

## Estresse Isolado ou Associado ao Etanol Libera Prostanóides em Aorta de Ratos via $\alpha$ 2-Adrenoceptores

*Stress Alone or associated with Ethanol Induces Prostanoid Release in Rat Aorta via  $\alpha$ 2-Adrenoceptor*

Rafaela de Fátima Ferreira Baptista<sup>1,2</sup>, Elane de Fátima Taipeiro<sup>2</sup>, Regina Helena Costa Queiroz<sup>3</sup>, Agnaldo Bruno Chies<sup>1,2</sup>, Sandra Cordellini<sup>1</sup>

Departamento de Farmacologia - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista - UNESP<sup>1</sup>; Laboratório de Farmacologia - Faculdade de Medicina de Marília - FAMEMA<sup>2</sup>, SP; Departamento de Análise Clínica - Toxicológica e Ciência de Alimentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP<sup>3</sup>, São Paulo, SP – Brasil

### Resumo

**Fundamento:** Estresse e etanol são ambos, independentemente, importantes fatores de risco cardiovascular.

**Objetivo:** Avaliar o risco cardiovascular do consumo de etanol e exposição ao estresse, isolados e em associação, em ratos machos adultos.

**Métodos:** Os ratos foram separados em quatro grupos: controle, etanol (20% na água de beber durante seis semanas), estresse (imobilização 1h dia/5 dias por semana/ 6 semanas) e estresse/etanol. As curvas de concentração-resposta à noradrenalina - na ausência e na presença de ioimbina, L-NAME ou indometacina - ou fenilefrina foram determinadas em aortas torácicas com e sem endotélio. EC50 e resposta máxima (n = 8-12) foram comparadas através de ANOVA de dois fatores (two-way) / método de Bonferroni.

**Resultados:** Estresse ou estresse em associação com o consumo de etanol aumentaram as respostas máximas de noradrenalina em aortas intactas. Essa hiper-reatividade foi eliminada pela remoção do endotélio, ou pela presença da indometacina ou ioimbina, mas não foi alterada pela presença de L-NAME. Enquanto isso, o consumo de etanol não alterou a reatividade à noradrenalina. As respostas da fenilefrina em aortas com e sem endotélio também permaneceram inalteradas independentemente do protocolo.

**Conclusão:** O estresse crônico aumentou as respostas aórticas dos ratos à noradrenalina. Esse efeito é dependente do endotélio vascular e envolve a liberação de prostanóides vasoconstritores através da estimulação de  $\alpha$ -2 adrenoceptores endoteliais. Além disso, o consumo crônico de etanol pareceu não influenciar as respostas de noradrenalina em aorta de rato, nem modificar o aumento de tais respostas observadas em consequência da exposição ao estresse. (Arq Bras Cardiol. 2014; 102(3):211-218)

**Palavras-chave:** Estresse; Consumo de bebidas alcoólicas; Norepinefrina; Agonistas de receptores adrenérgicos alfa 2; Ratos.

### Abstract

**Background:** Stress and ethanol are both, independently, important cardiovascular risk factors.

**Objective:** To evaluate the cardiovascular risk of ethanol consumption and stress exposure, isolated and in association, in male adult rats.

**Methods:** Rats were separated into 4 groups: Control, ethanol (20% in drinking water for 6 weeks), stress (immobilization 1h day/5 days a week for 6 weeks) and stress/ethanol. Concentration-responses curves to noradrenaline - in the absence and presence of yohimbine, L-NAME or indomethacin - or to phenylephrine were determined in thoracic aortas with and without endothelium. EC50 and maximum response (n=8-12) were compared using two-way ANOVA/Bonferroni method.

**Results:** Either stress or stress in association with ethanol consumption increased the noradrenaline maximum responses in intact aortas. This hyper-reactivity was eliminated by endothelium removal or by the presence of either indomethacin or yohimbine, but was not altered by the presence of L-NAME. Meanwhile, ethanol consumption did not alter the reactivity to noradrenaline. The phenylephrine responses in aortas both with and without endothelium also remained unaffected regardless of protocol.

**Conclusion:** Chronic stress increased rat aortic responses to noradrenaline. This effect is dependent upon the vascular endothelium and involves the release of vasoconstrictor prostanoids via stimulation of endothelial alpha-2 adrenoceptors. Moreover, chronic ethanol consumption appeared to neither influence noradrenaline responses in rat thoracic aorta, nor did it modify the increase of such responses observed as a consequence of stress exposure. (Arq Bras Cardiol. 2014; 102(3):211-218)

**Keywords:** Stress; Alcohol Drinking; Norepinephrine; Adrenergic alpha-2 Receptor Agonists; Rats.

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

**Correspondência:** Sandra Cordellini

Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, UNESP. CEP 18618-970, Rubião Júnior s/n, Botucatu, São Paulo, SP – Brasil

E-mail: cordelli@ibb.unesp.br

Artigo recebido em 20/07/13; revisado em 30/09/13; aceito em 02/10/13.

DOI: 10.5935/abc.20140015

### Introdução

O estresse crônico é um importante fator de risco para o desenvolvimento de patologias cardiovasculares<sup>1</sup>, tais como aterosclerose<sup>2</sup> disfunção endotelial<sup>3</sup> e hipertensão<sup>4</sup>. No entanto, a gravidade dos danos cardiovasculares causados por exposição ao estresse depende da natureza do estressor, bem como da sua intensidade e duração<sup>5</sup>.

A literatura relata que o estresse crônico prejudica a função endotelial, evidenciada por uma diminuição do relaxamento vascular induzido pela acetilcolina<sup>2</sup>, bem como uma redução da atividade da óxido nítrico sintase (NOS) na aorta<sup>6</sup>. Por sua vez, a exposição ao estresse agudo reduz a contração induzida por noradrenalina e aumenta o relaxamento induzido pela acetilcolina na aorta de rato<sup>1,7</sup>.

