e PLA₂, promove a liberação de NO e eicosanóides mediados pelo receptor B₁ (Marceau *et al*, 1998) (Figura 2). Estudos reportaram ainda a ativação de receptores B₁ por inibidores da ECA em células endoteliais, resultando em aumento dos níveis intracelulares de Ca⁺² e liberação de NO (Ignjatovic *et al*, 2002; Ignjatovic *et al*, 2004), porém, estudos posteriores não confirmaram estes resultados (Fortin *et al*, 2003).

O NO é um radical livre gasoso envolvido em diversas ações biológicas, incluindo relaxamento vascular, inibição da adesão leucocitária, agregação plaquetária e proliferação de músculo liso vascular (Moncada e Higgs, 1995). Além

disso, o NO produzido por macrófagos participa dos mecanismos de defesa contra microorganismos e como mediador biológico de algumas terminações nervosas (Moncada *et al*, 1991). O NO age como molécula central nas vias de sinalização da célula endotelial e contribui para a manutenção da homeostase cardiovascular (Tsuitsui *et al*, 2009). Após ser sintetizado pelas células endoteliais, o NO difunde-se para o músculo liso vascular e induz a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel, que cataliza a formação do segundo mensageiro 3',5'- monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), resultando em vasodilatação (Moncada e Higgs, 1995).

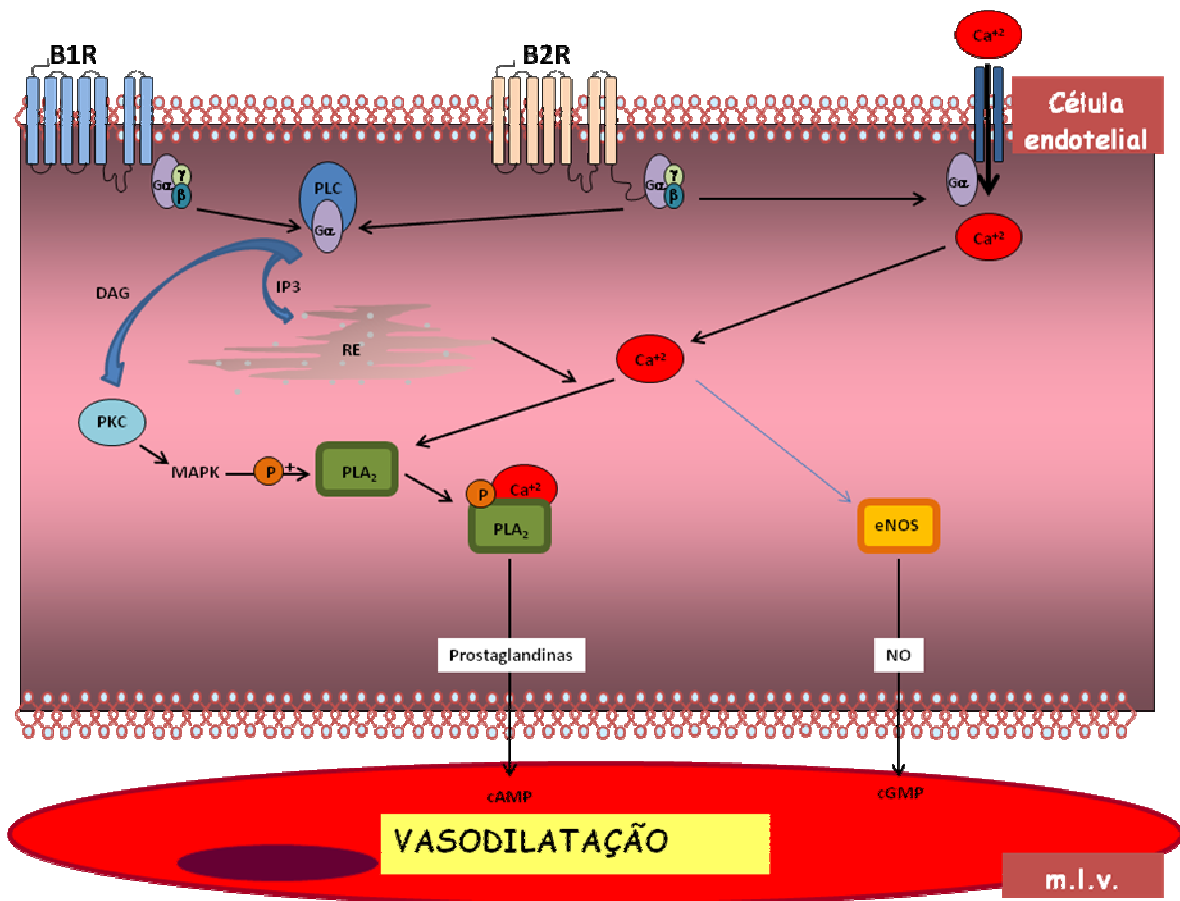


Figura 2: Representação esquemática de receptores B₁ (B₁R) e B₂ (B₂R) e segundo mensageiros liberados pela sua ativação. PLC: fosfolipase C; IP₃: trifosfato de inositol; DAG: diacilglicerol; PKC: fosfoquinase C; PLA₂: fosfolipase A₂; RE: retículo endoplasmático; eNOS: NOS endotelial; NO: óxido nítrico.

O NO é sintetizado enzimaticamente em diversos tipos celulares pela enzima NOS, que catalisa a oxidação do aminoácido L-arginina para formar L-citrulina e NO, em uma complexa reação que requer a presença dos co-fatores tetrahydrobiopterina (BH₄), flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e o consumo de co-substratos (oxigênio molecular e NADPH) (Michel, 1999). Ao menos 3 isoformas distintas da NOS são descritas: NOS neuronal (nNOS ou NOS1), NOS induzível (iNOS ou NOS 2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3) (Moncada e Higgs, 1995). A estrutura da NOS é composta por um domínio oxigenase, contendo sítios de ligação para L-arginina, BH₄ e um grupo heme, e um domínio redutase, que possui sítios de ligação para FAD, FMN e NADPH, acoplados entre si por um sítio de reconhecimento da proteína regulatória calmodulina (CaM) (Alderton *et al*, 2001).

A regulação da atividade das isoformas da NOS é complexa e inclui alterações pós-translacionais da enzima, interação com outras proteínas e fosforilação de sítios específicos (Kone *et al*, 2003). Estudos recentes ofereceram indícios convincentes de que ambos os receptores de cininas podem influenciar diretamente a atividade enzimática das isoformas da NOS, regulando a produção endotelial de NO. Neste sentido, estudos indicam a interação física direta entre o receptor B₂ e a eNOS na cavéola, formando um complexo inativo eNOS-B₂ que resulta em inibição da atividade da enzima (Ju *et al*, 1998). A estimulação com BK induz a fosforilação de sítios específicos do receptor B₂, resultando em diminuição da afinidade do receptor pela eNOS, dissociação do complexo B₂-eNOS, seguido por ativação da enzima (Marrero *et al*, 1999).

