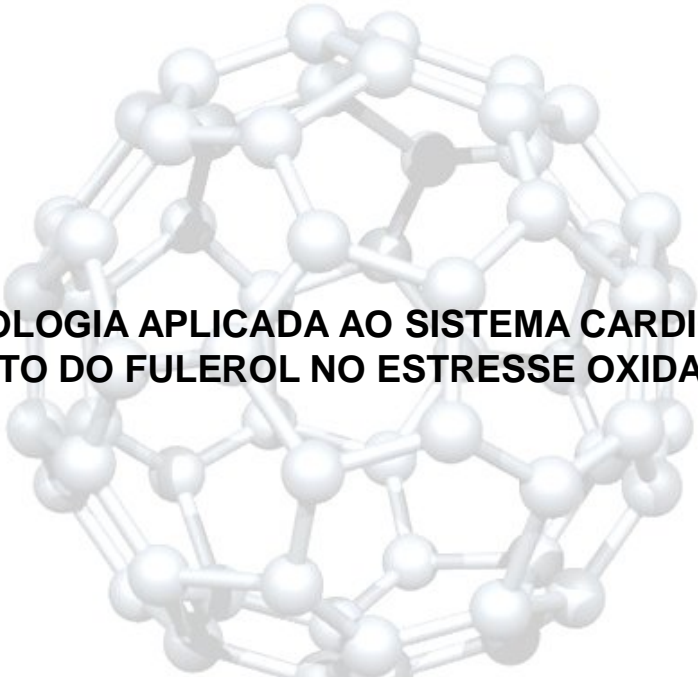




Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia



**NANOTECNOLOGIA APLICADA AO SISTEMA CARDIOVASCULAR.  
EFEITO DO FULEROL NO ESTRESSE OXIDATIVO.**

Marina de Souza Ladeira

Belo Horizonte- MG  
2013



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia



**NANOTECNOLOGIA APLICADA AO SISTEMA CARDIOVASCULAR.  
EFEITO DO FULEROL NO ESTRESSE OXIDATIVO.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aluna: Marina de Souza Ladeira

Orientadora: Dra. Silvia Guatimosim  
Co-orientador: Dr. Rodrigo R. Resende

Belo Horizonte- MG  
2013

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por suas sábias lições, pelo exemplo de amor, compreensão, alegria e pela confiança necessária para realizar os meus sonhos.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”*

Marthin Luther King

## AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa chega ao fim! Foi uma longa caminhada de quatro anos em que a dedicação e persistência foram essenciais para a conclusão desta jornada. Porém, não foi uma conquista solitária, ao contrário, foi a contribuição de inúmeras pessoas que tornaram possível a realização deste sonho e que merecem meus sinceros agradecimentos.

Gostaria de agradecer ao meu pai, pelo apoio incondicional, pela referência profissional de sabedoria e entusiasmo pela pesquisa científica. A minha mãe pelo amor e incentivo, exemplo de vida. Á minha irmã por todo o carinho e por sempre torcer por mim.

Ao “meu jovem” pelo carinho e incentivo. Pelo apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar meus desafios. Você é a “chatices” essencial na minha vida!

Gostaria de agradecer a minha orientadora, professora Silvia Guatimosim, por toda a confiança depositada, pelo exemplo de competência e excelência profissional. Agradeço pela oportunidade de enriquecer meu conhecimento. Foram sete anos de convivência, amizade e ensinamentos que levarei por toda a vida!

Ao professor Rodrigo Ribeiro Resende, pela co-orientação e principalmente pela amizade desde os tempos de faculdade. Quem diria, um colega de classe ser hoje meu co-orientador. Isso só reflete sua enorme garra e dedicação à carreira, a que eu me orgulho profundamente. Foi um grande prazer ter a oportunidade de trabalhar com você.

Á professora Vírginia Lemos e ao professor Luciano Capettini. Não tenho palavras para agradecer a enorme contribuição para o desenvolvimento desse trabalho. A sabedoria de vocês foi o diferencial! MUITÍSSIMO OBRIGADO!

