

## Estresse Crônico Melhora a Função Vascular Dependente de NO e Fluxo de Ca<sup>2+</sup>: Um Estudo Farmacológico

*Chronic Stress Improves NO- and Ca<sup>2+</sup> Flux-Dependent Vascular Function: A Pharmacological Study*

Thiago Bruder-Nascimento<sup>1,2</sup>, Dijon Henrique Salome Campos<sup>2</sup>, Antônio Carlos Cicogna<sup>2</sup>, Sandra Cordellini<sup>1</sup>

Departamento de Farmacologia - Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade do Estado de São Paulo (UNESP)<sup>1</sup>; Departamento de Clínica Médica - Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade do Estado de São Paulo (UNESP)<sup>2</sup>, Botucatu, SP - Brasil

### Resumo

**Fundamento:** Estresse está associado com complicações cardiovasculares.

**Objetivos:** O objetivo do presente estudo foi avaliar se o estresse crônico induz alterações vasculares, e se essas alterações são dependentes de óxido nítrico (NO) e Ca<sup>2+</sup>.

**Métodos:** Ratos machos Wistar com 30 dias de idade foram separados em 2 grupos: controle (C) e Estresse (St). Utilizou-se estresse crônico de imobilização por 1 hora/dia, 5 dias/semana, 15 semanas. Pressão arterial sistólica foi avaliada. A função vascular foi avaliada em anéis aórticos. Curvas de concentração-efeito foram realizadas para noradrenalina, na presença de L-NAME ou prazosina, cloreto de potássio (KCl), acetilcolina e nitroprussiato de sódio. Também foi efetuado um estudo para avaliação para fluxo de Ca<sup>2+</sup>.

**Resultados:** Estresse crônico induziu hipertensão e resposta vascular diminuída para noradrenalina e KCl e aumentada para acetilcolina. A pré-incubação com L-NAME eliminou a diferença para noradrenalina. A resposta contrátil vascular para Ca<sup>2+</sup> foi reduzida em animais estressados.

**Conclusão:** Nossos dados sugerem que a resposta vascular ao estresse crônico seria uma adaptação aos efeitos deletérios do estresse, incluindo a hipertensão. Além disso, esses mecanismos adaptativos dependem de liberação de NO e fluxo de Ca<sup>2+</sup>. Esses resultados ajudam a esclarecer os mecanismos envolvidos nas alterações cardiovasculares associadas ao estresse. Entretanto, mais estudos são necessários para a melhor compreensão desses mecanismos. (Arq Bras Cardiol. 2015; 104(3):226-233)

**Palavras-chave:** Estresse Fisiológico / fisiopatologia; Hipertensão; Óxido Nítrico / fisiologia; Ratos; Vasoconstritores / farmacologia.

### Abstract

**Background:** Stress is associated with cardiovascular diseases.

**Objective:** This study aimed at assessing whether chronic stress induces vascular alterations, and whether these modulations are nitric oxide (NO) and Ca<sup>2+</sup> dependent.

**Methods:** Wistar rats, 30 days of age, were separated into 2 groups: control (C) and Stress (St). Chronic stress consisted of immobilization for 1 hour/day, 5 days/week, 15 weeks. Systolic blood pressure was assessed. Vascular studies on aortic rings were performed. Concentration-effect curves were built for noradrenaline, in the presence of L-NAME or prazosin, acetylcholine, sodium nitroprusside and KCl. In addition, Ca<sup>2+</sup> flux was also evaluated.

**Results:** Chronic stress induced hypertension, decreased the vascular response to KCl and to noradrenaline, and increased the vascular response to acetylcholine. L-NAME blunted the difference observed in noradrenaline curves. Furthermore, contractile response to Ca<sup>2+</sup> was decreased in the aorta of stressed rats.

**Conclusion:** Our data suggest that the vascular response to chronic stress is an adaptation to its deleterious effects, such as hypertension. In addition, this adaptation is NO- and Ca<sup>2+</sup>-dependent. These data help to clarify the contribution of stress to cardiovascular abnormalities. However, further studies are necessary to better elucidate the mechanisms involved in the cardiovascular dysfunction associated with stressors. (Arq Bras Cardiol. 2015; 104(3):226-233)

**Keywords:** Stress, Physiological / physiopatology; Hypertension; Nitric Oxide / physiology; Rats; Vasoconstrictor Agents / pharmacology.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

**Correspondência:** Thiago Bruder do Nascimento •

Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre. CEP 14049-900, Ribeirão Preto, SP – Brasil

Email: bruderthiago@usp.br; bruderthiago@yahoo.com.br

Artigo recebido em 03/07/14; revisado em 29/08/14; aceito em 09/09/14.

DOI: 10.5935/abc.20140207

## Introdução

O estresse é conhecido como uma condição complexa e multidimensional<sup>1</sup>. As respostas aos agentes estressores dependem da intensidade, da frequência, da duração e do tipo desses agentes. O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e o sistema nervoso simpático (SNS) são os principais responsáveis pela modulação do organismo ao agente estressor<sup>2</sup>. Quando esses sistemas são estimulados, hormônio glicocorticoide, como o cortisol, e aminas biogênicas, como adrenalina e noradrenalina, são liberados através do eixo HHA e do SNS, respectivamente<sup>3</sup>.

O estresse desencadeia diferentes disfunções e patologias, como asma, alergia, depressão, ansiedade, úlcera, disfunção metabólica e doenças cardiovasculares, como acidente vascular cerebral, hipertensão e infarto<sup>2,4-8</sup>.

