

**Efeitos da eplerenona, um inibidor seletivo do
receptor de aldosterona, no estresse oxidativo e
disfunção vascular na fase inicial após o infarto do
miocárdio experimental**

Carmem Luíza Sartório

**Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas
(Fisiologia Cardiovascular)**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, maio de 2006**

Efeitos da eplerenona, um inibidor seletivo do receptor de aldosterona, no estresse oxidativo e disfunção vascular na fase inicial após o infarto do miocárdio experimental

Carmem Luíza Sartório

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Cardiovascular.

Aprovada em 29 de maio de 2006 por:

Prof. Dra. Ivanita Stefanon – UFES
Orientadora

Dr. Johann Bauersachs – Universität Klinikum Würzburg
Co-orientador

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – UFES
Examinador Interno

Dr. Aloir de Queiroz Araújo Sobrinho – UFES
Examinador Interno

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier – UFPE
Examinador Externo

Coordenador do PPGCF: _____
Prof. Dr. José Geraldo Mill

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, maio de 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Vitória, maio de 2006

Sartório, Carmem Luíza, 1974

Efeitos da eplerenona, um inibidor seletivo do receptor de aldosterona, no estresse oxidativo e disfunção vascular na fase inicial após o infarto do miocárdio experimental.

XVI, 145 p., 29,7 cm (UFES, D. Sc., Ciências Fisiológicas, 2002)

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

I. Infarto do Miocárdio II. Reatividade Vascular III. Aldosterona IV. Eplerenona V. Rato

“Ainda que eu tivesse o dom de profetizar o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência, ainda que eu tivesse toda fé a ponto de transportar montes, se não tivesse o amor, eu nada seria.”

(Apóstolo Paulo, na carta I aos Coríntios)

Dedico este trabalho a meu eterno e amado paizinho Gonzaga, minha mãe amada Cecy e meus irmãos Jorge, Kátia e Kelly

Agradecimentos

A Deus e aos seus enviados de luz, pela vida e proteção, e por terem me dado a chance de participar deste projeto, aprender muito, conhecer tanta gente boa e me dado forças para superar os momentos mais difíceis da minha vida. A cada dia se comprova em tudo a perfeição de sua suprema sabedoria.

À minha família, por estar sempre comigo, para o que der e vier, e por tudo que sempre fizeram por mim. Especialmente meus pais, que sempre estiveram e estão ao meu lado, me apoiando e aconselhando, transmitindo com a sua simplicidade a verdadeira sabedoria de vida. O amor é eterno, e longe é um lugar que não existe para aqueles que se amam. Amo vocês!

À Ivanita, pela orientação paciente, amiga e companheira de todas as horas. Seus conselhos e direcionamentos experientes sempre me trouxeram para a direção correta. Sem você nada disto seria possível. De coração um super obrigada por tudo!

A Dalton, nosso paizão de sempre, carinhoso e muito querido. Obrigada por estar nas nossas vidas.

Aos meus amados amigos da PPGCF, desde os colegas do LEMC, passando pelos outros laboratórios e também os professores e nossos funcionários. Sem o apoio e carinho de todos vocês a realização deste sonho não seria possível.

A Johann, um grande homem que tive oportunidade de conviver e admirar. Sua sabedoria associada à simplicidade e carinho cativa a todos. Obrigada por poder compartilhar seus conhecimentos e ter a sua amizade.

À família Galuppo, nono Paolo, Isaac, Nathalie, Elena e Daniela, que foi a minha segunda família em Wuerzburg. Sempre com seus conselhos e amizade, me ajudaram no aprendizado profissional e humano, além do apoio nos momentos difíceis. Especialmente à Dani, uma amiga muito querida e profissional excepcional, una sorella para toda a vida.

A todos os colegas de trabalho da Uniklinikum Wuerzburg, pelo apoio profissional e amizade de sempre. Ich liebe euch! Especialmente ao apoio técnico de Meike, que além de muito capacitada é uma colega carinhosa e muito querida.

Aos meus amigos que ficaram espalhados neste mundão de Deus: Gerard, Catia, Sara, Agnes, Lucia, Daniel, Calin, RongXue, Anna etc...tantos outros que não há como escrever tantos nomes. Em meu coração vocês estão escritos para sempre!

À minha amigona Paula, que me ajudou e apoiou desde os primeiros dias até os últimos na Alemanha, e se tornou uma verdadeira irmã. Amiga, muchas gracias!

A Saulo por todo o apoio e carinho que me ajudaram muito em mais esta etapa.

À minha segunda família no Brasil, a grande família Ramos, pelo apoio fundamental, sem o qual eu não conseguiria concluir este trabalho. Vocês são maravilhosos!

Sumário

Lista de Tabelas.....	8
Lista de Figuras.....	9
Resumo.....	12
Abstract.....	14
I. Introdução.....	16
1. Infarto do miocárdio.....	17
1.1 Aspectos epidemiológicos.....	17
1.2 Aspectos fisiopatológicos.....	18
1.3 Infarto do miocárdio experimental.....	19
1.4 Infarto do miocárdio e as alterações vasculares.....	20
2. Músculo liso vascular.....	22
3. Endotélio.....	24
4. Óxido nítrico (NO) e suas sintases (NOS).....	25
4.1 eNOS.....	27
5. Disfunção endotelial e estresse oxidativo vascular.....	30
6. O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).....	33
6.1 Enzima conversora de angiotensina (ECA) e angiotensina II.....	34
6.2 Aldosterona.....	37
7. Inibidores dos receptores de mineralocorticóides.....	40
7.1 Espironolactona.....	41
7.2 Eplerenona.....	42
II. Objetivos.....	45
1. Objetivo geral.....	46
2. Objetivos específicos.....	46
III. Materiais e Métodos.....	47
1. Animais	48
2. Infarto do miocárdio e intervenção farmacológica.....	48
3. Medidas hemodinâmicas.....	49
4. Avaliação da área de infarto e hipertrofia cardíacas.....	50
5. Teste radioimunológico (RIA) da aldosterona.....	52
6. Protocolos de reatividade vascular.....	53
7. Medida de formação de ânions superóxido.....	54

7.1 Ensaio de quimiluminescência.....	54
7.2 Produção de O_2^- <i>in situ</i>	55
8. Western Blot.....	55
9. Imunohistoquímica.....	57
9.1 Cortes em parafina.....	57
9.2 Cortes congelados.....	59
10. Expressão dos dados e análise estatística.....	60
11. Drogas e reagentes.....	60
IV. Resultados.....	61
1. Teste radioimunológico (RIA) da aldosterona.....	62
2. Medidas hemodinâmicas.....	63
3. Reatividade vascular e biologia molecular.....	65
4. Estresse oxidativo vascular.....	74
V. Discussão e conclusões.....	79
VI. Referências bibliográficas.....	108

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores hemodinâmicos e dados ponderais dos animais submetidos 64
à cirurgia fictícia (Sham) ou ao infarto do miocárdio tratados com placebo (IM
Pla) ou eplerenona (IM Eple), 7 dias após a cirurgia

Tabela 2. Valores obtidos nas curvas concentração-resposta à acetilcolina 66
(ACh), fenilefrina (Fenil) e DEA em animais submetidos à cirurgia fictícia
(Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM
Eple).

Tabela 3. Valores obtidos nas curvas concentração-resposta à angiotensina I 71
(Angio I) e angiotensina II (Angio II) em animais submetidos à cirurgia fictícia
(Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM
Eple).

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema demonstrativo da medida histológica da área de infarto com coloração Picrosirius Red. 51

Figura 2. Concentração sérica de aldosterona nos animais submetidos ao infarto do miocárdio (IM Pla) e cirurgia fictícia (Sham). 62

Figura 3. Representação de curvas pressão-volume medidas *in vivo* com cateter de condutância em animais submetidos à cirurgia fictícia (Sham) e infartados com tratamento placebo (IM Pla) ou eplerenona (IM Eple). 65

Figura 4. Curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fenil), acetilcolina (ACh), e DEA nos grupos cirurgia fictícia - Sham, infartado com tratamento placebo (IM Pla) e infartado tratado com inibidor de aldosterona eplerenona (IM Eple). 67

Figura 5. Expressão relativa de eNOS fosforilada (peNOS) por eNOS em animais submetidos à cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple). 68

Figura 6. Imunohistoquímica para a detecção da forma fosforilada da (peNOS) em animais submetidos cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple). 69

Figura 7. Curvas concentração-resposta à angiotensina I (Angio I), angiotensina II (Angio II) nos grupos cirurgia fictícia (Sham), infartado com tratamento placebo (IM Pla) e infartado tratado com inibidor de aldosterona eplerenona (IM Eple). 70

Figura 8. Expressão protéica da enzima conversora de angiotensina (ECA) e a sua forma fosforilada (pECA) nos animais submetidos à cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple). 72

Figura 9. Correlação entre a expressão protéica da enzima conversora de 73
angiotensina (ECA) e sua forma fosforilada (pECA).

Figura 10. Imunohistoquímica para a detecção da enzima conversora de 74
angiotensina (ECA) em animais submetidos à cirurgia fictícia (Sham), infartados
tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple).

Figura 11. Produção de ânions superóxido (O_2^-) medida pelo aumento da 75
quimiluminescência por lucigenina ($5\ \mu M$) em anéis de aorta de animais
submetidos à cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla)
ou com eplerenona (IM Eple).

Figura 12. Percentual de aumento na produção de ânions superóxido (O_2^-) 76
medida pelo aumento da quimioluminescência por lucigenina ($5\ \mu M$) em anéis
de aorta incubados com LNNA por 40 min. Animais submetidos à cirurgia fictícia
(Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple).

Figura 13. Produção *in situ* de O_2^- em animais submetidos à cirurgia fictícia 77
(Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple).

Figura 14. Expressão protéica da subunidade $p22^{phox}$ em animais submetidos à 78
cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com
eplerenona (IM Eple).

Figura 15. Expressão protéica da enzima MnSOD em animais submetidos à 78
cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com
eplerenona (IM Eple).

RESUMO E ABSTRACT

Resumo

O sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) exerce uma influência central na manutenção do tônus vascular, além da homeostase hidro-salina e débito cardíaco em seres humanos. A hiperatividade do SRAA pode resultar em consequências patológicas de certos quadros clínicos como o infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (IC). A aldosterona é classicamente considerada como um peptídeo regulador do metabolismo renal de sódio e potássio, regulação do volume sanguíneo e pressão arterial. Estudos recentes sugerem que a aldosterona pode causar lesão microvascular, inflamação vascular, estresse oxidativo e disfunção endotelial. Evidências demonstram ainda o envolvimento da aldosterona na patogênese da disfunção vasomotora na IC. Tanto evidências clínicas como experimentais demonstram que o uso dos inibidores do SRAA, incluindo aldosterona, previnem, tratam ou melhoram os sintomas da IC congestiva, com melhoria do prognóstico após o infarto do miocárdio. Todavia, pouco se sabe sobre os efeitos vasculares da aldosterona na fase inicial após o infarto do miocárdio (IM), bem como os possíveis efeitos vasculares protetores de uma inibição deste mineralocorticoide nesta fase. Este estudo foi designado a investigar os efeitos vasculares do antagonista seletivo do receptor de aldosterona, eplerenona, em ratos sete dias após o IM. Iniciando a terapia imediatamente após a cirurgia de ligadura da artéria coronária, ratos Wistar machos foram tratados por gavagem com placebo (IM Pla) ou eplerenona (IM Eple, 100 mg/kg/dia) por 7 dias e comparados a um grupo de animais controle (Sham). A vasodilatação máxima dependente do endotélio, induzida por ACh, em anéis isolados de aorta, estava acentuadamente reduzida nos animais IM Pla ($E_{\max}$ IM Pla $82 \pm 4,4\%$ vs. Sham $98 \pm 1,6\%$, $p < 0,01$). O tratamento com eplerenona melhorou significativamente este parâmetro ($94 \pm 3\%$, $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças no relaxamento independente do endotélio. A expressão da forma fosforilada da eNOS estava reduzida na aorta dos animais IM Pla e aumentada após tratamento com eplerenona. A produção de ânions superóxido, medida pela quimiluminescência aumentada por lucigenina, aumentou após o IM (IM Pla 11 ± 1 vs. Sham $6,5 \pm 0,7$ cpm/mg, $p < 0,001$) e normalizada nos animais IM Eple (IM Eple $6,9 \pm 0,5$ cpm/mg; $p < 0,001$). Esta melhoria do estresse oxidativo foi também observada na produção *in situ* de ânions superóxido pelo corante fluorescente hidroetidina. Além disso, a expressão da subunidade $p22^{\text{phox}}$ da NAD(P)H oxidase

estava aumentada no grupo IM Pla e reduzida no grupo IM Eple. A expressão da enzima antioxidante MnSOD foi aumentada pelo tratamento com eplerenona após infarto. A resposta vasoconstrictora à angiotensina I, bem como a expressão da enzima conversora de angiotensina (ECA) estavam aumentadas nos animais IM Pla e foram reduzidas pelo tratamento com eplerenona, sem alterações significantes na reatividade à angiotensina II. Em conclusão, o antagonismo do receptor de aldosterona com eplerenona melhorou a disfunção endotelial na fase inicial após IM. Os mecanismos basais envolvem a inibição da expressão aumentada da ECA, aumento da biodisponibilidade de NO derivado da eNOS e melhoria do estresse oxidativo vascular pela normalização da produção vascular de ânions superóxido, redução na expressão da NAD(P)H oxidase e melhoria da defesa antioxidante.

Abstract

The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) exerts a key influence to maintain the vascular tone, optimal salt and water homeostasis and cardiac output in human beings. Overactivity of the RAAS can lead to pathologic consequences in clinical conditions as myocardial infarction and congestive heart failure. Aldosterone, the final product of the RAAS, is classically viewed as a regulator of renal sodium and potassium handling, blood volume and blood pressure. Recent studies suggest that aldosterone can cause microvascular damage, vascular inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction. Evidences demonstrate the involvement of aldosterone in the pathogenesis of vasomotor dysfunction in heart failure. Accumulated basic and clinical evidences support the use of inhibitors of the RAAS, including aldosterone antagonists, in preventing, treating or ameliorating congestive heart failure, and optimizing the prognosis after myocardial infarction. However, little is known about aldosterone's vascular effects in the early phase post myocardial infarction (MI) as well as the potential vascular effects of its inhibition in this phase. This study was designed to investigate the vascular effects of the selective aldosterone receptor antagonist, eplerenone, in rats seven days after acute MI. Starting immediately after coronary ligation, male Wistar rats were treated by gavage with placebo (MI Pla) or eplerenone (MI Eple, 100 mg/kg/day) for 7 days and compared to a control group (Sham). Aortic endothelium-dependent maximal relaxation induced by acetylcholine, after pre-constriction with phenylephrine, was markedly reduced after MI compared to Sham ($E_{\max}$ MI Pla $82 \pm 4.4\%$ vs. Sham $98 \pm 1.6\%$, $p < 0.01$) and ameliorated by eplerenone treatment ($94 \pm 3\%$, $p < 0.05$), with no differences in the endothelium-independent relaxation. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) phosphorylation was reduced in the aorta of placebo rats with acute MI and improved by eplerenone. Aortic superoxide anion formation *in situ* as well as measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence, was significantly increased after MI (MI Pla 11 ± 1 vs. Sham 6.5 ± 0.7 cpm/mg, $p < 0.001$) and normalized in aortas from eplerenone treated rats (MI Eple 6.9 ± 0.5 cpm/mg, $p < 0.001$). In addition, the expression of the p22^{phox} subunit of NAD(P)H oxidase was significantly increased in the MI group and reduced by eplerenone treatment. Moreover, the constriction in response to angiotensin I as well as angiotensin converting enzyme (ACE) protein levels were markedly enhanced in aortae from MI placebo rats, and

reduced by eplerenone, with no differences in the reactivity to angiotensin II. In conclusion, aldosterone receptor antagonism by eplerenone improved endothelial dysfunction in the early phase post-MI. Underlying mechanisms involve inhibition of vascular ACE upregulation, improvement of eNOS-derived NO bioavailability and amelioration of oxidative stress by normalization of vascular superoxide anion formation, reduction of NAD(P)H oxidase expression and improvement of antioxidant defence.

INTRODUÇÃO

I. Introdução

1. Infarto do miocárdio

1.1. Aspectos epidemiológicos

No início do século XX as doenças cardiovasculares foram responsáveis por menos de 10% de todas as mortes. Hoje esta porcentagem está em torno de 30%, sendo que em torno de 80% desta incidência ocorre agora nos países em desenvolvimento (Gaziano, 2005). Dados da organização mundial da saúde informam que a doença cardíaca coronariana (angina de peito, infarto do miocárdio, cardiopatia isquêmica crônica) é hoje a principal causa de mortes em todo o mundo e que esta tendência tem se confirmado desde 1990. Todos os anos cerca de 3,8 milhões de homens e 3,4 milhões de mulheres falecem por doença coronariana. Esta enfermidade está em uma fase crescente e se tornando uma verdadeira pandemia, que não respeita fronteiras (World Health Organization [WHO] Atlas, Deaths from coronary heart disease). É esperado que no futuro, um aumento de 82% da mortalidade por doença coronariana ocorrerá nos países em desenvolvimento, parcialmente devido ao aumento da longevidade, urbanização e mudança de hábitos cotidianos. De grande relevância é também o prejuízo no que diz respeito ao mercado de trabalho, sendo a doença coronariana a principal causa do total de anos de vida perdidos, ajustados por incapacitação (AVAI; *DALY – disability adjusted life years*) (10% do total de DALYs em países em desenvolvimento e 18% em países desenvolvidos) (WHO Atlas, Deaths from coronary heart disease). Dados do ministério da saúde informam que no Brasil o principal grupo de causas de mortes, em todas as regiões e para ambos os sexos, foram as doenças do aparelho circulatório, representando em 2002 cerca de 32% entre as causas de morte definidas (DATASUS mortalidade 2002).

Apesar dos números apresentados, os índices de mortalidade na fase aguda da cardiomiopatia isquêmica têm diminuído nas últimas décadas, aumentando assim o número de indivíduos que sobrevivem por longo tempo com cicatriz ventricular (Chor *et al.*, 1995). Isto ressalta a importância da pesquisa direcionada à compreensão dos processos fisiopatológicos do infarto do miocárdio, bem como o direcionamento de medidas terapêuticas que visem à prevenção e minimizem o desenvolvimento de complicações futuras, otimizando desta maneira a sobrevida dos pacientes acometidos por essa doença.

1.2. Aspectos fisiopatológicos

As síndromes coronarianas agudas incluem uma série de manifestações clínicas que derivam de um processo fisiopatológico comum. Geralmente estas decorrem de ruptura ou erosão de uma placa ateromatosa coronariana, onde subsequentemente ocorre trombose intraluminal, a qual pode obstruir total ou parcialmente o lúmen da artéria coronária. As manifestações clínicas dependerão da área de miocárdio afetado bem como da severidade da isquemia e necrose miocárdicas. Pode ocorrer desde uma angina instável com isquemia, mas sem necrose miocárdica detectável, até uma síndrome coronariana aguda com variáveis graus de necrose de cardiomiócitos (Fox *et al.*, 2004). Como resultado da isquemia aguda ocorre uma alteração do processo de excitação-contração, levando à disfunção cardíaca sistólica e diastólica, que pode ser transiente e reversível se rapidamente for realizada uma reperfusão (Braunwald & Kloner, 1982) ou, se persistente, levar a morte celular. A necrose isquêmica é patognomônica de infarto agudo do miocárdio, com a elevação de marcadores bioquímicos de lise celular juntamente a um quadro clínico compatível (Alpert *et al.*, 2000).

O infarto do miocárdio é considerado a mais importante forma de cardiopatia isquêmica, no qual a duração e a gravidade da isquemia são suficientes para causar a morte do músculo cardíaco. Nesta enfermidade ocorre um desequilíbrio entre o suprimento e demanda de sangue oxigenado do coração. Quando o miocárdio pára de receber sangue rico em oxigênio e outros nutrientes, as reservas de energia armazenadas nas células esgotam-se em alguns minutos, e o músculo cardíaco entra em sofrimento. A isquemia pode decorrer tanto pela redução da oferta, como pelo aumento do consumo de oxigênio nos tecidos, e ainda por uma redução na disponibilidade de substratos nutrientes e remoção inadequada de metabólitos. (Anversa & Sonnenblick, 1990). A mortalidade e a morbidade decorrentes do infarto do miocárdio podem estar relacionadas tanto à incapacidade inadequada de bombeamento do coração quanto à gênese de arritmias cardíacas. A capacidade inadequada da bomba cardíaca pode ocorrer na fase aguda do infarto e resultar, assim, na síndrome clínica conhecida como choque cardiogênico. A disfunção menos severa pode persistir por longo tempo e então o miocárdio remanescente sofre alterações anatômicas e funcionais, conhecidas como remodelamento

cardíaco, que acabam por favorecer o aparecimento do quadro de insuficiência cardíaca (IC) (Garg *et al.*, 1993).

O remodelamento ventricular em resposta ao dano do miocárdio após o infarto é caracterizado por hipertrofia dos miócitos, dilatação da câmara ventricular e aumento do acúmulo de colágeno em áreas remotas ao local do infarto, levando ao prejuízo da função contrátil e progressivamente à IC (Pfeffer & Braunwald, 1990; Sutton & Sharpe, 2000). Como consequência, o débito cardíaco é ainda mais reduzido e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) aumenta e é associada com subsequente congestão pulmonar e marcante ativação neuro-humoral (Parmley, 1985; Teerlink *et al.*, 1994b; Fraccarollo *et al.*, 2003).

1.3. Infarto do miocárdio experimental

Aspectos clínicos e fisiopatológicos da isquemia miocárdica podem ser reproduzidos experimentalmente em diversas espécies de animais, através da oclusão cirúrgica temporária ou permanente de ramos da árvore coronariana, a qual culmina com o infarto do miocárdio. Porém, a aplicabilidade de cada modelo em relação ao infarto em humanos ainda é um fato discutível e depende do aspecto que se pretende avaliar. Animais de pequeno porte, como, por exemplo, o rato, têm sido extensivamente utilizados em estudos onde se objetiva avaliar as consequências da isquemia regional do miocárdio, causada pela oclusão cirúrgica permanente da artéria coronária esquerda, bem como o desenvolvimento progressivo das alterações da IC (Fishbein *et al.*, 1978; DeFelice *et al.*, 1989; Sam *et al.*, 2000). Embora aspectos clínicos decorrentes do infarto do miocárdio em humanos sejam diferentes daqueles decorrentes da indução experimental em ratos, este modelo possui grande utilidade para a compreensão das repercussões cardiovasculares pós-infarto (Pfeffer *et al.*, 1979). Um aspecto importante neste modelo experimental é o de que, quaisquer que sejam as disfunções funcionais que surjam após o infarto, elas serão sempre reflexos da oclusão aguda da artéria coronariana, sem qualquer interferência de outros fatores de risco associados, tais como: aterosclerose, hipercolesterolemia, diabetes ou hipertensão.

O infarto do miocárdio em rato tem sido extensivamente utilizado e citado na literatura, demonstrando assim este modelo experimental como adequado tanto para estudar as repercussões do infarto, quanto para desenvolver possibilidades

terapêuticas para alterações sistêmicas advindas desta doença e que induzem a IC. Outras vantagens como o baixo custo, a simplicidade de manuseio e um curso de vida menor, o que reproduziria em menor espaço de tempo as alterações decorrentes do infarto do miocárdio em humanos, confirmam este modelo como sendo de grande valia. O desenvolvimento destes modelos animais reproduzíveis é de suma importância também para o estudo dos mecanismos celulares e moleculares da IC, pois o detalhado conhecimento dos processos que participam do estabelecimento desta síndrome é um ponto crítico para o desenvolvimento de estratégias inovadoras destinadas a combatê-la (de Tombe, 1998).

1.4. Infarto do miocárdio e as alterações vasculares

As manifestações clínicas da IC geralmente refletem o esforço do organismo em compensar a circulação prejudicada. Dentre estas estão incluídas a exacerbação da resposta neurohumoral para manter a pressão arterial e o débito cardíaco, sinalizadores da resposta inflamatória como citocinas atuando no coração insuficiente e outros órgãos do corpo e resposta hipertrófica do miócito cardíaco (Burkart, 1995). Na fase inicial de compensação, a resposta neurohumoral na IC abrange mecanismos que estimulam os rins a reter sódio e água, vasoconstrição periférica que aumenta a pós-carga e estimulação β -adrenérgica que aumenta a frequência cardíaca, a contratilidade e o relaxamento ventricular. Nesta tentativa de manutenção do débito cardíaco na fase inicial da IC merece destaque a ativação da retenção de fluidos pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), o qual aumenta a pré-carga ventricular e o débito cardíaco, até que o débito cardíaco novamente nivele-se ao limite de ativação do SRAA. O ponto de ativação do SRAA é mantido em um nível de regulação mais elevado para preservar o débito cardíaco compensado. Porém, com a disfunção ventricular subsequente, o débito cardíaco não pode mais alcançar o limite de ativação do SRAA. Então, sendo incapaz de alcançar um novo limite de ativação mais alto, o SRAA permanece constantemente ativado em quantidade proporcional à redução do débito cardíaco, em uma tentativa inútil de aumentá-lo (Schrier & Abraham, 1999; Braunwald, 2001). Sendo assim, tais respostas são benéficas durante eventos clínicos de curta duração como choque cardiogênico e hemorragia, para manter a pressão arterial e o débito cardíaco. Todavia, a longo prazo, estas respostas agravam os sintomas e o prognóstico da IC.

A vasoconstrição arteriolar e a retenção de fluidos são adaptativas a curto-prazo por ajudarem a manter a pressão arterial. A primeira aumentando a pós-carga e a segunda a pré-carga. A estimulação simpática do coração também é inicialmente benéfica pelas respostas cronotrópicas, inotrópicas e lusitrópicas positivas levando ao aumento do débito cardíaco. Mas quando estas respostas se mantêm sustentadas, todas se tornam potencialmente deletérias. A retenção hidrossalina piora a congestão pulmonar e promove anasarca. A vasoconstrição periférica aumenta a demanda de energia do coração insuficiente, e a estimulação adrenérgica do coração é tanto arritmogênica como energeticamente dispendiosa (Francis, 1985; Parmley, 1985; Ertl & Kochsiek, 1993).