Aos professores Maurício Velloso, Alvaír Pinto e Patrícia Martinelli. Obrigada por tudo!

Á todos os colegas da Eletrocel, por tornarem o ambiente de trabalho tão agradável e pelo espírito de equipe. Em especial á Aline, Amanda, Cibele, Mariana e Pedro, por contribuírem diretamente com esse trabalho.

Á todos do laboratório de Fisiologia cardiovascular, em especial á Rosária, por auxiliar nas sínteses de fullerol e nos experimentos de lipoperoxidação e ao Dênis, pelas preparações de coração isolado.

Á todos do laboratório de Nanomateriais, principalmente ao Elias e a Fabiana pela síntese do fullerol.

Ao Prof. Anderson Ferreira, Prof. Frederic Frezard e Prof. Steyner Côrtes que participaram da banca do exame de qualificação, o meu muito obrigado!

Aos membros da banca examinadora da defesa de tese por terem aceitado participar da avaliação desse trabalho. Tenho certeza que a participação de vocês será enriquecedora.

Á CAPES e ao INCT em Nanomateriais de Carbono pelo apoio financeiro.

Enfim, á todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho!

E finalmente á Deus por sempre me iluminar e guiar...

**LISTA DE FIGURAS**

**Página**

- Figura 1:** Esquema representativo da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) a partir do processo de redução do oxigênio á água. .... **24**
- Figura 2:** Esquema representativo da reação dos sistemas antioxidantes enzimáticos Superóxido dismutase (SOD), Catalase e Glutathione Peroxidase (GPx) sobre as ERO..... **25**
- Figura 3:** Esquema dos mecanismos de geração de ERO e o sistema antioxidante no coração. Baixos níveis de ERO têm um papel na sinalização fisiológica cardíaca, crescimento e adaptações. Altos níveis de ERO atuam na fisiopatologia do remodelamento cardíaco e apoptose..... **26**
- Figura 4:** Modulação de genes cardíacos e da hipertrofia celular no cardiomiócito pela via de sinalização da calcineurina/NFAT. Setas vermelhas representam efeito hipertrófico induzido pela calcineurina via desfosforilação e translocação nuclear do NFAT. Setas verdes representam efeito anti- hipertrofico da GSK3 através da fosforilação do NFAT e repressão citoplasmática..... **27**
- Figura 5:** Esquema representativo das alterações celulares decorrentes do processo de estresse oxidativo em cardiomiócitos. O estresse oxidativo proveniente do aumento de atividade da NADPH oxidase, Xantina Oxidase, Mitocôndria ou desacoplamento da eNOS causa alterações celulares e moleculares que resultam em disfunções contráteis, hipertrofia celular, fibrose intersticial e apoptose que em conjunto podem levar a falência cardíaca..... **29**
- Figura 6.** Esquema ilustrativo mostrando os modelos de disfunção endotelial em vasos sanguíneos associados ao estresse oxidativo. Vasos sanguíneos de animais apoE KO ou tratados com paraquat apresentam produção de ERO que por efeito direto ou inibitório da produção de óxido nítrico (NO) resultam em disfunção endotelial. O tratamento com antioxidantes inibem a produção ou propagação de ERO..... **33**
- Figura 7:** Figura ilustrativa comparando o tamanho entre alguns organismos e materias..... **35**
- Figura 8:** Imagens ilustrativas dos nanomateriais de carbono: Nanotubos de carbono (esquerda) e fulereno C60 (direita)..... **36**
- Figura 9:** Esquema ilustrativo da reação da molécula de fulereno com o radical hidroxila ou superóxido..... **38**
- Figura 10:** Figura ilustrativa do fulereno polihidroxilado, ou fulerol (C<sub>60</sub>OH<sub>22-24</sub>)..... **39**
- Figura 11:** Diagrama representativo do protocolo de tratamento em cardiomiócitos neonatos..... **48**