Dados da literatura e de nosso laboratório mostraram que o estresse induz alterações cardíacas, como fibrose, disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo (VE) e alteração do trânsito de  $Ca^{2+}$ <sup>6,9-13</sup>. Além disso, as alterações cardiovasculares não estão restritas apenas ao coração, havendo evidência de que diferentes tipos de estresse agudo modulam a resposta vascular a diferentes agonistas, como elevação da resposta a acetilcolina e diminuição do efeito contrátil da noradrenalina, que são dependentes do óxido nítrico (NO) e do endotélio<sup>7,14-16</sup>. No entanto, mais estudos são necessários para melhor entender os mecanismos envolvidos nas respostas moduladas induzidas por estresse.

Portanto, este estudo teve por objetivo avaliar se o estresse crônico induz alterações vasculares, se tais modulações são dependentes de NO- e  $Ca^{2+}$ , e o real envolvimento do receptor adrenérgico  $\alpha_1$ . Nossa hipótese é que o estresse crônico promova respostas adaptativas vasculares dependentes de NO e  $Ca^{2+}$ , assim como a dessensibilização do receptor adrenérgico  $\alpha_1$ . Para a compreensão do envolvimento dos mediadores e do receptor adrenérgico  $\alpha_1$  mencionados acima, utilizaram-se ferramentas farmacológicas.

## Métodos

### Animais

Ratos machos Wistar de 30 dias de idade (70-100 g) provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu (Botucatu, São Paulo, Brasil) foram mantidos em gaiolas individuais. Foram mantidos constantes no ambiente a luz (ciclos de claro/escuro de 12 horas, começando às 6 h), o ar limpo, a temperatura ( $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ) e a umidade relativa ( $60\% \pm 5\%$ ). Após sete dias de aclimação, os ratos foram distribuídos em dois grupos: controle (C,  $n = 8$ ) e estresse crônico (St,  $n = 8$ ). Todos os experimentos e os procedimentos foram realizados conforme o *Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório* publicado pelo Conselho Nacional de Pesquisa (1996) e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu (protocolo nº 95/08-CEEA).

### Estresse crônico

As características do estresse a serem consideradas qualidade, frequência, tipo, físico ou emocional, assim como a espécie animal estudada<sup>17</sup>. A imobilização é um modelo de

estresse emocional, sendo um dos mais usados em pesquisa<sup>18</sup>. A partir dos 37 dias de idade, os animais do grupo St foram imobilizados individualmente em cápsulas de metal em temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) por uma hora ao dia, cinco dias por semana e por 15 semanas.

Durante a sessão de estresse, os animais do grupo C permaneceram nas gaiolas em temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) sem receber alimento nem água. Então, os animais do grupo St foram recolocados em suas gaiolas. Após 48 horas da última sessão de estresse, os animais foram submetidos aos protocolos experimentais.

### Teste de hipertrofia cardíaca e adrenal

Os animais foram sacrificados e avaliados quanto a hipertrofia de glândulas adrenais e de VE. Essas glândulas e o VE foram removidos, dissecados e pesados. A hipertrofia cardíaca foi avaliada através da relação VE/tíbia (mm) e, na ecocardiografia, pela relação VE/peso corporal final (PCF), conforme nosso estudo prévio<sup>7,8,13</sup>.

### Pressão arterial sistólica (PAS)

A PAS foi avaliada ao final da exposição ao estresse usando-se o método não invasivo de pletismografia de cauda (Narco BioSistemas®, International Biomedical, Austin, TX, EUA). A média de duas medidas de PAS foi considerada para cada animal.

### Nível de corticosterona

Os animais foram submetidos a jejum de 12–15 horas, anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.) e sacrificados por decapitação. As amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados, centrifugadas a 3000 X g por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , e o soro separado e estocado a  $-80^\circ\text{C}$  para análise posterior. O nível de corticosterona foi medido com um *kit* específico de radioimunoensaio (Coat-A-Count Rat Corticosterone – Diagnostic Products Corporation).

### Função vascular

Após exposição ao estresse por 15 semanas, os ratos foram sacrificados. A aorta torácica descendente foi excisada e dela retirados a gordura e o tecido conjuntivo aderidos. Dois anéis transversais da mesma artéria, medindo cerca de 4 mm de comprimento, foram cortados e montados no comprimento ideal para o registro da tensão isométrica em câmara de órgãos. Um anel serviu como controle, tendo o endotélio sido mecanicamente removido dos demais por fricção suave na superfície luminal. As preparações foram montadas em banhos de órgão contendo 7 ml de solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição em mM: NaCl 113,0; KCl 4,7;  $CaCl_2$  2,5;  $KH_2PO_4$  1,2;  $MgSO_4$  1,1;  $NaHCO_3$  25,0; glicose 11,0; ácido ascórbico 0,11. O fluido de banho, mantido a  $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , foi saturado com mistura gasosa de  $O_2$  (95%) e  $CO_2$  (5%), sendo 7,4 o pH. Deixou-se que as preparações entrassem em equilíbrio por pelo menos uma hora, sob uma tensão de repouso de 1,5 g, ideal para induzir contração máxima. A tensão foi registrada com um miógrafo (Ugo Basile).

Construíram-se curvas de concentração-efeito (CCE) a partir da resposta do tecido ao cloreto de potássio (KCl) e à noradrenalina. As CCE à noradrenalina foram construídas na ausência e na presença de L-NAME [ $3 \times 10^{-4}$  M, inibidor de NO sintase (NOS)] ou prazosina ( $10^{-8}$  M, antagonista do receptor adrenérgico  $\alpha_1$ ) (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, EUA).

Em outro conjunto de experimentos, construíram-se as CCE para a acetilcolina em anéis aórticos intactos (+E) e para nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis aórticos sem endotélio (-E) (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, EUA).