O consumo crônico de etanol também pode causar modificações cardiocirculatórias que contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares<sup>8,9</sup>. De acordo com essa possível associação, o consumo de etanol 20% ao longo de seis semanas aumentou a resposta do leito vascular mesentérico à fenilefrina em ratos Wistar<sup>8</sup>. O consumo de etanol também aumentou as respostas à agonistas simpáticos dentro dos vasos de condutância - vasos cujos mecanismos de modulação endotelial funcionam de modo diferente daqueles dos vasos de resistência. De fato, o consumo de etanol a 20% durante seis semanas aumentou as respostas à fenilefrina na aorta de ratos Wistar<sup>9</sup>. O consumo de etanol a 36% ao longo de 18 semanas também elevou as respostas da noradrenalina na artéria mesentérica de ratos<sup>10</sup>. Além disso, o consumo crônico de etanol 10% aumentou a resposta da noradrenalina na aorta de ratos machos Sprague-Dawley<sup>11</sup>. Por outro lado, o consumo crônico de etanol 20% diminuiu<sup>12</sup> ou não influenciou<sup>13</sup> respostas à fenilefrina em aortas de rato. Essas diferenças podem ser atribuídas às diferenças entre os protocolos experimentais ou características do modelo animal<sup>14</sup>.

Embora tanto o etanol quanto o estresse desempenhem papéis importantes no desenvolvimento de doença cardiovascular, ainda persistem dúvidas acerca de seus efeitos sobre a capacidade de resposta vascular especificamente. Estas dúvidas são ainda mais numerosas quando se consideram os efeitos de ambos os fatores em associação. Assim, o objetivo deste estudo foi o de abordar estas questões persistentes. Especificamente, o objetivo desse estudo foi investigar, em ratos adultos, a resposta vascular adaptativa à agonistas simpáticos induzida pelo consumo de álcool e exposição ao estresse (ambos isoladamente e em associação) e examinar seu mecanismo.

### Métodos

#### Desenho experimental

Ratos Wistar machos adultos (100 a 120 dias de idade) foram alojados em gaiolas de plástico com um ciclo claro-escuro de 12 horas (a  $23 \pm 2^\circ$  C) e alimentados com ração normal de laboratório. Por seis semanas, os animais foram separados em quatro grupos: grupo controle, que recebeu água "ad libitum"; grupo de estresse, que foi imobilizado em um tubo de

contenção metálica (1 hora/dia, 5 dias/semana) para restringir completamente seus movimentos, preservando apenas a respiração; grupo etanol, que recebeu uma solução de etanol a 20% em vez de água para beber<sup>15</sup>; e grupo estresse/etanol, que foi submetido ao estresse de imobilização e recebeu uma solução de etanol a 20%. Os animais dos grupos etanol e estresse/etanol foram adaptados ao consumo de etanol, aumentando gradualmente a concentração de etanol na solução (5% na primeira semana, 10% na segunda semana, e 20% a partir da terceira semana em diante).

Todos os experimentos e procedimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, publicado pelo *National Institutes of Health* dos EUA<sup>16</sup> e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista.

#### Etanol no sangue

Sangue (5 mL por rato) foi coletado da aorta de ratos anestesiados em seringas contendo heparina. Amostras de sangue (1 mL) foram colocadas em frascos headspace de 10 mL, aos quais foi adicionado 1,0 g de cloreto de sódio, 1,0 mL de água, e 100 mL de solução padrão interno (acetonitrila, 1 mL L<sup>-1</sup>). A análise do etanol foi realizada utilizando um cromatógrafo de fase gasosa GC-17A (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um detector de ionização de chama e um amostrador de headspace HSS-4A (Shimadzu). Os padrões de calibração (0,10-3,16 mg mL<sup>-1</sup>) foram preparados em frascos de headspace. As concentrações de etanol são expressas em mg mL<sup>-1</sup> no sangue.

#### Anéis aórticos

Os animais foram sacrificados utilizando um dispositivo de guilhotina. Após a toracotomia, a aorta torácica descendente foi removida e dissecada em segmentos de 3-4 mm (dois anéis). Os anéis foram montados dentro de uma câmara de órgãos de 2 mL contendo solução de Krebs-Henseleit (NaCl 130, KCl 4,7, CaCl<sub>2</sub> 1,6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, MgSO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 15, glucose 11,1; em mmol/L). Na câmara de órgãos, os anéis foram fixados a um gancho de aço inoxidável que foi ligado a um suporte estacionário, bem como a um segundo gancho, o qual foi ligado a um transdutor de força isométrica. A solução de Krebs-Henseleit foi mantida em pH 7,4 e a 37 °C e borbulhada continuamente com uma mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. A tensão foi monitorada continuamente e gravada utilizando-se um sistema de aquisição de dados Powerlab 8/30 (ADInstruments, Castle Hill, NSW, Austrália). Antes da curva de concentração-resposta aos agonistas, os anéis foram equilibrados durante 60 minutos sob uma tensão de repouso de 1,5 g, que é a tensão ideal para induzir a contração máxima.

O estado funcional do endotélio foi testado no início da curva de concentração-resposta pela capacidade de acetilcolina 10<sup>-4</sup>M em induzir respostas vasodilatadoras em preparações pré-contraídas pela fenilefrina 10<sup>-5</sup>M. Preparações que apresentaram mais de 80% de relaxamento

foram consideradas como tendo um endotélio intacto, enquanto aquelas que não mostraram relaxamento foram consideradas completamente desprovidas de endotélio. Alguns anéis foram submetidos à remoção mecânica do endotélio. Preparações com e sem endotélio foram estudadas em paralelo.

### Ensaio de banho de órgãos

A noradrenalina ( $10^{-10}$  M a  $10^{-4}$  M, Sigma-Aldrich) ou fenilefrina ( $10^{-10}$  M a  $10^{-4}$  M, Sigma-Aldrich) foram cumulativamente adicionadas ao banho de órgãos, e as respostas evocadas (g) foram plotadas para se obter uma curva de concentração-resposta. Quando apropriado, as respostas à noradrenalina também foram determinadas em preparações pré-tratadas por 30 min com  $10^{-4}$  M de L-NAME (Sigma-Aldrich) ou  $10^{-5}$  M de indometacina (Sigma-Aldrich), - inibidores não-seletivos de NOS e de ciclo-oxigenase (COX), respectivamente. Em outra série de experimentos, foram determinadas as respostas à noradrenalina em anéis pré-tratados durante 30 minutos com  $10^{-6}$  M de ioimbina (Sigma-Aldrich), um antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico. Os inibidores e o antagonista foram adicionados durante o último período de estabilização de 30 minutos e mantiveram-se em contato com a preparação até o final do experimento.