Devido à importância vital dos vasos sangüíneos na manutenção da homeostasia corporal, proporcionando, entre outras funções, o suprimento de gases e nutrientes para os órgãos e o controle da pressão arterial, várias pesquisas têm sido direcionadas à melhor compreensão dos fenômenos envolvidos nas alterações vasculares após o infarto do miocárdio, tanto em humanos como em modelos experimentais. A maioria destes estudos é realizada na fase crônica desta enfermidade ou seja, na IC. A exemplo disto, Pereira e colaboradores demonstraram que as alterações da reatividade do leito arterial caudal de ratos, 30 dias após o infarto agudo do miocárdio (IM), estão relacionadas à presença ou não da insuficiência cardíaca (Pereira *et al.*, 2005). Outros trabalhos, bem como dados prévios de nosso laboratório (Sartorio *et al.*, 2005), demonstraram uma disfunção vascular em uma fase inicial após IM, sem no entanto terem sido extensivamente descritos os mecanismos envolvidos nestas alterações. Com relação às alterações vasculares, que ocorrem após o infarto do miocárdio, bem como na IC, estas, de modo geral, se dão no sentido do aumento da resistência periférica total, redução na produção de substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio ou do prejuízo da sua biodisponibilidade, aumento da produção de substâncias vasoconstritoras ou ainda alterações intrínsecas à estrutura da parede vascular.

A seguir será feita uma descrição dos aspectos gerais do músculo liso vascular e do endotélio, dado ao fato de que estas são as camadas da parede vascular mais amplamente descritas na literatura bem como os sistemas relacionados à disfunção vascular observada neste estudo.

2. Músculo liso vascular

O tônus da musculatura lisa vascular é o principal fator determinante da resistência vascular. A regulação deste é dependente de uma complexa interação entre estímulos vasodilatadores e vasoconstritores oriundos de hormônios, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio e pressão sanguínea. Assim como todas as células musculares, as células musculares lisas vasculares requerem um aumento na concentração de Ca^{2+} citoplasmático para deflagrar a sua contração.

O aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular pode resultar tanto do influxo através de canais específicos da membrana citoplasmática, quanto da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, como o retículo sarcoplasmático (RS). A contribuição relativa de cada um desses dois mecanismos depende do tipo de vaso e da natureza do estímulo contrátil (Low *et al.*, 1996; Jackson, 2000).

Somlyo & Somlyo, em 1968, dividiram os mecanismos responsáveis pela contração do músculo liso vascular em duas classes: acoplamento eletromecânico (contração dependente das mudanças no potencial de membrana) e farmacomecânico (contração induzida por agonistas contráteis). Ambos os mecanismos culminam com o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular (Somlyo & Somlyo, 1968).

A despolarização induzida pelo aumento das concentrações de K^+ extracelular é um exemplo de acoplamento eletromecânico, causando contração predominantemente por influxo de Ca^{2+} , através da abertura de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem. A interação de certos agonistas, como a fenilefrina (agonista α -adrenérgico) com receptores acoplados à proteína Gs causa contração, por acoplamento farmacomecânico, via liberação do estoque de Ca^{2+} do RS e influxo de Ca^{2+} do espaço extracelular por ativação de canais para Ca^{2+} operados por receptor e por canais para Ca^{2+} ativados por despolarização (Chen & Rembold, 1995).

A contribuição relativa desses dois mecanismos depende da concentração do agonista, duração do estímulo e das propriedades do vaso estudado (van Breemen & Saida, 1989). Em situações fisiológicas, ambos os mecanismos contribuem para a manutenção do tônus vascular e o conhecimento da importância relativa de cada um nos vários tipos de artérias é necessário para o desenvolvimento de um acesso racional ao tratamento farmacológico de distúrbios vasculares.

A maioria dos fármacos e hormônios vasoconstritores como norepinefrina, endotelina, angiotensina II, serotonina e fenilefrina, promove contração da musculatura lisa vascular por mecanismos semelhantes, agindo sobre receptores específicos na membrana plasmática. Estes receptores são acoplados à proteína $G_{s\alpha}$, que é ativada com a união do agonista ao seu receptor específico, levando à ativação da fosfolipase C (PLC). Esta enzima, por sua vez, deflagra a hidrólise do 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2), o que leva à produção de 1,4,5- trifosfato de inositol (IP_3) e de diacilglicerol (DAG), capazes de liberar Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, e de ativar a proteína quinase C (PKC), respectivamente. A PKC ativada aumenta a sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} , fosforila a cadeia leve da miosina e aumenta a mobilização de Ca^{2+} através dos canais da membrana plasmática. Todos estes mecanismos elevam a concentração de Ca^{2+} intracelular (Rembold, 1992).

Com o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular livre, por aumento do influxo de Ca^{2+} através de canais específicos da membrana plasmática ou por sua liberação das organelas celulares, como o retículo sarcoplasmático (RS), começam a funcionar uma série de processos fisiológicos que conduzem à contração do músculo liso vascular. O Ca^{2+} se liga a uma proteína citoplasmática chamada calmodulina. O complexo Ca^{2+} -calmodulina ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) e libera o sítio ativo da actina ao ligar-se ao caldesmon. A MLCK ativada fosforila a cadeia leve da miosina, que sofre alteração conformacional, sendo capaz de interagir com a actina e promover contração. Quando a concentração de cálcio intracelular cai abaixo do requerido para deflagração destes processos (em torno de 10^{-6} M) ocorre a desativação do complexo Ca^{2+} -calmodulina – MLCK, promovendo o relaxamento do músculo liso vascular (Stull *et al.*, 1991; Marin, 1993).

É descrito que o influxo de Ca^{2+} do meio extracelular é o principal mecanismo de aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático necessário para a contração do músculo liso vascular. Para este influxo estão envolvidos os canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem, os canais para Ca^{2+} operados por receptor, os canais para cátions não seletivos e a troca Na^+/Ca^{2+} (Rembold, 1992; Horowitz *et al.*, 1996).

3. Endotélio

O endotélio vascular é uma camada única e contínua de células cobrindo o lúmen da parede vascular, separando o compartimento intravascular (sangue) do compartimento intersticial e músculo liso vascular. Baseado na quantidade de células (6×10^{13}), massa (1,5 Kg), superfície de área (1000 m^2) e especialmente por suas funções, o endotélio é considerado um órgão autônomo (Munzel *et al.*, 2005).

No princípio havia uma idéia de que o endotélio representava meramente uma barreira seletiva de difusão entre o lúmen vascular e o espaço intersticial. Porém, com a descoberta de autacóides como a prostaciclina em 1977 (Moncada *et al.*, 1977) e do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) em 1980 (Furchgott & Zawadzki, 1980), houve uma mudança definitiva neste conceito. Hoje o endotélio é reconhecido como um órgão endócrino, parácrino e autócrino, com capacidade de sintetizar, modificar e liberar inúmeras substâncias metabolicamente ativas que modulam importantes funções orgânicas, tais como o tônus e a proliferação vascular, respostas inflamatórias, propriedades trombóticas e fibrinolíticas e permeabilidade vascular (Campbell & Campbell, 1986; Rubanyi, 1993; Cai & Harrison, 2000).

As células endoteliais podem liberar uma variedade de mediadores vasoativos dilatadores e constritores a partir de sua ativação por estímulos diversos (Furchgott & Vanhoutte, 1989; Flavahan, 1992; Busse *et al.*, 1993; Vanhoutte, 2003). Estes fatores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do endotélio são descritos como os principais controladores do tônus do músculo liso vascular (Furchgott & Vanhoutte, 1989). Os vasodilatadores mais amplamente conhecidos são a prostaciclina (PGI_2) (Moncada *et al.*, 1977), o óxido nítrico (EDRF – NO) (Furchgott & Zawadzki, 1980; Palmer *et al.*, 1987) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Feletou & Vanhoutte, 1988). Entre os vasoconstritores podemos citar a angiotensina II (Kifor & Dzau, 1987), a endotelina-1 (Yanagisawa *et al.*, 1988), e os metabólitos do ácido araquidônico como o tromboxano A_2 (TXA_2), as prostaglandinas H_2 e $\text{F}_{2\alpha}$ (PGH_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$) (Frolich & Forstermann, 1989) e os ânions superóxido (O_2^-) (Rubanyi & Vanhoutte, 1986; Griendling *et al.*, 2000b).

A disfunção endotelial refere-se a um desequilíbrio das funções normais do endotélio pelo distúrbio de um ou mais dos processos acima descritos (Cai & Harrison, 2000). Em condições fisiológicas ocorre liberação equilibrada dos fatores

vasoativos derivados do endotélio, contribuindo assim para a homeostase do sistema e manutenção do tônus vascular. Durante a disfunção endotelial pode ocorrer uma diminuição do relaxamento dependente do endotélio, decorrente de menor liberação e/ou biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras, dele derivadas ou de um aumento na liberação de substâncias vasoconstritoras (De Artinano & Gonzalez, 1999). Este processo pode contribuir para aumentar a resistência vascular periférica bem como participar da gênese, manutenção, agravamento ou ainda ser conseqüência de enfermidades como a aterosclerose, hipertensão e IC congestiva (Katz *et al.*, 1993; Rubanyi, 1993; Marin & Rodriguez-Martinez, 1997; Drexler & Hornig, 1999).

Em seguida será dado maior detalhamento ao NO e a eNOS, bem como ao papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona vascular devido a serem estas as vias mais amplamente investigadas neste estudo.

4. Óxido nítrico (NO) e suas sintases (NOS)

O óxido nítrico (NO) é um radical livre inorgânico altamente reativo. Esta pequena molécula multifuncional tem sido demonstrada como chave em diversos processos fisiológicos tal como defesa imunitária, regulação do tônus vascular, agregação plaquetária, inflamação, neurotransmissão (Moncada *et al.*, 1991) e inibição da proliferação do músculo liso vascular (Garg & Hassid, 1989). Muitos desses efeitos são mediados pela ativação da guanilato ciclase solúvel e consequente aumento de guanosina 3':5'-monofosfato cíclico (cGMP) (Moncada *et al.*, 1991; Bredt & Snyder, 1994).

O NO é também um regulador enzimático, especialmente de metaloenzimas. A ativação da guanilato ciclase pelo NO se dá pela sua interação com o grupamento heme (Arnold *et al.*, 1977) ou citocromo p450 (Wink *et al.*, 1993). Além disso, outras metaloproteínas como aconitase, são moduladas por NO, sendo este identificado neste caso como um efector molecular da citotoxicidade induzida por macrófagos ativados (Hibbs *et al.*, 1988). O NO participa também da inativação reversível e irreversível da proteína quinase C por S-nitrosilação, o que participaria dos efeitos citoprotetores ou citotóxicos mediados por NO, respectivamente (Gopalakrishna *et al.*, 1993). Pelo mesmo mecanismo de S-nitrosilação, a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi descrita como sofrendo inativação por NO (Molina y

Vedia *et al.*, 1992). No coração e no sistema vascular o NO é capaz de reduzir a expressão e a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Michel *et al.*, 1996; Fernandez-Alfonso *et al.*, 1997; Takemoto *et al.*, 1997a; Ackermann *et al.*, 1998). Desta maneira fica demonstrada a capacidade do NO em participar de múltiplos processos regulatórios, que podem sofrer alterações em diversos quadros fisiopatológicos.

A função vasodilatadora do NO ocorre após sua difusão do endotélio para as células musculares lisas onde ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, que é uma proteína que possui um grupamento heme de alta afinidade para o NO. Quando ativada, esta enzima promove a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) a partir do trifosfato de guanosina (GTP). O aumento da concentração de GMPc leva à ativação da proteína quinase G (PKG), que atua por diversos mecanismos, tais como: fosforilação do fosfolambam ativando assim a Ca^{2+} ATPase no retículo sarcoplasmático (Cornwell *et al.*, 1991), estimulação da saída de Ca^{2+} intracelular via ativação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Furukawa *et al.*, 1991), inibição dos canais para Ca^{2+} tipo L (Tare *et al.*, 1990; Mery *et al.*, 1991), fosforilação dos canais para K^+ que induz hiperpolarização (Lincoln *et al.*, 1994) e também pela estimulação de Ca^{2+} ATPases de membrana. A PKG leva ainda à redução na sensibilidade dos filamentos contráteis aos íons Ca^{2+} (Rembold, 1992; Kawada *et al.*, 1997). O GMPc e a PKG participam da ativação da Na^+K^+ ATPase (Scavone *et al.*, 1995; Scavone *et al.*, 2000). O NO também pode ativar a bomba de sódio (Na^+K^+ ATPase) (Gupta *et al.*, 1996), mecanismo este que foi relacionado ao aumento da produção de NO pelo endotélio e pelo aumento da expressão da isoforma endotelial e neuronais da sintase de NO (Rossoni *et al.*, 2002; Xavier *et al.*, 2004). O NO promove ainda a ativação direta de canais para K^+ , levando ao efluxo deste íon e hiperpolarização da célula muscular lisa (Bolotina *et al.*, 1994). Em conjunto, estes mecanismos levam à redução da concentração de Ca^{2+} intracelular, culminando no relaxamento do músculo liso vascular bem como redução de respostas vasoconstritoras (Rapoport & Murad, 1983; Bolotina *et al.*, 1994).

O NO é produzido nas células endoteliais a partir da oxidação do grupo guanidino terminal do aminoácido L-arginina, que é transformado então em óxido nítrico e L-citrulina (Palmer *et al.*, 1988) por ação das enzimas sintases de óxido nítrico (NOS) (Andrew & Mayer, 1999). Existem três isoformas de NOS que podem ser divididas em duas classes funcionais. Uma classe é a constitutiva e inclui a

isoforma endotelial (eNOS), e uma neuronal (nNOS) sendo esta última descrita inicialmente (e predominantemente) no sistema nervoso central e periférico, e posteriormente em outros tecidos. Estas são duas isoformas constitutivas dependentes do complexo Ca^{2+} -calmodulina, produzindo NO em episódios curtos e em baixas concentrações (nM) para finalidades fisiológicas. A outra classe é formada pela isoforma induzível (iNOS) a qual produz NO em altas concentrações (μM) e por todo o tempo durante o qual a enzima permanecer ativada. Apesar de a iNOS expressar-se constitutivamente em alguns tecidos como epitélio pulmonar e túbulos distais dos rins, ela é principalmente expressada em resposta a citocinas e outros mediadores inflamatórios, e sua atividade é independente da concentração de Ca^{2+} (Moncada *et al.*, 1991; Forstermann *et al.*, 1994; Andrew & Mayer, 1999; Hecker *et al.*, 1999). A síntese do NO depende ainda de outros co-fatores, dentre eles a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida – NADPH), tetrahydrobiopterina (BH_4), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) (Angus & Cocks, 1989; Moncada *et al.*, 1991; Marletta, 1993; Busse *et al.*, 1994).

4.1. eNOS

A principal fonte endotelial de NO, que é um fator crucial para o funcionamento normal do sistema cardiovascular, é a eNOS presente nas células endoteliais (Palmer *et al.*, 1987; Harrison, 1997; Vanhoutte, 1997). Outras fontes relevantes para o sistema cardiovascular podem ser: os cardiomiócitos (Balligand *et al.*, 1993) e o sistema de condução cardíaco (Schulz *et al.*, 1991). Apesar da eNOS ser considerada uma enzima constitutivamente expressada, existem numerosos fatores que afetam a sua expressão basal e a atividade desta enzima. Dentre eles podemos citar o estresse de cisalhamento (*shear stress*) (Uematsu *et al.*, 1995; Malek *et al.*, 1999), hormônios como o estrogênio (Goetz *et al.*, 1994; Ruehlmann & Mann, 2000), lipoproteínas oxidadas de baixa densidade (LDLs) (Ramasamy *et al.*, 1998), hipóxia (Le Cras *et al.*, 1996; Hoffmann *et al.*, 2001), forças mecânicas (Ziegler *et al.*, 1998), estímulos químicos, como pela ação da acetilcolina, bradicinina, trombina, ionóforo de cálcio (A23187), substância P, adenina difosfato (ADP), e agregação plaquetária (Flavahan & Vanhoutte, 1995; Luscher & Noll, 1995; Vanhoutte, 2003). Esses fatores levam a mecanismos que culminam no aumento da

concentração intracelular de Ca^{2+} no endotélio, seja pelo influxo extracelular ou pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares, o que ativa (em conjunto com a calmodulina) a eNOS, levando à síntese e liberação de NO (Luckhoff *et al.*, 1988; Busse & Mulsch, 1990).

A sintase endotelial de óxido nítrico (eNOS) é um dímero constituído por dois idênticos monômeros de 134 kD. A enzima eNOS somente é ativa na sua forma dimérica (Albrecht *et al.*, 2003). A dimerização da eNOS inicia-se com a ligação através do grupamento heme (Klatt *et al.*, 1996), sem o qual a eNOS existe somente como um monômero. A ligação heme e a formação de um dímero tornam possível a ligação da tetrahydrobiopterina (BH_4) a este dímero da eNOS, o que proporciona a sua estabilidade e o protege de proteólise (List *et al.*, 1997; Venema *et al.*, 1997; Panda *et al.*, 2002). Os íons zinco são também importantes para esta estabilização, mantendo a integridade do sítio ligante para a BH_4 (Raman *et al.*, 1998). A atividade funcional do dímero da eNOS é dependente do número de moléculas de BH_4 a ela ligada. A BH_4 tem um papel decisivo para o transporte de elétrons durante a formação do NO. Uma disponibilidade limitada de BH_4 para a NOS resultará inevitavelmente na produção aumentada dos ânions superóxido e desacoplamento da NOS (Andrew & Mayer, 1999; Bevers *et al.*, 2006).

Na sua forma dimérica, a eNOS é passível de associar-se com membranas intracelulares, o que é uma condição necessária para a fosforilação e ativação desta enzima em resposta a estímulos (Sessa *et al.*, 1995; Fulton *et al.*, 2002). A localização celular exata da eNOS é incerta, porém tem sido descrita como estando situada no complexo de Golgi (O'Brien *et al.*, 1995), membrana plasmática (Hecker *et al.*, 1994) e cavéolas plasmalemais (Liu *et al.*, 1996; Garcia-Cardena *et al.*, 1997). A maior parte da eNOS das células endoteliais parece estar nas cavéolas, onde está ligada à caveolina (Garcia-Cardena *et al.*, 1997; Michel *et al.*, 1997; Feron *et al.*, 1998). Essa ligação leva à inibição da atividade da eNOS, pela interferência com a ligação à calmodulina e a transferência de elétrons para a subunidade heme (Ghosh *et al.*, 1998). Outras proteínas associadas à eNOS têm sido descritas, como a proteína de choque térmico (HSP90), a dinamina, receptores acoplados à proteína G, diversas quinases, e a proteína de interação com a eNOS (*eNOS interacting protein – NOSIP*), sendo estas envolvidas na modulação da atividade ou localização intracelular da eNOS (Fleming & Busse, 2003).

Dentre as três isoformas de NOS, a eNOS é a mais sensível às alterações do cálcio intracelular. A ativação clássica da eNOS nas células endoteliais por agonistas de receptor transmembrana como a bradicinina e a acetilcolina é acompanhado pela elevação intracelular de cálcio livre. Se durante esta estimulação for feita a quelação do cálcio extracelular ou a adição de inibidores de calmodulina, o relaxamento dependente do endotélio é abolido (Luckhoff *et al.*, 1988). Ao ocorrer o aumento da concentração intracelular de cálcio livre, há a formação do complexo cálcio-calmodulina e com isso a ligação à enzima eNOS e sua dissociação da caveolina. Neste momento a eNOS está ativa e assim permanecerá até que haja uma queda da concentração intracelular de cálcio. A eNOS ativada será produtiva enquanto os substratos L-arginina, oxigênio e NADPH estiverem presentes (Albrecht *et al.*, 2003). Apesar desta dependência de cálcio, também foi demonstrada a ativação da eNOS em situações onde há um aumento transiente e não sustentado de cálcio, como o *shear stress* (Ayajiki *et al.*, 1996) ou em níveis basais deste íon (Presta *et al.*, 1997).

A quantidade de NO produzida pela eNOS também é modulada pela sua fosforilação. Esta enzima pode ser fosforilada nos resíduos serina, treonina e tirosina (Michel *et al.*, 1993; Corson *et al.*, 1996; Garcia-Cardena *et al.*, 1996; Fleming *et al.*, 1998; Fulton *et al.*, 1999; Fleming *et al.*, 2001). Estes estudos indicam um papel importante da fosforilação da eNOS na regulação de sua atividade. Dois aminoácidos parecem ser particularmente importantes para regulação da atividade da eNOS e estes são: um resíduo serina no domínio reductase (na sequência da eNOS humana - Ser¹¹⁷⁷ e na eNOS bovina - Ser¹¹⁷⁹) e um resíduo treonina (na sequência da eNOS humana - Thr⁴⁹⁵ e na eNOS bovina - Thr⁴⁹⁷) localizado por sua vez dentro do domínio ligante da calmodulina (Fleming & Busse, 2003). Quando há a fosforilação do resíduo Ser¹¹⁷⁷, o fluxo de elétrons através do domínio reductase, e consequentemente a produção de NO, aumenta de duas a três vezes acima do nível basal (McCabe *et al.*, 2000). Já o resíduo Thr⁴⁹⁵ tem papel inibitório da atividade da eNOS e quando fosforilado inibe a ligação da calmodulina ao seu domínio nas células endoteliais, ou seja, mais calmodulina se liga à eNOS quando a Thr⁴⁹⁵ está desfosforilada (Fleming *et al.*, 2001).

5. Disfunção endotelial e estresse oxidativo vascular

Apesar de a disfunção endotelial ser um processo de origem multifatorial, uma importância central tem sido dada à participação do estresse oxidativo vascular neste processo. A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou uma redução da defesa antioxidante podem levar ao prejuízo da função vascular e até mesmo ao dano tecidual, o que já tem sido demonstrado em várias condições patológicas como hipertensão (Nakazono *et al.*, 1991), diabetes (Hattori *et al.*, 1991), aterosclerose (White *et al.*, 1994), isquemia miocárdica e IC (Ferrari *et al.*, 1998; Bauersachs *et al.*, 1999).

A produção de ERO na parede vascular tem sido descrita no endotélio, bem como no músculo liso e na adventícia (Jones *et al.*, 1996; Griending & Alexander, 1997; Rey & Pagano, 2002). As ERO incluem radicais livres como ânions superóxido (O_2^-), o óxido nítrico (NO), o peroxinitrito ($ONOO^-$), o radical hidroxil ($OH^\bullet$) e não radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A mais importante ERO na vasculatura é o ânion superóxido (O_2^-), o qual é formado pela redução univalente do oxigênio (Droge, 2002). Apesar do O_2^- poder diretamente promover alterações na função vascular, ele também é fundamental na produção de outras espécies reativas, como quando ocorre sua reação com o NO, a qual leva à produção de substâncias citotóxicas como o peroxinitrito ($ONOO^-$) e radicais hidroxil ($OH^\bullet$) (Beckman *et al.*, 1990; Griending *et al.*, 2000b; Ortega Mateo & Amaya Alexandre de, 2000). Desta reação pode ocorrer a perda da capacidade vasodilatadora do NO (Gryglewski *et al.*, 1986), vasoconstrição dependente do endotélio, conseqüente da perda da atividade do NO produzido em condições basais, levando a um predomínio da resposta vasoconstritora dependente do endotélio (Carr & Frei, 2000). Vale ressaltar que o ânion superóxido reage rapidamente com o NO para formar o peroxinitrito, reação esta que é três a quatro vezes mais rápida que a dismutação do O_2^- pela superóxido dismutase (Darley-Usmar *et al.*, 1995; Beckman & Koppenol, 1996). Portanto, a formação de peroxinitrito representa a via potencial principal para a reatividade do NO, dependendo da quantidade de O_2^- produzido (Beckman, 1996). E a quantidade basal de O_2^- e outras ERO nas células, por sua vez, está na dependência de sua taxa de produção, bem como da atividade dos sistemas antioxidantes (Li & Shah, 2004; Didion & Faraci, 2005). Esta perda da atividade biológica do NO pela sua associação com ERO na parede vascular tem sido alvo de

muitos estudos (Cai & Harrison, 2000; Hamilton *et al.*, 2004), sendo observada esta condição em vários processos patológicos, incluindo isquemia miocárdica e IC (Ferrari *et al.*, 1998; Bauersachs *et al.*, 1999), sendo a maioria absoluta destes estudos feitos na fase crônica destas enfermidades.

Com relação à formação das ERO, esta é mediada por algumas enzimas vasculares que incluem a NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, eNOS, além da cadeia de transporte de elétrons, isoenzimas da citocromo P450, lipooxygenase, ciclooxigenase, heme oxygenase e glicose oxidase (Kalinowski & Malinski, 2004; Wassmann *et al.*, 2004). A principal via e a mais comumente estudada como principal fonte de ERO no endotélio, bem como na adventícia e nas células musculares lisas, parece ser a das oxidases ligadas à membrana que utilizam o NADH ou NADPH como substratos (Pagano *et al.*, 1995; Babior, 1999; Cai & Harrison, 2000; Griendling *et al.*, 2000b). A NAD(P)H oxidase associada à membrana plasmática é a mais importante fonte de ânions superóxido em paredes de vasos sanguíneos intactos (Mohazzab *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1996; Rajagopalan *et al.*, 1996b; Pagano *et al.*, 1997). A NAD(P)H oxidase vascular tem algumas das características em comum com a enzima descrita nos neutrófilos (Babior, 1999). Porém, a NAD(P)H oxidase endotelial difere destas, pois continuamente produz uma baixa concentração de O_2^- , mesmo em células não estimuladas (Lassegue & Clempus, 2003; Li & Shah, 2004). A NAD(P)H oxidase é uma proteína composta por duas subunidades flavocitocromo b_{558} associadas à membrana que são a gp91^{phox} (onde “phox” vem de *phagocyte oxidase*) e p22^{phox}, e as subunidades citosólicas regulatórias p67^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} e a proteína de baixo peso molecular rac-1 ou rac-2 (Jones *et al.*, 1996; Gorlach *et al.*, 2000; Li & Shah, 2004) que na ativação se translocam para a membrana, associando-se com o citocromo b_{558} . Este último processo ativa rapidamente a oxidase, levando à grande produção de O_2^- (Lassegue & Clempus, 2003). O componente principal da NAD(P)H oxidase é a proteína p22^{phox}, que em junção com a gp91^{phox} forma uma proteína heterodimérica ligada à membrana referida como flavocitocromo b_{558} (Knoller *et al.*, 1991; Babior, 1999; Cahilly *et al.*, 2000). Este último é considerado como o centro redox da NAD(P)H oxidase (Knoller *et al.*, 1991). A proteína p22^{phox} é considerada essencial para a estruturação e ativação da NAD(P)H oxidase (Sumimoto *et al.*, 1996) e é um componente crítico para a geração vascular de ânions superóxido, bem como tendo um papel central para esse sistema oxidase na hipertrofia vascular

(Ushio-Fukai *et al.*, 1996). Apesar do padrão de expressão de algumas destas moléculas ter sido demonstrado, ainda devem ser determinadas quais subunidades participam em complexos funcionais em tipos celulares específicos e se proteínas ainda não identificadas tomam parte da formação de O_2^- (Griendling *et al.*, 2000a). Uma razão importante para o interesse nos últimos anos na pesquisa das NAD(P)H oxidases endotelial, bem como vascular de uma forma geral, é o achado de que esta enzima pode ser regulada por uma grande quantidade de fatores fisiológicos e patológicos (Lassegue & Clempus, 2003).