Na ocorrência de processo inflamatório, células endoteliais também podem expressar a iNOS através da ação de mediadores inflamatórios como IL1_B e interferon γ (IFN- γ), reconhecidos como mediadores da indução do receptor B₁

(Calixto *et al*, 2004). Inicialmente, acreditava-se que a atividade da iNOS era regulada apenas em nível de expressão, já que a ativação desta enzima é independente dos níveis intracelulares de Ca^{+2} , gerando grandes quantidades de NO na presença de substrato e co-fatores. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que o receptor B_1 promove a fosforilação de resíduos Ser^{745} da iNOS através da ativação da via de sinalização da ERK, resultando em liberação adicional de NO pela enzima (Zhang *et al*, 2007). Neste sentido, a β -arrestina 2, proteína originalmente envolvida no processo de internalização de receptores acoplados a proteína G, parece desempenhar um importante papel na ativação de iNOS induzida por receptores B_1 (Kuhr *et al*, 2010). Adicionalmente, foi descrito que a ativação da iNOS parece ser mediada principalmente por $G_{\alpha i}$ e β_{γ} , não sendo dependente da ativação da PKC e dos níveis intracelulares de Ca^{+2} (Brovkovich *et al*, 2011).

Recentemente, o desenvolvimento de camundongos nocaute para os receptores de cininas tem permitido um melhor entendimento do papel do Sistema Caliceína-Cininas em diversos eventos fisiológicos e patológicos (Pesquero e Bader, 2006). Camundongos submetidos à deleção genética do receptor B_2 ($B_2^{-/-}$) apresentam desenvolvimento normal (Borkowski *et al*, 1995), porém, apesar dos inúmeros estudos avaliando o fenótipo desses animais, há discrepâncias significativas quanto à pressão arterial de $B_2^{-/-}$. Alguns estudos descreveram um ligeiro aumento na pressão arterial de $B_2^{-/-}$ (Maddedu *et al*, 1997; Emanuelli *et al*, 1999; Maddedu *et al*, 1998; Maestri *et al*, 2003), porém, a maioria dos estudos não confirmou essas observações (Schanstra *et al*, 2003; Alfie *et al*, 1996; Alfie *et al*, 1997; Cervenka *et al*, 1999; Cervenka *et al*, 2001; Abadir *et al*, 2003; Milia *et al*, 2001; Trabold *et al*, 2002). Além disso, é descrito que $B_2^{-/-}$ apresentam sensibilidade exacerbada em resposta à dieta hipersódica (Alfie *et al*, 1997), ao acetato de

deoxicorticosterona (Emanuelli *et al*, 1998) e à infusão de Ang II (Madeddu *et al*, 1997).

Camundongos nocaute para o receptor B_1 ($B_1^{-/-}$) foram gerados e descritos como saudáveis, férteis e normotensos, mas exibiram hipoalgesia e menor susceptibilidade ao choque séptico induzido por administração de LPS (Pesquero *et al*, 2000). Além disso, $B_1^{-/-}$ apresentaram reduzido teor de gordura corporal e proteção contra ingestão de dieta hiperlipídica, sugerindo a participação do receptor B_1 na regulação do balanço energético (Mori *et al*, 2005). Foi descrito ainda que a ação relaxante do nitroprussiato de sódio (NPS) está consideravelmente reduzida em fundo de estômago de $B_1^{-/-}$, apesar do aumento da atividade da iNOS e dos níveis de cGMP neste tecido (Barbosa *et al*, 2009).

A geração de animais transgênicos com superexpressão do receptor B_1 forneceu uma ferramenta experimental interessante para o estudo das funções biológicas exercidas por este receptor na ausência de estímulo pró-inflamatório. Camundongos que superexpressam receptores B_1 foram descritos como saudáveis e normotensos, porém apresentaram maior susceptibilidade ao choque séptico induzido por LPS (Ni *et al*, 2003). Curiosamente, a administração sistêmica de DBK promoveu aumento na pressão arterial desses animais, provavelmente decorrente da contração do músculo liso vascular e conseqüente aumento de resistência periférica total (Ni *et al*, 2003). Em ratos que hiperexpressam o receptor B_1 exclusivamente no endotélio vascular, observou-se aumento da mortalidade em conseqüência do choque endotóxico induzido por LPS e efeito hipotensor em resposta a administração sistêmica de DBK (Merino *et al*, 2008).

Devido à natureza induzível do receptor B_1 , pesquisadores têm focado suas atenções no entendimento dos mecanismos de indução dessa proteína e do seu

envolvimento no processo inflamatório. Neste contexto, as vias de sinalização do receptor B_1 parecem desempenhar um papel benéfico em alguns processos patológicos como na injúria renal induzida por isquemia/reperfusão (Kakoki *et al*, 2007) e na proliferação celular induzida por angioplastia (Agata *et al*, 2000) através da liberação de NO. Por outro lado, existem evidências de que o receptor B_1 possa estar envolvido na regulação da pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (Emanuelli *et al*, 1999). Interessantemente, foi descrito que $B_2^{-/-}$ submetidos à hipertensão sódio-dependente apresentaram consistente indução de receptores B_1 (Duka *et al*, 2001). Além disso, a administração de antagonistas do receptor B_1 promoveu considerável aumento da pressão arterial nesses animais (Duka *et al*, 2001). Duka *et al* (2006) observaram ainda que somente o bloqueio farmacológico simultâneo dos receptores B_1 e B_2 foi capaz de promover aumento consistente da pressão arterial de ratos normotensos (Duka *et al*, 2006). Em conjunto, estes estudos sugerem que o receptor B_1 possa assumir parte das propriedades hemodinâmicas do receptor B_2 na ausência deste.

Justificativa

Estudos anteriores relataram que a deleção genética de receptores B_1 causa alterações na resposta inflamatória (Pesquero *et al*, 2000) e em alguns parâmetros metabólicos (Mori *et al*, 2008); entretanto, o papel deste receptor na regulação do tônus vascular e na função endotelial não foi ainda investigado, especialmente em condições fisiológicas. Diante disso, o presente trabalho empregou técnicas de estudos vasculares e celulares tendo como objetivo principal a elucidação da influência de receptores B_1 sobre processos envolvidos na geração e degradação do

mediador NO. O presente estudo pretende contribuir para o esclarecimento mais profundo da influência do Sistema Calicreína-Cininas na hemodinâmica circulatória.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo do presente estudo foi investigar a influência da deleção genética de receptores B_1 sobre metabolismo vascular do NO, utilizando camundongos nocaute ($B_1^{-/-}$) e camundongos selvagens (WT) como controle.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o relaxamento dependente e independente do endotélio em preparações isoladas de arteríolas do leito mesentérico;
- Determinar níveis basais de NO circulantes;
- Determinar a produção basal de NO em cortes histológicos de arteríolas mesentéricas;
- Determinar a atividade da NOS em homogenatos de leito vascular mesentérico;
- Determinar a produção de NO em culturas primárias de células endoteliais, avaliando os efeitos de tratamentos com o substrato e co-fator da NOS (L-arginina e BH_4 , respectivamente), e do antioxidante ácido ascórbico;
- Determinar a produção de ânion superóxido em culturas primárias de células endoteliais, avaliando os efeitos de tratamentos com BH_4 e ácido ascórbico.

3. MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos C57Bl/6 nocautes para receptor B_1 ($B_1^{-/-}$) e selvagens (WT), machos, com 10-14 semanas de idade, foram obtidos do estoque do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME – UNIFESP). Camundongos foram mantidos em câmara com temperatura controlada e ciclo de 12 horas de luminosidade, com 60% de umidade, alimentação padrão e água *ad libitum*. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram aprovados de acordo com os protocolos do comitê de ética da UNIFESP (número de protocolo 0928/05), de acordo com o guia para uso e cuidados de animais de laboratório publicado pela US National Institutes of Health (Publicação NIH, N°. 85-23, revisado em 1996).

3.2 Expressão de receptores B_1 em vasos mesentéricos de animais WT e $B_1^{-/-}$

O RNA total foi obtido pelo uso de TRizol (Invitrogen Corp., CA, EUA) e amostras de RNA foram tratadas com DNase I Amplification Grade (Invitrogen). cDNA foi sintetizado a partir de 5 μ g do RNA total utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), como recomendado pelo protocolo do fabricante. Para a obtenção de controles RT negativos de cada amostra (RT-), 5 μ g de cada RNA total tratado com DNase foi submetido ao mesmo protocolo de transcrição reversa sem a adição da enzima M-MLV. Para detecção da expressão gênica do receptor B_1 em mesentério de animais WT e $B_1^{-/-}$, foi utilizada a enzima TAQ DNA polimerase (Invitrogen), conforme sugerido pelo fabricante com o seguinte protocolo de ciclos de

temperatura: 95° C durante 3 minutos seguidos por 35 ciclos de 95° C durante 15 segundos e 72° C durante 20 segundos. PCR foi realizado com 500 ng de cDNA para receptor B₁ e TATA Binding Protein (TBP), utilizado como padrão interno, com volume final de reação de 30 µL. Amplificação do cDNA foi realizada utilizando as seguintes seqüências de primers: 5' CCCTATCACTCCTGCCACACC 3' (forward) e 5' CGAAGTGCAATGGTCTTTAGGTC 3' (reverse) para o gene TBP; e 5' TGGAGTTGAACGTTTTGGGTT3' (forward) e 5'GTGAGGATCAGCCCCATTGT3' (reverse) para o gene do receptor B₁ (Bdkrb1). Em paralelo, foi realizado um PCR com a substituição de amostras por água e um PCR com 300 ng de DNA genômico de animais WT como amostra, utilizado como controle positivo da reação. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio e as respectivas bandas foram visualizadas e fotografadas sob luz UV. A Figura 3 mostra a baixa expressão de receptores B₁ em vasos mesentéricos de WT e ausência total em B₁^{-/-}.

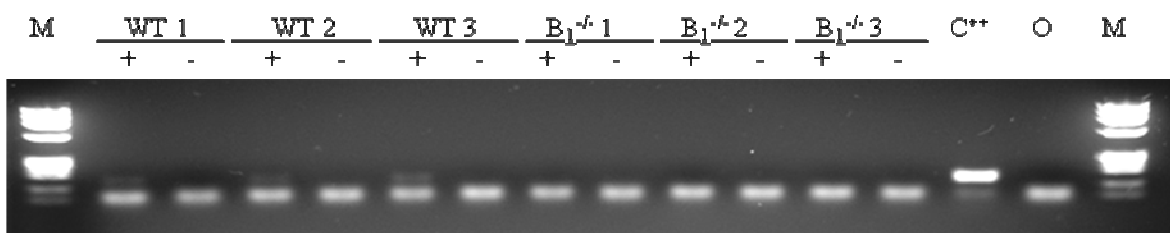


Figura 3: Imagem de gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV após eletroforese. PCR realizado utilizando cDNA (+) ou respectivas amostras não submetidas a reação de transcrição reversas (-). DNA genômico de WT (C⁺⁺) foi utilizado como controle positivo da reação. Reação realizada com a substituição de amostra por água (O) e o marcador Lambda Phi Hind DNA (M) estão indicados.

3.3 Reatividade vascular em leito vascular mesentérico

Leito vascular mesentérico isolado foi preparado como previamente descrito para a preparação em ratos, com pequenas alterações para o camundongo (McGregor, 1965). Camundongos foram anestesiados (hidrato de cloral, 450 mg/kg, s.c.) e a artéria mesentérica superior foi canulada e dissecada da sua borda com o intestino. O leito vascular mesentérico foi perfundido com solução Krebs-Henseleit, pH 7.4, 37°C, aerado com 95% O₂ e 5% CO₂, mantido a um ritmo constante de 2 mL/min utilizando uma bomba peristáltica e doses crescentes dos seguintes agentes vasoativos foram testados: norepinefrina (NE), acetilcolina (ACh) e NPS. Estudos preliminares foram realizados com o objetivo de estabelecer o fluxo de perfusão ideal para realização dos experimentos, onde a vasoconstrição induzida por NE (concentração final de 10 µmol/L) foi monitorada com os fluxos de 0.5, 1, 1.5 e 2 mL/min. Sob estas condições de fluxo, a pressão de perfusão basal foram as seguintes (em mmHg): 25 ± 3 a 0.5 mL/min (n=3); 30 ± 9 a 1.0 mL/min (n=4), 29 ± 3 a 1.5 mL/min (n=4) e 28 ± 1 a 2.0 mL/min. A concentração de NE foi escolhida com base na sua habilidade para induzir uma vasoconstrição submáxima. A 0.5 mL/min, não foi observado resultado consistente (n=3). A contração induzida por NE (aumento em mmHg) nos outros fluxos avaliados foram: 27 ± 4 a 1.0 mL/min (n = 3); 66 ± 10 a 1.5 mL/min (n = 4) e 81 ± 7 a 2.0 mL/min (n = 7). Desta forma, todos os experimentos foram realizados utilizando um fluxo constante de 2 mL/minuto. Após 30 minutos de estabilização, drogas foram injetadas *in bolus*, com um volume final entre 100 – 300 µL, com 3 minutos de intervalo entre cada dose. Para estudos com ACh e NPS, preparações foram pré-contraídas com a adição de NE (10 µmol/L) à solução de Krebs. As respostas vasculares foram avaliadas através de alterações na

pressão de perfusão (mmHg) medidas por um sistema de aquisição de dados (PowerLab 8/S, ADInstruments Pty Ltda, Castle Hill, Australia).