A regressão não-linear (declive variável) das curvas de concentração-efeito obtida revelou a  $R_{max}$  (resposta máxima; ponto mais alto de cada curva de concentração-resposta) e  $EC_{50}$  (logaritmo negativo da concentração que provocou 50% da resposta máxima). O valor  $EC_{50}$  é indicativo da sensibilidade à droga estudada.

### Determinação de nitritos/nitratos ( $NO_2/NO_3$ )

Alíquotas de 100  $\mu$ l das amostras de plasma de diferentes grupos experimentais foram desproteïnadas com 200  $\mu$ l de etanol absoluto, no freezer ( $-20$  °C) por 30 minutos. Também foram submetidas à centrifugação (10.000 rpm durante 5 minutos) e o sobrenadante foi coletado. A fim de determinar o total de ( $NO_2/NO_3$ ) no plasma, a seguinte mistura foi utilizada como meio de reação: tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, cofatores (concentração final de 100  $\mu$ M de NADPH e FAD 5 mM) e nitrato redutase de *Aspergillus* (Sigma) a uma concentração de 0,1 U/mL. As amostras foram então incubadas por 3 horas em banho-maria a 37 °C antes de serem adicionadas ao reagente de Griess I (1% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico) e reagente de Griess II (naftil-etileno-diamina a 0,1%). Em seguida, o cromóforo do composto foi lido em um espectrofotômetro a 540 nm. A concentração das amostras foi calculada utilizando-se uma curva padrão com concentrações conhecidas de  $NaNO_2$  (0,40-200  $\mu$ l) e expressa em mM/L.

### Análise estatística

A concentração de agentes vasoativos que produzia uma resposta que era 50% da resposta máxima ( $EC_{50}$ ) foi calculada em cada experiência. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. As respostas máximas ( $R_{max}$ ) e os valores de  $EC_{50}$  foram comparados por ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Bonferroni, em que uma

variável foi o consumo do etanol e a outra a exposição ao estresse de imobilização. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## Resultados

As respostas à noradrenalina observadas em aortas intactas de animais expostos a estresse e estresse/etanol foram maiores do que as observadas em aortas intactas de animais de controle. Esses desfechos resultaram em valores elevados de  $R_{max}$ . Os animais expostos ao etanol isoladamente, no entanto, não demonstraram respostas mais elevadas do que os controles (Figura 1A). A presença de L-NAME aumentou a  $R_{max}$  à noradrenalina em anéis aórticos de animais dos grupos controle e etanol, permitindo respostas de magnitude semelhante com preparações retiradas dos grupos estresse e estresse/etanol (Figura 1B).

Inversamente, a indometacina aboliu a elevação das respostas à noradrenalina nas aortas dos grupos estresse e estresse/etanol, resultando, assim, em valores de  $R_{max}$  ao nível do grupo de controle (Figura 1C). Da mesma forma, a ioimbina também aboliu a hiper-reatividade à noradrenalina em aorta torácica dos animais dos grupos estresse e estresse/etanol (Figura 1D). Finalmente, em relação à  $EC_{50}$ , não foram detectadas diferenças entre os grupos, independentemente da ausência ou presença de L-NAME, indometacina ou ioimbina (Tabela 1).

A remoção do endotélio aumentou a sensibilidade à noradrenalina em relação à respectiva aorta com endotélio intacto (Tabela 1). Além disso, a remoção do endotélio aórtico eliminou a hiper-reatividade à noradrenalina observada nos grupos estresse e estresse/etanol (Figura 2A). Nenhum dos protocolos alterou a reatividade à noradrenalina em aortas desnudas (Figuras 2B, 2C e 2D), nem afetaram a reatividade à fenilefrina (Figuras 3A e 3B) em aortas intactas ou desnudas.  $EC_{50}$  da fenilefrina similares também foram observadas entre os grupos (Tabela 2).