Como já previamente comentado, a eNOS também pode atuar como fonte de ânions superóxido. Na ausência de seu substrato L-arginina ou do cofator BH_4 a eNOS pode sofrer um desacoplamento e neste estado os elétrons que normalmente deveriam seguir de uma subunidade do domínio reductase para outra subunidade do domínio oxigenase, são desviados para o oxigênio molecular ao invés da L-arginina, resultando em uma produção de superóxido ao invés de NO (Xia & Zweier, 1997; Vasquez-Vivar *et al.*, 1998; Munzel *et al.*, 2005).

O delicado balanço entre o estado de oxidação e redução (redox) é mantido por uma série de enzimas e moléculas pro-oxidantes e antioxidantes na vasculatura. No entanto, o aumento da atividade dos sistemas oxidantes e a reduzida atividade dos antioxidantes levam ao estresse oxidativo. Dentre as enzimas antioxidantes vasculares de maior relevância podemos citar a glutathiona peroxidase (GPX), a catalase, a tioredoxina redutase e as superóxido dismutases (SODs). A glutathiona peroxidase e a catalase são as principais enzimas antioxidantes envolvidas na degradação do peróxido de hidrogênio (Droge, 2002; Faraci & Didion, 2004). Já o sistema da tioredoxina pode efetivamente regenerar proteínas que são inativadas pelo estresse oxidativo e constitui um sistema oxiredutase com papéis regulatórios antioxidantes, sendo sensíveis ao redox e abundantemente expressado em células endoteliais, estando a expressão da tioredoxina aumentada em situações de estresse oxidativo (Yamawaki *et al.*, 2003; Wassmann *et al.*, 2004). As SODs são a principal defesa celular contra o superóxido em todas as células vasculares (Wassmann *et al.*, 2004) e portanto será agora descrita. A SOD em mamíferos tem sido descrita em três isoformas. Uma delas é citosólica ou cobre-zinco SOD (CuZn-SOD ou SOD-1) (McCord & Fridovich, 1969), uma é localizada na mitocôndria (SOD manganês – MnSOD ou SOD-2) (Weisiger & Fridovich, 1973) e uma forma extracelular da CuZn-SOD (EC-SOD ou SOD-3) (Marklund, 1982; Hassan, 1988;

Didion & Faraci, 2005). As SODs têm um papel fundamental na dismutação do O_2^- em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Desta maneira as SODs protegem o organismo contra os efeitos citotóxicos do O_2^- além de proteger o NO e a sinalização mediada por ele, já que a reatividade do NO com o O_2^- ocorre em uma frequência três vezes mais rápida que a sua dismutação pela SOD (Darley-Usmar *et al.*, 1995; Beckman & Koppenol, 1996). Apesar da localização diferencial celular de cada isoforma, apenas recentemente estudos descreveram a importância funcional de cada isoforma individual da SOD na parede vascular em condições de normalidade e durante as doenças vasculares (Faraci & Didion, 2004). A exemplo disto a expressão da CuZn-SOD está aumentada em resposta ao estresse de cisalhamento e é relacionada ao estado redox (Inoue *et al.*, 1996). A EC-SOD é encontrada primariamente ligada ao sulfato de heparan na superfície celular, e pode ser especialmente relevante para a regulação extracelular da atividade do NO. Em aortas de camundongos, a expressão da EC-SOD foi descrita aumentada por angiotensina II (Fukai *et al.*, 1999). A MnSOD mitocondrial também é sensível ao redox e pode ter a sua expressão induzida por fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF), via ativação da NAD(P)H oxidase (Abid *et al.*, 2001).

Vale lembrar que o sistema relacionado à atividade oxidante e antioxidante pode sofrer uma modulação por agonistas e condições farmacológicas que podem levar ao desequilíbrio de expressão e atividade das enzimas oxidantes e antioxidantes, e, por outro lado certas intervenções ou drogas podem reduzir o estresse oxidativo. Como exemplos de fatores que levam ao aumento da produção de ERO na vasculatura podem ser citados a angiotensina II (Seshiah *et al.*, 2002), a aldosterona (Keidar *et al.*, 2004), fatores de crescimento e citocinas (Stralin & Marklund, 2000; Stralin & Marklund, 2001) e lipídios como o LDL oxidado (Meilhac *et al.*, 2000). Exemplos de fatores que reduzem a produção ou aumentam a inativação de ERO na vasculatura são o estrogênio (Wagner *et al.*, 2001a; Laufs *et al.*, 2003), o NO (Fukai *et al.*, 2000), e os antioxidantes como a vitamina C e E (Hornig *et al.*, 1998b).

6. O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

O sistema-renina-angiotensina-aldosterna (SRAA) tem sido reconhecido como possuindo um importante papel na preservação da estabilidade hemodinâmica. O

SRAA complementa e interage também com os efeitos hemodinâmicos produzidos por outros sistemas vasomotores como o sistema nervoso simpático e hormônios vasoativos. Em suma, sua ação é regular o volume do fluido extracelular, o balanço eletrolítico e a função cardiovascular através de efeitos diretos e indiretos em diversos órgãos e sistemas (Skeggs *et al.*, 1976). O sistema SRAA é estimulado por situações que comprometam a estabilidade da pressão sanguínea e homeostase do volume do fluido extracelular. Isto inclui perda excessiva de volume sanguíneo, deficiência na ingestão de sódio, excessiva perda de sódio e água, redução do débito cardíaco, baixa perfusão renal, alterações posturais e outras síndromes hipotensivas (Erdos, 1990; Weber *et al.*, 1995).

Apesar da descrição clássica renal dos componentes do sistema renina-angiotensina no que diz respeito à sua síntese e ação, estes componentes têm sido descritos como estando presentes tanto no coração como na parede vascular, funcionando de maneira autócrina e parácrina (Dzau, 1988a). A aldosterona tem sido demonstrada não somente atuando como também sendo sintetizada em tecidos não renais como o tecido vascular, cardíaco e cerebral (Takeda *et al.*, 1995; Gomez-Sanchez *et al.*, 1997; Silvestre *et al.*, 1998). O SRAA está marcadamente ativado na IC (Struthers, 1996; Wollert & Drexler, 1999), motivo pelo qual alguns componentes deste sistema, com relevância para o presente estudo, serão detalhados a seguir.

6.1. Enzima conversora de angiotensina (ECA) e angiotensina II

A angiotensina II é um polipeptídeo formado por 8 aminoácidos e que exerce diversos efeitos cardiovasculares. A via clássica de formação da angiotensina II advém de reações ocorridas inicialmente na circulação renal e depois na circulação sistêmica. Esta se inicia com a liberação de renina pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais quando estimuladas por uma redução da pressão arterial ou desequilíbrio hidro-eletrolítico. A renina atua sobre o angiotensinogênio, produzido no fígado, formando assim a angiotensina I, um decapeptídeo. Esta, sob a ação da ECA é convertida em angiotensina II, com potente ação vasoconstritora (Skeggs *et al.*, 1976; Peach, 1977; Erdos, 1990).

A ECA é uma zinco-metalopeptidase de 150-180 kDa que foi primeiramente descrita por Skeggs e colaboradores (Skeggs *et al.*, 1956). Esta enzima promove a clivagem dipeptídica carboxi-terminal de alguns peptídeos e se expressa em diversos

tecidos como o endotélio vascular, o endotélio dos túbulos proximais renais, coração pulmão, macrófagos ativados e algumas regiões do cérebro (Dzau, 1988a). Seu papel é central na regulação do tônus vascular pela conversão do peptídeo inativo angiotensina I ao vasoconstrictor e trófico angiotensina II, além de inativar o vasodilatador bradicinina e substância P (Vanhoutte *et al.*, 1989; Linz *et al.*, 1995; Blais *et al.*, 2000). Estudos demonstram que o K_m da ECA para a bradicinina é substancialmente mais baixo que para a angiotensina I, indicando uma cinética mais favorável à hidrólise da bradicinina que para a conversão de angiotensina I a angiotensina II (Jaspard *et al.*, 1993).

A conversão da angiotensina I em angiotensina II ocorre primariamente no endotélio pulmonar (Ng & Vane, 1968), embora a presença da ECA já tenha sido descrita em diversos outros tecidos como coração (Roth *et al.*, 1969), glândulas adrenais (Plunkett *et al.*, 1985), testículos (Howard *et al.*, 1990) e vasculatura (Dzau, 1988b), sendo chamado então de sistema renina-angiotensina tecidual. O sistema renina angiotensina local pode ser potencialmente mais importante que o sistêmico (Dzau & Hirsch, 1990). Tem sido sugerido que enquanto o sistema neuroendócrino circulatório está ativado na fase aguda da IC, o sistema tecidual torna-se dominante em uma situação hemodinâmica estável (Dzau & Hirsch, 1990; Dzau, 1992). A via para a síntese de angiotensina II no interior da parede vascular tem sido alvo de diversos estudos. Já foi demonstrado que todos os componentes deste processo estão presentes nos vasos sanguíneos como a renina (Okamura *et al.*, 1992) e o angiotensinogênio (Campbell & Habener, 1986; Rakugi *et al.*, 1993). As células do endotélio vascular podem sintetizar angiotensina II, que também é considerada como um fator vasoconstritor derivado do endotélio (Kifor & Dzau, 1987).

A ECA vascular é uma ectoenzima que se expressa principalmente nas células endoteliais (Ryan *et al.*, 1976; Alhenc-Gelas *et al.*, 1990). No endotélio a expressão da ECA pode estar aumentada por diversos fatores como hipóxia (King *et al.*, 1989), glicocorticóides (Mendelsohn *et al.*, 1982), endotelina (Kawaguchi *et al.*, 1990), ionóforos de cálcio, fatores de crescimento (Dzau *et al.*, 2001) e aldosterona (Sugiyama *et al.*, 2005). A expressão da ECA em células endoteliais em cultura também depende do estado de crescimento celular, sendo que a expressão da ECA aumenta exponencialmente quando a confluência intercelular é obtida (Shai *et al.*, 1992). A regulação endotelial da ECA parece então ser um determinante da função vascular na saúde e na enfermidade (Dzau *et al.*, 2001).

Uma forma solúvel da ECA também é encontrada no plasma, a qual possivelmente é derivada da forma ligada à membrana plasmática através de clivagem enzimática, ocorrendo esta tanto intracelularmente quanto na membrana plasmática (Erdos, 1990). Porém, medidas bioquímicas da atividade da ECA demonstraram que esta é uma enzima de base tecidual, sendo que menos que 10% foi encontrada no plasma circulante (Cushman & Cheung, 1971). A função precisa da ECA plasmática ainda não foi esclarecida. Todavia, como esta representa apenas uma pequena porção da atividade total da ECA, seu papel parece ser mínimo (Dzau *et al.*, 2001). Estudos demonstram também que os efeitos dos inibidores da ECA na atividade da ECA circulante correlacionam-se muito pouco com o que acontece no nível tecidual (Teerlink *et al.*, 1993; Farquharson & Struthers, 2002b).

Os inibidores da ECA têm sido considerados um dos principais avanços na terapia da IC crônica, porém outros estudos demonstram que a quantidade de angiotensina II plasmática não permanece suprimida em todos os pacientes com IC durante o tratamento crônico com inibidores da ECA (Swedberg *et al.*, 1990; MacFadyen *et al.*, 1999). Uma das possíveis razões seria aumento da ECA plasmática e tecidual em resposta a inibidores da ECA (King & Oparil, 1992) ou a conversão de angiotensina I a angiotensina II por outras vias que não a da ECA. Esta via de conversão alternativa, não proveniente da ECA, pode contribuir para a reativação da produção de angiotensina II em situações de inibição crônica da ECA, e, portanto, aumentar as doses do inibidor da ECA nos últimos estágios da doença poderia ter um impacto pequeno na geração de angiotensina II (Farquharson & Struthers, 2002b).

Apesar de a ECA ser descrita como a principal via de conversão da angiotensina I a angiotensina II, ela não é a única. Esta conversão também pode ser efetuada pela quimase, catepsina G, tonina e outras proteases (Dzau *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1995; Weir & Dzau, 1999; Perazella & Setaro, 2003). Destas enzimas, a quimase parece ser a principal via alternativa de conversão de angiotensina II na vasculatura de humanos (Okunishi *et al.*, 1984; Dell'Italia & Husain, 2002) e alguns animais experimentais (Takai *et al.*, 1996; Takai *et al.*, 1997; Miyazaki & Takai, 2001).

Os efeitos vasoconstritores da angiotensina II são, em sua maioria, obtidos pela estimulação de receptores AT₁ no músculo liso vascular, acoplados a proteína G_{sα}. Estes receptores ao serem estimulados ativam a fosfolipase C de membrana,

aumentando assim a formação de trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). Isto resulta em elevação dos níveis intracelulares de cálcio, proveniente dos estoques intracelulares e o do meio extracelular, culminando com a contração muscular (Katusic & Shepherd, 1991; Luscher & Tanner, 1993). As células do endotélio também possuem receptores AT₁ que atuam ativando a fosfolipase C e induzindo a liberação de NO e prostaciclina, fazendo contraposição a seu efeito vasoconstritor. Os receptores AT₂ endoteliais ao serem ativados pela angiotensina (1-7) e angiotensina II também promovem relaxamento dependente do endotélio (Gohlke *et al.*, 1998). A angiotensina II além do seu potente efeito vasoconstritor, estimula a liberação de catecolaminas das terminações nervosas, a secreção de aldosterona, reduz a natriurese e diurese e estimula o crescimento do músculo liso vascular e cardíaco (Yamazaki *et al.*, 1996). Outros efeitos vasculares da angiotensina II que podem ser citados são a ativação inflamatória em células musculares lisas (Kranzhofer *et al.*, 1999), indução da expressão de fatores de crescimento autócrinos no músculo liso vascular (Itoh *et al.*, 1993), modulação da migração celular e redução da apoptose do músculo liso vascular (Pollman *et al.*, 1996), alteração da composição da matriz extracelular (Scott-Burden *et al.*, 1991; Takagishi *et al.*, 1995) e ação pro-trombótica (Ridker *et al.*, 1993). A angiotensina II também é considerada como principal mediador do estresse oxidativo vascular, sendo esta uma potente ativadora da NAD(P)H oxidase que resulta na produção de ânions superóxido (Griendling *et al.*, 1994).

6.2. Aldosterona

De acordo com a idéia clássica sobre a aldosterona, esta é o mais importante mineralocorticoide, produzido na zona glomerular da glândula adrenal (Simpson & Tait, 1953) em resposta à angiotensina II, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), potássio e inibida, por exemplo, pelo fator natriurético atrial (Muller, 1987). Sua produção se dá a partir do colesterol através de reações enzimáticas envolvendo algumas monooxigenases denominadas P450. Durante este processo um metabólito intermediário, 11-desoxicorticosterona, é hidroxilado no carbono 11-β para formar corticosterona e então hidroxilado no carbono 18 à 18-hidroxycorticosterona e finalmente oxidado no carbono 18 formando aldosterona. O gene necessário para esta síntese é o citocromo mitocondrial P450 ald (CYP11B2). A aldosterona

interage com as células epiteliais situadas no néfron distal e coletor cortical do rim, cólon, glândulas salivares e sudoríparas. A aldosterona circulante regula o transporte de sódio e potássio nas células endoteliais ao ligar-se com a forma inativa do receptor de mineralocorticóides (Arriza *et al.*, 1987). O cortisol liga-se com igual afinidade que a aldosterona ao receptor de mineralocorticóides, e a especificidade tecidual para a aldosterona é conferida pela expressão local da enzima 11 β -hidroxiesteroide dehidrogenase (11 β HSD) tipo 2. Esta é responsável pela conversão do cortisol e corticosterona a metabólitos inativos cortisona e 11-dehidrocorticosterona (Funder *et al.*, 1988). Quando há a ligação da aldosterona com o receptor de mineralocorticóides, este receptor se dissocia de um complexo multiprotéico contendo acompanhantes moleculares (*molecular chaperones*) (Trapp & Holsboer, 1995). Estes últimos farão então a translocação do receptor através dos poros nucleares até a cromatina em regiões regulatórias de promotores gênicos alvo (Fejes-Toth *et al.*, 1998). Quando no núcleo, no caso no néfron distal do rim, este receptor ativado atuará como um fator de transcrição positivo, modulando a expressão de múltiplas proteínas, dentre estas a SGK-1 (*serum and glucocorticoid inducible kinase 1*) (Chen *et al.*, 1999a). A expressão da SGK-1 deflagra uma cascata de eventos que culmina com a absorção de íons Na⁺ e água através do canal de sódio e indiretamente aumentará a excreção de K⁺ (Bhargava *et al.*, 2001). Desta maneira há uma expansão do volume intravascular e aumento da pressão sanguínea (Booth *et al.*, 2002).

Apesar da descrição dos componentes renais e supra-renais envolvidos na produção e atuação da aldosterona, atualmente já se sabe que existem sítios de produção de aldosterona extra-adrenais. Já foram descritos em diferentes tecidos corporais a produção local de aldosterona, entre eles cérebro, vasos sanguíneos e miocárdio (Takeda *et al.*, 1995; Gomez-Sanchez *et al.*, 1997; Silvestre *et al.*, 1998). A regulação da síntese extra-renal de aldosterona parece ser ditada pelos mesmos estímulos que regulam a síntese na glândula adrenal (Takeda *et al.*, 1996; Silvestre *et al.*, 1998). A localização dos receptores de mineralocorticóides, além da localização clássica nas células epiteliais renais, colon, glândulas salivares e sudoríparas, também já foi descrito nos tecidos cerebral (Roland *et al.*, 1995), cardíaco (Pearce & Funder, 1987; Lombes *et al.*, 1995) e na vasculatura (Kornel *et al.*, 1988; Funder *et al.*, 1989; Hatakeyama *et al.*, 1994; Takeda *et al.*, 1997). Isto

indica uma gama de novos possíveis efeitos da aldosterona mediados pela ativação dos receptores de mineralocorticóides nestes tecidos.

Destacando os efeitos vasculares da aldosterona, esta já foi descrita como capaz de causar danos à vasculatura, independentes de seus efeitos na pressão sanguínea. Alguns exemplos destes prejuízos são suas propriedades fibrótica (Benetos *et al.*, 1997), pró-inflamatória (Rocha *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2002), redutora da complacência vascular (Duprez *et al.*, 1998), pró-trombótica e antifibrinolítica (Brown *et al.*, 2000). Além disso, a aldosterona promove a redução da biodisponibilidade do NO (Ikeda *et al.*, 1995; Farquharson & Struthers, 2000) e aumenta a produção de ERO vasculares (Rajagopalan *et al.*, 2002). Vale ressaltar que a maioria destes efeitos deletérios nos estudos acima descritos pôde ser revertida pelo bloqueio da aldosterona pelo tratamento com espironolactona ou eplerenona.

De grande importância e alvo de diversos estudos é a interrelação existente entre os diversos componentes do SRAA. Tem sido demonstrado que a aldosterona modula a expressão de alguns componentes do sistema renina-angiotensina vascular. A aldosterona é capaz de potencializar o efeito sinalizador da angiotensina II nas células musculares lisas (Mazak *et al.*, 2004). A produção local de aldosterona, via estimulação de receptores AT₁ por angiotensina II, é responsável pelos efeitos desta última na estimulação da proliferação do músculo liso vascular de ratos (Xiao *et al.*, 2000). Também, a inibição da aldosterona reduz os efeitos negativos da angiotensina no que diz respeito ao estresse oxidativo vascular (Virdis *et al.*, 2002). A aldosterona promove a estimulação da atividade da ECA na vasculatura (Farquharson & Struthers, 2000), além de ser capaz de aumentar a expressão da ECA em cardiomiócitos (Harada *et al.*, 2001) e células endoteliais (Sugiyama *et al.*, 2005). Desta maneira fica demonstrado que a aldosterona promove um *feedback* positivo no sistema-renina angiotensina vascular, formando um verdadeiro ciclo vicioso, que ainda deve ser elucidado quanto à possível participação no desenvolvimento e/ou progressão da disfunção endotelial e lesão vascular induzidas por aldosterona nas diversas enfermidades que envolvem alterações cardiovasculares.

Por outro lado, a produção de aldosterona nas células endoteliais também pode ser estimulada por angiotensina II, sendo este aumento através da estimulação da enzima sintase de aldosterona vascular, que também pode ser estimulada por K⁺

e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Takeda *et al.*, 1996). Originalmente, havia sido estabelecido que os inibidores da ECA bloqueariam a secreção renal de aldosterona. Porém, a secreção de aldosterona também pode estar aumentada por mecanismos independentes de angiotensina II, o chamado escape de aldosterona (*aldosterone escape*) (Staessen *et al.*, 1981; Borghi *et al.*, 1993). O mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não foi esclarecido. Uma das possibilidades seria a reativação da produção de angiotensina II, já comentada anteriormente, durante o tratamento crônico com os inibidores da ECA (MacFadyen *et al.*, 1999; Roig *et al.*, 2000). As vias alternativas de produção de angiotensina II, acima descritas, como a quimase, poderiam ser uma explicação para o escape de aldosterona (Urata *et al.*, 1995). Todavia, este não deve ser o único mecanismo, uma vez que o escape de aldosterona foi observado também em pacientes sem reativação da angiotensina II (Lee *et al.*, 1999). Outra possibilidade seria o aumento de K^+ promovido pela inibição da ECA, e ainda outros estimuladores da secreção de aldosterona como o ACTH (Struthers, 1996; Struthers, 2004b).

Apesar de diversos estudos já realizados, investigações adicionais são necessárias para elucidar a fisiopatologia dos componentes do SRAA vascular bem como a interrelação entre seus componentes na instalação e progressão das diversas enfermidades cardiovasculares.

7. Inibidores dos receptores de mineralocorticóides

Concentrações excessivas de aldosterona podem ser prejudiciais em diversos aspectos. A aldosterona aumenta a retenção de sódio e água e mantém o volume circulante, aumenta a pré-carga cardíaca, aumenta a perda de potássio e magnésio, reduz os níveis de colesterol de alta densidade (HDL) e prejudica a função do endotélio vascular. Além disso, a aldosterona estimula o crescimento celular hipertrófico e a fibrose, levando ao remodelamento ventricular. Este mineralocorticóide promove ainda a depressão da sensibilidade do baroreflexo (Wang, 1994) e seus potenciais efeitos vasculares podem levar a uma vasoconstrição generalizada. Estas condições têm sido observadas na IC (Zannad, 1995). Devido à grande quantidade de efeitos deletérios cardiovasculares das altas concentrações de aldosterona em quadros patológicos como a hipertensão e IC, há

um grande direcionamento aos estudos dos inibidores do receptor de mineralocorticóides (RM).

Os principais antagonistas do RM disponíveis até o presente momento são a espironolactona e a eplerenona, que têm demonstrado possuir excelentes efeitos no tratamento da IC (Pitt *et al.*, 1999; McMahon, 2001; Pitt *et al.*, 2003), porém com algumas limitações. Apesar dos efeitos benéficos, têm sido descritos efeitos colaterais com relação aos inibidores do RM. Dentre os principais efeitos colaterais está a hipercalemia. Entretanto, a frequência e a severidade da hipercalemia durante a administração por eplerenona, por exemplo, parece estar especialmente exacerbada em pacientes com insuficiência renal, diabetes e microalbuminúria (Brown, 2003). Por outro lado, a hipocalemia também contribui para a patogênese da doença cardiovascular, e muitas desordens cardiovasculares como infarto do miocárdio, IC, hipertensão e o uso de algumas drogas agravam este quadro. Por isso, é importante ressaltar que estes pacientes que recebem diuréticos que poupam potássio, como a espironolactona ou eplerenona, têm uma redução na mortalidade tanto pela progressão da IC como por morte súbita em comparação aos diuréticos regulares (Macdonald & Struthers, 2004).

7.1. Espironolactona

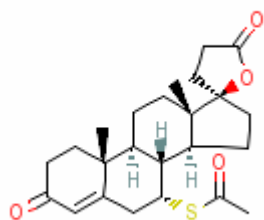
A espironolactona é um antagonista do RM que tem sido tradicionalmente utilizado como um diurético poupador de potássio e magnésio no tratamento da hipertensão e IC (Brest, 1986; Pitt *et al.*, 1999). Este fármaco foi sintetizado na década de 70 (Sadee *et al.*, 1972) e, até 2002, quando houve a aprovação da eplerenona pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) para o tratamento da hipertensão, e, em 2003, com a aprovação para o tratamento da IC após infarto do miocárdio, era a única possibilidade terapêutica para o bloqueio da aldosterona (Delyani, 2000). A espironolactona é um inibidor competitivo do receptor de aldosterona (Hofmann *et al.*, 1974; Delyani, 2000). Sua estrutura é similar a outros esteróides com um anel lactona substituído no C-17. Seu clearance é em torno de 10 minutos em animais (Sadee *et al.*, 1972) e rápido também em humanos (Sadee *et al.*, 1973). Seus metabólitos ativos (canrenoato e canrenona) têm meia vida em torno de 17 a 22 h (Karim *et al.*, 1976). A espironolactona tem seus efeitos antagonistas mediados via receptor androgênico e seus efeitos agonistas mediados

via receptor progesterônico (McMahon, 2001; McMahon, 2003). Sua especificidade reduzida para o receptor de aldosterona traz problemas que limitam o seu uso em longo prazo, como a ginecomastia, ciclos menstruais anormais e impotência (Delyani, 2000).

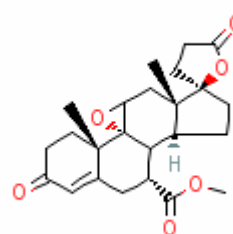
7.2. Eplerenona

A eplerenona é um novo inibidor específico para o receptor de aldosterona (*specific aldosterone receptor antagonist* - SARA). Em contraste com a espironolactona, este fármaco demonstrou uma alta seletividade para o receptor de aldosterona e uma pequena afinidade para o receptor de progesterona (<1%) e receptores de andrógenos (0,1%) (Delyani, 2000; Weinberger *et al.*, 2002). Esta maior seletividade e baixa afinidade para outros receptores de hormônios esteroidais, minimiza efeitos colaterais observados no tratamento com espironolactona como ginecomastia, impotência, mastodinia e sangramento vaginal (Krum *et al.*, 2002; Weinberger *et al.*, 2002; Zillich & Carter, 2002).

A eplerenona é também chamada de SC-66110, CGP-30083 e epoximexrenona, e representa uma nova possibilidade terapêutica seletiva para o bloqueio da aldosterona como tratamento terapêutico em pacientes hipertensos ou com IC pós-infarto (Rudolph *et al.*, 2004). Sua estrutura química difere daquela encontrada no inibidor não seletivo espironolactona, pela introdução de uma ponte 9 α , 11 α -epoxi e pela substituição do grupo 17 α -tioacetil por um grupo carbometoxi (Brown, 2003).