- Figura 12:** Imagem obtida através de microscopia confocal mostrando cardiomiócitos neonatos marcados com  $\alpha$ -actinina. Através do programa LSM Browse a área celular de cada cardiomiócito foi mensurada através da marcação ao redor da célula .....50
- Figura 13:** Diagrama representativo do protocolo de tratamento em animais.....51
- Figura 14:** Figura representativa do sistema de perfusão por pressão constante do coração isolado..... 52
- Figura 15:** Transiente de cálcio em cardiomiócitos (F/F<sub>0</sub>). F representa a fluorescência máxima emitida no momento da contração do miócito ventricular. F<sub>0</sub> representa a fluorescência basal emitida no momento de repouso da célula..... 55
- Figura 16:** Imagem do programa imageJ mostrando as imagens histológicas e a grade para marcação do tipo de tecido do corte histológico..... 56
- Figura 17:** Ensaio de quimioluminescência para quantificação do peróxido reativo. (A) Gráfico da análise do pico máximo de luminescência emitida (em Unidades Relativas de Luminescência-URL) durante 10 minutos de experimento (B) Gráfico da análise da área sob a curva do padrão de luminescência durante 10 minutos de experimento. (C) Gráfico de barras demonstra análise do potencial inibitório do fulerol (em % inibitória) sobre a produção de peróxido reativo durante 10 minutos de experimento..... 62
- Figura 18:** Ensaio de quimioluminescência para quantificação da produção de superóxido pelo sistema xantina/xantina oxidase. (A) Gráfico da análise do pico máximo de luminescência emitida (em Unidades Relativas de Luminescência-URL) durante 10 minutos de experimento. (B, C) Gráfico da análise da área sob a curva do padrão de luminescência durante 10 minutos de experimento utilizando fulerol (B) ou vitamina C (C). (D) Gráfico da análise do potencial inibitório (em % inibitória) do fulerol e vitamina C sobre a produção de superóxido durante 10 minutos de experimento..... 63
- Figura 19:** Quantificação dos níveis de ERO obtida através da fluorescência do DHE. (A) Imagens representativas obtidas através da microscopia confocal da fluorescência (B) Gráfico de barras com a média dos níveis de ERO em unidades relativas de fluorescência (URF)..... 64
- Figura 20:** Análises da área celular dos cardiomiócitos neonatos após 48 horas de tratamento. Imagem de imunofluorescência mostrando o tamanho relativo dos cardiomiócitos controle, tratados com fenilefrina, tratados com fenilefrina + fulerol nas concentrações de 1  $\mu$ M e 10 nM e tratados apenas com fulerol .As células foram marcadas em vermelho com anticorpo anti  $\alpha$ - actinina..... 65
- Figura 21:** Análises da área celular dos cardiomiócitos neonatos após 48 horas de tratamento. (A) Gráfico de barras sumariza os dados de medida de área celular (em  $\mu$ m<sup>2</sup>) de cardiomiócitos neonatos controle, tratados com isoproterenol (Iso), tratados com isoproterenol + fulerol (Iso + Ful) e tratados apenas com fulerol (Ful). (B) Gráfico



de barras sumariza os dados de medida de área celular (em  $\mu\text{m}^2$ ) de cardiomiócitos neonatos controle, tratados com fenilefrina (Phe), tratados com fenilefrina + fulerol (Phe + Ful) e tratados apenas com fulerol (Ful)..... 66

**Figura 22:** Análises da localização e expressão celular da calcineurina e NFAT (citossol/núcleo) em cardiomiócitos controle, tratados com fenilefrina (A) ou isoproterenol (B) e com o tratamento associado com o fulerol. Imagens pseudocoloridas representativas de imunofluorescência. Escala de cor mostra níveis máximo e mínimo de fluorescência..... 68

**Figura 23:** Quantificação de hidroperóxidos lipídicos pelo método de Fox em amostras de plasma (A) e rim (B) de animais controle, tratados com isoproterenol, tratados com isoproterenol associado ao fulerol ou somente fulerol..... 69