### Contribuição do $\text{Ca}^{2+}$ intracelular e extracelular para a reduzida resposta à noradrenalina dos anéis aórticos sem endotélio

A partir de adaptação de Tirapelli e cols.<sup>19</sup>, investigamos a contribuição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular na diminuição da resposta vascular à noradrenalina, obtendo-se resposta contrátil a esse agonista na solução de Krebs sem  $\text{Ca}^{2+}$ . Os anéis foram expostos a essa solução por 1 minuto e então estimulados com  $10^{-7}$  e  $10^{-6}$  M de noradrenalina, avaliando-se então a tensão. Além disso, o papel da mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular foi investigado usando-se contração induzida por  $\text{CaCl}_2$  na presença de noradrenalina. Em solução sem  $\text{Ca}^{2+}$  e contendo EDTA (1 mM), os anéis aórticos desnudados foram contraídos com noradrenalina ( $10^{-4}$  M) para esgotar os estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e, então, enxaguados em solução de Krebs sem  $\text{Ca}^{2+}$  e EDTA e contendo noradrenalina (0,1 mM). O processo foi repetido várias vezes até a extinção da contração induzida por noradrenalina, quando se considerou que o  $\text{Ca}^{2+}$  foi completamente esgotado.

### Análise estatística

Os dados foram apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A massa cardíaca e a hipertrofia adrenal, os níveis de corticosterona e a PAS final dos grupos foram comparados usando-se o teste *t* e o teste de Tukey *post hoc* com o software GraphPad Prism 6.04. As curvas de concentração-efeito individuais foram submetidas a análise de regressão não-linear. Os valores do algoritmo negativo de EC50 (pD2) e a resposta máxima foram comparados usando-se o teste *t* de Student ou ANOVA, quando apropriado. Adotou-se o nível de significância de 5%.

### Resultados

O estresse crônico não aumentou a massa cardíaca: os valores de LV (g)/tíbia (mm) nos grupos C e St foram  $0,15 \pm 0,02$  vs  $0,16 \pm 0,03$ , respectivamente; e os resultados da ecocardiografia [LV (g)/PCF (g)] nos grupos C e St foram  $1,45 \pm 0,16$  vs  $1,52 \pm 0,11$ , respectivamente. No entanto, o estresse crônico aumentou o peso seco da adrenal (grupo C =  $0,57 \pm 0,08$  vs grupo St =  $0,76 \pm 0,05$ ). Além disso, os animais expostos a estresse crônico desenvolveram hipertensão [C =  $118,3 \pm 12,3$  vs St =  $148,8 \pm 9,43^*$  (mmHg)] e apresentaram elevação dos níveis plasmáticos de corticosterona [C =  $48,3 \pm 10,2$  vs St =  $97,2 \pm 16,3^*$  (ng/mL)] \**p* < 0,05.

O estresse crônico promoveu diminuição da resposta máxima ao KCl nos anéis aórticos com ou sem endotélio [+E

(C:  $2,65 \pm 0,48$  vs St:  $2,06 \pm 0,26^*$ ); -E (C:  $2,62 \pm 0,64$  vs St:  $2,18 \pm 0,62^*$ )]. Além disso, não houve diferença na  $\text{pD}_2$  dos anéis com e sem endotélio [(C:  $3,47 \pm 0,10$  vs St:  $3,36 \pm 0,09$ ) e (C:  $11,51 \pm 2,80$  vs St:  $11,17 \pm 2,81$ )] (Figura 1) \**p* < 0,05.

À semelhança da resposta ao KCl, os anéis aórticos com ou sem endotélio dos ratos submetidos ao estresse também apresentaram redução da resposta máxima à noradrenalina. Pré-incubação com L-NAME obscureceu essas alterações. Não houve diferença nos parâmetros  $\text{pD}_2$  nos grupos sem pré-incubação com L-NAME. A pré-incubação com L-NAME elevou a sensibilidade à noradrenalina nos anéis com e sem endotélio (Figura 2 e Tabela 1).

A prazosina, antagonista  $\alpha_1$  competitivo, foi usada para avaliar o real envolvimento do receptor adrenérgico  $\alpha_1$ . Ela desviou para a direita a resposta à noradrenalina em anéis aórticos sem endotélio, mas não houve diferença entre os grupos C e St quanto ao parâmetro  $\text{pD}_2$  (C =  $7,82 \pm 0,08$ ; St =  $7,81 \pm 0,09$ ; C/Prazosina =  $6,02 \pm 0,05^*$ ; St/Prazosina =  $6,14 \pm 0,06^*$ ) \**p* < 0,05 (Figura 3).

O estresse crônico aumentou a resposta máxima à acetilcolina em anéis aórticos com endotélio, assim como sua sensibilidade (Figura 4.A e Tabela 2). Além disso, anéis aórticos sem endotélio dos ratos submetidos ao estresse apresentaram desvio para a esquerda para o doador de NO, NPS, e não houve diferença na resposta máxima (Figura 4.B e Tabela 2).

Os ratos submetidos a estresse apresentaram diminuição da resposta contrátil à noradrenalina na solução de Krebs sem  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, as CCE para  $\text{CaCl}_2$ , na presença de noradrenalina, em anéis aórticos sem endotélio de ratos submetidos a estresse crônico também apresentaram diminuição da resposta máxima. Não se observou diferença em  $\text{pD}_2$  (Figura 5 e Tabela 3).