$C_{24}H_{32}O_4S$
Espironolactona



$C_{24}H_{30}O_6$
Eplerenona

Esta diferença estrutural da eplerenona com relação à espironolactona, confere excelente seletividade para o receptor de aldosterona com relação a outros esteróides. Além disso, esta substituição química produz uma molécula que possui uma atividade desprezível na enzima citocromo P-450 de órgãos endócrinos (Delyani, 2000). Um exemplo de sua seletividade é o relato de que em ratos o IC₅₀ da eplerenona para o receptor de aldosterona foi de 360 nmol/l, enquanto o IC₅₀ para andrógeno, progesterona, e receptores de estrogênio foi de >10000 nmol/l. O clearance da eplerenona se dá primariamente via o metabolismo por CYP4503A4 a metabólitos inativos (com uma meia vida de eliminação de 4 a 6 horas) (Brown, 2003). Estudos *in vitro* revelaram que a eplerenona tem uma afinidade 10 a 20 vezes menor para o receptor de aldosterona que a espironolactona (de Gasparo *et al.*, 1987), apesar de estudos recentes em humanos demonstrarem que a eplerenona possui 50 a 70% da potência da espironolactona (Weinberger *et al.*, 2002). Todavia quando comparado à espironolactona a eplerenona é praticamente desprovida de uma ligação considerável ao receptor de androgênio e progesterona, e tem uma reduzida capacidade de ligar-se aos receptores de glicorticóides (de Gasparo *et al.*, 1987), o que o torna mais seguro para o tratamento crônico.

Trabalhos experimentais e clínicos demonstraram que a eplerenona promove acentuada proteção cardíaca, cerebral, vascular e renovascular na IC após IM (Rudolph *et al.*, 2004). Dentre estes podemos citar os trabalhos nos quais o tratamento por longo prazo com eplerenona promove uma melhoria da função ventricular bem como uma melhoria da função vascular em ratos cronicamente infartados (Fraccarollo *et al.*, 2003; Schafer *et al.*, 2003). Em um grande estudo clínico (EPHESUS – *Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*) o inibidor específico para receptor de aldosterona, eplerenona, foi relatado como promotor de redução na morbidade e mortalidade em pacientes com infarto agudo do miocárdio com complicação por disfunção ventricular esquerda e IC (Pitt *et al.*, 2003). Quando analisados os dados do mesmo estudo 30 dias após a randomização e início do tratamento, foi demonstrado houve maior redução nos índices de mortalidade, por todas as causas, quando o tratamento foi iniciado em torno de 7 dias após o infarto do miocárdio (Pitt *et al.*, 2005). Hayashi e colaboradores demonstraram os efeitos benéficos da administração imediata (nas primeiras 24 horas) do inibidor do espironolactona após o infarto agudo do miocárdio em pacientes (Hayashi *et al.*, 2003). Nestes foi observada a prevenção do

remodelamento ventricular esquerdo, demonstrado através da redução de um marcador plasmático da síntese de colágeno.

No entanto, permanece ainda a questão: quão precoce deve ser o início da terapia com o bloqueio do receptor de aldosterona pós-infarto do miocárdio? Há uma carência de dados, até o presente momento, que demonstrem os possíveis benefícios do tratamento com eplerenona na fase inicial após infarto do miocárdio, especialmente no que diz respeito à função vascular, já que esta pode estar alterada nesta fase, bem como os mecanismos envolvidos.

OBJETIVOS

II. Objetivos

1. Objetivo geral

Avaliar os possíveis efeitos vasculares do inibidor específico do receptor de aldosterona, eplerenona, em uma fase inicial (7 dias) após o infarto do miocárdio.

2. Objetivos específicos

Investigar a alteração de componentes vasculares em aortas de ratos 7 dias após o infarto do miocárdio em animais sham, infartados placebo, ou infartados tratados com eplerenona através de:

Protocolos de reatividade vascular:

- Vasodilatação dependente do endotélio (acetilcolina)
- Vasodilatação independente do endotélio (DEA NONOate)
- Vasoconstrição por agonista α_1 adrenérgico (fenilefrina)
- Vasoconstrição por angiotensina I e II

Biologia molecular:

- Expressão protéica da eNOS e sua forma fosforilada (peNOS) (Western Blot)
- Expressão protéica da ECA e sua forma fosforilada (pECA) (Western Blot)
- Imunohistoquímica para ECA e peNOS

Avaliar o estresse oxidativo vascular nos grupos estudados através da avaliação da:

- Produção de ânions superóxido em ensaio bioquímico (lucigenina)
- Produção *in situ* de radicais livres (hidroetidina)
- Quantificação protéica da NADPH oxidase (subunidade p22^{phox}) (Western Blot)
- Quantificação protéica de enzima antioxidante vascular (MnSOD) (Western Blot)

MATERIAIS E MÉTODOS

III. Materiais e métodos

1. Animais

Para a realização deste trabalho experimental foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*) pesando entre 200 e 250 g. Estes foram fornecidos pelo biotério da Univesität Klinikum Würzburg adquiridos da Charles River (Sulzfeld, Germany). Todos os ratos foram mantidos em gaiolas com livre acesso à ração e água, sob condições controle de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas. Os procedimentos executados nesta pesquisa estavam em conformidade com o “Guia para o cuidado e uso de animais de laboratório” (*Guide for the care and use of laboratory animals*) publicado pela NIH (National Institutes of Health, nº 85-23, revisado em 1996).

2. Infarto do miocárdio e intervenção farmacológica

O infarto do miocárdio experimental foi produzido pela ligadura do ramo descendente da coronária anterior esquerda como descrito inicialmente por Pfeffer e cols. (Pfeffer *et al.*, 1979). Os animais foram anestesiados com isoflorano, intubados e ventilados a um volume constante pela área corpórea com uma bomba de respiração artificial (UB 7025, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus, March, Germany) conectada a um cilindro de carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂) e a um difusor de isoflorano (Aerrane- Isofluran®, Ohio Medical Anesthetics) para a manutenção da anestesia e uma bomba de vácuo (Fluovac, Harvard Apparatus) para absorver os resíduos tóxicos do anestésico. O coração foi cuidadosamente exposto após a separação do músculo peitoral e uma pequena abertura torácica no nível do quinto espaço intercostal esquerdo. A artéria coronariana descendente anterior esquerda foi ligada com um fio de polipropileno (Ethicon 5-0) na zona entre a artéria pulmonar e o átrio esquerdo. O grupo controle (cirurgia fictícia – Sham) passou pelas mesmas etapas citadas acima, com exceção da ligadura da artéria coronariana. O coração foi então retornado a sua posição normal e o tórax foi fechado. Após o retorno da respiração espontânea a intubação foi removida. Com este procedimento a mortalidade dentro das primeiras 24 h foi de 40-50 %. Os animais sobreviventes

foram aleatoriamente divididos em três grupos e tratados por gavagem, uma vez ao dia, com as seguintes soluções:

- a. Sham (Sham) – solução placebo de goma arábica.
- b. Infarto Placebo (IM Pla) – solução placebo de goma arábica.
- c. Infarto Eplerenona (IM Eple) – solução com o inibidor específico para o receptor de aldosterona: eplerenona (100 mg/kg/dia).

O tratamento com as soluções acima indicadas teve início logo em seguida ao procedimento cirúrgico. Os animais foram alocados em gaiolas com no máximo cinco animais e receberam água e ração balanceadas “*ad libitum*”, passando por ciclo claro/escuro a cada 12 h.

3. Medidas hemodinâmicas

Ao sétimo dia após a cirurgia de infarto os animais foram novamente anestesiados em uma cuba com isoflorano (Aerrane- Isofluran[®], Ohio Medical Anesthetics), uma cânula de polietileno foi inserida na traquéia para a respiração artificial e foram ventilados a um volume constante (volume por minuto de 1 mL/100g de peso corporal e com frequência respiratória de 88 ipm) com uma bomba de respiração artificial, através dos mesmos aparatos acima descritos durante a cirurgia de infarto. Em seguida foi procedida a canulação da artéria carótida e da veia jugular com um cateter de polietileno (PE-50) preenchido com salina heparinizada (100 U/mL), conectado via uma válvula tríptica a um micromanômetro (Millar) e um transdutor (Statham), ligado, por sua vez, a um sistema de aquisição de dados (PowerLab 4SP, AD instruments, Castle Hill, Australia), acoplado a um computador (PC Pentium) através do software (PowerLab Chart 5, v 5.1.1). Foram então registradas a pressão ventricular sistólica esquerda (PSVE), a pressão diastólica final ventricular esquerda (PDFVE), o valor máximo da derivada temporal do aumento e declínio da pressão ventricular esquerda ($dP/dt_{\max}$ e $dP/dt_{\min}$ respectivamente), a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). A constante de tempo da decaída da pressão ventricular esquerda (regressão do log [pressão] vs. tempo) foi calculada pelo método de Weiss (Weiss *et al.*, 1976). Os valores das pressões sistólica e diastólica inicial e final ventriculares foram coletados após estabilização do cateter dentro do ventrículo, e medidos de uma média de 10 ciclos consecutivos, sob ritmo cardíaco regular.

Após as medidas iniciais supracitadas foram obtidos os registros *in vivo* de curvas pressão-volume pela introdução de um cateter de condutância de ponta (SPR-774, Millar Instruments, Houston, Texas). O cateter 1.4 F foi avançado da artéria carótida direita até o ventrículo esquerdo, através de um cateter de polietileno (PE-50) preenchido com salina. Os sinais de pressão e volume foram registrados em um sistema de aquisição de dados (BioBench software, National instruments, Austin, Texas). O Software Pvan 2.9 (Millar Instruments) foi usado para analisar todos os dados das curvas pressão-volume registrados usando a injeção de salina hipertônica para a calibração do volume de condutância paralela (Ito *et al.*, 1996). O volume ventricular esquerdo foi calculado para cada rato pelo volume de condutância corrigido pelo volume de condutância paralelo relativo.

4. Avaliação da área de infarto e hipertrofia cardíacas

Após a realização dos registros hemodinâmicos os animais foram sacrificados e os corações removidos para avaliação ponderal das câmaras, bem como a avaliação da área de infarto.

As câmaras cardíacas foram separadas em solução salina resfriada com nitrogênio líquido e pesadas. O septo interventricular foi considerado parte do ventrículo esquerdo. O peso úmido foi corrigido pelo peso corporal para estimar a hipertrofia cardíaca.

A quantificação da área de infarto foi procedida histologicamente por planimetria. O ventrículo esquerdo foi cortado em 3 secções transversas: ápice, anel mediano (aproximadamente 3 mm) e base. O anel mediano foi conservado em formalina 4% e depois incluído em parafina. Para tal os seguintes passos foram seguidos:

- a) etanol 70% por 30 minutos
- b) etanol 80% por 30 minutos
- c) etanol 100% por 30 minutos
- d) xilol+etanol (1:1) por 30 minutos
- e) xilol por 30 minutos
- f) xilol +parafina (1:1) por 30 minutos
- g) parafina à 60°C por 60 minutos
- h) parafina à 60°C rapidamente

i) inclusão em parafina à 60°C em formas e secagem

Foi então feita a secagem por no mínimo 24 horas destes blocos de parafina e deste anel foram realizados cortes de 5 µm sendo feitos a intervalos de 100 µm. Procedeu-se então à coloração com o corante Picrosirius red, o qual promove uma coloração avermelhada na área cicatricial necrótica e amarelada no tecido não infartado. A imagem foi então gravada utilizando-se uma câmera (Insight Fire Wire, DIAGONSTIC instruments, USA) conectada a um computador (Pentium) e acoplada a um microscópio óptico (Axioscop 2 plus, Zeiss, Germany) através do software através do software Metamorph. As imagens adquiridas foram analisadas utilizando o programa SigmaScan® Pro 5.0. O cálculo da porcentagem de infarto foi feito pela divisão do perímetro da cicatriz na superfície endocárdica (CEN) pelo perímetro endocárdico total (PEN) mais o perímetro da cicatriz epicárdica (CEP) dividido pelo perímetro epicárdico total (PEP) (figura 1) dividido por 2 e multiplicado por 100 $[(CEN/PEN + CEP/PEP) \times 2/100]$. O tamanho do infarto dos grupos (porcentagem do ventrículo esquerdo infartado) foi calculado pela média de todos os cortes avaliados e expressado como porcentagem da extensão. Apenas infartos maiores que 40% foram incluídos neste estudo.

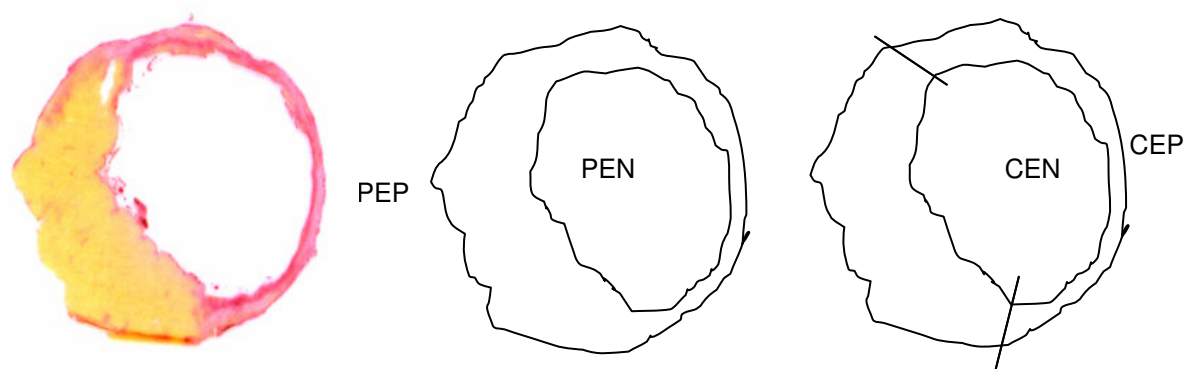


Figura 1. Esquema demonstrativo da medida histológica da área de infarto com coloração Picrosirius Red. Perímetro epicárdico total (PEP), perímetro endocárdico total (PEN), perímetro da cicatriz epicárdica (CEP) e perímetro da cicatriz na superfície endocárdica (CEN).

5. Teste radioimunológico (RIA) da aldosterona

O soro dos animais foi obtido pela centrifugação das amostras de sangue, coletadas em tubos NUNC Cryo[®], e centrifugadas em 1500g durante 15 minutos à 4^o C. Após a centrifugação o soro (sobrenadante) foi pipetado em alíquotas de aproximadamente 1 mL em frascos NUNC[®], e então acondicionadas à -80^o C até o dia do ensaio bioquímico. Neste dia as amostras foram descongeladas progressivamente em um recipiente com gelo e foram utilizados 200 µL de plasma para cada frasco de medida. Para a determinação quantitativa da aldosterona nas amostras de plasma foi utilizado o kit comercial ALDOCTK-2 (DiaSorin Inc.). O princípio deste ensaio consiste na competição entre a aldosterona marcada e aquela aldosterona contida nos calibradores ou nas amostras para o número fixo e limitado de sítios de anticorpos. Após a incubação, a quantidade de aldosterona marcada ligada ao anticorpo fixado nos tubos revestidos é inversamente proporcional à concentração de aldosterona não marcada presente nos calibradores ou nas amostras. O método adotado para a separação livre/ligado baseia-se no uso de tubos revestidos, onde o anticorpo é ligado à parede dos tubos. Os tubos revestidos com anticorpo foram do tipo anti-soro de coelho anti-aldosterona. Os frascos calibradores, com aldosterona liofilizada em quantidades crescentes, também foram utilizados para a realização de uma curva-padrão. Estes frascos foram reconstituídos com 1mL de água destilada e as soluções resultantes continham quantidades crescentes de 0 – 50 -100 - 250 - 500 – 1000 pg/mL de aldosterona. Uma solução de aldosterona marcada (¹²⁵I vermelho), soro humano sem esteróides, tampão fosfato, conservante e um corante vermelho inerte, com radioatividade máxima de 85 kBq (2,3 µCi) foi adicionada aos frascos em um volume de 500 µL e então agitadas (vortex) e incubados por 18-22h em temperatura ambiente. No dia seguinte os tubos foram aspirados e então se procedeu à medida da radioatividade em um contador gama para a contagem de iodo¹²⁵ (definição da janela do contador: 15-80 KeV; eficiência do contador: 70%; tempo de contagem: 1 min). Os valores obtidos foram expressos em pg/mL.

6. Protocolos de reatividade vascular

Após os procedimentos hemodinâmicos a aorta torácica foi removida e imersa em solução de Krebs fria (4° C). O tecido conectivo foi então cuidadosamente dissecado e o arco da aorta e a extremidade inferior foram descartados. A aorta foi seccionada em um segmento superior de aproximadamente 10 mm, o qual foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido para posterior análise de Western blot. Outra secção (~6 mm) foi usada para a medida da produção de ânions superóxido. O que restou foi cortado em anéis de 3 mm de comprimento os quais foram montados em um banho de órgãos (Föhr Medical Instruments, FMI, Seeheim, Germany) para a medida de força isométrica. Dois pequenos anéis a partir dos segmentos inferiores foram feitos do restante da aorta (quando possível), sendo um congelado em gel especial para congelação (Tissue Teck®) e guardado a -80°C e o outro conservado em formalina 4% e posteriormente incluído em parafina. Estes últimos 2 segmentos foram usados para a medida da produção de ânions superóxido *in situ* e imunohistoquímica.

Os anéis foram então posicionados no banho de órgãos e estabilizados por 30 minutos em uma tensão basal de 2 g em solução de Krebs-Henseleit (NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; MgSO₄ 1,2 mM; CaCl₂ 1,6 mM; K₂HPO₄ 1,2 mM; NaHCO₃ 25 mM; glucose 12 mM; pH 7,4 a 37°C), contendo diclofenaco (1μM) e gaseificada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). Os anéis foram então contraídos com KCl (com um máximo de concentração de 100 mM) até a obtenção de respostas reproduzíveis. Após lavar e obter novamente os valores basais estáveis os anéis foram contraídos com fenilefrina 10⁻⁶M e relaxados com uma concentração de acetilcolina de 10⁻⁶M para testar a viabilidade endotelial. Após três ciclos de lavagem e estabilização do valor basal dos anéis, foi realizada uma curva concentração-resposta à fenilefrina (10⁻⁹ a 10⁻⁵M) para a verificação da função contrátil a esta agonista α₁-adrenérgico. Em seguida foi verificado o relaxamento dependente do endotélio com uma curva concentração-resposta à acetilcolina (10⁻⁹ a 10⁻⁵M). O relaxamento independente do endotélio foi testado pela curva concentração-resposta ao doador de óxido nítrico DEA NONOate (2-(N,N-diethylamino)-diazénolate-2-oxide, 10⁻⁹ a 10⁻⁶M). As curvas de acetilcolina foram realizadas após pré-contração com fenilefrina a níveis similares entre os grupos. As curvas com DEA

foram realizadas após a incubação por 40 minutos com LNNA (N_{ω} -Nitro-L-arginina, 10^{-4} M) para a avaliação do relaxamento independente do endotélio, sem a influência das sintases de óxido nítrico (NOS). Em alguns anéis foram realizadas após a curva de acetilcolina uma curva concentração-resposta cumulativa para angiotensina I e II (10^{-9} a 10^{-6} M) já que o contato prévio com doadores de NO poderia modificar a resposta a estes agentes (Ackermann *et al.*, 1998). O intervalo entre as curvas concentração-resposta descritas foi de 20 minutos. O registro da reatividade vascular aórtica foi feito através do software FMI VitroDat 2.4.

7. Medida da formação de ânions superóxido

7.1. Ensaio de quimiluminescência

A formação vascular de ânions superóxido (O_2^-) foi feita pela medida do aumento da quimiluminescência por lucigenina. A reação luminosa entre O_2^- e lucigenina (5 μ M) (Bauersachs *et al.*, 1998; Skatchkov *et al.*, 1999) foi detectada por um luminômetro (Wallac, Freiburg, Germany) durante a incubação dos anéis de aorta em uma solução de HEPES-Krebs modificada (HEPES 9,4 mM; NaCl 132 mM; glucose 5 mM; KCl 4 mM; $MgCl_2$ 0,49 mM; $CaCl_2$ 1mM; pH 7,4 à 37°C). Os valores foram obtidos a partir da subtração do valor basal (obtido pela medida de HEPES mais lucigenina) pelo valor obtido com o tecido (anel de aorta no HEPES mais lucigenina), em uma média de 10 medidas consecutivas, com tempo de integração de 30 segundos cada. Ao início de cada medida, era aplicada uma pulsação no tubo com a amostra a ser quantificada. Após a medida os anéis foram secos em uma estufa à 40°C por 24 horas para a obtenção do peso seco. O sinal específico de quimiluminescência foi expresso como *counts* por minuto por unidade de peso do tecido em miligramas (cpm/mg). Em alguns animais dos grupos, após a medida basal e a primeira medida, foi avaliada a participação exercida pela liberação basal de NO na produção de ânions superóxido. Isto foi feito através da incubação por 40 min com um inibidor inespecífico das sintases de óxido nítrico (LNNA). Em seguida foi realizada uma segunda medida e o dado foi expresso como percentual de aumento relativo à primeira medida.

7.2. Produção de O_2^- *in situ*

O corante fluorescente hidroetidina (HE) foi utilizado para avaliar a produção de ânions superóxido *in situ*. A HE é livremente permeável às células e na presença de O_2^- é oxidada a brometo de etídio (EtBr), onde é preso por interagir com o DNA (Rothe & Valet, 1990). O EtBr é excitado em 488 nm com um espectro de 610 nm. Em ensaios sem células, a adição de peróxido de hidrogênio à HE não aumenta significativamente a fluorescência do EtBr (Carter *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1998). Cortes de anéis de aorta congelados em Tissue Tek, em uma espessura de 5 μ m, foram acondicionados em lâminas de vidro superfrost Plus[®], e secos por 15 minutos à temperatura ambiente, após a criotomia. Em seguida estes cortes não fixados foram incubados com uma solução de dihidroetidina 2 μ M (diluído no mesmo tampão HEPES utilizado para a medida por quimiluminescência). Após serem recobertos por uma lamínula, as lâminas de vidro foram acondicionadas em uma câmara umedecida e foto protegida e então incubadas, à 37°C, por 30 minutos. As imagens deste ensaio foram obtidas em um microscópio confocal (Bio-Rad MRC-1024) equipado com um laser krypton/argon. Os anéis de aorta dos animais SHAM, PLA e EPLE foram processados e as imagens registradas em paralelo. Os parâmetros estabelecidos para o laser utilizados foram idênticos entre os grupos pesquisados. A fluorescência foi detectada com um filtro “long-pass” de 585 nm (Schafer *et al.*, 2004).

8. Western blot

As amostras de aorta coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas à -80°C até o momento da extração protéica. A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização das aortas em tampão RIPA (NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM, EDTA 5mM; Nonidet-P 40 1% vol/vol; deoxicolato 0,5% peso/vol; NaF 10 mM; pirofosfato de sódio 10 mM; fluoreto de fenilmetisulfonil 100 mM; aprotinina 2 μ g/mL; leupeptina 2 μ g/mL) em temperatura fria (4°C). Para obter um resfriamento ainda maior, o gral e pistilo de porcelana utilizados para a homogeneização das aortas foram resfriados com nitrogênio líquido, antes e durante este procedimento. Após a homogeneização do tecido, esta mistura foi acondicionada em tubos

eppendorf *safe lock* e centrifugada à 8000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então separado e o “pellet” desprezado. Foram feitas alíquotas e estas foram mantidas à -80°C até o momento da realização dos ensaios. Quando realizado o Western blot as amostras foram adicionadas de um tampão de carregamento das amostras (*sample loading buffer*) contendo um agente redutor (DTT) e SDS 3x (Cell Signaling) em uma diluição 1:9 respectivamente. As amostras foram então adicionadas deste tampão em uma proporção de 1:1,5 (*sample loading buffer*:amostra) e aquecidas à 95°C por 5 minutos. Em seguida foram carregados os géis SDS-poliacrilamida 12% imersos em um tampão de eletroforese (tris base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 16 mM, pH 8,3) e submetidos a uma amperagem de 20 mA. Após o término da eletroforese foi feita a transferência elétrica das proteínas para uma membrana PVDF (polyvinylidene difluoride membrane, Immun-blot®, Bio-Rad, München, Germany) durante a noite, em um tampão de transferência (tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 15%, pH 8,3) numa temperatura de 4°C usando 20 V em um Criterion Blotter (Bio-Rad). Após a transferência as membranas foram bloqueadas por uma hora em uma solução bloqueadora de leite desnatado (Amersham, Freiburg, Germany) diluída a 5% em um tampão TBS – tween (Tris base 200 mM, NaCl 1370 mM, HCl 1M, pH 7,6). As bandas foram detectadas utilizando um composto fluorescente (ECL e ECL+ plus, Amersham, Freiburg, Germany). Os anticorpos primários utilizados foram para eNOS (1:2500) monoclonal (BD Biosciences), eNOS fosforilada na Ser¹¹⁷⁷(1:2000) monoclonal (BD Biosciences), ACE (ECA) (1:1000) monoclonal (ABCAM), ECA fosforilada (gentilmente cedido pela Dra. Karin Kohlstedt da Universidade Johann Wolfgang Goete, Frankfurt) *rabbit* policlonal (1:1000), MnSOD (ABCAM) (*Rabbit* policlonal, 1:50000)., p22^{phox} (Santa Cruz biotechnology) *goat* policlonal (1:1000) e GAPDH (ABCAM) monoclonal (1:50000). Os anticorpos secundários foram anti-*mouse* monoclonal IgG, anti-*rabbit* policlonal IgG (Cell Signaling) e anti-*goat* policlonal IgG (Santa Cruz biotechnology) (1:10000), incubados por uma hora. As proteínas pesquisadas foram corrigidas pela quantidade de GAPDH detectado.

9. Imunohistoquímica

Para corroborar os dados encontrados nos ensaios de Western blot foram realizadas algumas imunohistoquímicas para a visualização da expressão protéica no tecido vascular.