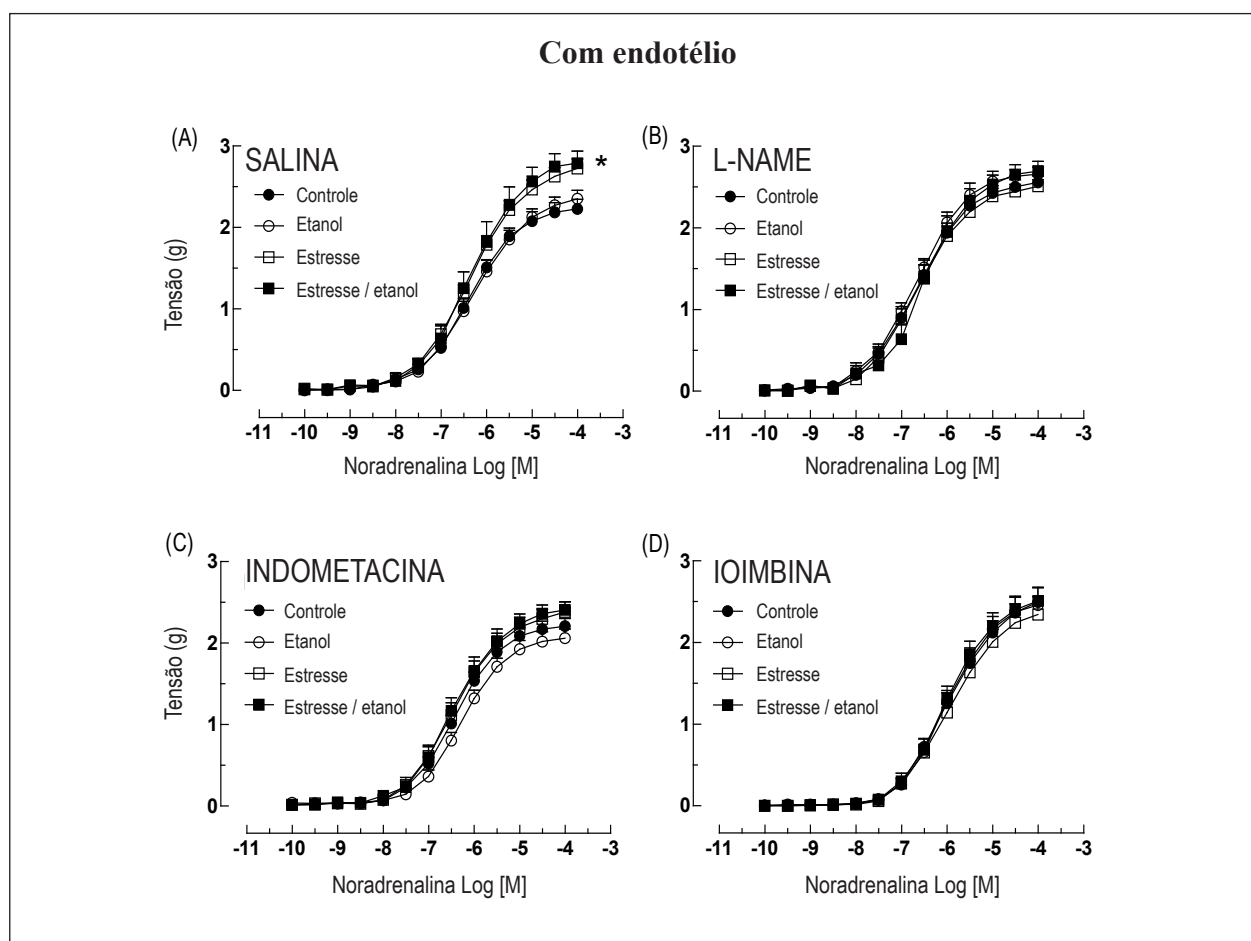
A concentração de etanol no sangue atingiu  $0,42 \pm 0,09$  mg / mL em ratos expostos ao etanol, durante 6 semanas,  $n = 8$ , enquanto a concentração atingiu  $0,57 \pm 0,13$  mg/mL no grupo estresse/etanol,  $n = 10$ .

A concentração no plasma de nitrito/nitrato, determinada pela reação de Griess, não foi significativamente diferente entre os grupos (Figura 4).

## Discussão

Evidências experimentais e epidemiológicas sugerem que tanto o etanol quanto o estresse desempenham um papel importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares<sup>2,17,18</sup>. No entanto, há divergências na literatura sobre os efeitos do consumo crônico de etanol, bem como a exposição ao estresse, sobre as respostas vasculares a agentes vasoativos. Além disso, a literatura é escassa em relação aos riscos cardiovasculares da associação desses fatores.

Os dados aqui relatados mostram que, independentemente do consumo de etanol, o estresse induziu hiper-reatividade da aorta à noradrenalina. Essa resposta parece ter sido dependente da integridade das células endoteliais, já que



**Figura 1** – Curvas de concentração-resposta à noradrenalina obtidas de anéis de aorta torácica intactos de animais expostos ao consumo de etanol e/ou estresse, na ausência ou na presença de L-NAME ( $10^{-4}$ M), indometacina ( $10^{-6}$ M) ou ioimbina ( $10^{-6}$ M). Os valores são expressos em médias  $\pm$  EPM. O número de determinações independentes é 8-10. \*Indica uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais de controle.

foi abolida pela remoção do endotélio. Por outro lado, o consumo crônico de etanol não influenciou as respostas à noradrenalina em aorta torácica de rato.

O consumo de etanol também não mostrou sinais de ter influenciado a hiper-reatividade à noradrenalina induzida por estresse. Considerando-se que a ausência do endotélio potencializa a resposta contrátil à noradrenalina em ratos não expostos a estresse, a resposta aumentada à noradrenalina observada na aorta intacta de ratos estressados poderia indicar uma disfunção endotelial nessa condição. Esses achados corroboram os relatos anteriores mostrando que o estresse promove disfunção endotelial<sup>2,3,19,20</sup>. No entanto, outros estudos relataram que a exposição ao estresse pode na verdade aumentar, ao invés de prejudicar, a função endotelial<sup>1,21,22</sup>.

Além disso, os dados apresentados corroboram estudos que mostram que o consumo de etanol a 20% durante 12 semanas, não alterou a resposta à fenilefrina em aorta de ratos Fisher<sup>13</sup>. Por outro lado, contradiz estudos que mostram aumento da resposta à noradrenalina em aorta de ratos Sprague-Dawley, depois de terem sido expostos a etanol a 10% por 5 meses<sup>10</sup>.

Além disso, estudos prévios indicam aumento das respostas à fenilefrina na aorta de ratos Wistar também expostos a etanol 20% durante 6 semanas<sup>8,9,15</sup>. Curiosamente, apesar de utilizar exatamente o mesmo protocolo experimental, concentrações mais baixas de etanol no sangue foram determinadas no presente estudo. É possível que essas concentrações mais baixas de etanol no sangue não tenham sido suficientes para induzir a resposta aórtica à norepinefrina ou fenilefrina que foi observada em estudos anteriores. De fato, o potencial para modificações induzidas por etanol para resposta aórtica à norepinefrina ou fenilefrina em ratos não foi completamente eliminado pelos resultados apresentados. Pelo contrário, estas discrepâncias demonstram a necessidade de estudos complementares, em que diferentes concentrações de etanol no sangue também devem ser avaliadas.

Muitos estudos têm demonstrado que a modulação do tônus vascular pode envolver vasoconstritor derivado do endotélio e prostanóides vasodilatadores<sup>23</sup>. Embora a taxa de produção de metabólitos de COX nas células normais pareça facilitar os vasodilatadores, é possível que essa taxa varie em resposta a certos estados patológicos, tais como a hipertensão<sup>24</sup>.