3.4 Mensuração dos níveis plasmáticos de NO

Níveis plasmáticos de NO foram avaliados através da detecção de nitritos e nitratos, compostos derivados de NO, como previamente descrito (Moriel *et al*, 2002). Animais foram sacrificados por deslocamento cervical, amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA e centrifugadas (1500 g). A concentração de nitrito/nitrato no sangue foi determinada pelo método de quimiluminescência, liberado pela reação do NO com o ozônio após redução do nitrato com solução saturada de VCL₃ em HCl (1 mol/L), a 90° C, utilizando o equipamento NO analyzer (NOA^{TM280}, Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, EUA). Nitritos foram determinados após redução com solução de KCl (1%) em ácido acético glacial para converter nitrito em NO.

3.5 Produção basal de NO em arteríolas mesentéricas

A produção basal de NO em arteríolas mesentéricas foi determinada utilizando diacetato de 4,5 diaminofluoresceína (DAF -2 DA, Alexis, EUA), um marcador de NO permeável à membrana celular, como descrito previamente (Ceravolo *et al*, 2007). No interior da célula, o composto DAF -2 DA é hidrolisado por esterases citosólicas liberando DAF-2. A reação entre DAF-2 e NO promove a formação de DAF - 2 T, uma triazolofluoresceína fluorescente. Arteríolas mesentéricas foram dissecadas, imersas em meio de congelamento e cortadas em fatias de 10 µm de espessura em criostato (Leica CM 1850, Leica Instruments, Alemanha). Lâminas foram pré-

incubadas com solução tampão fosfato (PB) contendo CaCl_2 (0.45 $\mu\text{mol/L}$) e L-arginina (100 $\mu\text{mol/L}$) durante 30 minutos a 37°C . Lâminas foram lavadas, incubadas com solução PB contendo DAF-2 DA (10 $\mu\text{mol/L}$) por 30 minutos a 37°C e observadas em microscópio equipado com filtro de fluorêscina (Ex: 488 nm/Em: 515 nm) (Axiovert 100M – Carl Zeiss SMT, Alemanha). A fluorescência emitida em resposta à produção de NO foi quantificada através de densitometria óptica (unidades arbitrárias, u.a.) utilizando um programa de análise de imagem (AxioVision 4.8.; Carl Zeiss, Alemanha). A análise semi-quantitativa da produção basal de NO foi determinada em ao menos três lâminas de cada animal.

3.6 Detecção da atividade da NOS

A atividade da NOS foi mensurada através da conversão bioquímica de L- ^3H arginina para L- ^3H citrulina, de acordo com o método previamente descrito por Rees *et al* (1996). Vasos do leito mesentérico foram dissecados e imediatamente homogeneizados em tampão gelado contendo (em mmol/L): Hepes (20); sacarose (0.32); DTT (1.0); EDTA (0.1); pepstatin (1.0); PMSF (1.0); na presença de 10 g/mL^{-1} de leupeptina. Amostras foram incubadas ($37^\circ\text{C}/60$ minutos) em um tampão contendo: FAD/FMN (4 $\mu\text{mol/L}$); CaM (10 $\mu\text{g/mL}^{-1}$); Ca^{2+} (1.25 mmol/L); NADPH (1 mmol/L); L-arginina (120 nmol/L); L- ^3H arginina [(50 nmol/L) atividade específica: 45.2 Ci mmol $^{-1}$; NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA, EUA) e tetrahydrobiopterina (BH_4 , 10 $\mu\text{mol/L}$). Uma segunda etapa de ensaios foi realizada na ausência de Ca^{+2} para a determinação da atividade de iNOS separadamente, isoforma da NOS independente dos níveis intracelulares de Ca^{+2} . Uma resina de troca de cátions (Dowex 50WX8-400, equilibrado com Hepes 50 mmol/L, pH 5.5) foi

adicionada à reação para remoção do excesso de L-[³H] arginina. O sobrenadante foi coletado e a radioatividade foi quantificada por cintilação. As leituras (cpm) obtidas nas duas etapas experimentais (NOS total e iNOS) foram corrigidas pela quantidade de proteína e expressas em unidades arbitrárias (u.a.).

3.7 Cultura primária de células endoteliais

3.7.1 Isolamento de células endoteliais pulmonares

Culturas primárias de células endoteliais pulmonares foram estabelecidas de acordo com a técnica descrita por Chen *et al* (1995), com pequenas adaptações para camundongos. Pulmões foram retirados, lavados com solução de tampão fosfato (PBS), cortados em pedaços de 1x1x1 mm e colocados em uma placa de cultura de 6 x 35 mm. Os tecidos foram recobertos com meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM low glucose) contendo soro fetal bovino (20%) e gentamicina (40 mg/L) (Gibco, Invitrogen), pH 7.4, e mantidas em incubadora de CO₂ (5%) a 37° C. Após 60 horas, os tecidos foram descartados e foi possível observar a presença de células aderidas à placa, conforme demonstrado na Figura 4. A cada 48 horas, as culturas foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi trocado. As células endoteliais cresceram até a confluência e foram propagadas em razão 1:2 utilizando tripsina (0,1%). Células foram utilizadas entre a quarta e sexta passagens para a realização dos experimentos.