9.1. Cortes em parafina

Pequenos segmentos de aorta (~ 2-3 mm) foram conservados em formalina a 4% por 24 h e posteriormente acondicionados em solução de KCl 0,5 M e mantidos em refrigeração (4°C) até a sua inclusão em parafina. Esta inclusão compreende os seguintes passos, onde o tecido é imerso em:

- a) etanol 70% por 30 minutos
- b) etanol 80% por 30 minutos
- c) etanol 100% por 30 minutos
- d) xilol+etanol (1:1) por 30 minutos
- e) xilol por 30 minutos
- f) xilol +parafina (1:1) por 30 minutos
- g) parafina à 60°C por 60 minutos
- h) parafina à 60°C rapidamente
- i) inclusão em parafina à 60°C em formas e secagem

Após a secagem dos blocos de parafina por 24h foram feitos cortes de 5µm cada e posicionados em lâminas de vidro (superfrost Plus®). Após a secagem em uma estufa à 60°C durante a noite, foi iniciado o processo de desparafinização. Este compreende os seguintes passos de imersão das lâminas com os cortes:

- a) xilol 2 vezes por 10 minutos
- b) xilol+etanol (1:1) por 10 minutos
- c) etanol 100 % por 3 minutos
- d) metanol + 3% H₂O₂
- e) etanol 100 % por 2 minutos
- f) etanol 95% por 3 minutos
- g) etanol 75% por 3 minutos
- h) etanol 50 % por 3 minutos

i) água destilada rapidamente

Para a imunohistoquímica da ECA foi usada a técnica de recuperação do antígeno mediado por calor (*heat-mediated antigen retrieval*) como recomendado pelo fabricante do anticorpo (ABCAM). Os reagentes utilizados pertencem ao kit Vectastain® ABC Elite PK-6200 e kit DAB vector SK-4100. As lâminas foram então lavadas em tampão fosfato (PBS) por 5 minutos. Todas as lavagens descritas foram feitas sob agitação da câmara onde estavam imersas as lâminas. Em seguida estas foram mergulhadas em um tampão citrato (2,94 g Trisódio citrato; 0,5 mL Tween 20; pH 6,0) em um recipiente de polietileno com a tampa semi-aberta. Este foi colocado em um forno de microondas caseiro na sua potência máxima (aproximadamente 800 W). Nesta etapa o nível do tampão foi observado de modo a não expor os tecidos à secagem. As lâminas foram então resfriadas progressivamente à temperatura ambiente imersas no tampão PBS. Procedeu-se à lavagem com PBS três vezes por 2 minutos e feitiço da margem do tecido (ImmEdge, Vector Laboratories). Sobre cada aorta foi gotejada uma solução 1% de H₂O₂ e incubadas por 20 minutos. Mais uma vez as lâminas foram lavadas em PBS. Foi preparada a solução bloqueadora em (10 mL de PBS + 3 gotas de horse serum) e incubadas as lâminas por 30 minutos. Após este período a solução bloqueadora foi escoada e o anticorpo primário, diluído nesta mesma solução, para ECA (1:100) monoclonal (ABCAM) foi aplicado. A incubação foi feita durante a noite em uma câmara umedecida, à 4°C. No dia seguinte as lâminas foram lavadas em PBS e na sequência foram incubadas com o anticorpo secundário por 30 minutos (10 mL PBS + 3 gotas de horse serum + 1 gota do anticorpo secundário universal). Mais uma vez foram lavadas em PBS e incubadas com os reagentes A e B por 30 minutos (2,5 mL PBS + 1 gota do reagente A + 1 gota do reagente B). Após lavar em PBS foram então expostas as lâminas ao DAB (diaminobenzidina) por um período de aproximadamente 4 minutos, o que fornece uma coloração café ao tecido nas partes onde haja a proteína procurada. Foram então lavadas em água destilada. Seguiram-se os procedimentos de coloração com hematoxilina (10 segundos) e após lavar em água da torneira e água destilada foi feita a sequência para a montagem final das lâminas com as lamínulas. Este compreende a imersão das lâminas em:

- a) etanol 50 % rapidamente
- b) etanol 100 % rapidamente
- c) xilol+etanol (1:1) por 5 minutos

d) xilol 2 vezes por 2 minutos cada

As lamínulas foram permanentemente fixadas usando um meio não aquoso (Vecta Mount). Após a secagem as imagens foram adquiridas em um microscópio (Axioscop 2 plus, Zeiss, Germany) acoplado a uma câmera (Insight Fire Wire, DIAGONSTIC instruments, USA) e a um computador (Pentium) através do software Metamorph.

9.2. Cortes congelados

Pequenos segmentos de aorta (2-3 mm) foram congelados em Tissue Teck[®] (OCT compound, CA) com isopentano resfriado pela adição de nitrogênio líquido. Depois foram acondicionados à -80°C até o momento da criotomia. Cortes de 5 µm foram feitos e então secos em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida os mesmos foram imersos em acetona fria (-20°C) em um agitador por 5 minutos. As lâminas foram deixadas expostas ao ar para a secagem por 30 minutos e depois incubadas por 30 minutos com uma solução de H₂O₂ 0,3%. Após a lavagem em tampão PBS foram escoadas e incubadas com uma solução bloqueadora por 30 minutos. Esta solução e todas as demais descritas neste protocolo a seguir foram feitas com os produtos do kit comercial Vectastain[®] ABC Elite PK-6200 e kit DAB vector SK-4100. Escoada esta solução foi então aplicado o anticorpo para a forma fosforilada da eNOS (Ser¹¹⁷⁷) em uma concentração de 1:500, diluída na mesma solução bloqueadora. Os cortes foram então incubados durante a noite em um refrigerador (4°C) em uma câmara fechada e umedecida. No dia posterior as lâminas foram lavadas em PBS expostas por 30 minutos ao anticorpo secundário. Novamente lavadas em PBS, foram os cortes incubados com os reagentes A e B do kit (30 minutos). Depois de lavadas mais uma vez em PBS foram expostas ao DAB por aproximadamente 1 minuto. Lavadas em água destilada duas vezes, foram então procedidas as etapas para a montagem permanente com as lamínulas sendo estes passos os mesmos descritos para os cortes em parafina.

Em todas as técnicas de imunohistoquímica realizadas foram incubados cortes em paralelo com o anticorpo primário *mouse* IgG (1:15000) que serviram então como controle negativo para os anticorpos específicos utilizados.

10. Expressão dos dados e análise estatística

Os resultados de reatividade vascular das curvas concentração-resposta de contração foram expressos como delta da tensão isométrica em gramas (tensão desenvolvida à concentração aplicada menos a tensão basal). As respostas de relaxamento à acetilcolina e DEA foram expressas como porcentagem relativa à pré-contracção com fenilefrina antes da execução da curva.

Os resultados estão descritos como média $\pm$ EPM. Para a determinação do log de EC₅₀ (valor das concentrações que produziram 50% da resposta máxima) foi realizada uma análise de regressão não linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta, utilizando o programa GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA). Os testes estatísticos utilizados foram o teste *t* de Student não pareado e a análise de variância de uma via (ANOVA 1 via) seguida, quando o $p < 0,05$, pelo teste *post-hoc* de Fisher. Os valores foram considerados significantes para um mínimo de $p < 0,05$. Os programas de análise estatística utilizados foram o GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA) e StatView for Windows versão 5.0.1.

11. Drogas e reagentes

Todos os reagentes de alta pureza foram comprados através da firma Sigma (Deisenhofen, Germany). Angiotensina I e II foram obtidas pela Bachem (Germany). Eplerenona foi provida pela Pharmacia (Erlangen, Germany). Dihidroetidina foi fornecida pela Fluka (Buchs, Switzerland).

RESULTADOS

IV. Resultados

1. Teste radioimunológico (RIA) da aldosterona

Inicialmente foi observada a concentração de aldosterona sérica encontrado sete dias após a cirurgia de infarto. Isto foi feito tendo em vista a necessidade de validar o modelo de infarto experimental em uma fase precoce como tendo indicação para o uso de um inibidor específico para o receptor de aldosterona. Houve aumento na concentração de aldosterona no soro dos animais infartados quando comparados com os Sham (Figura 2; $p < 0,05$).

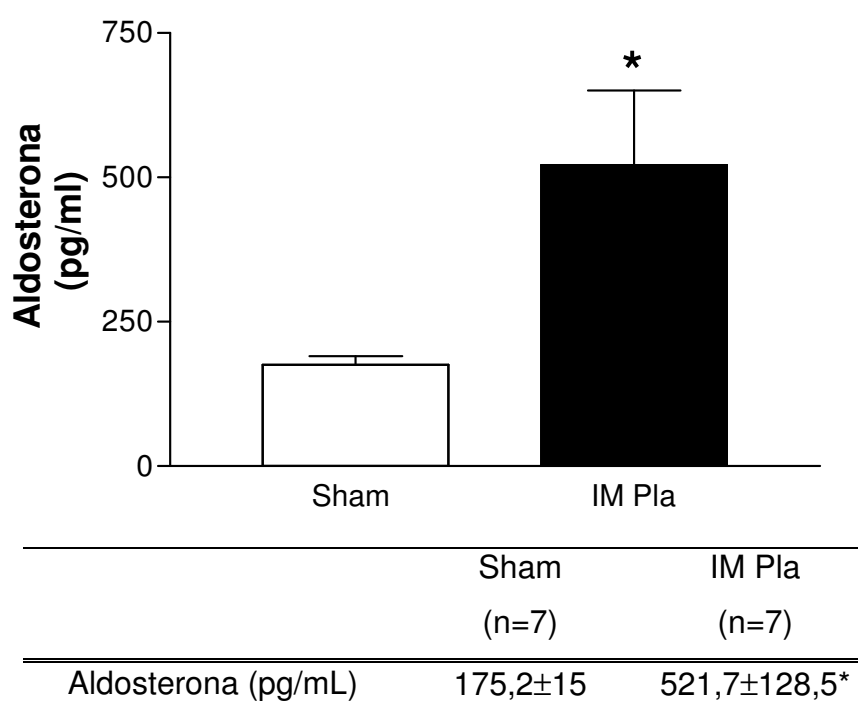


Figura 2. Concentração sérica de aldosterona nos animais submetidos ao infarto do miocárdio (IM Pla) e cirurgia fictícia (Sham). Os valores estão representados como média±EPM. Teste *t* de Student não pareado; * $p < 0,05$ vs. Sham.

2. Medidas hemodinâmicas

Sete dias após a cirurgia de infarto (IM) ou fictícia (Sham) e o tratamento (IM Eple) ou não com o inibidor do receptor de aldosterona, eplerenona (100 mg/kg/dia), foram obtidas as medidas dos parâmetros hemodinâmicos e os dados ponderais. Estes valores podem ser observados na tabela 1. A pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) esteve reduzida no grupo infartado quando comparado ao Sham ($p<0,05$) e o tratamento com eplerenona não se mostrou capaz de alterar este parâmetro. A pressão diastólica final ventricular esquerda (PDFVE) estava aumentada no grupo infartado tratado com placebo quando comparado ao grupo Sham ($p<0,05$). Uma significativa redução deste parâmetro foi encontrada no grupo infartado tratado com o inibidor do receptor de aldosterona eplerenona (IM Eple vs. IM Pla $p<0,01$). O valor máximo da derivada temporal do aumento da pressão ventricular esquerda (dP/dt_{max}) também esteve reduzido no grupo IM Pla quando comparado ao grupo Sham ($p<0,05$). O tratamento com eplerenona foi capaz de aumentar significativamente este parâmetro em comparação ao grupo IM Pla (IM Eple vs. IM Pla $p<0,01$). O valor máximo da derivada temporal do declínio da pressão ventricular esquerda (dP/dt_{min}) foi diminuído no grupo IM Pla quando confrontado ao grupo Sham (IM Pla vs. Sham $p<0,05$). O grupo IM Eple teve este parâmetro significativamente aumentado com relação ao placebo, porém não totalmente normalizado (IM Eple vs. IM Pla $p<0,01$; IM Eple vs. Sham $p<0,05$).

Tabela 1. Valores hemodinâmicos e dados ponderais dos animais submetidos à cirurgia fictícia (Sham) ou ao infarto do miocárdio tratados com placebo (IM Pla) ou eplerenona (IM Eple), 7 dias após a cirurgia. IM (%) - porcentagem infartada do ventrículo esquerdo; PAM - pressão arterial média; FC - frequência cardíaca; PSVE - pressão sistólica do ventrículo esquerdo; PDFVE – pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; VSFVE – volume sistólico final do ventrículo esquerdo; VDFVE – volume diastólico final do ventrículo esquerdo; $dP/dt_{\max}$ - valor máximo da derivada temporal do aumento da pressão ventricular esquerda; $dP/dt_{\min}$ – valor máximo da derivada temporal do declínio da pressão ventricular esquerda; VE/PC – peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal; VD/PC – peso do ventrículo direito corrigido pelo peso corporal; PC – peso corporal.

	Sham	IM Pla	IM Eple
IM (%)	-	44,9±2,2	46,2±1,4
PAM (mmHg)	127±3	94±5*	105±4*
FC (bpm)	399±7	362±12	367±10
PSVE (mmHg)	137±3	99±4*	106±4*
PDFVE (mmHg)	5,4±0,4	23,9±2*	14,9±2*††
VSFVE (μL)	200±16	505±53*	392±31*††
VDFVE (μL)	446±38	771±50*	633±26*††
$dP/dt_{\max}$	7950±526	4108±386*	5325±381*††
$dP/dt_{\min}$	5461±424	3052±315*	4062±183*††
VE/PC (mg/g)	2,23±0,08	2,13±0,05	2,08±0,05
VD/PC (mg/g)	0,55±0,02	0,69±0,03	0,61±0,02
PC (g)	290±5	278±6	277±4

Os valores estão representados como média±EPM (n= 9-12). Análise estatística utilizada foi ANOVA 1 via, *post-hoc* de Fisher; *p<0,05 vs. Sham; †† p<0,01 vs. IM Pla.

A curva pressão-volume do grupo IM Pla foi acentuadamente deslocada para direita quando comparada ao grupo Sham. O grupo infartado tratado com

eplerenona (IM Eple) obteve um significativo deslocamento para a direita neste registro, demonstrando uma melhoria de sua função ventricular esquerda. A representação gráfica de alguns exemplos das curvas obtidas pode ser observada na figura 3 e os valores na tabela 1. Os valores do volume sistólico final do ventrículo esquerdo do grupo infartado estiveram aumentados quando comparados ao grupo Sham (VSFVE IM Pla vs. Sham $p < 0,05$) e o tratamento com eplerenona promoveu uma significativa redução deste parâmetro nos animais infartados (IM Eple vs. IM Pla $p < 0,01$), porém não uma completa normalização (IM Eple vs. Sham $p < 0,05$). Também o volume diastólico final do ventrículo esquerdo apresentou-se aumentado no grupo IM Pla quando comparado ao Sham (VDFVE IM Pla vs. Sham $p < 0,05$) e foi observada uma redução deste pelo tratamento com eplerenona (IM Eple vs. IM Pla $p < 0,01$).

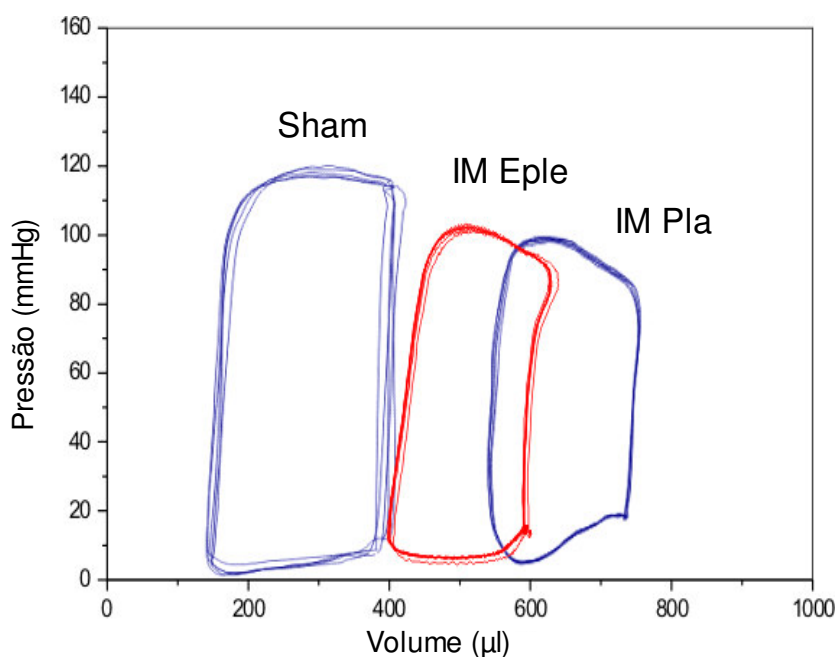


Figura 3. Representação de curvas pressão-volume medidas *in vivo* com cateter de condutância em animais submetidos à cirurgia fictícia (Sham) e infartados com tratamento placebo (IM Pla) ou eplerenona (IM Eple).

3. Reatividade Vascular e Biologia Molecular

Inicialmente procedeu-se a curva concentração-resposta ao agonista α_1 adrenérgico fenilefrina. Nesta não foram observadas diferenças significativas entre

os grupos, como observado na figura 4A e tabela 2. Em seguida, após uma pré-contracção em níveis similares com fenilefrina, foram feitas as curvas concentração-resposta para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio com o agonista muscarínico colinérgico acetilcolina. O relaxamento percentual do grupo IM Pla foi observado significativamente diminuído quando comparado ao grupo Sham, tanto quando observada a sensibilidade (pD_2) quanto o efeito máximo (E_{max}) (figura 4B e tabela 2; $p<0,01$). O tratamento com o inibidor específico para o receptor de aldosterna eplerenona foi capaz de normalizar o efeito máximo vasodilatador no grupo IM Eple sem, no entanto, alterar a sua sensibilidade a este agonista (figura 4B e tabela 2; E_{max} IM Eple vs. IM Pla $p<0,05$; pD_2 IM Eple vs. Sham $p<0,01$).

Também foi avaliado o relaxamento independente do endotélio com o uso do doador de óxido nítrico DEA. Previamente a esta curva procedeu-se à incubação por 40 minutos com o inibidor inespecífico das sintases de óxido nítrico LNNA para prevenir qualquer participação destas sintases. Após a pré-contracção com fenilefrina foi feita a curva concentração-resposta com DEA, sem serem observadas diferenças significativas entre os grupos (figura 4C e tabela 2).

Tabela 2. Valores obtidos nas curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), fenilefrina (Fenil) e DEA em anéis de aortas de ratos submetidos à cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple).

	Sham (n= 9)		IM Pla (n= 11)		IM Eple (n= 11)	
	$pD_2(-\text{Log } EC_{50})$	E_{max}	$pD_2(-\text{Log } EC_{50})$	E_{max}	$pD_2(-\text{Log } EC_{50})$	E_{max}
ACh	$7,18 \pm 0,58$	$98 \pm 1,61$	$6,78 \pm 0,12^{**}$	$82 \pm 4,43^{**}$	$6,75 \pm 0,08^{**}$	$94 \pm 2,98^{\dagger}$
DEA	$6,71 \pm 0,23$	$98 \pm 1,70$	$6,63 \pm 0,15$	$101 \pm 0,96$	$6,71 \pm 0,25$	$101 \pm 1,06$
Fenil	$7,19 \pm 0,12$	$2,7 \pm 0,24$	$7,3 \pm 0,12$	$2,5 \pm 0,12$	$7,31 \pm 0,15$	$2,5 \pm 0,21$

Os valores são expressos como média $\pm$ EPM sendo o valor do efeito máximo (E_{max}) expresso como percentual de relaxamento relativo à pré-contracção obtida com fenilefrina nas curvas de ACh e DEA e como a diferença entre o valor basal e obtido, em gramas, para as curvas de fenilefrina. ANOVA 1 via, *post-hoc* de Fisher; $^{**}p<0,01$ vs. Sham; $^{\dagger}p<0,05$ vs. IM Pla.

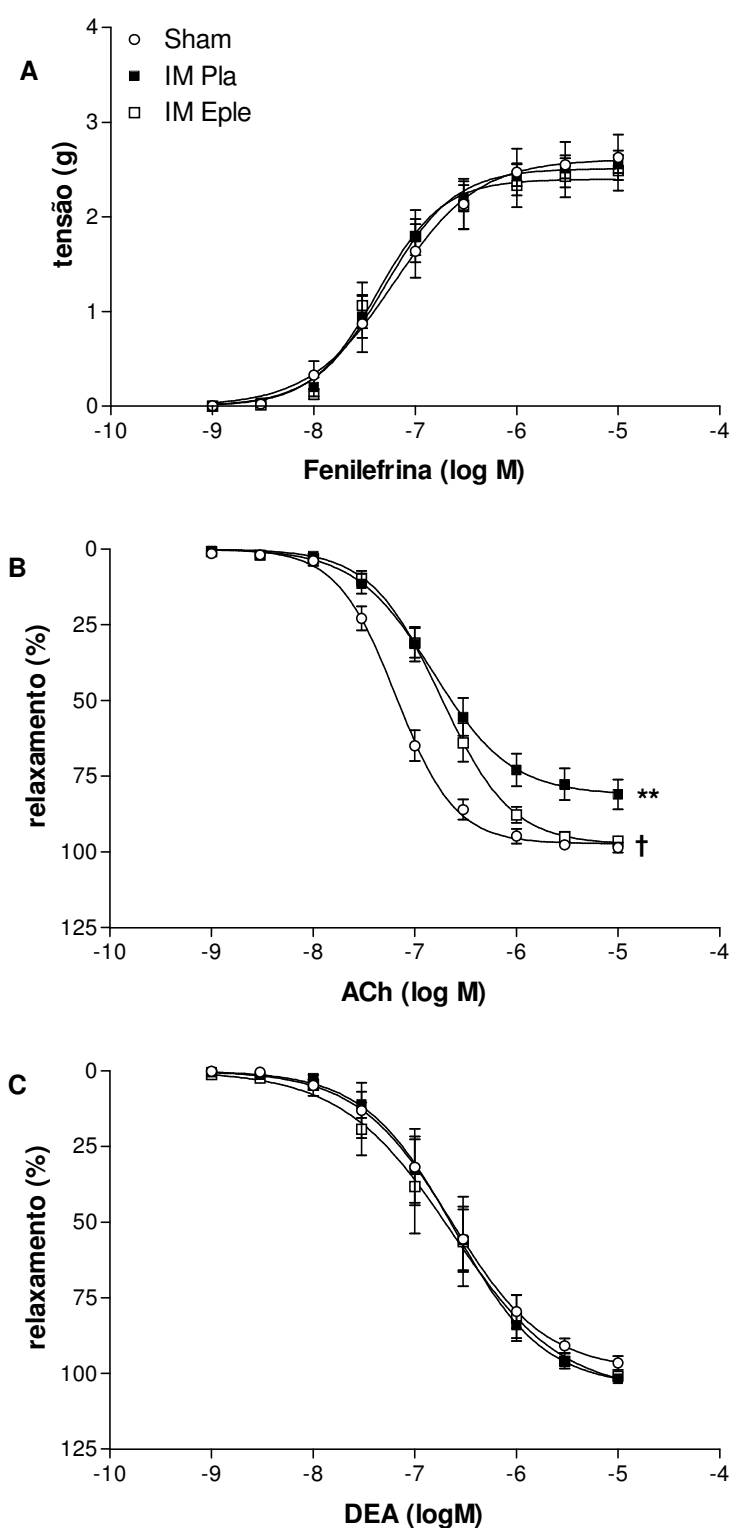


Figura 4. Curvas concentração-resposta à **(A)** fenilefrina (Fenil), **(B)** acetilcolina (ACh), e **(C)** DEA nos grupos cirurgia fictícia (Sham O), infartado com tratamento placebo (IM Pla ■) e infartado tratado com inibidor de aldosterona eplerenona (IM Eple □) em anéis de aorta. Os valores são expressos como média±EPM. ANOVA 1 via, *post-hoc* de Fisher; ** $p < 0,01$ vs. Sham; † $p < 0,05$ vs. IM Pla.

Para observar a possível origem da disfunção endotelial observada foram feitos Western blots para a detecção da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), bem como para a sua forma fosforilada (peNOS). Observou-se um aumento da razão da expressão protéica da forma fosforilada desta enzima (peNOS) com relação à forma não fosforilada (eNOS) no grupo tratado com eplerenona quando comparado ao grupo IM Pla (IM Eple vs. IM Pla $p<0,05$; figura 5).

Para corroborar este achado, foram feitas análises imunohistoquímicas de cortes de aorta de animais de cada grupo para investigar a expressão da forma fosforilada da eNOS. Tal resultado pode ser observado na figura 6, onde a coloração amarronzada no endotélio indica a expressão da forma fosforilada da eNOS (peNOS), estando esta reduzida no grupo infartado tratado com placebo quando comparado ao grupo Sham e o tratamento com eplerenona preveniu esta redução.

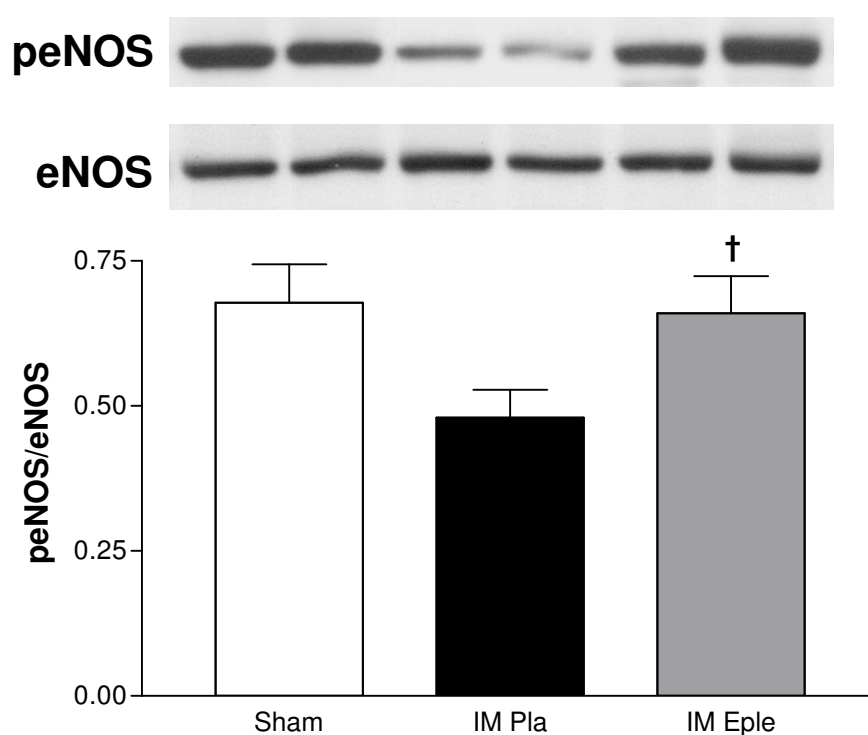


Figura 5. Expressão relativa de eNOS fosforilada (peNOS) por eNOS na aorta de ratos submetidos à cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple). Os valores são expressos como média±EPM (n= 8-21). ANOVA 1 via, *post-hoc* de Fisher; † $p<0,05$ vs. IM Pla.

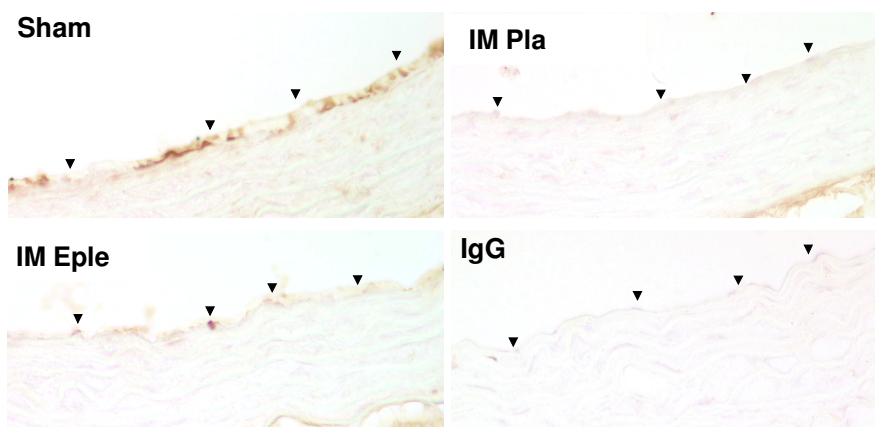


Figura 6. Imunohistoquímica para a detecção da forma fosforilada da (peNOS) em aortas de ratos submetidos à cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple). As figuras mostradas são demonstrativas de dois resultados representativos. A figura assinalada com IgG representa o controle negativo, isto é, os cortes incubados sem o anticorpo primário para a peNOS e apenas com IgG. A coloração amarronzada representa a expressão protéica corada por DAB. Aumento 250X. As cabeças de setas indicam o endotélio.