### Discussão

No presente estudo, o estresse crônico aumentou o peso seco da adrenal e os níveis plasmáticos de corticosterona, o que sugere aumento da atividade do eixo HHA, corroborando achados da literatura, que mostram esses mesmos efeitos em diferentes modelos de estresse<sup>17,20,21</sup>. O estresse pode levar a hipertensão através da produção de vários mediadores ou hiperatividade de alguns sistemas, como renina-angiotensina-aldosterona, e aminas vasoativas, como adrenalina, associadas com regulação da pressão arterial<sup>22-24</sup>. Nosso modelo de estresse levou a hipertensão, que pode estar associada com liberação de adrenalina pelas adrenais, uma vez que encontramos aumento da massa adrenal, que indica hiperatividade do SNS, corroborando achados da literatura<sup>13,22</sup>.

Estresse, em modelos agudo ou crônico, melhora a função vascular para diferentes agonistas<sup>7,14,16,25</sup>. Nossos resultados corroboram tais dados, observando-se respostas aumentadas para noradrenalina e acetilcolina. Além disso, podemos sugerir que tais respostas sejam dependentes de NO por duas razões: i) a incubação prévia com inibidor de NOS aboliu a redução da resposta máxima à noradrenalina nos anéis aórticos de ratos submetidos ao estresse em comparação com aqueles do grupo controle; ii) descobrimos que a resposta à acetilcolina foi maior nos anéis aórticos do grupo St do que naqueles do grupo C.

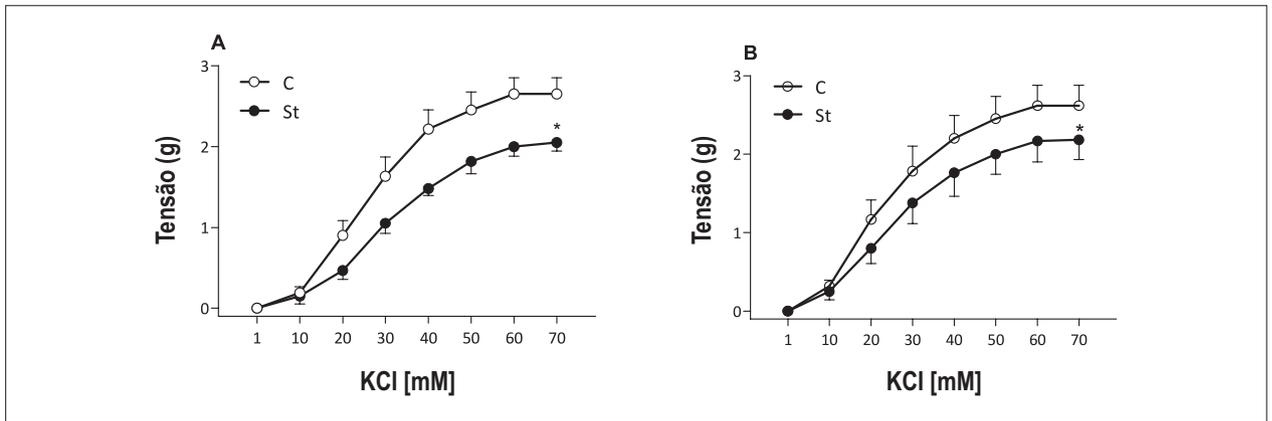


Figura 1 – Curvas de concentração-efeito para KCl obtidas com dois anéis, um com endotélio (A) e outro sem (B), da mesma aorta torácica em ratos dos grupos controle (C - círculos vazios) e estresse (St - círculos cheios). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n = 6) \*p < 0,05.