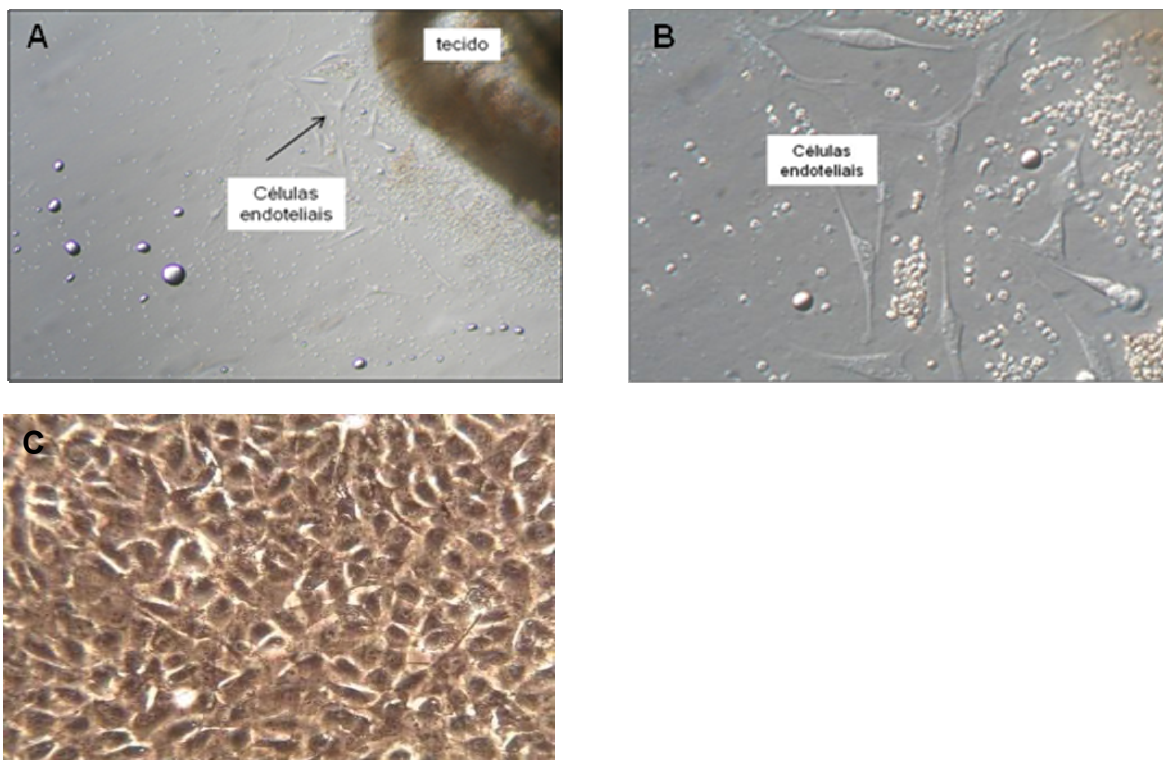


Figura 4: [A] Imagem obtida 48 horas após o plaqueamento, antes da remoção do tecido (aumento 100X); [B] células endoteliais 60 horas após o plaqueamento, logo após a remoção do tecido (aumento 200x); [C] células endoteliais (4^a passagem) em confluência (aumento 100x).

3.7.2 Identificação e caracterização das culturas primárias de células endoteliais

3.7.2.1 Marcação com *Ulex Europaeus*

A caracterização das culturas de células endoteliais foi realizada pela marcação com *Ulex europaeus* I, marcador específico para células endoteliais. *Ulex europaeus* tem sido amplamente utilizado como um marcador de células endoteliais já que esta lectina liga-se especificamente em resíduos de L-fucose presentes na membrana do endotélio (Jackson et al, 1990). Em nossos ensaios, utilizamos *Ulex europaeus* conjugado ao FITC (fluoresceína isotiocianato), e a detecção das marcações foi realizada em microscópio de fluorescência (AE31 – Motic®). Ao atingirem 70% de confluência, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA) (30 min) e

incubadas à 4° C (overnight) com o *Ulex europaeus* (5 a 100 µg/mL em PBS/NONIDET 40 0,01%) (Vector Laboratories®). Após a remoção da solução, as culturas foram lavadas com PBS e incubadas (5 min) com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) [1:200] (Santa Cruz®), um marcador específico para material genético. Dessa forma, cada célula presente no campo de observação foi identificada pela marcação em azul (DAPI), e todas as células endoteliais foram identificadas pela marcação com Ulex/FITC (verde) (Figuras 2A e 2B).

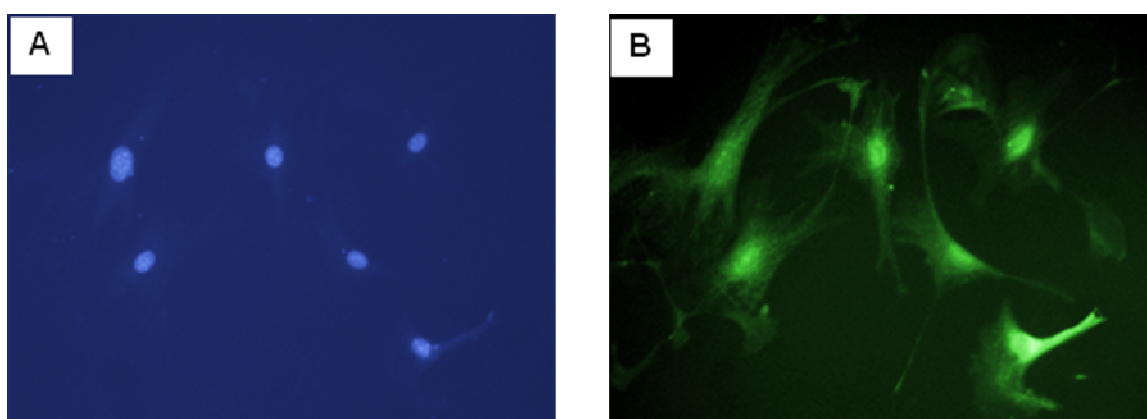


Figura 5: Imagens obtidas a partir de culturas confluentes (entre 4^a e 6^a passagens), após incubação com DAPI 1:200 [A] e ULEX europeus 100 mg/mL [B] (aumento 200X).

3.7.2.2 Imunohistoquímica

Ensaio de imunohistoquímica foram realizados para identificar a expressão do fator de von Willebrand (vWF), um tradicional marcador de células endoteliais (Wit e Mourik, 2001). Em paralelo, linhagem celular de músculo liso vascular de aorta de coelho foi utilizada como controle positivo para padronização da marcação com anticorpo anti- α -actina, uma proteína específica do citoesqueleto de músculo liso

vascular (Figura 6C). As células foram plaqueadas em lâminulas estéreis (13 mm), lavadas com solução de PBS e fixadas com PFA 4% em temperatura ambiente por 30 minutos. As células foram lavadas (3 x 10 minutos), permeabilizadas com Nonidet P 40 (1%) e bloqueadas com FBS (5%) durante 30 minutos, a 37° C. Posteriormente, as amostras foram incubadas “overnight” a 4° C com anticorpo primário policlonal de coelho anti vWF (Santa Cruz Biotechnology, EUA) em razão de diluição 1:50. As lâminulas foram então lavadas com PBS (3 x 15 minutos) e incubadas com IgG conjugado a FITC anti-coelho (Santa Cruz Biotechnology, EUA), na diluição de 1:100, durante 2 horas a 37° C. Após estes procedimentos, imagens foram obtidas por um microscópio confocal (Ex: 495 nm; Em: 521 nm para vWF) (Figura 6A). Em outra etapa dos experimentos, as células endoteliais foram incubadas com anticorpo primário monoclonal de camundongo anti α -actina (Santa Cruz Biotechnology) em razão de diluição 1:50, conforme protocolo estabelecido para marcação de células de músculo liso vascular (Figura 6C). As lâminulas foram então lavadas com PBS (3 x 15 minutos) e incubadas com IgG conjugado a Texas Red anti-camundongo (Santa Cruz Biotechnology, EUA), na diluição de 1:100, durante 2 horas a 37° C (Ex.: 595 nm; Em.: 615 nm) (Figura 6D). Para ambas as marcações, o núcleo celular foi corado com DAPI na diluição de 1:200 por 5 minutos a 37° C (Ex: 358 nm; Em: 461 nm). Imagens representativas das marcações das células estão demonstradas na Figura 6.