Foi avaliada também a participação de componentes do sistema renina-angiotensina na reatividade vascular dos grupos estudados. Em um primeiro momento foram feitas curvas concentração-resposta à angiotensina I como observado no gráfico A da figura 7. Um aumento significativo da resposta contrátil a este agonista foi observado no grupo infartado quando comparado ao Sham, tanto na sensibilidade (pD_2 IM Pla vs. Sham $p < 0,05$) quanto na resposta máxima obtida (E_{max} IM Pla vs. Sham $p < 0,01$). O tratamento com o inibidor específico para o receptor de aldosterona, eplerenona, foi capaz de reduzir significativamente a sensibilidade (pD_2 IM Eple vs. IM Pla $p < 0,05$) além de diminuir a resposta máxima no grupo tratado com este fármaco (E_{max} IM Eple vs. IM Pla $p < 0,05$).

A reatividade vascular à angiotensina II também foi avaliada, porém não foi significativamente alterada quando confrontados os grupos estudados (figura 7B). Os valores representativos dos parâmetros citados para as curvas de angiotensina I e II estão descritos na tabela 3.

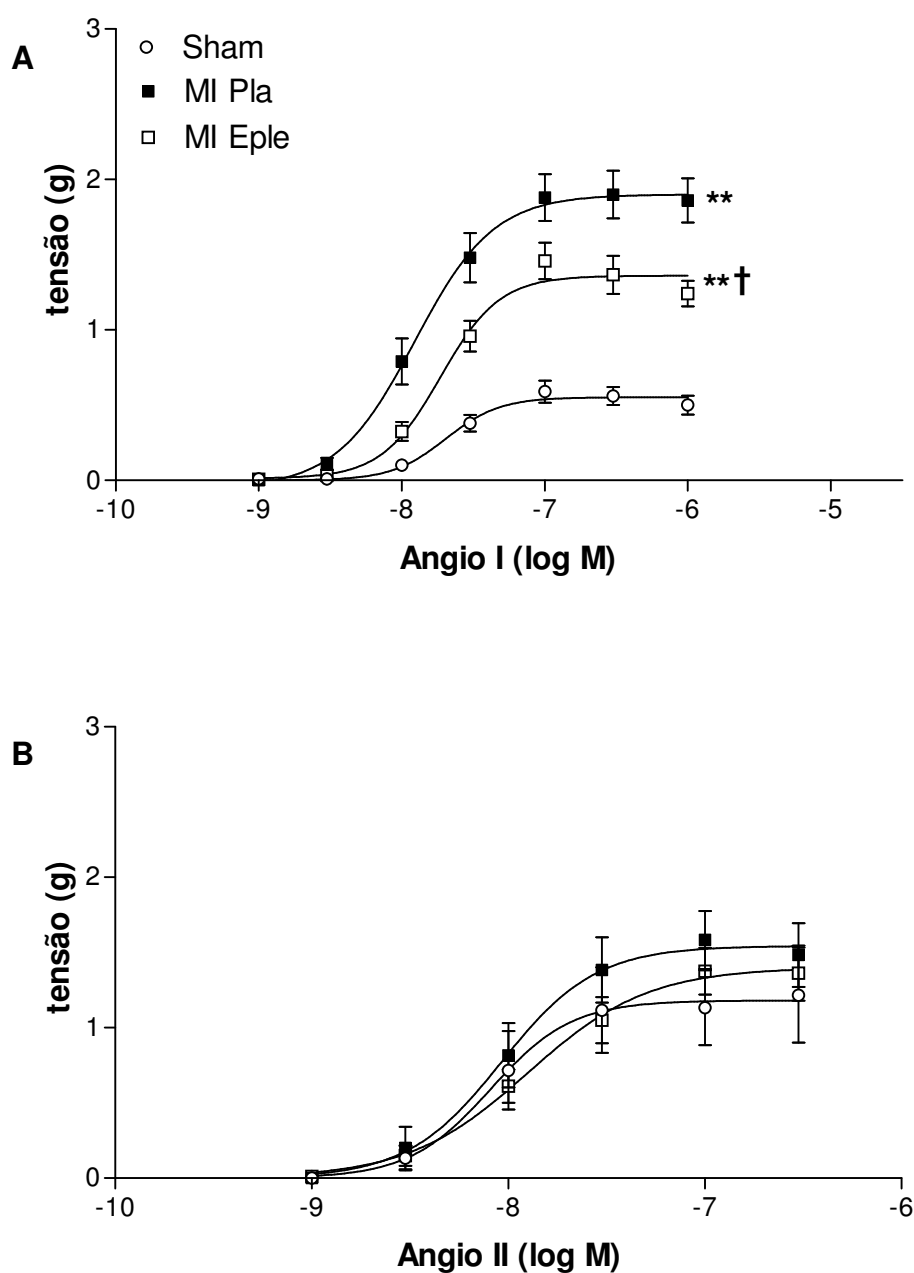


Figura 7. Curvas concentração-resposta à **(A)** angiotensina I (Angio I), **(B)** angiotensina II (Angio II) em anéis isolados de aorta dos grupos cirurgia fictícia (Sham ○), infartado com tratamento placebo (IM Pla ■) e infartado tratado com inibidor de aldosterona eplerenona (IM Eple □). Os valores são expressos como média±EPM. ANOVA 1 via, *post-hoc* de Fisher; ** $p<0,01$ vs. Sham; † $p<0,05$ vs. IM Pla.

Tabela 3. Valores obtidos nas curvas concentração-resposta à angiotensina I (Angio I) e angiotensina II (Angio II) em anéis isolados de aorta de ratos submetidos à cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple).

	Sham (n= 9)		IM Pla (n= 11)		IM Eple (n= 11)	
	pD ₂ (-Log EC ₅₀)	E _{max} (g)	pD ₂ (-Log EC ₅₀)	E _{max} (g)	pD ₂ (-Log EC ₅₀)	E _{max} (g)
Angio I	7,7±0,03	0,6±0,1	7,9±0,07*	1,9±0,1**	7,7±0,04 [†]	1,5±0,1** [†]
Angio II	8,0±0,04	1,3±0,2	8,2±0,17	1,7±0,2	7,9±0,08	1,4±0,2

Os valores são expressos como média±EPM. ANOVA 1 via, *post-hoc* de Fisher; *p<0,05, ** p<0,01 vs. Sham; [†]p<0,05 vs. IM Pla.

Para investigar a possível origem do aumento à resposta contrátil à angiotensina I, procedeu-se à quantificação da expressão protéica da enzima conversora de angiotensina (ECA) nas amostras de aorta destes animais. Os resultados indicaram um aumento significativo da expressão desta enzima na vasculatura dos animais infartados tratados com placebo quando comparados aos Sham (ECA IM Pla vs. Sham p<0,05). O tratamento com eplerenona reduziu este parâmetro (figura 8A). Ao observarmos a expressão da forma fosforilada da ECA (pECA), não foi demonstrada uma diferença significativa entre os grupos, apesar da tendência dos grupos seguir o mesmo padrão observado para a ECA (Figura 8B). Houve correlação positiva entre estes dois parâmetros, indicando que a expressão da ECA aumenta proporcionalmente à pECA (Figura 9).

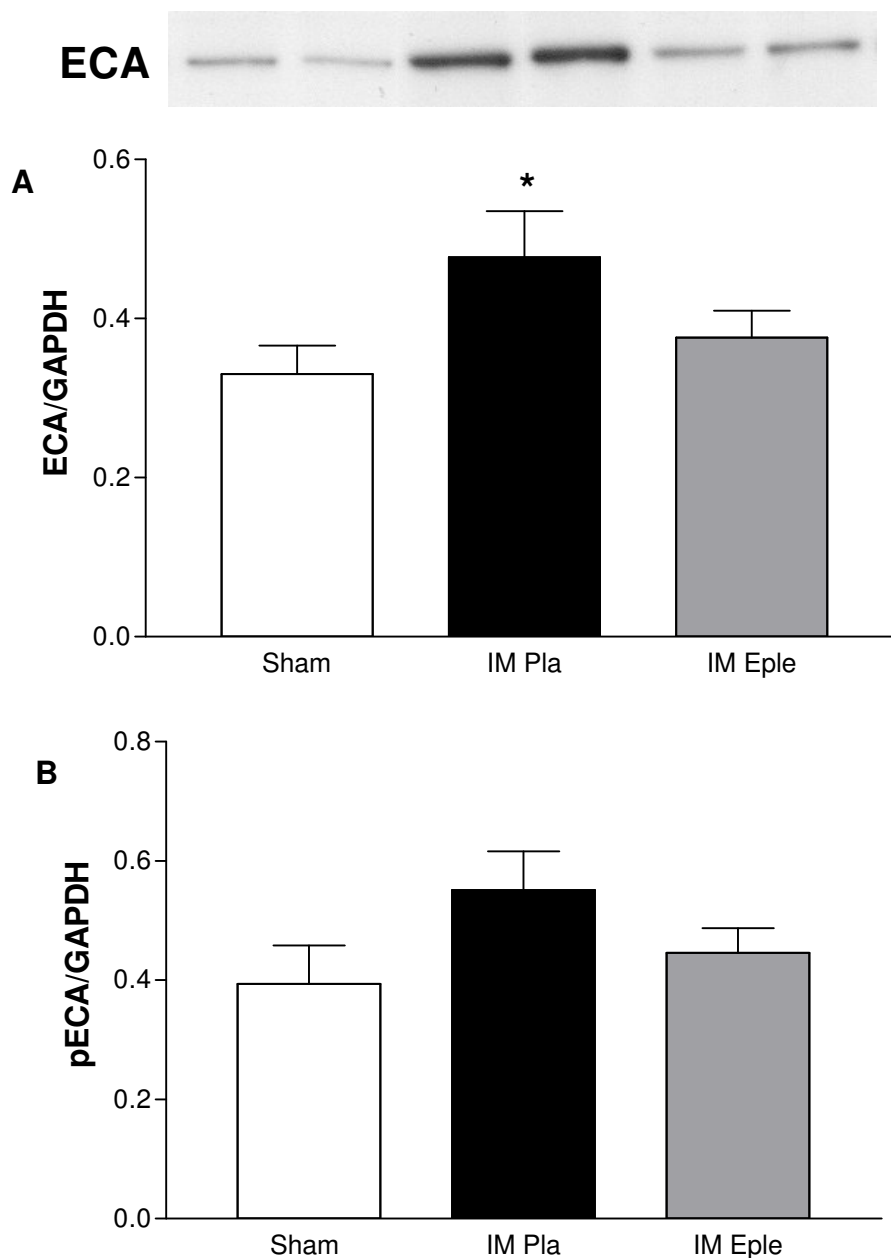


Figura 8. (A) Expressão protéica da enzima conversora de angiotensina (ECA) e **(B)** a sua forma fosforilada (pECA) na aorta de ratos submetidos à cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple). Os valores são expressos como média±EPM (n= 10-21). ANOVA 1 via, *post-hoc* de Fisher; *p<0,05 vs. Sham.

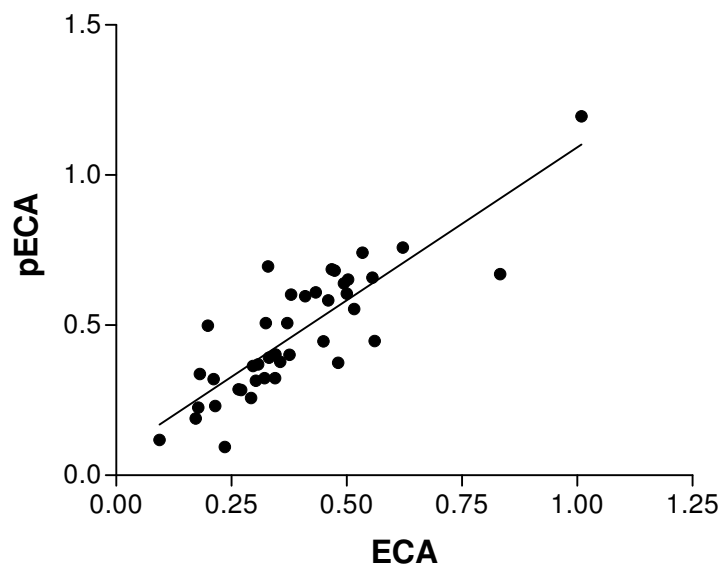


Figura 9. Correlação entre a expressão protéica da enzima conversora de angiotensina (ECA) e sua forma fosforilada (pECA) expressa em unidades arbitrárias, em aortas de ratos de todos os grupos avaliados. Índice de Pearson $r=0,84$; $p<0,0001$.

Para observar *in situ* a expressão da ECA procedeu-se à imunohistoquímica da mesma em cortes dos animais dos diferentes grupos pesquisados. Na figura 10 são observados cortes representativos destas imunohistoquímicas, onde se pode observar a coloração acentuada no endotélio no grupo IM Pla quando comparado aos grupos Sham e IM Eple.

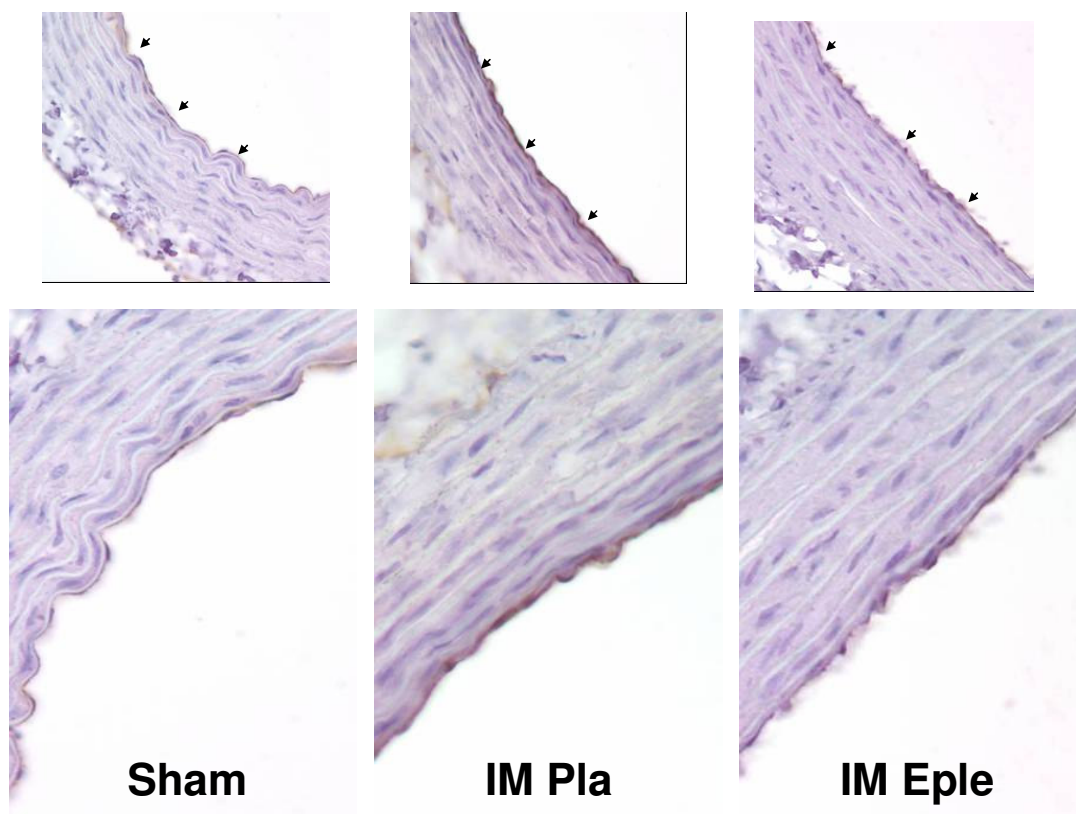


Figura 10. Imunohistoquímica para a detecção da enzima conversora de angiotensina (ECA) em aorta de ratos submetidos à cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple). As figuras apresentadas são demonstrativas de dois resultados representativos. Os controles negativos foram incubados sem o anticorpo primário para a ECA e com IgG e não mostraram coloração ao DAB (dados não mostrados). A coloração amarronzada representa a expressão protéica da ECA corada por DAB. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina para a coloração nucléica. As setas indicam as células endoteliais. Painel superior 250x painel inferior 400x.

4. Estresse oxidativo vascular

Foi realizada também a investigação relativa à possível participação de estresse oxidativo na vasculatura deste modelo experimental, dada a sua relevante correlação com a disfunção vasomotora.

O primeiro protocolo proposto foi a avaliação da produção de ânions superóxido (O_2^-) nos anéis de aorta dos grupos estudados. Para isto foi realizada a medida do aumento da quimiluminescência por lucigenina ($5 \mu M$). Foi observada um significativo aumento da produção de O_2^- no grupo infartado placebo quando comparado ao Sham (IM Pla vs. Sham $p < 0,001$) e o tratamento com eplerenona foi capaz de normalizar este parâmetro (IM Eple vs. IM Pla $p < 0,001$) (figura 11).

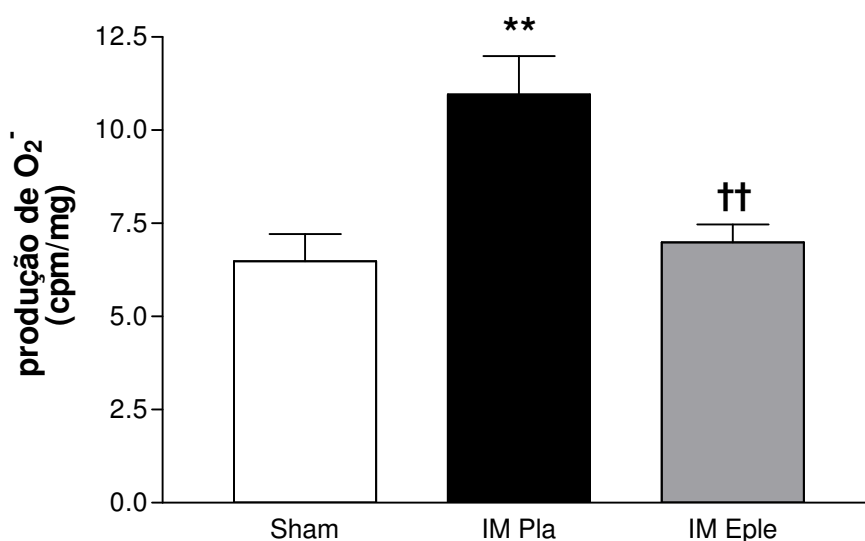


Figura 11. Produção de ânions superóxido (O_2^-) medida pelo aumento da quimiluminescência por lucigenina ($5 \mu M$) em anéis de aorta de animais submetidos à cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple). Os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 8-14$). ANOVA 1 via, *post-hoc* de Fisher; ** $p < 0,001$ vs. Sham; †† $p < 0,001$ vs. IM Pla.

Visando demonstrar o papel protetor da liberação basal de NO na produção de radicais livres foi feita a avaliação do aumento da produção de ânions superóxido por uma prévia incubação com o composto LNNA. Os dados percentuais relativos às primeiras medidas estão mostrados na figura 12. Apesar de não significantes, a tendência mostra que no grupo infarto placebo (IM Pla) há uma menor participação do NO na produção de radicais livres quando comparado ao grupo tratado com eplerenona (IM Eple).

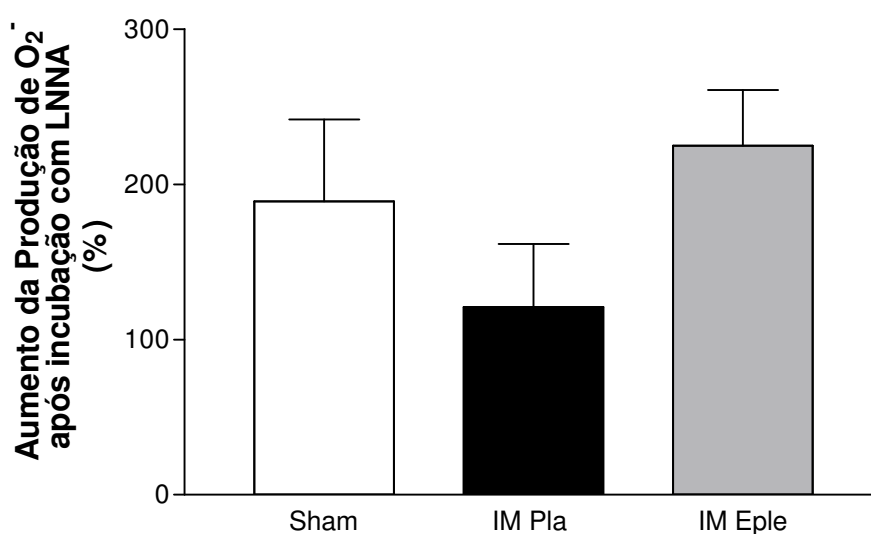


Figura 12. Percentual de aumento na produção de ânions superóxido ($O_2^{\bullet -}$) medida pelo aumento da quimioluminescência por lucigenina ($5 \mu M$) em anéis de aorta incubados com LNNA por 40 min. Animais submetidos à cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple). Os valores são expressos como média $\pm$ EPM do percentual de aumento com relação à primeira medida ($n=6$).

Para ilustrar a produção de $O_2^{\bullet -}$ *in situ* foi realizado o ensaio de fluorescência oxidativa com o corante fluorescente hidroetidina. Na figura 13 estão as fotografias representativas dos grupos estudados. Foi observado um aumento da fluorescência, e, portanto, de $O_2^{\bullet -}$ no grupo IM Pla, sendo que o tratamento com eplerenona preveniu este aumento, corroborando desta maneira os dados previamente obtidos com a quimiluminescência.

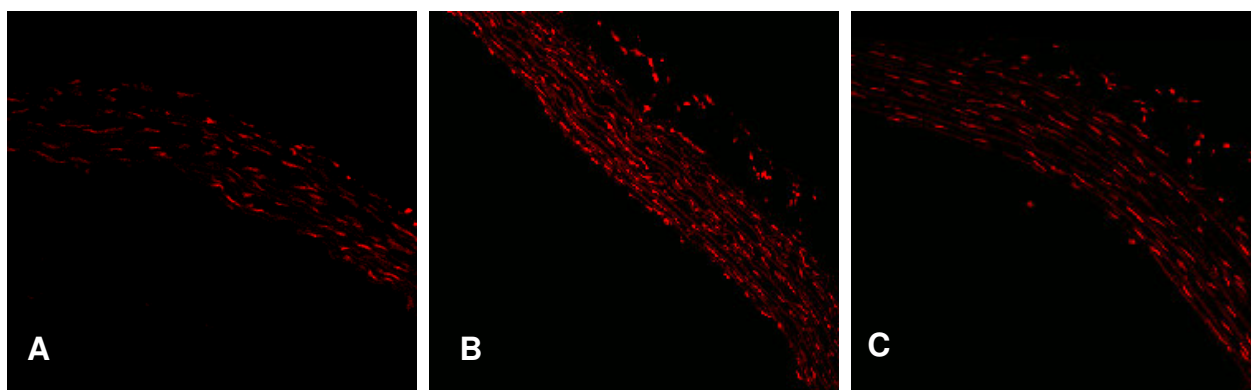


Figura 13. Produção *in situ* de O_2^- em aortas de ratos submetidos à **(A)** cirurgia fictícia (Sham), **(B)** infartados tratados com placebo (IM Pla) ou **(C)** com eplerenona (IM Eple). As figuras mostradas são demonstrativas de dois resultados representativos.

Dada a importante correlação entre a produção de radicais livres pela NADPH oxidase, e sua ativação por componentes do SRAA, buscou-se a possível alteração na expressão da subunidade $p22^{phox}$ desta enzima. Esta subunidade é de essencial importância para a ativação da NADPH oxidase nas células vasculares (Ushio-Fukai *et al.*, 1996). Os resultados estão apresentados na figura 14, onde se observa um aumento da expressão desta subunidade no grupo IM quando comparado ao Sham. O tratamento com eplerenona (IM Eple) foi capaz de reduzir significativamente a expressão da $p22^{phox}$.

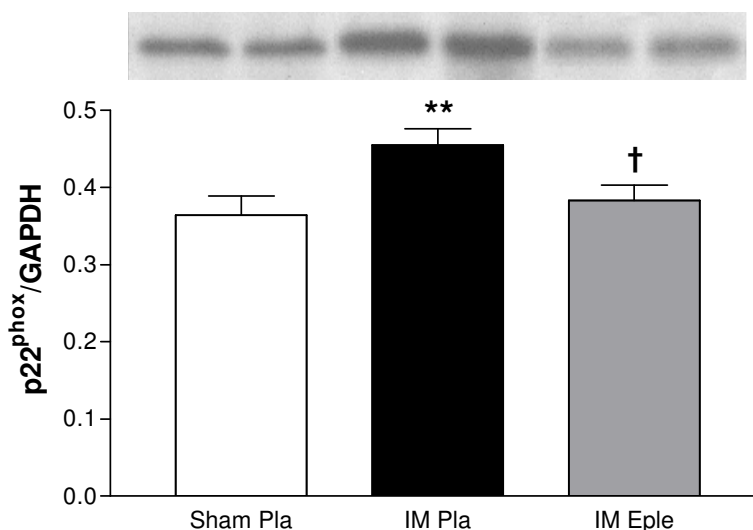


Figura 14. Expressão protéica da subunidade p22^{phox} em aortas de ratos submetidos à cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple). Os valores são expressos como média±EPM (n= 7-9). ANOVA 1 via, *post-hoc* de Fisher; **p<0,001 vs. Sham; † p<0,05 vs. IM Pla.

Investigando o possível mecanismo protetor do tratamento com eplerenona foi feita a avaliação da expressão protéica da isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase (MnSOD). Foi então observado um aumento significativo no grupo tratado com eplerenona quando comparado ao tratado com placebo (IM Eple vs. IM Pla p<0,05; figura 15).