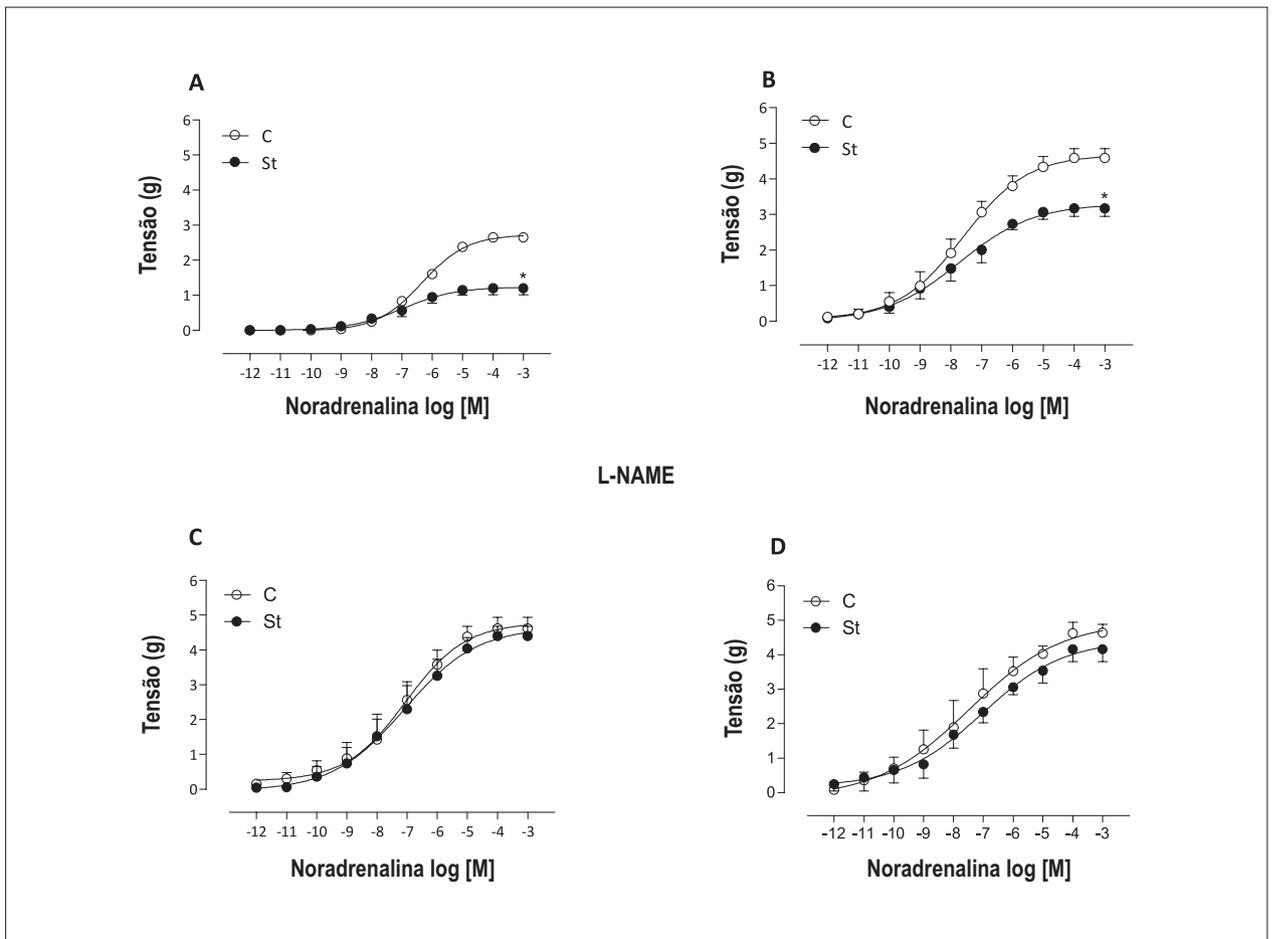


Figura 2 – Curvas de concentração-efeito para noradrenalina obtidas em anéis aórticos com endotélio intacto (E+) (A e C) e desnudado (E-) (B e D), na presença (C e D) ou ausência (A e B) de L-NAME ( $3 \times 10^{-4}$  M), em ratos dos grupos controle (C - círculos vazios) e estresse (St - círculos cheios). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n = 5-7) \*p < 0,05.

Tabela 1 – Reatividade vascular à noradrenalina na presença ou ausência de L-NAME

Grupos	Agonistas	Parâmetros			
		Resposta máxima		pD <sub>2</sub>	
		+E	-E	+E	-E
C	Nor	2,65 ± 0,21	4,58 ± 0,64 <sup>#</sup>	6,33 ± 0,07	7,60 ± 0,23 <sup>#</sup>
	Nor/L-NAME	4,62 ± 0,70 <sup>§</sup>	4,40 ± 0,63 <sup>#</sup>	7,05 ± 0,29 <sup>§</sup>	7,47 ± 0,52
St	Nor	1,20 ± 0,40 <sup>*</sup>	3,87 ± 0,58 <sup>**</sup>	6,49 ± 0,32	7,27 ± 0,21 <sup>#</sup>
	Nor/L-NAME	4,64 ± 0,55 <sup>§</sup>	4,16 ± 0,78 <sup>§*</sup>	7,08 ± 0,38 <sup>§</sup>	7,03 ± 0,44

C: grupo controle; St: grupo estresse. Efeitos do estresse crônico na resposta máxima e pD<sub>2</sub> (logaritmo negativo de EC50) para noradrenalina (Nor) em anéis aórticos de ratos Wistar, na presença ou ausência de L-NAME (3x10<sup>-4</sup> M). Curvas de concentração-efeito (CCE) foram construídas em anéis aórticos com endotélio intacto (E+) e endotélio desnudado (E-). Resultados apresentados como média ± EPM de 5-7 ratos em cada grupo experimental. \*p < 0,05 C vs St; § p < 0,05 L-NAME vs Nor; # p < 0,05 -E vs +E

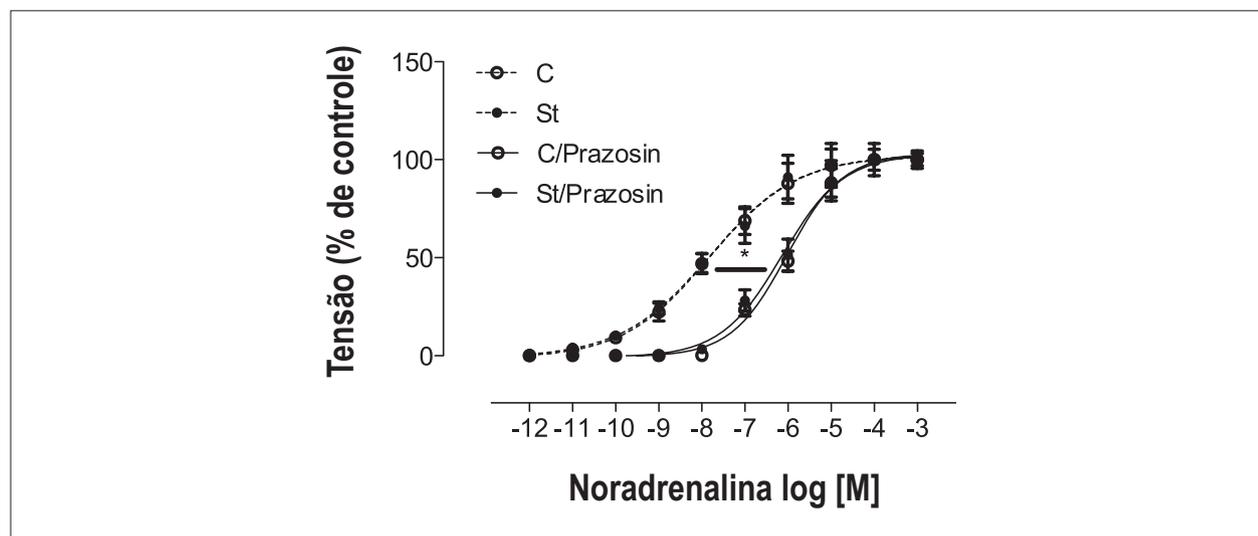


Figura 3 – Curvas de concentração-efeito para noradrenalina em anéis aórticos com endotélio desnudado (E-), na presença (linha sólida) ou ausência (linha tracejada) de prazosina (10<sup>-8</sup> M), em ratos dos grupos controle (C - círculos vazios) e estresse (St - círculos cheios). Dados apresentados como média ± EPM (n = 6) \*p < 0,05.