**Tabela 1 – Valores de EC<sub>50</sub> para noradrenalina, obtidos de anéis aórticos com e sem endotélio, na presença ou ausência de L-NAME, indometacina ou ioimbina de ratos machos adultos expostos ou não ao estresse crônico e etanol, sozinhos ou em combinação**

	Controle EC <sub>50</sub> (x10 <sup>-7</sup> M)	Estresse EC <sub>50</sub> (x10 <sup>-7</sup> M)	Etanol EC <sub>50</sub> (x10 <sup>-7</sup> M)	Estresse/ etanol EC <sub>50</sub> (x10 <sup>-7</sup> M)
Com endotélio				
Solução salina	3,97 ± 0,06 (10)	3,85 ± 0,04 (10)	4,88 ± 0,06 (10)	4,29 ± 0,08 (10)
L-NAME (10 <sup>-4</sup> M)	2,48 ± 0,05 (09)	2,36 ± 0,05 (09)	2,60 ± 0,04 (09)	2,64 ± 0,08 (09)
Indometacina (10 <sup>-5</sup> M)	3,85 ± 0,05 (08)	3,56 ± 0,06 (08)	5,39 ± 0,05 (08)	3,58 ± 0,06 (08)
Ioimbina (10 <sup>-6</sup> M)	10,76 ± 0,06 (09)	10,19 ± 0,06 (09)	10,23 ± 0,04 (09)	9,00 ± 0,06 (09)
Sem endotélio				
Solução salina	0,61 ± 0,10* (10)	0,83 ± 0,07* (10)	0,64 ± 0,06 (10)	0,67 ± 0,09* (10)
L-NAME (10 <sup>-4</sup> M)	0,77 ± 0,06* (09)	1,18 ± 0,11* (09)	1,10 ± 0,07* (09)	0,90 ± 0,06* (09)
Indometacina (10 <sup>-5</sup> M)	0,83 ± 0,05* (08)	1,88 ± 0,06* (08)	1,47 ± 0,05* (08)	1,30 ± 0,08* (08)
Ioimbina (10 <sup>-6</sup> M)	1,82 ± 0,05* (09)	1,94 ± 0,08* (09)	2,10 ± 0,05* (09)	2,75 ± 0,07* (09)

Controle: recebeu água "ad libitum"; etanol: recebeu solução de etanol a 20% em vez de água potável; estresse: imobilização em um tubo de contenção metálica (1 hora / dia, 5 dias / semana durante 6 semanas); estresse crônico/etanol: submetido ao estresse de imobilização e exposto a 20% de etanol. Dados expressos como média ± EPM e, entre parênteses, o número de determinações independentes. \* p < 0,05 em relação à respectiva aorta com endotélio.

A fim de investigar o envolvimento de prostanóides nas alterações das respostas à noradrenalina induzidas pelo estresse, os experimentos foram realizados em aortas pré-tratadas com indometacina. A presença desse inibidor de COX aboliu o aumento da resposta máxima à noradrenalina observada na aorta intacta de ratos estressados. Depois de ter sido restaurada, essa resposta atingiu um valor semelhante à observada em aorta de rato com endotélio, obtida de ratos do grupo controle na ausência de indometacina. Esses dados sugerem que a hiper-reatividade da aorta à noradrenalina induzida pelo estresse de imobilização crônica ocorre devido à liberação de prostanóides vasoconstritores. A liberação de prostanóides vasoconstritores, foi observada anteriormente em micro e macrovasos de ratos espontaneamente hipertensos<sup>25</sup> e na aorta de ratos hipertensos DOCA-sal<sup>23,24</sup>.

Uma vez que a influência dos prostanóides vasoconstritores no aumento induzido pelo estresse de respostas à noradrenalina na aorta de ratos é estabelecida, é pertinente analisar "como" esse agonista simpático é capaz de ativar esse mecanismo endotelial.

Estudos anteriores relataram que  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2 adrenoceptores são expressos no músculo liso ou nas células endoteliais<sup>26-28</sup>. Além disso, a estimulação dos  $\alpha$ 2 adrenoceptores localizados no endotélio libera óxido nítrico (NO)<sup>29,30</sup> e/ou prostanóides<sup>29</sup>, contrabalanzando, assim, os efeitos vasoconstritores da noradrenalina mediada pelos  $\alpha$ 1 adrenoceptores presentes na camada de músculo liso. Também tem sido demonstrado que as respostas da aorta torácica à clonidina, um agonista seletivo adrenoceptor- $\alpha$ 2, podem ser moduladas de forma negativa pelo NO e positivamente por prostanóides vasoconstritores<sup>31</sup>.