**Figura 24:** Análises de parâmetros cardiovasculares obtidos dos animais controle, tratados com isoproterenol, isoproterenol + fulerol e somente fulerol após 7 dias de tratamento consecutivo. (A) Tensão sistólica (em gramas), (B) Frequência cardíaca (em batimentos por minuto), (C) Velocidade da contratilidade miocárdica (+dP/dt Max), (D) Velocidade de relaxamento (-dP/dt Max)..... 70

**Figura 25:** Análise histológica do ventrículo esquerdo dos animais controle, isoproterenol e isoproterenol + fulerol após 7 dias de tratamento consecutivo. Fotomicrografias do ventrículo esquerdo proveniente de animais controle (A), tratados com isoproterenol sozinho (B) ou em conjunto com o fulerol (C). Gráfico de barras mostrando a proporção entre cardiomiócitos (D) e tecido conjuntivo (E).  
..... 72

**Figura 26:** Medida do diâmetro médio dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratos controle, tratados com isoproterenol na presença ou não do fulerol..... 73

**Figura 27:** Análise da dinâmica do cálcio intracelular. (A) Imagens obtidas por microscopia confocal do transiente de cálcio de animais controle, tratados com isoproterenol, tratados com isoproterenol + fulerol e tratados com fulerol. (B) Gráfico de barras da análise do pico do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  dado pela razão entre a fluorescência máxima e fluorescência basal (F/F<sub>0</sub>). (C) Decaimento do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em 50% (T<sub>50</sub>) dados pelo decaimento da fluorescência máxima (F)..... 75

**Figura 28:** Efeito do fulerol sobre o relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em modelo de anéis de aorta de ratos contendo endotélio funcional. As concentrações de fulerol utilizadas foram de 1nM (A), 10 nM (B), 100 nM (C), 1  $\mu\text{M}$  (D)..... 77

**Figura 29:** Efeito do fulerol sobre o relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em modelo de disfunção endotelial induzido por paraquat (5 $\mu\text{M}$ ). Os dados de relaxamento representam o percentual de redução da contração à fenilefrina em resposta a ACh. Os vasos foram pré-tratados com fulerol 10 minutos antes da aplicação do paraquat. As doses de fulerol utilizadas foram de 1 nM (A), 10 nM (B), 100 nM (C), 1  $\mu\text{M}$  (D)..... 78

**Figura 30:** Efeito do fulerol sobre o relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em modelo animal com disfunção endotelial (ApoE KO). Os dados de relaxamento representam o percentual de redução da contração à fenilefrina em resposta a ACh. Os vasos foram tratados com 100 nM de fulerol (A) e 100 µM de vitamina E(B)..... **80**

**LISTA DE TABELAS**

**Página**

**Tabela 1:** Parâmetros cardiovasculares dos corações isolados de animais controle, tratados com isoproterenol (ISO), isoproterenol associado ao fulerol (ISO + FUL) e tratados apenas com fulerol (FUL).....**70**

**Tabela 2:** Valores referentes á porcentagem de cardiomiócitos e tecido conjuntivo do ventrículo esquerdo de animais controle, tratados com isoproterenol (ISO) e isoproterenol associado ao fulerol (ISO + FUL)..... **72**