Acetilcolina, um agonista endotélio-dependente, pode liberar NO ao se ligar a receptor muscarínico localizado em células endoteliais, levando a relaxamento vascular<sup>26</sup>.

Outro achado interessante de nosso estudo mostra que o músculo liso vascular dos ratos submetidos a estresse é mais sensível ao NO do que aquele do grupo não submetido ao estresse, pois o doador de NO, NPS, induziu desvio para a esquerda nos anéis aórticos sem endotélio. Não avaliamos as vias associadas com a produção de NO, como AKT (proteína quinase B), que pode fosforilar NO sintase<sup>27</sup>, mas podemos confirmar que tanto liberação de NO quanto sensibilidade a ele estão envolvidas na modulação da resposta vascular ao estresse crônico.

Avaliamos se o receptor adrenérgico α1 participa da função vascular de ratos submetidos ao estresse, usando um antagonista competitivo para o receptor adrenérgico α1. Concluímos que a atividade do receptor adrenérgico α1 não se altera na aorta de ratos submetidos ao estresse, e que a redução da resposta máxima observada no grupo

deve estar ligada aos eventos *downstream* do receptor adrenérgico α1, como liberação de NO e sensibilidade a ele<sup>28</sup>, ou a liberação de NO deve estar associada à ativação do receptor adrenérgico α1 por noradrenalina<sup>29</sup>.

À semelhança da resposta à noradrenalina, o KCl, um agonista contrátil não dependente de receptor, também apresentou diminuição da resposta máxima em anéis aórticos do grupo St. Tais dados, juntamente com prazosina e noradrenalina, reforçam o envolvimento de um mediador intracelular na resposta vascular ao estresse, o NO sendo um forte candidato, pois a contração vascular induzida por KCl não depende de um receptor específico, mas de potencial de ação.

O Ca<sup>2+</sup> tem papel crucial na homeostase vascular, modulando a função e a estrutura vasculares, o Ca<sup>2+</sup> intracelular e a sua captação sendo essenciais para uma operação perfeita<sup>30</sup>. Analisamos se o Ca<sup>2+</sup> intracelular e a sua captação estão envolvidos na atenuação da vasoconstrição à noradrenalina em ratos submetidos ao estresse. Observou-se atenuação da resposta

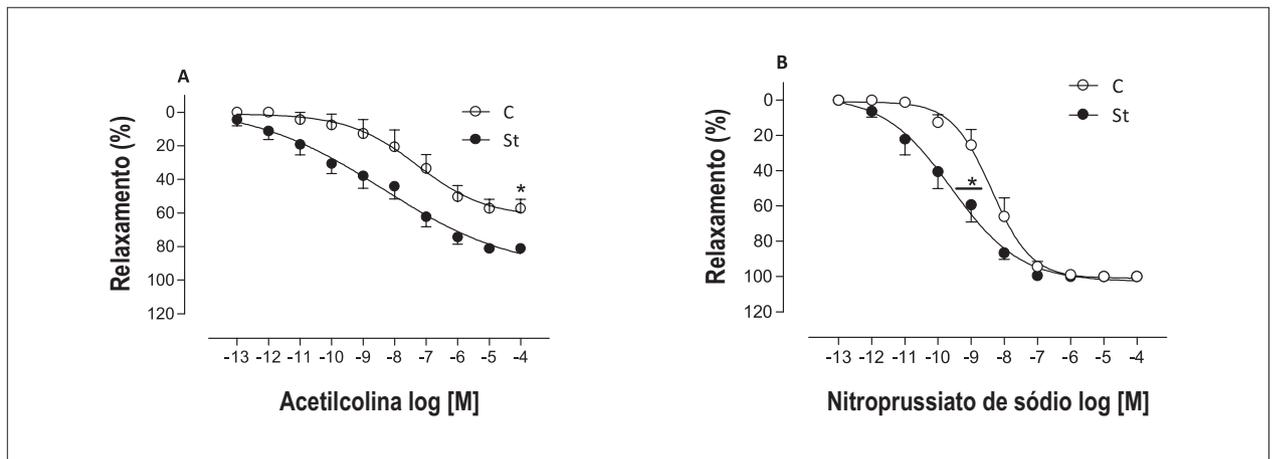


Figura 4 – Curvas de concentração-efeito para acetilcolina (A), obtidas em anéis aórticos com endotélio intacto (E+), e para nitroprussiato de sódio (B), obtidas em anéis aórticos com endotélio desnudado (E-), em ratos dos grupos controle (C - círculos vazios) e estresse (St - círculos cheios). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n = 5-7) \*p < 0,05.

Tabela 2 – Reatividade vascular à acetilcolina

Grupos	Agonistas	Parâmetros	
		Resposta máxima	pD <sub>2</sub>
+E			
C	ACh (%)	62,4 $\pm$ 8,63	7,27 $\pm$ 0,47
St		95,3 $\pm$ 16,2*	8,37 $\pm$ 0,63*
-E			
C	NPS (%)	101 $\pm$ 5,4	8,38 $\pm$ 0,10
St		103 $\pm$ 5,7	9,58 $\pm$ 0,22*

C: grupo controle; St: grupo estresse. Efeitos do estresse crônico na resposta máxima e pD<sub>2</sub> (logaritmo negativo de EC<sub>50</sub>) para acetilcolina (ACh) em anéis aórticos com endotélio intacto (E+) e para nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis aórticos com endotélio desnudado (E-) de ratos Wistar. Curvas de concentração-efeito (CCE) foram construídas. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM de 5-7 ratos em cada grupo experimental. \* p < 0,05 C vs St.