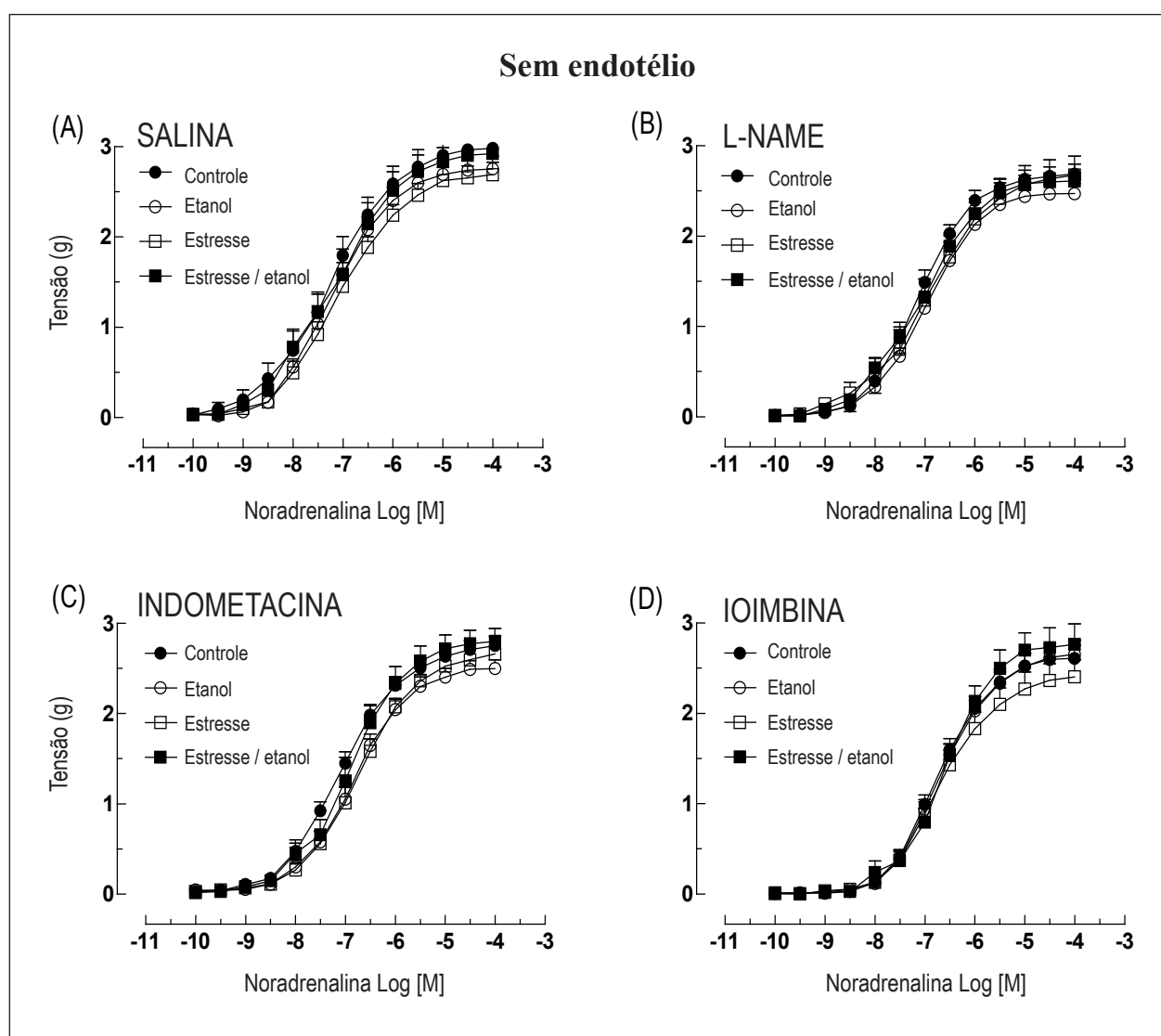
No presente estudo, a presença de ioimbina aboliu o aumento induzido pelo estresse de respostas à noradrenalina na aorta torácica de ratos. Além disso, nem a exposição ao estresse, nem o consumo de etanol alterou as respostas da

aorta torácica à fenilefrina, um agonista adrenérgico- $\alpha$ 1 seletivo. Esses dados sugerem que a estimulação do adrenoceptor- $\alpha$ 2 endotelial pode libertar prostanóides vasoconstritores, aumentando assim as respostas à noradrenalina em aortas de ratos expostos ao estresse.

A literatura relata a liberação de mediadores que induzem não apenas a contração, mas também o relaxamento em aorta de ratos com hipertensão DOCA-sal<sup>23,24,32</sup>. Desse modo, não é ainda claro no presente estudo se apenas os prostanóides vasoconstritores são responsáveis pelo aumento da resposta à noradrenalina na aorta de animais estressados, ou se eles agem em conjunto com os mecanismos de L-arginina/NO.

Dada essa dúvida, investigamos o papel da via de L-arginina/NO na resposta à noradrenalina em aorta de ratos cronicamente estressados (com e sem a associação com o consumo de etanol). Os resultados mostram que a inibição da NOS por L-NAME aumentou a R<sub>max</sub> à noradrenalina em aortas torácicas de animais em ambos os grupos de controle e etanol, permitindo respostas de magnitude semelhante em relação às preparações retiradas de grupos de estresse e estresse/etanol, na ausência ou na presença de L-NAME. Esses dados sugerem que não há nenhuma mudança na via de NO induzida por exposição ao estresse e o consumo crônico de etanol, nem isoladamente, nem em conjunto. Essa hipótese também é apoiada pela observação de concentrações plasmáticas similares de nitrito/nitrato entre os diferentes grupos experimentais.

Em resumo, o presente estudo constatou que o estresse crônico aumentou respostas da aorta de ratos à noradrenalina. Esse efeito é dependente do endotélio vascular e envolve prostanóides vasoconstritores liberados pela estimulação dos  $\alpha$ -2 adrenoceptores endoteliais. Além disso, o consumo crônico de etanol pareceu não influenciar as respostas da noradrenalina em aorta de rato, nem modificar o aumento de tais respostas observadas em consequência da exposição ao estresse.



**Figura 2** – Curvas de concentração-resposta à noradrenalina obtidas de anéis de aorta torácica desnudos de animais expostos ao consumo de etanol e/ou estresse, na ausência ou na presença de L-NAME ( $10^{-4}$ M), indometacina ( $10^{-5}$ M) ou ioimbina ( $10^{-6}$ M). Os valores são expressos em médias  $\pm$  EPM. O número de determinações independentes é 8-10.

**Tabela 2** – Valores de  $EC_{50}$  para fenilefrina obtido de anéis aórticos com e sem endotélio de ratos machos adultos expostos ou não a estresse crônico ou etanol, sozinhos ou em combinação

	Controle $EC_{50}$ ( $\times 10^{-7}$ M)	Estresse $EC_{50}$ ( $\times 10^{-7}$ M)	Etanol $EC_{50}$ ( $\times 10^{-7}$ M)	Estresse/etanol $EC_{50}$ ( $\times 10^{-7}$ M)
Com endotélio	1,58 $\pm$ 0,15 (09)	2,25 $\pm$ 0,12 (09)	1,14 $\pm$ 0,10 (09)	1,79 $\pm$ 0,10 (09)
Sem endotélio	0,88 $\pm$ 0,09* (09)	0,67 $\pm$ 0,08* (09)	0,80 $\pm$ 0,04* (09)	1,10 $\pm$ 0,07* (09)

Controle: recebeu água "ad libitum"; etanol: recebeu solução de etanol a 20% em vez de água potável; estresse: imobilização em um tubo de contenção metálica (1 hora / dia, 5 dias / semana durante 6 semanas); estresse crônico / etanol: submetido ao estresse de imobilização e expostos a 20% de etanol. Dados expressos como média  $\pm$  EPM e, entre parênteses, o número de determinações independentes. \*  $p < 0,05$  em relação à respectiva aorta com endotélio.