**Tabela 3:** Valores referentes ao diâmetro dos cardiomiócitos de animais controle, tratados com isoproterenol (ISO), isoproterenol associado ao fulerol (ISO + FUL) e percentual de hipertrofia em relação ao controle..... **73**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- µg**- Micrograma  
**µL**- Microlitro  
**µM**- Micromolar  
**µm**- Micrômetro  
**ACh**- Acetilcolina  
**ANOVA**- Análise de variância  
**apoE**- Apolipoproteína E  
**apoE KO**- “nocaute” para Apolipoproteína E  
**ARA-C**- citosina β-d-arabinofuranosida  
**ATP**- Trifosfato de adenosina  
**AUC**- Área sob a curva  
**bFGF**- Fator de crescimento básico de fibroblastos  
**BPM**- Batimentos por minuto  
**BSA**- Albumina de soro bovino  
**C<sub>60</sub>**- Fórmula química do fulereno  
**C<sub>60</sub>(OH)<sub>22-24</sub>**- Fórmula química do fullerol  
**Ca<sup>2+</sup>** - Íon cálcio  
**CaCl<sub>2</sub>**- Cloreto de cálcio  
**CaM**- Calmodulina quinase  
**CAT**- Catalase  
**cGMP** - Guanosina monofosfato cíclico  
**CO<sub>2</sub>**- Dióxido de carbono ou gás carbônico  
**DAPI**- Marcador nuclear, 4',6-diamidino-2-phenylindole.  
**DHE** – Dihidroetídeo  
**DMEM** - Meio de água modificado de Dulbecco  
**DMSO**- Dimetilsulfóxido  
**DNA**- Ácido desoxirribonucleico  
**eNOS** - Óxido nítrico sintase endotelial  
**EPM**- Erro padrão da média  
**ERO**- Espécies reativas de oxigênio  
**F**- Fluorescência máxima

- F0**- Fluorescência basal.
- F/F0**- Razão entre a fluorescência máxima e a fluorescência basal.
- FUL**- Fulerol
- GATA4**- Proteína de ligação GATA 4
- GC** - Guanilato ciclase
- GPx**- Glutathione peroxidase
- GSH**- Glutathione reduzida
- GSK3**- Glicogênio sintetase quinase 3
- GSSG**- Glutathione oxidada
- GST**- Glutathione transferases
- H<sub>2</sub>O**- Água
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**. Peróxido de hidrogênio
- HBSS**- Solução salina balanceada de Hank
- HEPES**- Ácido 4-(2-hydroxietil)-1-piperazineetanosulfônico
- HPR**- Globulina de cavalo conjugada com peroxidase de rábano
- HVE**- Hipertrofia ventricular esquerda
- IFN-g**- Interferon gama
- IL**- Interleucinas
- ISO**- Isoproterenol
- ISO + FUL**- Associação de isoproterenol e fulerol
- KCl**- Cloreto de Potássio
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**. Dihidrogenofosfato de potássio
- L15**- Meio de cultura L15 (Leibovitz)
- LDL**- Lipoproteína de baixa densidade
- LPO**- Lipoperoxidação
- LUMO**- Orbital molecular não ocupado mais baixo (do inglês "*Low unoccupied molecular orbital*").
- MAO**- Monoamina oxidase
- MCP-1**- proteína quimioatraente a monócitos-1
- MEF2**- Fator de crescimento de Miócito tipo 2
- MgCl<sub>2</sub>**. Cloreto de magnésio
- MgSO<sub>4</sub>**. Sulfato de magnésio
- MIP-1 $\alpha$** - Proteína inflamatória de macrófagos 1-alfa

**min-** Minuto  
**mg-** Miligrama  
**mL-** Mililitro  
**mM-** Milimolar  
**mm-** Milímetro  
**mmHg-** Milímetro de mercúrio  
**MMPs-** Metaloproteinases  
**ms-** Milissegundos  
**NaCl-** Cloreto de Sódio  
**NADPH-** Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina  
**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**- Fosfato monossódico  
**NaHCO<sub>3</sub>**- Bicarbonato de sódio  
**NaOH-** Hidróxido de sódio  
**NCX-** Trocador sódio-cálcio  
**NFAT** - Fator Nuclear de células T ativadas  
**nm-** Nanômetro  
**nM-** Nanomolar  
**NO** - Óxido nítrico  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Radical superóxido  
**O<sub>2</sub>**- Oxigênio  
**OH<sup>•</sup>** - Radical hidroxil  
**PBS-** Tampão fosfato-salino  
**PDFG-** Fator de crescimento derivado de plaquetas  
**PFA** – Paraformaldeído  
**pH-** potencial de hidrogênio  
**PHE-** Fenilefrina  
**PKA-** Proteína quinase A  
**PLB-** Fosfolamban  
**pM-** Picomolar  
**PP2B** – Calcineurina  
**PQ-** Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio)  
**RNA-** Ácido ribonucleico  
**SFB-** Soro fetal bovino