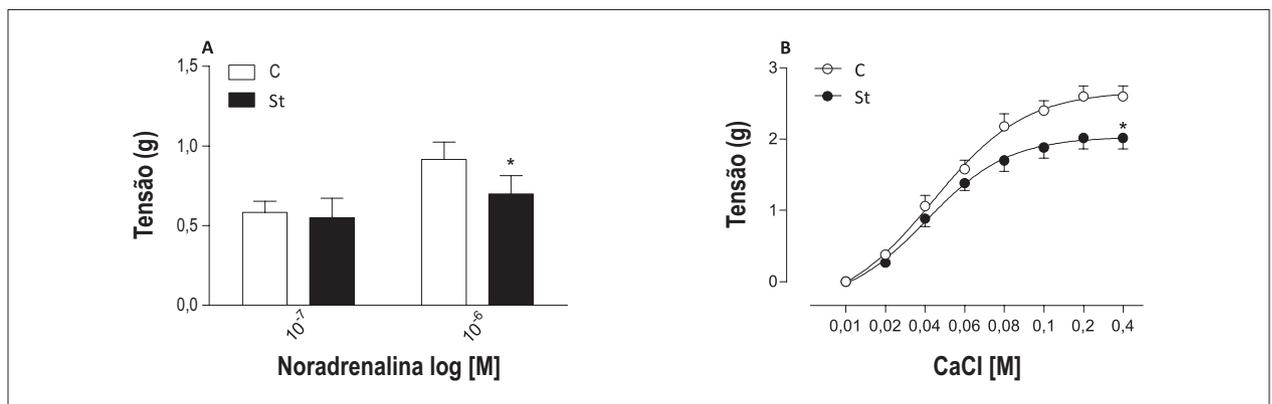


Figura 5 – Resposta contrátil à noradrenalina em anéis aórticos com endotélio desnudado (E-) de ratos dos grupos controle (barra vazia) e estresse (barra sólida) em solução de Krebs sem Ca<sup>2+</sup> (A). Curvas de concentração-efeito para CaCl<sub>2</sub> em anéis aórticos com endotélio desnudado de ratos dos grupos controle (C - círculos vazios) e estresse (St - círculos cheios). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n = 5-7) \*p < 0,05.

Tabela 3 – Reatividade vascular ao  $\text{CaCl}_2$

Grupos	Agonistas	Parâmetros	
		Resposta máxima	$\text{pD}_2$
		-E	
C	$\text{CaCl}_2$	2,76 ± 0,13	8,81 ± 0,34
St		2,03 ± 0,10*	8,97 ± 0,37

C: grupo controle; St: grupo estresse. Efeitos do estresse crônico na resposta máxima e  $\text{pD}_2$  (logaritmo negativo de  $\text{EC}_{50}$ ) para  $\text{CaCl}_2$  em anéis aórticos de ratos Wistar. Curvas de concentração-efeito (CCE) foram construídas em anéis aórticos com endotélio desnudado. Resultados apresentados como média ± EPM de 5-7 ratos em cada grupo experimental. \*  $p < 0,05$  C vs St.

vascular a concentrações isoladas de noradrenalina no presente estudo. Portanto, podemos sugerir que a liberação intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , que ocorre no retículo endoplasmático após interação do inositol trisfosfato (IP3) com seu receptor localizado na membrana do retículo endoplasmático<sup>31,32</sup>, ou a baixa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo endoplasmático poderia participar dessa modulação. Além disso, a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  por algum canal, como o canal de cálcio do tipo  $\text{L}^{32,33}$ , poderia ser baixa na vasculatura do grupo St, uma vez que a CCE para  $\text{Ca}^{2+}$ , em um meio sem  $\text{Ca}^{2+}$  e na presença de noradrenalina, mostrou-se atenuada nos anéis aórticos sem endotélio de ratos submetidos a estresse.

## Conclusão

Nosso estudo auxilia a compreensão e identifica novos mediadores envolvidos na resposta vascular atenuada à noradrenalina em ratos submetidos ao estresse, sendo a liberação de NO e o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  possíveis mediadores. Acreditamos que esses mediadores sejam positivamente ativados para contrabalançar os deletérios efeitos cardiovasculares causados por situações estressantes. No entanto, mais estudos são necessários para melhor entendermos a resposta adaptativa ao estresse crônico.