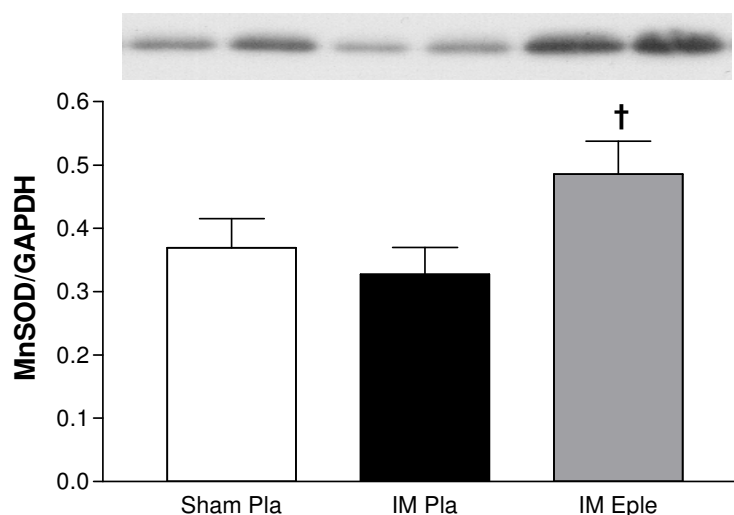


Figura 15. Expressão protéica da enzima MnSOD em aortas de ratos submetidos à cirurgia fictícia (Sham), infartados tratados com placebo (IM Pla) ou com eplerenona (IM Eple). Os valores são expressos como média±EPM (n= 8-20). ANOVA 1 via, *post-hoc* de Fisher; † p<0,05 vs. IM Pla.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

V. Discussão e Conclusões

O principal resultado deste estudo foi a demonstração de que em uma fase inicial após o infarto do miocárdio experimental a aldosterona promove alterações vasculares que induzem à disfunção endotelial. Dentre os mecanismos envolvidos estão o aumento da expressão da ECA, redução da bioviabilidade do NO pela eNOS além do estresse oxidativo vascular por aumento da expressão e atividade da NAD(P)H oxidase e redução das reservas antioxidantes. Estes eventos parecem ser mediados via receptores de mineralocorticóides, uma vez que o uso do inibidor específico do receptor de aldosterona, eplerenona, promoveu melhorias significativas nestes parâmetros.

Inúmeros estudos têm sido desenvolvidos no intuito de conhecer os mecanismos envolvidos nas alterações cardíacas e sistêmicas decorrentes do IM, bem como possibilidades terapêuticas para evitar a instalação ou minimizar as manifestações da síndrome da IC. Apesar dos esforços para tal, a maioria dos trabalhos têm demonstrado alterações vasculares na fase crônica onde já se estabeleceu a IC, posto que é nesta etapa que se realizam a grande maioria das investigações experimentais e clínicas. Da mesma maneira, o tratamento com eplerenona, inibidor específico do receptor para aldosterona, tem sido avaliado geralmente em uma fase crônica após o IM, ou após longo tempo de terapia com este fármaco, tanto em investigações clínicas (Pitt *et al.*, 2003) quanto experimentais (Fraccarollo *et al.*, 2003; Schafer *et al.*, 2003). Apesar disso, estudos ressaltam que o mais alto risco de incidência de mortalidade ocorre no período inicial após o infarto (Wu *et al.*, 2002; Steg *et al.*, 2004). E, em relação ao tratamento com os inibidores do receptor de mineralocorticóides, foi demonstrado que os pacientes após IM obtiveram uma redução maior nos índices de mortalidade quando o tratamento com eplerenona foi iniciado em torno de 7 dias após o infarto do miocárdio (Pitt *et al.*, 2005). Da mesma forma, a administração imediata (nas primeiras 24 horas) do inibidor do receptor de mineralocorticóides, espironolactona, após o IM em pacientes foi mais eficaz (Hayashi *et al.*, 2003). Portanto, parece ser mais prudente que se inicie o tratamento hospitalar com eplerenona subsequente à estabilização hemodinâmica após o IM (Pitt *et al.*, 2005). No entanto, os mecanismos basais envolvidos nestes benefícios observados pelo tratamento na fase inicial com a eplerenona após o IM ainda não foram elucidados, especialmente no que diz

respeito aos mecanismos vasculares. O presente trabalho foi dedicado a investigar as alterações vasculares, bem como os possíveis benefícios do tratamento com eplerenona aos sete dias após o infarto agudo do miocárdio.

No início deste estudo foi realizada a medida da concentração sérica de aldosterona para corroborar o modelo experimental proposto como indicado ao uso de um inibidor do receptor de aldosterona. Os resultados demonstraram haver aumento na concentração sérica deste mineralocorticoide aos sete dias após infarto. A concentração plasmática de aldosterona está aumentada após o IM e na IC, sendo relacionada com a severidade desta enfermidade (Swedberg *et al.*, 1990; Rouleau *et al.*, 1994; Fraccarollo *et al.*, 2003). A concentração sanguínea aumentada de aldosterona já foi considerada como um fator de risco independente para o aumento da mortalidade em pacientes portadores de IC (Swedberg *et al.*, 1990). O principal mecanismo envolvido no aumento da produção da aldosterona pelas adrenais parece ser a atividade sustentada do sistema renina angiotensina (Laragh, 1962; Anand *et al.*, 1989). Este sistema por sua vez se mostra ativado na fase inicial da descompensação cardíaca pela redução do volume circulante efetivo, culminando com a retenção hidro-salina na tentativa de restabelecer este volume, o que não é restaurado em pacientes com IC (Palmieri *et al.*, 2002). Apesar de freqüentemente associada ao aumento da angiotensina II, a concentração de aldosterona foi encontrada aumentada em pacientes com IC mesmo com a completa inibição da ECA, sugerindo uma via de produção independente de angiotensina II (Jorde *et al.*, 2002). Um outro estudo clínico detectou concentrações elevadas de aldosterona em mais de 40% dos pacientes com IC crônica sintomática, apesar do uso do inibidor da ECA (MacFadyen *et al.*, 1999), fenômeno este conhecido como “escape de aldosterona” (*aldosterone scape*). Este mecanismo relaciona-se a uma concentração elevada de aldosterona circulante na presença de inibição da atividade da ECA e baixos níveis de angiotensina II, o que sugere então um mecanismo de produção de aldosterona independente daquele induzido pelo sistema renina-angiotensina (Staessen *et al.*, 1981; Duprez *et al.*, 1998). Em pacientes tratados cronicamente com os inibidores da ECA, o escape de aldosterona foi inversamente correlacionado com a diminuição da complacência arterial da aorta nos seus maiores ramos, o que por sua vez poderia levar a uma piora adicional do processo da IC, devido ao aumento da impedância ao fluxo ventricular (Duprez *et al.*, 1998). O mesmo grupo de estudiosos demonstrou também esta correlação inversa no que diz respeito à

capacitância venosa (Rietzschel *et al.*, 2000) o que seria um fator a mais para o prejuízo do quadro da IC. Por outro lado, Hodsman e colaboradores não observaram diferenças na concentração plasmática de aldosterona entre ratos submetidos ao infarto e os controles, um mês após a cirurgia de IM (Hodsman *et al.*, 1988). Um estudo com pacientes demonstrou que não houve evidência de correlação entre a atividade dos componentes do SRAA plasmáticos e a atividade da ECA na vasculatura (Farquharson & Struthers, 2002b). Este fato ressalta a dissociação entre os componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) circulantes e locais. Da mesma forma, a infusão de aldosterona em doses que não alteram a pressão sanguínea foi capaz de produzir agudamente disfunção endotelial em humanos (Farquharson & Struthers, 2002a), mostrando desta maneira que a aldosterona promove prejuízos independentes de seus efeitos hemodinâmicos. Em conjunto estes dados sugerem que a concentração sanguínea de aldosterona tem uma importância relativa, não podendo ser considerada como um indicador absoluto dos efeitos deletérios que este mineralocorticoide pode promover nos diversos tecidos do organismo.

Na análise aqui realizada dos dados hemodinâmicos foi observado um aumento na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) nos animais infartados quando comparados aos Sham. O tratamento por 7 dias com eplerenona promoveu uma significativa melhora deste parâmetro. Com relação às curvas pressão-volume, houve um deslocamento marcante das mesmas para a direita nos animais infartados e o tratamento com eplerenona promoveu uma prevenção parcial desta alteração, como observada no deslocamento menos acentuado para a direita nas curvas do grupo IM Eple. Os valores obtidos na curva pressão-volume indicam esta melhora sendo que os volumes sistólico e diastólico finais do ventrículo esquerdo (VSFVE e VDFVE, respectivamente) se mostraram aumentados nos animais infartados e o tratamento com eplerenona reduziu estes valores significativamente. Parâmetros indicativos de contratilidade miocárdica como dP/dt_{max} e dP/dt_{min} mostraram-se significativamente reduzidos no grupo IM Pla quando comparados aos animais Sham. O tratamento por sete dias com eplerenona foi capaz de promover uma significativa melhora em ambos os parâmetros descritos.

Alguns estudos corroboram as melhorias hemodinâmicas e de contratilidade observadas aqui. Fraccarollo e colaboradores demonstraram melhorias semelhantes

em estudos crônicos após IM, onde o tratamento com eplerenona promoveu uma redução significativa na PDFVE, VSFVE e VDFVE comparados ao grupo placebo (Fraccarollo *et al.*, 2003; Fraccarollo *et al.*, 2005). Nestes mesmos relatos a dP/dt mínima e máxima também se mostraram diminuídas após o infarto e o tratamento com eplerenona mostrou apenas uma tendência à melhoria, o que só foi alcançado com o tratamento combinado com um inibidor da ECA ou com antagonistas dos receptores AT_1 . Os mecanismos envolvidos nestas melhorias estariam relacionados à prevenção da fibrose intersticial, hipertrofia cardíaca e alterações moleculares responsáveis pela progressiva disfunção contrátil após o infarto. Em um trabalho prévio em pacientes, a espironolactona também promoveu uma redução marcante na dilatação do ventrículo esquerdo e uma melhoria da fração de ejeção, podendo assim melhorar a capacidade ao exercício e redução de mortes por IC (Cicoira *et al.*, 2002). Em ratos senis com infarto de pequeno a moderado, a eplerenona se mostrou capaz de normalizar as evidências hemodinâmicas e ecocardiográficas de disfunção diastólica, bem como a quantidade de colágeno intersticial e fibrose aórtica (Masson *et al.*, 2004). Também em outro modelo experimental, tratado com desoxicorticosterona (DOCA), os animais mostraram um aumento progressivo na quantidade de colágeno intersticial e a terapia com eplerenona não apenas preveniu a fibrose cardíaca, mas a reverteu uma vez estabelecida (Young & Funder, 2004). Por outro lado, Delyani e colaboradores demonstraram que a eplerenona não retardou a cicatrização ventricular aos 3, 7 ou 28 dias após o infarto, com relação à deposição de colágeno reparador e o índice de expansão do infarto, mas protegeu em uma fase mais avançada (28 dias) o miocárdio viável de uma fibrose reativa (Delyani *et al.*, 2001). Também no que diz respeito à contratilidade, foi demonstrado que a aldosterona promove um efeito inotrópico negativo em trabéculas de miocárdio humano e espironolactona e eplerenona não bloquearam este efeito (Chai *et al.*, 2005). Apesar das alterações hemodinâmicas aqui descritas, existem relatos onde fica claro que a aldosterona, bem como seus inibidores, possuem efeitos independentes das alterações hemodinâmicas. Importante se faz ressaltar que a proteção tecidual observada com o bloqueio de aldosterona é obtida mesmo quando estes fármacos bloqueadores são administrados em doses tão baixas que não sejam capazes de alterar a pressão arterial. A exemplo disso, um estudo clínico demonstrou que a administração de espironolactona dentro das primeiras 24 h a pacientes após o infarto trouxe melhorias à função e ao remodelamento ventricular

esquerdo, associadas à redução de um marcador da síntese de colágeno, no entanto sem significativa hipotensão (Hayashi *et al.*, 2003). Também em um estudo experimental, utilizando o modelo de IM em cães, foi demonstrado que mesmo administrando eplerenona em doses que não afetavam a pressão arterial ou a frequência cardíaca houve uma redução significativa da PDFVE e estresse de parede do ventrículo (Suzuki *et al.*, 2002). Rocha e colaboradores demonstraram claramente que em animais experimentais o uso do inibidor de aldosterona impediu a fibrose miocárdica e aórtica, bem como as lesões nefroescleróticas e cerebrovasculares, mesmo na ausência de mudanças na pressão sanguínea (Rocha *et al.*, 2000). Estes estudos vêm ao encontro dos resultados aqui apresentados, que demonstram também uma redução na pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) bem como na pressão arterial média (PAM) nos animais infartados quando comparados aos Sham, sem alteração significativa destes parâmetros após 7 dias de tratamento com eplerenona. Também em dois grandes estudos clínicos, o RALES (*Randomized Aldactone Evaluation Study*) onde foi administrado espironolactona a pacientes com IC congestiva (Pitt *et al.*, 1999) e o EPHEUS (*Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*) (Pitt *et al.*, 2003) que administrou eplerenona a pacientes com disfunção ventricular esquerda após infarto do miocárdio, houve redução da mortalidade com a administração dos antagonistas do receptor de mineralocorticóides em doses que não promoveram redução na pressão arterial. Ou seja, o efeito tecidual protetor do bloqueio de aldosterona em estudos clínicos e experimentais não é, em absoluto, devido a um mero efeito anti-hipertensivo (Struthers, 2004a).

Uma outra vertente relevante para explicar os benefícios aqui observados diz respeito à produção e efeitos locais da aldosterona. De fato, a aldosterona tem sido descrita como sendo produzida localmente em diversos tecidos do corpo como, por exemplo, o tecido vascular e coração (Takeda *et al.*, 1995; Silvestre *et al.*, 1998). Seus receptores já foram encontrados em tecido cardíaco (Pearce & Funder, 1987; Lombes *et al.*, 1995; de Resende *et al.*, 2006) e foi demonstrado recentemente que após o infarto há um aumento significativo da expressão dos receptores de mineralocorticóides no miocárdio ventricular esquerdo (de Resende *et al.*, 2006). Após infarto do miocárdio ocorre ainda uma ativação tecidual cardíaca específica da via de produção de aldosterona (sintase de aldosterona) e fibrose intersticial,

relacionada à produção local e não sistêmica de angiotensina II (Silvestre *et al.*, 1999). Estes fatos abrem uma gama de possibilidades para efeitos da aldosterona mediados pela ativação dos receptores de mineralocorticóides nestes tecidos “não clássicos”. Isto seria uma das muitas razões pela qual o nível de aldosterona sanguíneo parece não predizer a eficácia do bloqueio da aldosterona e seus efeitos deletérios sendo, porém, um indicativo para o uso destes agentes bloqueadores (Struthers, 2004a).

Apesar dos relatos acima descritos, o objetivo central deste trabalho foi estudar as respostas locais, vasculares, na fase inicial após infarto do miocárdio e observar possíveis efeitos do inibidor específico do receptor de aldosterona, eplerenona, neste modelo experimental. Para tal foram realizados inicialmente protocolos de reatividade vascular. Para avaliar a resposta vasoconstritora, foi utilizado o agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina, que promove a contração da musculatura lisa vascular agindo em receptores específicos na membrana plasmática acoplados à proteína G_s . Isto ativa mecanismos que elevam a concentração de Ca^{2+} intracelular (Rembold, 1992) e promovem a contração do músculo liso (Stull *et al.*, 1991; Marin, 1993; Horowitz *et al.*, 1996). Nas curvas concentração-resposta à fenilefrina realizadas no presente estudo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados. Diversos estudos, todavia, indicam para um aumento da resposta a agonistas vasoconstritores em diversos leitos vasculares após infarto do miocárdio. Teerlink e colaboradores demonstraram haver aumento da reatividade vascular à norepinefrina em anéis de aorta, também aos 7 dias após o infarto (Teerlink *et al.*, 1994a). Esta resposta seria endotélio dependente, ocorrendo devido a uma redução no efeito modulatório negativo do endotélio pela menor liberação basal de NO. Foi observado ainda um decréscimo na sensibilidade dos receptores α_1 -adrenérgicos na contração mediada por cloreto de potássio em anéis sem endotélio de animais com IC. Indo ao encontro destes relatos, um estudo com hamsters cardiomiopáticos mostrou aumento da resposta máxima vasoconstritora à norepinefrina em aortas (Crespo, 1999) sendo sugerido para tal modelo experimental um aumento dos receptores α_1 -adrenérgicos (Kagiya *et al.*, 1991). A análise da reatividade da artéria caudal em ratos demonstrou que a reatividade vascular à norepinefrina e fenilefrina estava aumentada após infarto do miocárdio (Meerson *et al.*, 1993). Também em um trabalho de nosso

laboratório foi demonstrado um aumento da resposta contrátil à fenilefrina no leito vascular caudal tanto aos três (Sartorio *et al.*, 2005) quanto aos 30 dias (Pereira *et al.*, 2005) após o infarto do miocárdio em ratos. Em outro estudo com vasos mesentéricos ficou demonstrado que em artérias com endotélio intacto de ratos com IC havia um aumento da resposta contrátil à fenilefrina, o que também foi relacionado a um aumento de ânions superóxido pela iNOS, provavelmente por uma privação de seu substrato L-arginina (Miller *et al.*, 2000). O aumento da resposta vasoconstritora após o infarto poderia ser relacionado também com a redução na expressão ou sensibilidade de receptores α_2 -adrenérgicos endoteliais (Feng *et al.*, 1996) e aumento da produção de agentes vasoconstritores endoteliais como a endotelina (Stewart *et al.*, 1991; Paulus, 1994) e os prostanóides da via da ciclooxigenase (Vanhoutte, 1996). Indo de encontro a esses achados, Stassen e colaboradores, ao estudarem a reatividade vascular cinco semanas após infarto do miocárdio, demonstraram redução da reatividade vascular vasoconstritora em artérias mesentéricas à norepinefrina, fenilefrina, serotonina e vasopressina, enquanto não observaram nenhuma alteração em anéis de aorta (Stassen *et al.*, 1997). Outro grupo de pesquisadores observaram hiporeatividade vasoconstritora ao potássio em artérias musculares periféricas de ratos 2 semanas após infarto, o que indicaria disfunção vasoconstritora não específica ao receptor e sim um defeito contrátil generalizado (Ceiler *et al.*, 1999). Dados prévios de nosso laboratório, usando anéis de aorta, não demonstraram diferenças na resposta vasoconstritora na IC, um mês após infarto, e até mesmo um aumento na produção basal de NO nestes animais (da Cunha *et al.*, 2004). Estes últimos relatos corroboram o do presente estudo, porém com diferenças no que diz respeito à resposta mediada pelo endotélio, que será discutida mais adiante.

Além dos mecanismos já citados, a aldosterona pode promover efeitos rápidos não-genômicos que levam a um aumento rápido da concentração intracelular de cálcio tanto no endotélio como no músculo liso vascular. Isto sugere que a aldosterona poderia atuar como vasoconstritora pelo aumento do cálcio nas células do músculo liso vascular (Wehling *et al.*, 1994; Christ *et al.*, 1995a; Christ *et al.*, 1995b). Em um estudo onde foi feita a infusão de aldosterona em voluntários adultos saudáveis, foi demonstrado que este mineralocorticóide promove efeitos rápidos e não genômicos de aumento da resistência vascular sistêmica, alterando, porém, a pressão arterial sistêmica e o controle autonômico (Schmidt *et al.*, 1999).

Romagni e colaboradores observaram um efeito rápido de vasoconstrição pela infusão de aldosterona (2,5 pmol/min) (Romagni *et al.*, 2003). Foi demonstrado ainda que a aldosterona tem efeito agudo em parâmetros cardiovasculares como a resistência vascular periférica, o débito e o índice cardíaco em homens com suspeita de doença coronariana (Wehling *et al.*, 1998). Por outro lado, a infusão de 10, 50 ou 100 ng/min de aldosterona não promoveu qualquer efeito no antebraço de pacientes saudáveis (Gunaruwan *et al.*, 2002). Liu e colaboradores demonstraram que a infusão de aldosterona em concentrações fisiológicas levou a uma redução concentração-dependente da contração mediada por fenilefrina em anéis de aorta, efeito este dependente do endotélio, já que a aldosterona aumentou a resposta à fenilefrina nos anéis sem endotélio (Liu *et al.*, 2003). O tratamento com o inibidor do receptor de aldosterona eplerenona no presente estudo não promoveu qualquer efeito na contratilidade à fenilefrina quando comparado aos demais grupos. Vale lembrar que o presente trabalho refere-se a um modelo experimental e os dados supracitados se baseiam em infusões agudas para a avaliação dos efeitos a curto-prazo exercidos pela aldosterona. Apesar disto, estes efeitos agudos da aldosterona podem ser relevantes e contribuir para o entendimento de suas ações fisiopatológicas na IC e na hipertensão arterial (Farquharson & Struthers, 2002a; Liu *et al.*, 2003). Um exemplo do efeito direto da aldosterona na reatividade endotelial foi dado por Farquharson e Struthers, que descreveram este mineralocorticoide como sendo capaz de induzir agudamente a disfunção endotelial, por redução da biodisponibilidade do NO, mesmo sem alterações na pressão arterial sistêmica, fenômeno este descrito como vasculopatia induzida por aldosterona (“aldosterone-induced vasculopathy”) (Farquharson & Struthers, 2002a). Estes relatos em conjunto sugerem que a aldosterona pode exercer também efeitos em curto prazo na reatividade vascular, e que o tratamento com o inibidor de aldosterona parece ser uma importante terapêutica na fase inicial da IC, sem, no entanto, ter sido elucidado até então os possíveis mecanismos relacionados aos efeitos benéficos na vasculatura destes fármacos nesta fase.

A disfunção endotelial tem sido descrita como estritamente relacionada ao risco de eventos cardiovasculares futuros (Suwaidi *et al.*, 2000; Gokce *et al.*, 2002). A função endotelial é, portanto, considerada como um forte sinalizador do risco cardiovascular (Vita & Keaney, 2002), sendo assim um tema bastante focado para a investigação clínica e experimental. No presente estudo foi empregada a

acetilcolina (ACh) para a avaliação da função endotelial, que medeia um relaxamento dependente do endotélio ao atuar em receptores muscarínicos endoteliais (Moncada *et al.*, 1991). Aqui a resposta máxima e a sensibilidade vasodilatadora mediada por ACh apresentou-se reduzida já em uma fase inicial após infarto. A vasodilatação dependente do endotélio está acentuadamente alterada na IC congestiva, contribuindo para a resistência periférica aumentada e a vasoconstrição sistêmica (Drexler *et al.*, 1992). O prejuízo no relaxamento dependente do endotélio tem sido descrito em pacientes com IC crônica (ICC) (Kubo *et al.*, 1991; Katz *et al.*, 1992; Hornig *et al.*, 1998b), contribuindo para o aumento da resistência vascular. Foi demonstrado que em artérias de condutância de pacientes com IC houve prejuízo no relaxamento induzido por ACh, enquanto os efeitos da adenosina e trinitrato de glicerina estavam preservados (Ramsey *et al.*, 1995). Também estudos experimentais em ratos com ICC após IM (Ontkian *et al.*, 1991; Drexler & Lu, 1992; Mulder *et al.*, 1996; Bauersachs *et al.*, 1999) demonstram esta redução na capacidade vasodilatadora dependente do endotélio-NO em diversos leitos vasculares. Apesar disto, outros estudos demonstram não haver diferenças neste parâmetro. Em membro posterior de ratos não foram demonstradas diferenças nas curvas de vasodilatação à ACh realizadas em ratos 1, 3, 5 e 13 semanas após o infarto (Ceiler *et al.*, 1999). Em artérias caudais de ratos, após infarto do miocárdio experimental, não foram observadas alterações nas respostas vasodilatadoras à ACh e nitroprussiato de sódio (NPS) (Meerson *et al.*, 1993). Um outro estudo demonstrou até mesmo o aumento do relaxamento à ACh em ratos 4 semanas após infarto (da Cunha *et al.*, 2004). A explicação possível para estas diferenças na literatura, pode ser devido à realização dos estudos em diferentes períodos de tempo, leitos vasculares e severidade da IC. A exemplo disto, um estudo clínico demonstrou que a redução da resposta à ACh e NPS está relacionada à severidade clínica da IC (Carville *et al.*, 1998). Ressalta-se ainda que a maioria dos estudos supracitados foi realizada na fase crônica da IC.

A presença de disfunção endotelial avaliada pela vasodilatação à ACh na fase inicial após o infarto não se apresenta uniformemente descrita na literatura. Por exemplo, há estudos realizados sete dias após a cirurgia de infarto, que não observaram diferenças significativas nas curvas concentração-resposta à ACh após pré-contracção com norepinefrina quando comparadas ao grupo Sham (Teerlink *et al.*, 1993; Teerlink *et al.*, 1994a). O primeiro estudo mostrou diferenças no

relaxamento à ACh apenas 4 ou 16 semanas após IM, ressaltando que a disfunção endotelial seria um processo de evolução tempo-dependente, exercendo um papel minoritário na fase inicial da IC. Todavia, um estudo de Wagner e colaboradores demonstrou uma redução significativa no relaxamento à ACh em aortas de ratos apenas 2 horas após a cirurgia do infarto (Wagner *et al.*, 2001b). Hasegawa *et al.* estudando coronárias de coelhos duas semanas após infarto do miocárdio, encontraram a função vasodilatadora prejudicada (Hasegawa *et al.*, 2000). Da mesma maneira, resultados prévios de nosso laboratório demonstraram haver uma redução da resposta vasodilatadora à ACh em artérias caudais de ratos aos 30 e já aos 3 dias após infarto do miocárdio (Pereira *et al.*, 2005; Sartorio *et al.*, 2005).

O tratamento com eplerenona foi capaz de normalizar a resposta máxima vasodilatadora à ACh, sem, entretanto, alterar a sensibilidade. A aldosterona tem sido considerada como uma importante influenciadora da função vascular, o que é bastante razoável já que esta pode ser produzida no endotélio (Takeda *et al.*, 1996) e músculo liso vascular (Hatakeyama *et al.*, 1994). Também os receptores de mineralocorticóides se fazem presentes neste tecido (Kornel *et al.*, 1988; Hatakeyama *et al.*, 1994; Takeda *et al.*, 1997). Os efeitos deletérios da aldosterona que levam à disfunção vascular incluem, além da retenção hidro-salina, redução da complacência arterial e venosa (Rietzschel *et al.*, 2000), aumento da resistência vascular periférica (Wehling *et al.*, 1998) e prejuízo do controle vascular autonômico parasimpático levando à disfunção do baroreflexo (Yee & Struthers, 1998; Duprez *et al.*, 2000). A maioria dos relatos que demonstram a aldosterona como uma promotora de efeitos danosos à vasculatura provém de resultados a partir de um bloqueio crônico da aldosterona por espironolactona ou eplerenona. Em primatas em dieta pró-aterosclerótica, o tratamento com eplerenona recuperou o relaxamento à ACh que estava reduzido nos animais placebo (Takai *et al.*, 2005). Em pacientes com IC, a espironolactona promoveu melhora significativa na vasodilatação dependente do endotélio mediada por ACh e aumentou a biodisponibilidade do NO (Farquharson & Struthers, 2000). Bauersachs e colaboradores demonstraram experimentalmente em ratos que a espironolactona adicionada ao tratamento com inibidor da ECA, em um tratamento crônico, promove uma melhora na disfunção vasomotora atribuída a uma normalização da resposta vasodilatadora mediada por NO, além de uma modulação benéfica no balanço entre a produção de NO e produção e ânions superóxido (Bauersachs *et al.*, 2002). Mais recentemente outro

estudo demonstrou a eplerenona promovendo a normalização do relaxamento dependente do endotélio quando associado ao inibidor da ECA trandolapril (Schafer *et al.*, 2003) por mecanismos similares aos acima descritos. Todavia, todos estes estudos foram referentes a avaliações realizadas na fase crônica da IC, seja experimental ou clínica. O atual estudo é pioneiro ao buscar os mecanismos envolvidos nos benefícios do tratamento com eplerenona na disfunção endotelial em uma fase inicial após o infarto.