**SOD-** Superóxido dismutase

**T50-** Tempo necessário para a fluorescência decair em 50%

**TBAH-** Hidróxido de Tetrabutilamônio

**TGF- $\beta$**  - Fator de crescimento tumoral –  $\beta$

**TIMPs-** do inglês “*tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*”

**TNF- $\alpha$** - Fator de necrose tumoral alfa

**U.I.-** Unidade internacional

**URF-** Unidades relativas de Fluorescência

**URL-** Unidades relativas de luminescência

**VIT E-** Vitamina E

## RESUMO

O estresse oxidativo decorrente do aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO) está associado à progressão de diversas disfunções cardiovasculares. No coração, o estresse oxidativo pode afetar a estrutura e função do miocárdio, estimulando o processo de hipertrofia e apoptose dos miócitos. Além do efeito no coração, o estresse oxidativo está associado à disfunção endotelial, podendo promover alterações no tônus vascular. Diante disso, o tratamento com agentes antioxidantes apresentam uma potencial atividade terapêutica, podendo atenuar as disfunções cardiovasculares e prevenir a progressão da insuficiência cardíaca. Dentre os agentes antioxidantes, o fulerol tem ganhado destaque por sua capacidade de complexar e inativar as ERO e inibindo seus efeitos no dano oxidativo. O fulerol é uma nanoestrutura de carbono esférica e é hoje reconhecido como poderoso antioxidante devido sua alta reatividade frente á moléculas eletronicamente ricas, sendo um dos objetos moleculares de maior número de ligações tipo pi por unidade de volume.

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito do fulerol nas disfunções cardiovasculares induzidas pelo estresse oxidativo.

Ensaio *in vitro* mostraram os efeitos protetores do fulerol nas alterações moleculares e bioquímicas induzidas pelo tratamento com os agentes hipertróficos isoproterenol e fenilefrina em células cardíacas provenientes de ratos Wistar. O tratamento com fulerol preveniu o aumento dos níveis de ERO e da área celular, reduzindo a expressão de proteínas envolvidas na sinalização hipertrófica, a calcineurina e o fator nuclear ativado por células T (NFAT), nos cardiomiócitos tratados com os agonistas adrenérgicos. Nos estudos *in vivo*, observamos que o tratamento concomitante com o fulerol foi capaz de reduzir o processo de lipoperoxidação induzido pelo tratamento com isoproterenol em ratos Wistar, contribuindo para a melhoria da função cardíaca e dinâmica do cálcio e na redução da fibrose e hipertrofia dos cardiomiócitos ventriculares.

Além disso, avaliamos o efeito do fulerol na disfunção endotelial em aorta de ratos Wistar exposta ao herbicida paraquat e na aorta de camundongos apoE KO. Observamos que o fulerol reverteu a disfunção endotelial, caracterizada pela



redução do relaxamento induzido pela acetilcolina em ambos os modelos experimentais, restaurando a reatividade vascular.

Como conclusão, o fulerol possui atividade antioxidante capaz de prevenir os efeitos deletérios do estresse oxidativo no sistema cardiovascular.

**Palavras-chaves:** Estresse oxidativo, hipertrofia cardíaca, disfunção endotelial, fulerol, antioxidantes.

## ABSTRACT

The oxidative stress related to enhanced concentration of reactive oxygen species (ROS) is associated to the progression of cardiovascular dysfunction. In the heart, the oxidative stress can affect the structure and function of the myocardium, resulting in hypertrophy and apoptosis of the myocytes. Beyond the effects on the heart, the oxidative stress is associated to endothelial dysfunction, affecting the vascular tonus. Therefore, treatments with antioxidants present therapeutic potential and may attenuate the cardiovascular dysfunction and prevent the progression of heart failure. Among the antioxidants, fullerol has gained much attention due to its ability to complex to ROS and therefore, inhibiting the oxidative damage. Fullerol is a spherical carbon nanostructure known as a powerful antioxidant due to its reactivity to electron rich species, as the major molecular structure with pi ligands per volume.