## Referências

- McEwen BS, Seeman T. Protective and damaging effects of mediators of stress. Elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load. *Ann NY Acad Sci.* 1999;896:30-47.
- Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 2002; 53(4):865-71.
- Dunn AJ, Swiergiel AH. The role of corticotropin-releasing factor and noradrenaline in stress-related responses, and the inter-relationships between the two systems. *Eur J Pharmacol.* 2008;583(2-3):186-93.
- Viau V, Meaney MJ. Variations in the hypothalamic-pituitary- adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology.* 1991;129(5):2503-11.
- Hjemdahl P. Stress and the metabolic syndrome: an interesting but enigmatic association. *Circulation.* 2002;106(21):2634-6.
- Rozanski A, Blumenthal JA, Davidson KW, Saab PC, Kubzansky L. The epidemiology, pathophysiology, and management of psychosocial risk factors in cardiac practice: the emerging field of behavioral cardiology. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(5):637-51.
- Bruder-Nascimento T, Cordellini S. Vascular adaptive responses to physical exercise and to stress are affected differently by nandrolone administration. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(4):337-44.
- Bruder-Nascimento T, Campos DH, Alves C, Thomaz S, Cicogna AC, Cordellini S. Effects of chronic stress and high-fat diet on metabolic and nutritional parameters in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2013;57(8):642-9.
- Costoli T, Bartolomucci A, Graiani C, Stilli D, Laviola G, Sgoifo A. Effects of chronic psychosocial stress on cardiac autonomic responsiveness and myocardial structure in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(6):H2133-40.
- Krepsova K, Micutkova L, Novotova M, Kubovcakova L, Kvetnansky R, Krizanova O. Repeated immobilization stress decreases mRNA and protein levels of the type 1 IP3 receptor in rat heart. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1018:339-44.
- Burri MV, Nanda NC, Lloyd SG, Hsiung MC, Dod HS, Beto RJ, et al. Assessment of systolic and diastolic left ventricular and left atrial function using vector velocity imaging in Takotsubo cardiomyopathy. *Echocardiography.* 2008;25(10):1138-44.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, Análise estatística e Obtenção de financiamento: Bruder-Nascimento T, Cicogna AC, Cordellini S; Obtenção de dados: Bruder-Nascimento T, Campos DHS; Análise e interpretação dos dados e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Bruder-Nascimento T, Campos DHS, Cicogna AC, Cordellini S; Redação do manuscrito: Bruder-Nascimento T.

## Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela Fapesp processo: 2009/03771-2.

## Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de Dissertação de Mestrado de Thiago Bruder do Nascimento pela Universidade do Estado de São Paulo.

12. Zhao Y, Xu J, Gong JB, Qian L. L-type calcium channel current up-regulation by chronic stress is associated with increased  $\alpha 1c$  subunit expression in rat ventricular myocytes. *Cell Stress Chaperones*. 2009;14(1):33-41.
13. Bruder-Nascimento T, Campos DH, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Okoshi K, Cordellini S, et al. Chronic stress improves the myocardial function without altering L-type  $Ca^{+2}$  channel activity in rats. *Arq Bras Cardiol*. 2012;99(4):907-14.
14. Milakofsky L, Harris N, Vogel WH. Effects of repeated stress on plasma arginine levels in young and old rats. *Physiol Behav*. 1993;54(4):725-8.
15. Manukhina EB, Lapshin AV, Meerson FZ. Effect of adaptation to periodic hypoxia on post infarction fall of blood pressure and hyperactivation of the endothelium. *Fisiol Zh*. 1998;37(3):98-105.
16. Cordellini S, Vassiliefv VS. Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rats is potentiated by previous chronic stress: nitric oxide involvement. *Gen Pharmacol*. 1998;30(1):79-83.
17. Adam TC, Epel ES. Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav*. 2007;91(4):449-58.
18. Kvetnansky R, Weise VK, Thoa NB, Kopin JJ. Effects of chronic guanethidine treatment and adrenal medullectomy on plasma levels of catecholamines and corticosterone in forcibly immobilized rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1979;209(2):287-91.
19. Tirapelli CR, Al-Khoury J, Bkaily G, D'Orléans-Juste P, Lanchote VL, Uyemura SA, et al. Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316(1):233-41.
20. Huizenga NA, Koper JW, de Lange P, Pols HA, Stolk RP, Grobbee DE, et al. Interperson variability but intraperson stability of baseline plasma cortisol concentrations, and its relation to feedback sensitivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to a low dose of dexamethasone in elderly individuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(1):47-54.
21. Ricart-Jané D, Rodríguez-Sureda V, Benavides A, Peinado-Onsurbe J, López-Tejero MD, Llobera M. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. *Metabolism*. 2002;51(7):925-31.
22. Kulkarni S, O'Farrell I, Erasi M, Kochar MS. Stress and hypertension. *WMJ*. 1998;97(11):34-8.
23. Pausova, Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(2):173-8.
24. Santos PC, Krieger JE, Pereira AC. Renin-angiotensin system, hypertension, and chronic kidney disease: pharmacogenetic implications. *J Pharmacol Sci*. 2012; 120(2):77-88.
25. Lanza Júnior U, Cordellini S. Differential vascular adaptive response to stress exposition in male and female rats: role of gonadal hormones and endothelial cells. *Stress*. 2007;10(1):27-36.
26. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
27. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;10;399(6736):601-5.
28. Jones CJ, DeFily DV, Patterson JL, Chilian WM. Endothelium-dependent relaxation competes with alpha 1- and alpha 2-adrenergic constriction in the canine epicardial coronary microcirculation. *Circulation*. 1993;87(4):1264-74.
29. Rascado RR, Bendhack LM. Activation of alpha2-adrenoceptors is necessary to induce nitric oxide release in isoprenaline-induced relaxation. *Vascul Pharmacol*. 2005;42(2):63-8.
30. Orlov S, Resink TJ, Bernhardt J, Ferracin F, Buhler FR. Vascular smooth muscle cell calcium fluxes. Regulation by angiotensin II and lipoproteins. *Hypertension*. 1993;21(2):195-203.
31. Bolton TB. Calcium events in smooth muscles and their interstitial cells; physiological roles of sparks. *J Physiol*. 2006;570(Pt 1):5-11.
32. Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO. Inositol trisphosphate receptor  $Ca^{2+}$  release channels. *Physiol Rev*. 2007;87(2):593-658.
33. Callera GE, Bendhack LM. Contribution of sarcoplasmic reticulum calcium uptake and L type calcium channels to altered vascular responsiveness in the aorta of renal hypertensive rats. *Gen Pharmacol*. 1999;33(6):457-66.