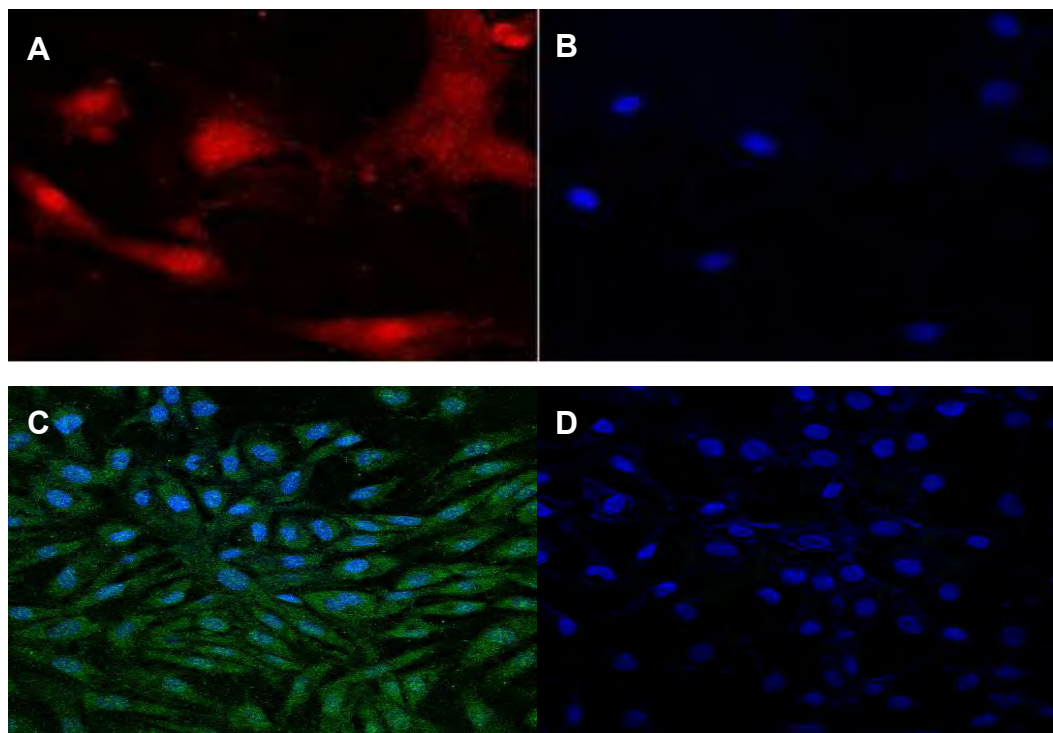


Figura 6: Imagem representativa da marcação positiva de células endoteliais com anticorpo anti-vWF **[A]** e localização do núcleo celular com DAPI **[B]**. Imagem representativa da marcação positiva de células de músculo liso vascular **[C]** e marcação negativa de células endoteliais primárias **[D]** com anticorpo anti- α actina.

3.7.2.3 Expressão gênica de ECA e vWF

Ensaio de RT-PCR foram realizados com o intuito de detectar a expressão gênica de vWF e da ECA, enzima localizada na superfície luminal da membrana plasmática do endotélio vascular (Ching et al, 1983). Células endoteliais foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² e RNA total foi obtido utilizando TRizol (Invitrogen Corp., USA), seguindo especificações do fabricante. Amostras de RNA foram tratadas com DNase I Amplification Grade (Invitrogen) e cDNA foi sintetizado a partir de 5 μ g de RNA total utilizando enzima transcriptase reversa (M-MLV; Invitrogen). O PCR foi realizado utilizando 2 μ g do cDNA total obtido após reação de RT de cada amostra como “*template*”. Amostras foram submetidas a uma reação com volume final de 50 μ L conforme método utilizando Taq DNA Polimerase

(Invitrogen). A amplificação do cDNA foi realizada utilizando os seguintes primers: 5'GGC TCC TGG AAA GAA AAT CA 3' (*forward*) e 5' CAC CAC AAA AGC TTT GAG CA 3' (*reverse*) para vWF; 5' CTG CTA AGC AAC ATG AGC AG 3' (*forward*) e 5'GAT CCC CTG ATA CTT GGT TC 3' (*reverse*) para ECA. Um total de 10 µL do produto final da reação de PCR foi misturado a 2 µL de loading buffer (5x), as amostras foram submetidas à corrida em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e as respectivas bandas foram visualizadas e fotografadas sob luz ultra-violeta.

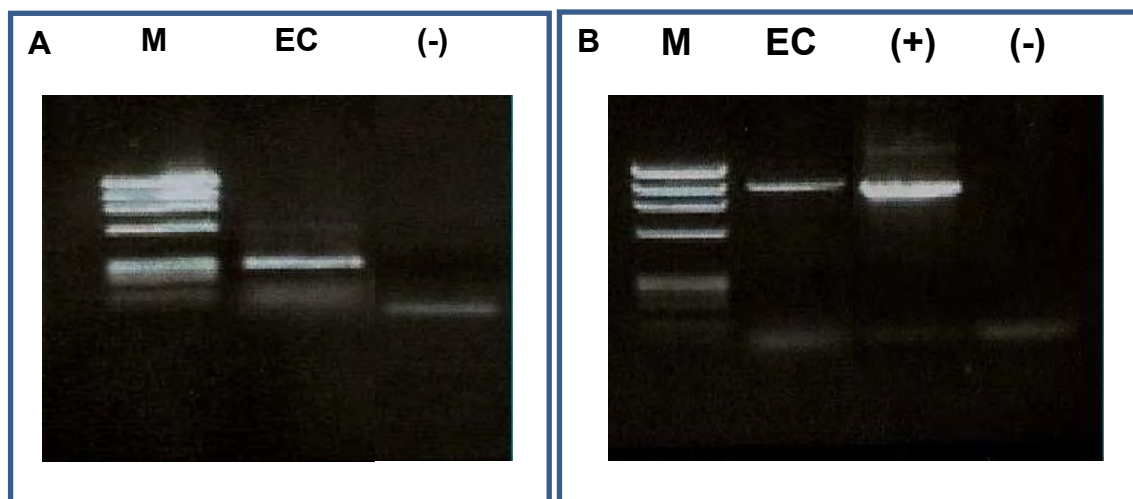


Figura 7: Expressão de mRNA para vWF **[A]** ou ECA **[B]** detectada através de RT-PCR em células endoteliais primárias de WT e $B_1^{-/-}$. Como controle negativo, foi utilizado água em substituição a amostra **[-]**. O marcador *Lambda Phi Hind DNA* está identificado como **[MW]**. DNA genômico de homogenatos de pulmão foi utilizado como controle positivo **[+]** para detecção de expressão de mRNA para ECA.