The present study aimed to evaluate the effects of fullerol on cardiovascular dysfunction induced by oxidative stress.

Our *in vitro* assay showed the protect effects of fullerol on the molecular and biochemical alterations induced by isoproterenol and phenylephrine treatment in neonatal cardiomyocytes isolated from Wistar rats. Fullerol administration prevented the enhancement of ROS production, the increase in cellular area and expression of proteins that are involved in the hypertrophic signaling (calcineurin and NFAT) induced by adrenergic agonist treatment in cardiomyocytes. We observed, *in vivo*, that concomitant treatment with fullerol in male Wistar rats was able to reduce lipoperoxidation induced by isoproterenol, contributing to the improvement of the cardiac function and calcium handling, attenuating the development of fibrosis and hypertrophy of ventricular myocytes.

Moreover, we evaluated the effects of fullerol on the endothelial dysfunction induced by paraquat exposure in the isolated aorta of Wistar rats and in the aorta of apoE knockout (KO) mice. We observed that fullerol incubation restored vascular reactivity preventing the endothelial dysfunction, characterized by a reduction of the relaxation induced by acetylcholine on vessels exposed to paraquat or from apoE KO animals.

Therefore, we can conclude that, fullerol has antioxidant activity capable of preventing the deleterious effects of oxidative stress on the cardiovascular system.

**Keywords:** Oxidative stress, cardiac hypertrophy, endothelial dysfunction, fullerol, antioxidants.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA .....	VI
LISTA DE TABELAS.....	X
ABREVIATURAS .....	XI
RESUMO .....	XV
ABSTRACT .....	XVII
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1 Estresse oxidativo .....	23
1.2 Remodelamento cardíaco e o estresse oxidativo .....	25
1.3 Agonistas adrenérgicos e o estresse oxidativo.....	30
1.4 Disfunções endoteliais e o estresse oxidativo .....	32
1.5 Nanotecnologia.....	34
1.6 Nanotecnologia aplicada á saúde .....	35
1.7 Fullerenos e seus derivados.....	37
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
2.1 Objetivo geral.....	42
2.2 Objetivos específicos.....	42
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
3.1 Síntese do fullerol.....	45
3.2 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelo método de quimioluminescências .....	46
3.3 Animais.....	47
3.4 Isolamento e cultura dos cardiomiócitos neonatais .....	47
3.5 Tratamento dos cardiomiócitos neonatais .....	48
3.6 Medida das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) .....	49
3.7 Imunofluorescência .....	49
3.8 Medidas da área celular dos cardiomiócitos .....	50
3.9 Tratamento <i>in vivo</i> de ratos com isoproterenol.....	51
3.10 Registros dos parâmetros cardíacos pelo método de Langendorff	51
3.11 Quantificação de hidroperóxidos lipídicos pelo método de Fox ....	53
3.12 Isolamento dos cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos .....	54

<b>3.13 Medida do transiente de cálcio .....</b>	<b>54</b>
<b>3.14 Histologia e morfometria .....</b>	<b>55</b>
<b>3.15 Experimentos de reatividade vascular .....</b>	<b>57</b>
3.15.1 Obtenção e montagem dos anéis de aorta .....	57
3.15.2 Avaliação da integridade endotelial.....	58
3.15.3 Efeito do fulerol na resposta vasorrelaxante à acetilcolina .....	58
3.15.4 Modelo de disfunção endotelial induzida por Paraquat .....	58
3.15.5 Modelo de disfunção endotelial em animais apoE KO .....	59
<b>3.16 Análises estatísticas .....</b>	<b>59</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>108</b>
<b>Modelo teórico .....</b>	<b>109</b>
<b>Pedido de depósito de patente.....</b>	<b>115</b>