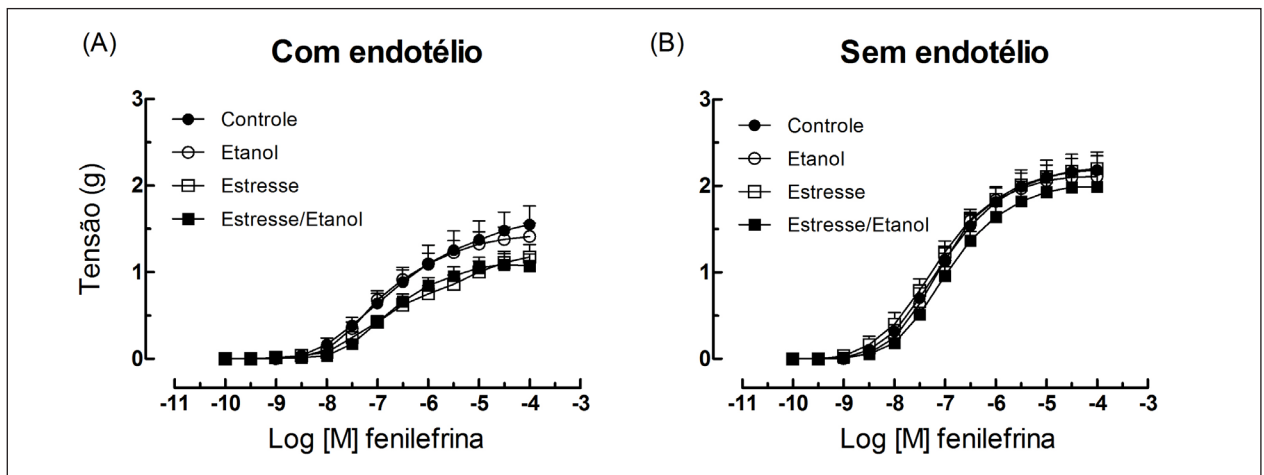


Figura 3 – Curvas de concentração-resposta à fenilefrina obtidas de anéis de aorta torácica com e sem endotélio de animais expostos ao consumo de etanol e/ou estresse. Os valores são expressos em médias  $\pm$  EPM. O número de determinações independentes é 8-10.

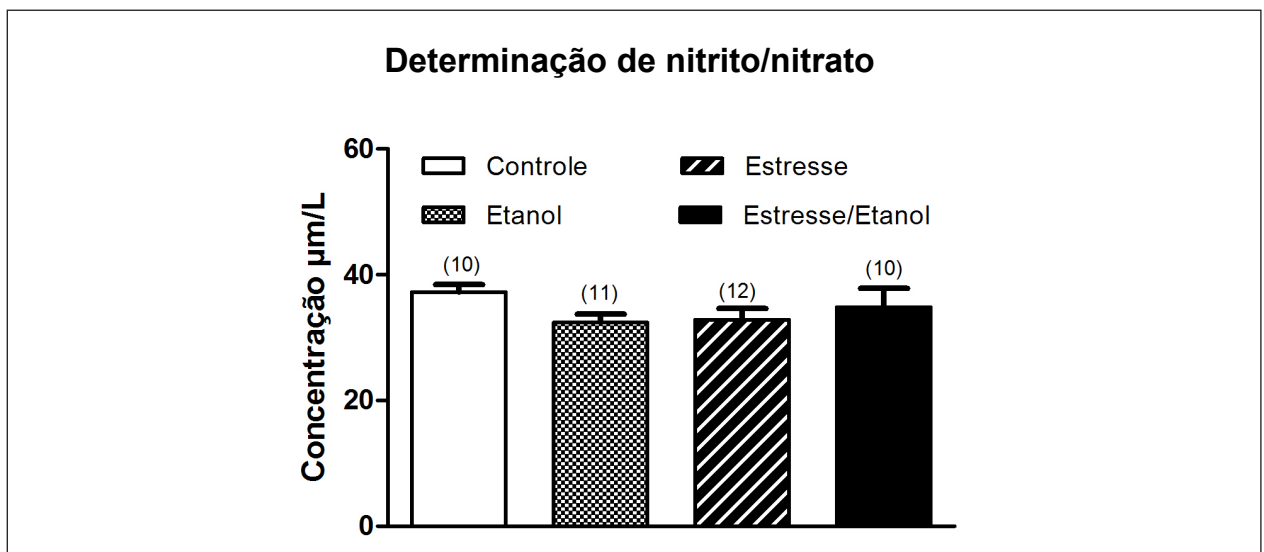


Figura 4 – Concentração no plasma de nitrito/ nitrato determinado pela reação de Griess em animais expostos ao consumo de etanol e/ou estresse. Os valores são expressos em médias  $\pm$  EPM. O número de determinações independentes é de 10-12.

## Agradecimentos

Esse estudo foi financiado pela CAPES. Agradecemos ao Sr. Alisson Douglas Ventura Neves (Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Marília, São Paulo, Brasil) pela assistência técnica.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, Obtaining funding, Análise estatística, Obtenção de financiamento, Redação do manuscrito: Baptista RFF, Chies AB, Cordellini S; Obtenção de dados: Baptista RFF, Taieiro EF, Queiroz RHC; Análise e interpretação dos dados: Baptista RFF, Taieiro EF, Queiroz RHC, Chies AB, Cordellini S; Revisão crítica do manuscrito

quanto ao conteúdo intelectual: Baptista RFF, Taieiro EF, Chies AB, Cordellini S.

## Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes

## Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pelas CAPES

## Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Rafaela de Fátima Ferreira Baptista pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" UNESP/Botucatu.