3.8 Produção de NO em cultura primária de células endoteliais

A produção de NO foi determinada em células endoteliais incubadas com solução Hanks contendo DAF-2 DA (10 µmol/L) durante 30 minutos a 37° C. Células foram estimuladas com ACh (1 mmol/L) e observadas em um microscópio confocal (Axiovert 100M, Carl Zeiss SMT, Alemanha). Imagens foram obtidas a cada 15

segundos durante 5 minutos (Exc.: 495nm; Em.: 515nm). Em outra etapa do experimento, células foram co-incubadas em solução Hanks contendo DAF-2 DA e L-arginina, substrato da NOS (1 mmol/L), ou L-NAME, inibidor da síntese de NO (1 mmol/L), ou des-arg⁹-leu⁸-BK (0.1 mmol/L), antagonista do receptor B₁, ou BH₄, um co-fator da NOS (0,1 mmol/L), ou ácido ascórbico, um agente antioxidante (50 µmol/L). A liberação de NO também foi analisada em células endoteliais incubadas com DAF 2- DA e estimuladas com DBK, agonista seletivo do receptor B₁ (1 mmol/L). As imagens obtidas foram analisadas por densitometria óptica (AxioVision Release 4.8, Zeiss Inc.) e expressas como unidades arbitrárias (u.a.).

3.9 Geração de ânion superóxido em células endoteliais

Células endoteliais foram semeadas em lâminulas estéreis (35 mm) e cultivadas até atingirem a semi-confluência. A geração basal de ânion superóxido foi determinada em células endoteliais incubadas em solução Hanks contendo dihidroetidina (10 µmol/L) durante 30 minutos a 37° C. Em presença do ânion superóxido, a dihidroetidina é convertida no composto fluorescente brometo de etídio, o qual se intercala ao DNA da célula, sendo possível a observação da marcação utilizando os parâmetros adequados. As células endoteliais foram observadas e imagens da marcação com dihidroetidina foram obtidas utilizando microscópio confocal (Axiovert 100M – Carl Zeiss SMT – Alemanha). As condições de configuração do sistema de aquisição de imagens foram mantidas iguais para a comparação da fluorescência entre os grupos analisados (Exc.: 518 nm; Em.: 605 nm). A formação basal de ânion superóxido foi determinada em células endoteliais pré-incubadas em solução Hanks contendo dihidroetidina na ausência ou presença de BH₄ (0.1 mmol/L) ou ácido ascórbico (50 µmol/L). As imagens obtidas foram

analisadas por densitometria óptica (AxioVision Release 4.8, Zeiss Inc., Alemanha) e expressas como unidades arbitrárias (u.a.).

3.10 Drogas e reagentes

NE, ACh, NPS, DBK, des-arg⁹-leu⁸-BK, L-NAME e L-arginina foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA); DMEM e FBS de Gibco (Gaithersburg, MD, EUA), DAF-2 DA de Alexis (Farmingdale, EUA) e Ulex europaeus de Vector Laboratories (Burlingame, EUA). Todos os demais reagentes foram adquiridos de Merck (Alemanha)

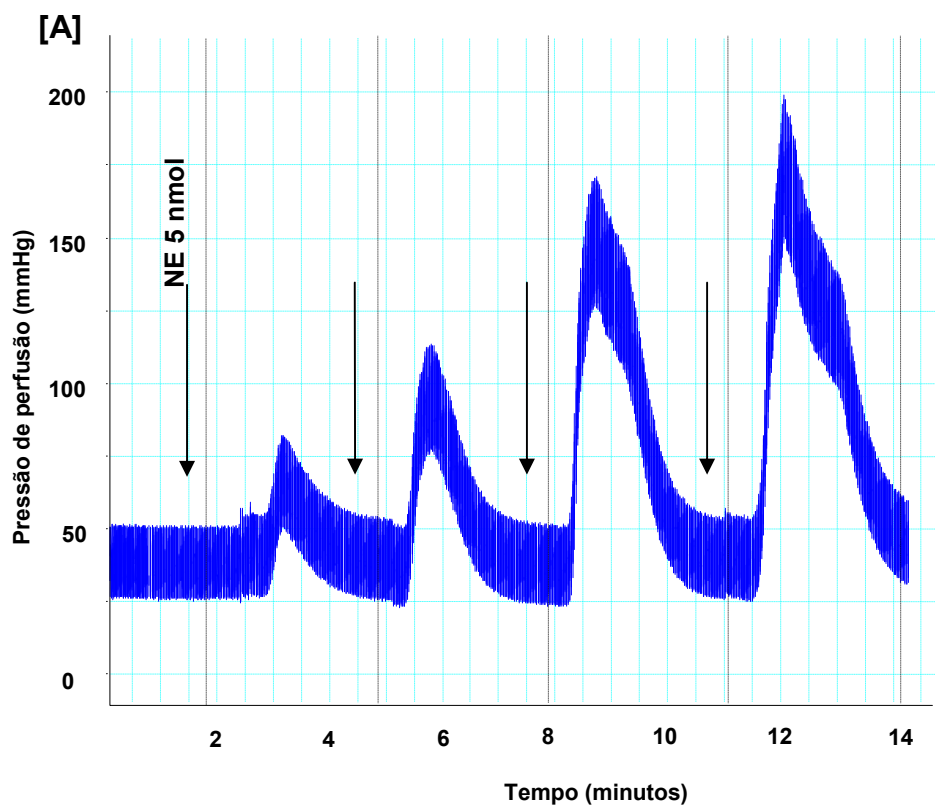
3.11 Análise estatística

Comparações foram feitas por ANOVA seguida de teste Tukey-Kramer ou test-t de Student quando apropriado. Valores expressos representam a Média \pm EPM. Significância estatística foi considerada quando $P < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 Reatividade vascular em leito arteriolar mesentérico

Preparações isoladas de leito vascular mesentérico provenientes de $B_1^{-/-}$ e WT foram testadas com doses crescentes de NE (5, 10, 50 e 100 nmols), um potente vasoconstritor agonista α_1 . A administração de NE promoveu vasoconstrição dose-dependente em preparações de ambas as linhagens (Figura 8A). Como demonstrado na Figura 8B, a vasoconstrição (mmHg) induzida por NE foi semelhante entre os grupos experimentais.



