

Caracterização do modelo de disfunção endotelial induzida em cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) pelo tratamento com angiotensina II durante 6 horas.

Barbara Macedo*¹, Eliane S. Grazziano², Cezar R. Pestana³, Heloísa S. Araújo⁴, Gerson J. Rodrigues⁴.

1. Estudante de IC da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar; *bamacedo@gmail.com

2. Pesquisadora no Departamento de Enfermagem (DEnf – UFSCar) São Carlos/SP

3. Pesquisador do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e Natureza (ILACVN-UNILA) Foz do Iguaçu-PR

4. Pesquisador do Departamento de Ciências Fisiológicas, (DCF – UFSCar) São Carlos/SP

Palavras Chave: disfunção endotelial, óxido nítrico, angiotensina II.

Introdução

O endotélio vascular apresenta uma importante função protetora contra as doenças cardiovasculares, sendo que a liberação do óxido nítrico (NO) apresenta um papel central nesta proteção^{1,2}. A disfunção endotelial (DE) é caracterizada pela diminuição da capacidade das células endoteliais (CE) em liberar NO, o que é observado com níveis circulantes elevados de Angiotensina II^{3,4}. A obtenção de CE em cultura com DE é importante para o estudo de estratégias farmacológicas para prevenir e ou reverter esta condição. Assim, o principal objetivo deste trabalho é avaliar o grau de disfunção endotelial obtida em 6 horas com o estímulo feito por Angiotensina II (Ang II).

Resultados e Discussão

Células HUVECs foram tratadas com 10 μ M de ionóforo de cálcio (A23187) para estimular a produção de NO, na ausência e presença de 100nM de Ang II e o controle PBS suplementado (PBSs). A determinação de NO (em nM) foi feita no sobrenadante celular no tempo de 6 horas pelo eletrodo seletivo de NO (InNO-T-II). A determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi realizada pela sonda DHE com 20 minutos de incubação, nas mesmas condições de tratamento. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do sal de tetrazólio (MTT) nas concentrações de Ang II 0,1, 10 e 100 nM, controle e controle de morte: Triton 1%.

As HUVECs estimuladas pelo A23187 liberaram maior concentração de NO em relação a todos os tratamentos (Figura 1). Este aumento na produção de NO pode ser atribuído a ativação da enzima eNOS em resposta ao aumento da concentração de Ca²⁺ citosólico ([Ca²⁺]_c) na célula endotelial induzido pelo A23187⁵. Resultado semelhante tem sido observado em aortas de ratos hipertensos renais⁵. O tratamento com Ang. II diminuiu a liberação de NO, tanto nas células estimuladas com A23187 quanto nas incubadas com PBS (Figura 2). Este resultado pode ser atribuído a maior degradação do NO pelo ânion superóxido (O₂⁻), que foi observado no experimento apresentado na figura 2, uma vez que o NO reage com O₂⁻ formando peroxinitrito⁶. Como pode ser observado na figura 2, ocorreu maior produção de O₂⁻ nas células estimuladas com Ang. II, que foi inversamente proporcional à liberação de NO, o que indica que na presença de maior concentração de O₂⁻ ocorre maior degradação de NO. Como observado, os tratamentos realizados não alteraram a viabilidade celular, indicando que a menor liberação de NO em 6 horas não ocorre devido a menor viabilidade celular (Figura 3).

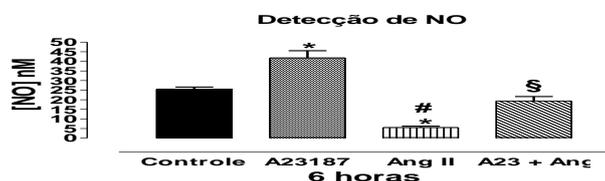


Figura 1: Cinética da produção de NO em função do tempo para as diferentes condições de tratamento. *P<0,01: diferença dos tratamentos em relação ao controle. #P<0,001: diferença entre A23187 vs Ang II. §P<0,01: diferença dos tratamentos A23187 e Ang II vs A23+ Ang II.

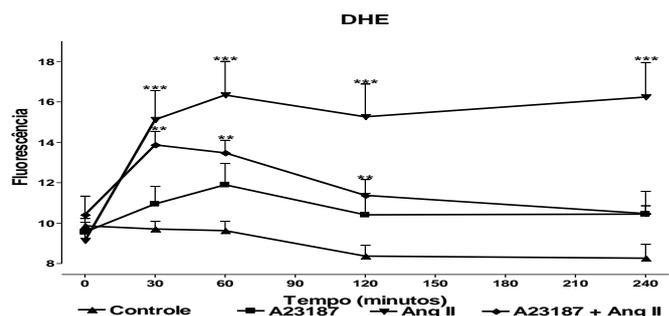


Figura 2: Cinética da produção de ânion superóxido (O₂⁻) pelas CE em função do tempo para as diferentes condições de tratamento. ***P<0,001: diferença entre o A23 + Ang II em relação ao controle ao longo do tempo. **P<0,001: diferença entre o tratamento Ang II em relação ao controle ao longo do tempo.

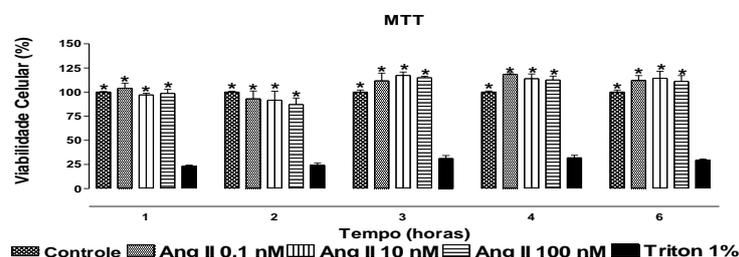


Figura 3. As barras representam a média \pm EPM da viabilidade celular (em %) nas diferentes condições testadas ao longo de 6 horas. Todos os tratamentos apresentaram P<0,001 em relação ao Triton 1%.

Conclusões

Nossos dados indicam que o tratamento de células endoteliais em cultura com Ang. II durante 6 horas foi eficaz em induzir disfunção endotelial, uma vez que diminuiu a liberação de NO provocado pelo aumento na formação de O₂⁻ e não por menor viabilidade celular.

Agradecimentos

FAPESP

1. DAVEL AP, *et al.* (2011). Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. VANHOUTTE PM. (2010). Regeneration of the Endothelium in Vascular Injury.3. RAJAGOPALAN S *et al.* (1996). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. 4. MOHAZZAB-H KM *et al.* (1994). NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary endothelium.5. OLIVEIRA AP *et al.* (2009). Relaxation induced by calcium ionophore is impaired in carotid arteries from 2K-1C rats due to failed effect of nitric oxide on the smooth muscle cells.6 MUKOYAMA M *et al.* (1996) Expression cloning of type angiotensin II receptor reveals a unique class of seven- transmembrane receptors.