### Referências

1. Cordellini S, Vassilief 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.
2. Chung IM, Kim YM, Yoo MH, Shin MK, Kim CK, Suh SH. Immobilization stress induces endothelial dysfunction by oxidative stress via the activation of the angiotensin II/its type I receptor pathway. *Atherosclerosis*. 2010;213(1):109-14.
3. Ghiadoni L, Donald AE, Cropley M, Mullen MJ, Oakley G, Taylor M, et al. Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation*. 2000;102(20):2473-8.
4. Diaconu C, Târțau L, Lupușoru CE. Experimental research on the influence of stress factors in an animal model of hypertension. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2011;115(2):349-53.
5. Hjemdahl P. Stress and the metabolic syndrome: an interesting but enigmatic association. *Circulation*. 2002;106(21):2634-6.
6. Bernatova I, Csizmadiova Z. Effect of chronic social stress on nitric oxide synthesis and vascular function in rats with family history of hypertension. *Life Sci*. 2006;78(15):1726-32.
7. Navarro-Oliveira CM, Vassilief VS, Cordellini S. The sympathetic adrenomedullary system, but not the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, participates in aorta adaptive response to stress: nitric oxide involvement. *Auton Nerv System*. 2000;83(3):140-7.
8. Tirapelli CR, Fukada SY, Yogi A, Chignalia AZ, Tostes RC, Bonaventura D, et al. Gender-specific vascular effects elicited by chronic ethanol consumption in rats: a role for inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*. 2008;153(3):468-79.
9. Tirapelli CR, Leone AF, Coelho EB, Resstel LB, Lanchote VL, Uyemura SA, et al. Effect of ethanol consumption on blood pressure and rat mesenteric arterial bed, aorta and carotid responsiveness. *J Pharmacol*. 2007;59(7):985-93.
10. Hatton DC, Bukoski RD, Edgar S, Mccarron DA. Chronic alcohol consumption lowers blood pressure but enhances vascular contractility in Wistar rats. *J Hypertens*. 1992;(6):529-37.
11. Lapido CO, Adigun SA, Nwaigwe CI, Adegunloye BJ. Chronic ethanol consumption alters vascular smooth muscle responses in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29(8):707-9.
12. Strickland JA, Wooles WR. Effect of acute and chronic ethanol on the agonist responses of vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 1988;152(1-2):83-91.
13. Husain K, Vazquez M, Ansari RA, Malafa MP, Lalla J. Chronic alcohol-induced oxidative endothelial injury relates to angiotensin II levels in the rat. *Mol Cell Biochem*. 2008;307(1-2):51-8.
14. Utkan T, Yildiz F, Ilbay G, Ozdemirci S, Erden BF, Gacar N, Ulak G. Blood pressure and vascular reactivity to endothelin-1, phenylephrine, serotonin, KCl and acetylcholine following chronic alcohol consumption in vitro. *Fundam Clin Pharmacol*. 2001;15(3):157-65.
15. 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 Exp Pharmacol Ther*. 2006;316(1):233-41.
16. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): Institute of Laboratory Animal Resources. National Academy of Sciences; 1996.
17. Toda N, Ayajiki K. Vascular actions of nitric oxide as affected by exposure to alcohol. *Alcohol Alcohol*. 2010;45(4):347-55.
18. Husain K, Ferder L, Ansari RA, Lalla J. Chronic ethanol ingestion induces aortic inflammation/oxidative endothelial injury and hypertension in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2010;30(8):930-9.
19. Okruhlicová L, Dlugosová K, Mitasíková M, Bernátová I. Ultrastructural characteristics of aortic endothelial cells in borderline hypertensive rats exposed to chronic social stress. *Physiol Res*. 2008;57(2):31-7.
20. Loria AS, Kang KT, Pollock DM, Pollock JS. Early life stress enhances angiotensin II-mediated vasoconstriction by reduced endothelial nitric oxide buffering capacity. *Hypertension*. 2011;58(4):619-26.
21. 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.
22. Júnior UL, Cordellini S. Differential vascular adaptive response to stress exposure in male and female rats: role of gonadal hormones and endothelial cells. *Stress*. 2007;10(1):27-36.
23. Cordellini S. Endothelial dysfunction in DOCA-salt hypertension: possible involvement of prostaglandin endoperoxides. *Gen Pharmacol*. 1999;32(3):315-20.
24. Cordellini S, Carvalho MH, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D. Indirect evidence for an endothelium-derived contracting factor release in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens*. 1990;8(1):53-60.
25. Takase H, Dohi Y, Kojima M, Sato K. Changes in the endothelial cyclooxygenase pathway in resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1994;23(2):326-30.
26. Ruffolo RR Jr, Waddell JE, Yaden EL. Postsynaptic alpha adrenergic receptor subtypes differentiated by yohimbine in tissues from the rat. Existence of alpha-2 adrenergic receptors in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther*. 1981;217(2):235-40.
27. Ohyanagi M, Nishigaki K, Faber JE. Interaction between microvascular alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res*. 1992;(1):188-200.
28. Moina MJ, Bardan B, Campos Toimil M, Alzueta AF, Gil-Longo J, Orallo F. Effects of hydralazine on contractile responses to alpha 1 and alpha 2-adrenoceptor agonists in isolated rubbed rat aorta. *Gen Pharmacol*. 1994;25(1):165-72.
29. Ferrer M, Osol G. Estrogen replacement modulates resistance artery smooth muscle and endothelial alpha2-adrenoceptor reactivity. *Endothelium*. 1998;6(2):133-41.
30. Tschudi M, Richard V, Bühler FR, Lüscher TF. Importance of endothelium-derived nitric oxide in porcine coronary resistance arteries. *Am J Physiol*. 1991;260(1 Pt 2):H13-20.
31. Tejera N, Balfagón G, Marín J, Ferrer M. Gender differences in the endothelial regulation of alpha2-adrenoceptor-mediated contraction in the rat aorta. *Clin Sci (Lond)*. 1999;97(1):19-25.
32. Van der Voede J, Leusen I. Endothelium-dependent and independent relaxation of aortic ring from hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1986;250(5 Pt 2):H711-7.