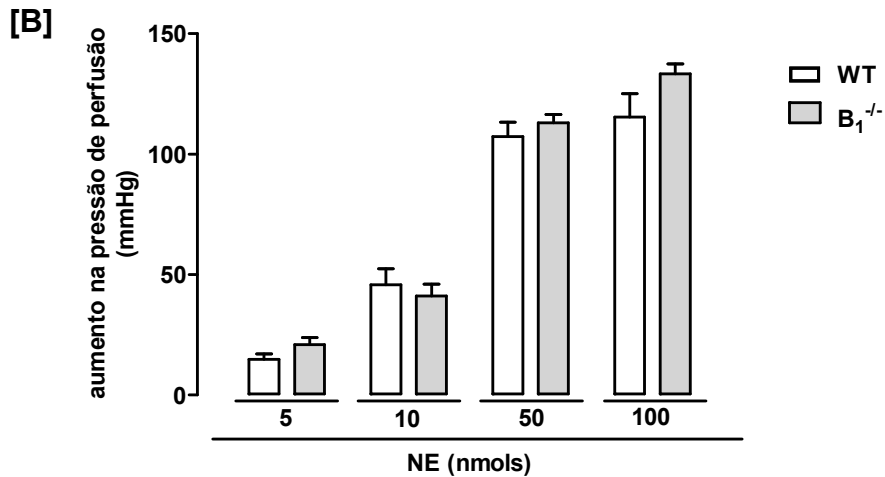


Figura 8: **[A]** Imagem representativa do aumento de pressão de perfusão em resposta a administração de NE. As setas indicam administração de NE. **[B]** Efeito vasoconstritor de NE em leito arteriolar mesentérico de WT (□) e B₁^{-/-} (■). Respostas são expressas como aumento na pressão de perfusão (mmHg). Resultados representam a Média ± EPM, n = 5-7 para cada dose.

Em preparações de leito vascular mesentérico, a função endotelial foi avaliada pelo efeito de ACh (um agente relaxante dependente do endotélio) e NPS (um agente relaxante independente do endotélio). Em todas as preparações, ACh induziu consistente vasodilatação dose-dependente. O relaxamento em resposta à ACh foi consideravelmente reduzido em preparações de B₁^{-/-} quando comparados a WT. O comprometimento da vasodilatação induzida por ACh em preparações de B₁^{-/-} foi constatado em todas as doses administradas (Figura 9A). Por outro lado, não foram detectadas diferenças entre os grupos experimentais quando o NPS foi administrado às preparações (Figura 9B).

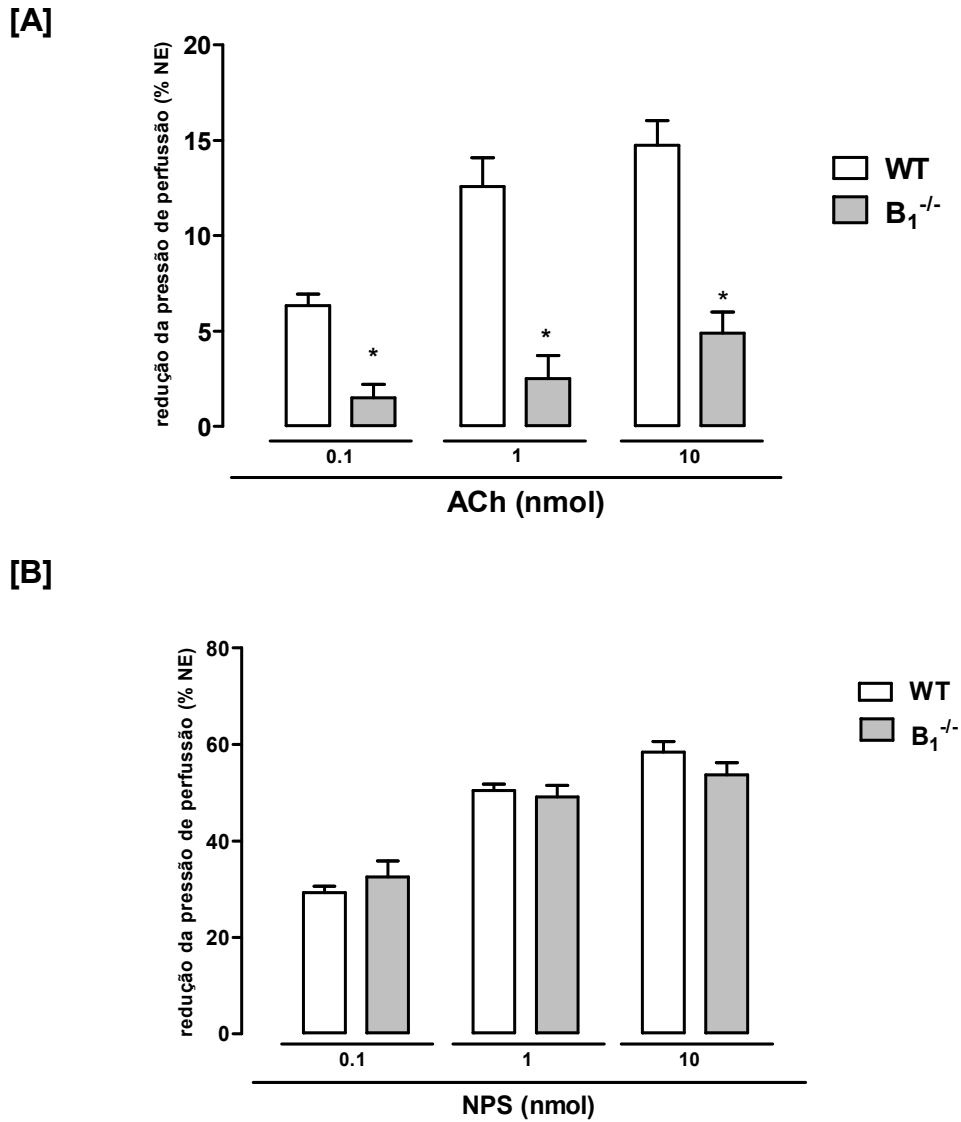


Figura 9: Efeito vasodilatador de ACh **[A]** e NPS **[B]** em leito arteriolar mesentérico de WT(□) e B₁^{-/-}(■). Respostas são expressas como % de contração induzida por NE (10 μmol/L). Resultados representam média ± EPM, n = 5-7 para cada dose. **P* < 0.05 vs WT.

4.2 Níveis plasmáticos de NO

Níveis de NO circulante foram determinados através da mensuração da concentração de nitritos/nitratos, derivados do metabolismo de NO, em amostras de sangue de ambas as linhagens. Como demonstrado na Figura 10, foi detectada uma redução significativa nos níveis de NO circulante em amostras de B₁^{-/-} (49,6 ± 10,5