Para avaliar se a redução do relaxamento dependente do endotélio poderia estar relacionada à disfunção dos mecanismos vasodilatadores intrínsecos ao músculo liso vascular em resposta ao NO, foram feitas curvas concentração-resposta com um doador de NO, o DEA NONOate. Estas foram realizadas após incubação com um composto inibidor da NOS, o LNNA, para prevenir a participação da liberação basal de NO. A vasodilatação independente do endotélio mediada pelo DEA NONOate, não foi diferente entre os grupos estudados. Por outro lado, Katz e colaboradores relataram redução na resposta vasodilatadora à nitroglicerina em pacientes com IC congestiva, comparados a indivíduos normais, sugerindo uma reatividade reduzida do músculo liso vascular à vasodilatação mediada por GMPc (Katz *et al.*, 1993). Isto demonstraria prejuízo no mecanismo vasodilatador nas células musculares lisas, o que poderia contribuir inclusive para a redução da resposta vasodilatadora à ACh. Em ratos infartados após 8 semanas, ficou demonstrada uma redução na produção de cGMP sob estímulo com NPS, apesar do aumento na expressão da guanilato ciclase solúvel (GCs) (Bauersachs *et al.*, 1999). Esta resposta foi normalizada após a adição do varredor de radicais livres Tiron, o que se justifica pela atividade da GCs ser susceptível aos ânions superóxido. Foi demonstrado também que o tratamento “per se” com espironolactona em ratos por 11 semanas após o infarto reduz a sensibilidade ao NPS, o que mascararia em parte o benefício trazido por este fármaco ao relaxamento induzido por ACh (Bauersachs *et al.*, 2002). Em outro estudo em animais infartados tratados cronicamente com eplerenona foi observada a mesma alteração anteriormente citada, sendo justificada pela redução da atividade da GCs induzida pela angiotensina II circulante, já que com o uso combinado da eplerenona com o inibidor da ECA, trandolapril, esta alteração não foi observada (Schafer *et al.*, 2003). Todavia, numerosos estudos, em sua maioria, demonstram resultados semelhantes aos aqui apresentados, corroborando-os. A exemplo disto, o relaxamento independente do endotélio

permaneceu inalterado em aortas de ratos após infarto do miocárdio (Teerlink *et al.*, 1993; Teerlink *et al.*, 1994a; Bauersachs *et al.*, 1999; Bauersachs *et al.*, 2000) bem como em outros leitos vasculares como artérias coronárias (Hasegawa *et al.*, 2000), pulmonares, mesentéricas (Baggia *et al.*, 1997) e do membro posterior (Gaballa & Goldman, 1999). Aos 7 dias após infarto, aortas de rato não apresentaram diferenças significativas com relação ao grupo Sham na vasodilatação a um doador de NO, o NPS (Teerlink *et al.*, 1993). Da mesma forma um estudo em hamsters cardiomiopáticos não detectou diferenças da resposta ao NPS, tanto em uma fase onde não havia sinais de IC como quando esta já se encontrava estabelecida (Crespo, 1999). Outro resultado demonstrou não haver diferenças no relaxamento ao NPS em aortas de ratos nas primeiras horas após o infarto (Wagner *et al.*, 2001b). Os resultados aqui demonstrados sugerem que a reduzida resposta à acetilcolina observada neste estudo não parece estar relacionada a uma reduzida responsividade do músculo liso vascular ao NO, mas a outros possíveis mecanismos relacionados, como, por exemplo, devido à disfunção da via do NO e estresse oxidativo vascular.

Em vasos de grande calibre como a aorta, o NO tem sido descrito como o vasodilatador predominante liberado no relaxamento dependente do endotélio (Moncada *et al.*, 1991; Nagao *et al.*, 1992). O mecanismo chave sugerido para a explanação da redução do relaxamento dependente do endotélio é a redução da biodisponibilidade de NO. Esta por sua vez está relacionada ao balanço entre a sua produção e degradação. Alterações na via do NO têm sido extensivamente descritas em estudos clínicos e experimentais após o infarto do miocárdio e IC. Já foi observada na IC experimental, em ratos e cães, a redução da biodisponibilidade do NO pelo decréscimo na expressão vascular da principal enzima responsável pela sua liberação, a eNOS (Comini *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1996). Em artérias de resistência de ratos, 3 semanas após infarto, a expressão aumentada da eNOS, por transfecção de seu cDNA, promoveu uma melhoria na vasodilatação por ACh, bem como nos níveis de eNOS, previamente demonstrados reduzidos nos ratos com IC (Gaballa & Goldman, 1999). Tem sido sugerido que os níveis circulantes de citocinas na IC crônica, especialmente TNF- α , poderiam ser responsáveis por uma resposta prejudicada a agonistas como acetilcolina, via um prejuízo direto na liberação de NO e desestabilizando os níveis do mRNA da eNOS (Yoshizumi *et al.*, 1993; Mendes Ribeiro *et al.*, 2001). Em pacientes com cardiomiopatia, a atividade significativa da

enzima induzível (iNOS) é acompanhada pela redução da atividade da sintase constitutiva (eNOS) (de Belder *et al.*, 1993). Indo de encontro a esses resultados, Bauersachs e colaboradores demonstraram um aumento na expressão vascular da eNOS 8 semanas após infarto do miocárdio, concomitante ao aumento do estresse oxidativo vascular, o que promoveria uma disfunção endotelial apesar deste aumento (Bauersachs *et al.*, 1999). A liberação basal de NO também foi encontrada aumentada na IC em pacientes (Drexler *et al.*, 1992; Habib *et al.*, 1994).

Apesar da maioria destes relatos terem demonstrado a redução da eNOS, estes foram realizados em uma fase crônica após infarto e há uma carência de dados sobre o que ocorreria com esta enzima em uma fase mais inicial. Os resultados obtidos pela técnica de Western blot no presente estudo demonstraram que apesar da expressão da eNOS estar inalterada aos 7 dias após infarto, houve uma diminuição da expressão desta enzima em sua forma fosforilada no resíduo Ser¹¹⁷⁷ (peNOS) com significativa redução da razão peNOS/eNOS nos animais infartados quando comparados aos Sham, e este parâmetro foi normalizado pelo tratamento com eplerenona. Estes dados foram corroborados ainda por análises imunohistoquímicas, onde se observou uma tendência similar aos resultados obtidos com Western Blot. Estudos prévios demonstraram a importância da fosforilação da eNOS na regulação da quantidade de NO produzido. A fosforilação deste resíduo Ser¹¹⁷⁷ está associada com um aumento na produção de NO e ativação da enzima em concentrações muito mais baixas de cálcio/calmodulina do que a eNOS não fosforilada (Chen *et al.*, 1999b; Dimmeler *et al.*, 1999; Michell *et al.*, 1999). Um outro estudo, onde foi analisada a fosforilação da eNOS, mostrou haver o aumento do fluxo de elétrons através do domínio reductase desta, e conseqüentemente a produção de NO, aumentou de duas a três vezes acima do nível basal (McCabe *et al.*, 2000; Fleming & Busse, 2003). Estudos que compararam o potencial de fosforilação de diferentes resíduos Ser, concluíram que o resíduo Ser¹¹⁷⁷ exerce um papel central na produção de NO, enquanto no outro resíduo avaliado (Ser⁶³³) nenhuma fosforilação foi detectada ou nenhuma conseqüência da fosforilação foi evidente (Dimmeler *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 1999). Estes relatos sugerem a importância da fosforilação da eNOS para a sua atividade e produção de NO. Sendo assim, a redução desta forma fosforilada aqui observada poderia ser um indicativo de redução da atividade desta enzima no grupo IM. Stathopoulos *et al.* também encontraram uma redução na atividade da isoforma cálcio-dependente da NOS em

aorta de ratos, oito semanas após infarto do miocárdio (Stathopoulos *et al.*, 2001). Smith e colaboradores, analisando aortas de cães com IC, demonstraram haver redução na produção de nitrito, uma medida indireta da atividade da eNOS, tanto em resposta à estimulação pela ACh como pela bradicinina (Smith *et al.*, 1996). Com isto, estes autores sugeriram que a vasodilatação dependente do endotélio estaria atenuada devido a uma redução da atividade da eNOS. Fraccarollo e colaboradores demonstram aumento dos níveis de peNOS miocárdicos pelo tratamento crônico com eplerenona associada a trandolapril em ratos com IC, o que foi relacionado aos à prevenção do remodelamento ventricular (Fraccarollo *et al.*, 2003). Diferentemente dos resultados do presente trabalho, foi relatado um aumento na expressão da eNOS pela monoterapia com eplerenona em aortas de ratos com IC crônica, que tinham este parâmetro inicialmente reduzido (Schafer *et al.*, 2003). O mesmo grupo havia demonstrado previamente que a combinação da terapia com espironolactona e inibidor da ECA promoveu o aumento da expressão da eNOS em aorta de ratos após infarto (Bauersachs *et al.*, 2002).

Em suma, este importante mecanismo modulador da eNOS poderia contribuir para elucidar a melhoria da disfunção endotelial observada nos animais tratados com eplerenona, bem como participar da redução do estresse oxidativo vascular pelo balanço positivo entre a produção e inativação do NO. Foi descrito também que um dos estímulos capazes de promover a fosforilação da eNOS é o estresse de cisalhamento (*shear stress*), pela ativação da serina quinase Akt e proteína quinase A (PKA), que fosforila a Ser¹¹⁷⁷ e aumenta a atividade eNOS (Go *et al.*, 1998; Dimmeler *et al.*, 1999; Fisslthaler *et al.*, 2000). Desta maneira, resta a dúvida de que este aumento na proporção de peNOS/eNOS seja efeito primário da droga ou ocorra como consequência das melhorias hemodinâmicas promovidas pela eplerenona. Porém este efeito hemodinâmico não parece ser a razão central para este aumento da peNOS/eNOS na presente avaliação, já que apesar de haver prejuízo de diversos parâmetros hemodinâmicos, como por exemplo a função ventricular esquerda (reduzida dP/dt mínima e máxima), nos animais IM e melhoria destes com o tratamento com eplerenona, a PSVE e PAM se mostraram reduzidas no grupo IM e o tratamento com eplerenona não foi capaz de alterar este parâmetro.

Tendo em vista a inter-relação entre os componentes do SRAA, bem como a sua ativação após o IM, correlacionando-o com a disfunção vasodilatadora, avaliamos também a resposta vascular constritora à angiotensina I e II. Nossos

resultados demonstraram um aumento na reatividade à angiotensina I nos animais infartados e uma redução significativa tanto na sensibilidade quanto na resposta máxima pela terapia com eplerenona, sem, no entanto, ser observada diferença na reatividade à angiotensina II. Corroborando estes dados funcionais, em paralelo, os estudos de biologia molecular por Western Blot e imunohistoquímica demonstraram que houve um aumento da expressão da ECA vascular nos animais infartados, tendência esta significativamente reduzida pelo tratamento com eplerenona.

Como a angiotensina I não possui efeito vasoconstritor próprio, as contrações promovidas por este peptídeo refletem de uma maneira indireta a conversão de angiotensina I a angiotensina II, ou seja, a atividade da ECA, já que as vias alternativas de formação da ECA, como a quimase, têm sido descritas como praticamente não atuantes na vasculatura de ratos (Okunishi *et al.*, 1993). Outros estudiosos relataram que a presença de vias alternativas em artérias de ratos existe, porém não exerce papel funcional central na conversão de angiotensina I em II (Inoue *et al.*, 1999), indo de encontro a dados provenientes de ensaios enzimáticos bioquímicos que mostraram a predominância de outras vias que não a da ECA em artérias de ratos (Akasu *et al.*, 1998). Saye e colegas também descreveram a angiotensina I como o análogo mais potente testado em preparações de aorta de coelho com endotélio intacto (Saye *et al.*, 1984).

Um dos motivos para explicar o aumento da resposta vasoconstritora à angiotensina I seria o aumento da expressão ou atividade da ECA. Um estudo demonstrou que a aldosterona induz um aumento na expressão e atividade da ECA em cardiomiócitos neonatais de ratos (Wang *et al.*, 2002). O estudo de Harada e colaboradores vem ao encontro destes dados, já que demonstrou o aumento expressivo no mRNA da ECA em cultura de cardiomiócitos neonatais na presença de aldosterona (Harada *et al.*, 2001). Keidar e colaboradores mostraram que a aldosterona pode promover tanto o aumento da atividade da ECA quanto a expressão macrofágica do seu mRNA, relacionando a ela um efeito aterogênico (Keidar *et al.*, 2004). Em outro trabalho, estudiosos demonstraram experimentalmente que a aldosterona aumentava a densidade de receptores da ECA em modelos experimentais (Sun *et al.*, 1993). Também em células endoteliais de aortas de ratos (RAECs) em cultivo foi atualmente demonstrado que a aldosterona induz um aumento na expressão da ECA (Sugiyama *et al.*, 2005). Estes dados indicam um mecanismo de feedback positivo da aldosterona e ECA, no

sistema renina-angiotensina-aldosterona, possivelmente envolvido no desenvolvimento da disfunção endotelial e patologias cardiovasculares induzidas por aldosterona. Estudos ressaltam que a aldosterona potencializa os efeitos mediados pela angiotensina II. Hatakeyama e colaboradores mostraram que a aldosterona adicionada ao meio de cultura de células musculares lisas vasculares humanas potencializa a hipertrofia induzida por angiotensina II (Hatakeyama *et al.*, 1994). Em outro estudo ficou demonstrado que a aldosterona, sintetizada localmente, pode mediar os efeitos proliferativos da angiotensina II, via receptor AT1, no músculo liso vascular de ratos (Xiao *et al.*, 2000), além de potencializar a sinalização induzida por angiotensina II (Mazak *et al.*, 2004).

A atividade aumentada da renina plasmática em ratos com IC foi pobremente correlacionada à disfunção endotelial em ratos (Teerlink *et al.*, 1993). A primeira evidência em humanos demonstrando a dissociação entre a ativação dos componentes do SRAA plasmática e atividade da ECA vascular in vivo foi relatado por Farquharson e Struthers (Farquharson & Struthers, 2002b). Este estudo mostra que a atividade da ECA circulante correlaciona-se muito pouco com o que acontece no nível tecidual. Isto condiz com a observação de camundongos Knockout para ECA, onde os efeitos fisiológicos desta resultaram da ECA tecidual (Esther *et al.*, 1997). A atividade da ECA tecidual parece ser mais importante que a atividade da ECA circulante e um estudo de Hornig e colaboradores confirma claramente a maior importância dos inibidores da ECA com maior afinidade tecidual que aqueles com menor (Hornig *et al.*, 1998a).

O aumento da atividade da ECA tecidual tem sido relacionado com a disfunção endotelial após infarto. Nesse sentido, o aumento da atividade da ECA resultaria no aumento da degradação da bradicinina e da formação de angiotensina II, além da possibilidade da indução local da produção de aldosterona (Yan *et al.*, 2003). A angiotensina II, que tem seus níveis plasmáticos aumentados na IC, por sua vez estimula a formação local de ânions superóxido pela estimulação de uma NAD/NADPH oxidase, podendo contribuir para um quadro de estresse oxidativo (Rajagopalan *et al.*, 1996a; Drexler & Hornig, 1999), o que será discutido mais adiante. Outros achados demonstram que a inibição da ECA melhorou a função endocárdica e do endotélio vascular em ratos após infarto. A exemplo disso, o captopril foi capaz de prevenir a redução do mRNA da eNOS cardíaco e aumentar a produção basal de NO em artérias de resistência (Ceiler *et al.*, 1999; Qi *et al.*, 1999).

O estudo clínico TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) foi o primeiro a demonstrar que a inibição sustentada da ECA melhora a disfunção endotelial (Mancini *et al.*, 1996). Além da vasodilatação melhorada nos pacientes fazendo uso deste medicamento (Quinapril), foi observada uma concentração mais baixa de angiotensina II vascular e maior viabilidade do NO por reduzida produção de ânions superóxido e aumento de cininas. O captopril também foi capaz de prevenir a redução do mRNA da eNOS cardíaco e aumentar a produção basal de NO em artérias de resistência (Ceiler *et al.*, 1999; Qi *et al.*, 1999).

A porção citoplasmática da ECA, mais especificamente a Ser¹²⁷⁰, é fosforilável e considerada o mais importante sítio de fosforilação da ECA. Esta fosforilação aumenta a estabilidade e expressão desta enzima na membrana plasmática endotelial (Kohlstedt *et al.*, 2002). Apesar da carência de dados que demonstrem a participação desta fosforilação da ECA como um mecanismo modulador (Kohlstedt *et al.*, 2004; Kohlstedt *et al.*, 2005), procedeu-se à investigação da expressão da ECA fosforilada (pECA) no extrato de aorta dos grupos estudados no presente trabalho. Na expressão da pECA por Western Blot foi observada uma tendência similar àquela da expressão da ECA, observando-se uma correlação positiva entre as duas medidas. Isto sugere a possibilidade de um mecanismo regulatório comum para estes dois fatores.

Estudiosos observaram um aumento da atividade da ECA em artérias sem endotélio quando comparadas com artérias com endotélio, provavelmente devido à presença de ECA na adventícia e no músculo liso vascular (Arnal *et al.*, 1994; Fernandez-Alfonso *et al.*, 1997). Crespo descreveu um importante aumento na atividade da ECA em aortas em uma fase inicial no desenvolvimento da IC em hamsters, sem alteração deste parâmetro no plasma ou miocárdio destes animais (Crespo, 1999). O aumento da atividade da ECA tecidual também tem sido relacionado com a disfunção endotelial após infarto.

Alguns trabalhos têm demonstrado uma inter-relação entre a atividade da ECA e a via do NO. Um exemplo disso são relatos onde a administração crônica de N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) promoveu o aumento da atividade da ECA cardíaca e vascular, sem, no entanto, alterar este parâmetro no soro e em outros órgãos (Takemoto *et al.*, 1997b). Com um tratamento similar, Michel e colegas, demonstraram um aumento vascular da atividade da ECA, restrito à camada média e adventícia, sem afetar a atividade da ECA no soro (Michel *et al.*, 1996). A

expressão da ECA também se mostrou aumentada 2 dias após a remoção endotelial por balão na artéria carótida de ratos (Fernandez-Alfonso *et al.*, 1997). Akermann *et al.* (1998) demonstraram que NO e compostos doadores de NO inibem a atividade da ECA, plasmática e vascular, em carótidas de ratos, de uma dependente de maneira concentração e competitiva, sugerindo que o NO poderia interagir com o(s) centro(s) ativos da enzima. O mesmo estudo mostrou ainda que a liberação de NO pelo endotélio reduz fisiologicamente a conversão de angiotensina I a angiotensina II. Contrastando com estes dados foi descrita uma redução da potência contrátil da angiotensina I após a remoção do endotélio em femorais de cães (Mombouli *et al.*, 1991). Este resultado possivelmente é devido à uma redução da conversão de angiotensina I em angiotensina II, já que a ECA está localizada primordialmente no endotélio vascular.

Apesar do atual estudo não ter demonstrado diferenças significativas na reatividade à angiotensina II, Didion e colaboradores, estudando arteríolas de músculo esquelético 8 semanas após infarto do miocárdio, encontraram resposta vasoconstritora aumentada à vasopressina e angiotensina II, inferindo que isto poderia ser consequência de redução na biodisponibilidade do NO (Didion *et al.*, 1997). A preincubação de anéis de aorta com aldosterona leva a quase o dobro da resposta contrátil à angiotensina II, enquanto a contração ao KCl permanece inalterada (Ullian *et al.*, 1996). Em artérias de hamsters cardiomiopáticos em diversos períodos de evolução da cardiomiopatia a resposta vascular vasoconstritora à angiotensina II estava aumentada (Crespo, 1999). Em coronárias a aldosterona potencializou o efeito vasoconstritor da angiotensina II (Chai *et al.*, 2005). Também Ullian e colaboradores mostraram que a aldosterona promove um aumento dependente de tempo e concentração no número de receptores AT₁, sem, no entanto, aumentar a afinidade destes, além de prevenir a sua *downregulation* e desensibilização induzida por angiotensina II. Isto demonstra que a aldosterona pode potencializar as respostas pressóricas da angiotensina II via efeitos nos seus receptores (Ullian *et al.*, 1992; Ullian *et al.*, 1993; Ullian & Fine, 1994). Este aumento pela aldosterona nos receptores de angiotensina II parece ocorrer independente da atividade da renina plasmática, o que levaria ao *feedback* negativo da angiotensina II (Schiffrin *et al.*, 1985). Todavia, corroborando os resultados aqui demonstrados, um estudo em humanos encontrou um aumento na resposta vascular à angiotensina I, indicando uma maior conversão de angiotensina I a angiotensina II, sem, no entanto,

ter sido observada alteração na resposta vascular à angiotensina II (Farquharson & Struthers, 2002b).

Da mesma maneira que os resultados aqui relatados, estudos indicam para os benefícios da inibição dos receptores de mineralocorticóides e melhoria da função vascular relacionados ao SRAA. Em primatas não humanos em dieta pró-aterosclerótica, foi demonstrado que aldosterona promove um aumento da atividade da ECA vascular, o que foi suprimido com o tratamento por eplerenona (Takai *et al.*, 2005). Um estudo no qual pacientes com IC receberam terapia considerada ótima (β bloqueadores, estatinas e inibidor da ECA) também demonstrou uma melhoria adicional no relaxamento dependente do endotélio mediado por ACh com o tratamento por espironolactona (Macdonald *et al.*, 2004). A contração induzida por angiotensina I foi reduzida pela espironolactona nestes pacientes, indicando que houve uma menor conversão de angiotensina I a angiotensina II, além daquela inibição obtida pelo tratamento com o inibidor da ECA. O mesmo fato foi demonstrado em pacientes com IC mais severa (Farquharson & Struthers, 2000). Em recente estudo Fraccarollo e colaboradores demonstraram em ratos com IC que a eplerenona previne a *upregulation* da ECA no coração insuficiente (Fraccarollo *et al.*, 2005). A adição de espironolactona à terapia com inibidor da ECA em ratos com IC após IM se mostrou eficiente nos vasos sanguíneos, aumentando a biodisponibilidade do NO, associada com reduzida produção de O_2^- (Bauersachs *et al.*, 2002). Também o uso da eplerenona associado ao trandolapril promoveu a normalização da disfunção endotelial em ratos com IC (Schafer *et al.*, 2003). O uso da eplerenona, bem como a terapia inibindo a ECA ou o receptor AT1, foram capazes de reduzir o citado efeito, bem como o efeito pró-oxidante e pró-aterogênico da aldosterona.

De fundamental importância para biodisponibilidade do NO é, além de sua produção, a sua taxa de degradação. Evidências sugerem que a disfunção endotelial poderia resultar da redução da liberação ou da inativação aumentada do NO (Comini *et al.*, 1996; Katz *et al.*, 1999). Os ânions superóxido parecem ser a principal fonte de inativação do NO (Gryglewski *et al.*, 1986), e ao combinar-se com este forma o reativo radical peroxinitrito ($ONOO^-$) (Beckman *et al.*, 1990; Beckman, 1996; Denninger & Marletta, 1999; Griendling *et al.*, 2000b; Ortega Mateo & Amaya Aleixandre de, 2000) o qual pode formar radicais hidroxil e promover a nitração de resíduos de tirosina (Bouloumie *et al.*, 1997). O peroxinitrito pode, além de reduzir a

biodisponibilidade do NO, oxidar grupos sulfidril teciduais (Radi *et al.*, 1991b), desoxirribose (Beckman *et al.*, 1990) e lipídios (Radi *et al.*, 1991a; Rubbo *et al.*, 1994). Esta última pode levar à formação de lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL) (Tomasian *et al.*, 2000) que por sua vez, juntamente a outros produtos de peroxidação lipídica, pode reduzir a expressão da eNOS em células endoteliais (Liao *et al.*, 1995).

Trabalhos com animais experimentais (Bauersachs *et al.*, 1999; Schafer *et al.*, 2003; Schafer *et al.*, 2004) e também com pacientes após infarto do miocárdio (Hornig *et al.*, 1998b; Katz *et al.*, 1999), sugeriram ou demonstraram um aumento na produção de ânions superóxido, o que estaria reduzindo a viabilidade do NO e levando à disfunção endotelial. O aumento dos níveis de citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Heba *et al.*, 2001) também pode estar envolvido nessas alterações do metabolismo oxidativo após o infarto. O TNF- α pode causar disfunção endotelial por aumentar a produção de radicais livres derivados do oxigênio, os quais, a seu turno, destroem o NO produzido pelo endotélio. O TNF também induz a apoptose do endotélio mediada pelo estresse oxidativo (Ferrari *et al.*, 1998; Hornig *et al.*, 1998b; Landmesser *et al.*, 2000) além de inibir a expressão da SOD extracelular (Marklund, 1992). Evidências experimentais sugerem que o TNF- α é capaz de prejudicar a liberação estimulada de EDRF (Aoki *et al.*, 1989). Katz *et al.* demonstraram ainda que os níveis plasmáticos de TNF- α , em pacientes com IC, se relacionam ao grau de disfunção endotelial como por estímulo à ACh (Katz *et al.*, 1994).

A produção de ânions superóxido nos resultados aqui apresentados estava aumentada nos anéis de aorta dos animais IM Pla em um ensaio bioquímico de aumento de quimioluminescência por lucigenina. Este dado foi confirmado também *in situ* com o corante sensível ao O₂⁻ hidroetidina que, ao ser oxidado a brometo de etídio, produz fluorescência. Em ambos os protocolos, este aumento na produção de O₂⁻ no grupo IM Pla foi significativamente reduzido nos animais tratados com eplerenona. O efeito da aldosterona como promotora de estresse oxidativo vascular tem sido enfaticamente sugerido por estudos em diversos vasos sanguíneos como coronárias (Sun *et al.*, 2002) e vasos periféricos (Bauersachs *et al.*, 2002; Viridis *et al.*, 2002; Schafer *et al.*, 2003). Uma sugestão possível para o benefício promovido no estresse oxidativo pela eplerenona seria o aumento de potássio circulante. O

potássio inibe a formação endotelial de radicais livres (McCabe *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1998), e, portanto, os efeitos poupadores de K^+ da eplerenona poderiam contar para a redução da geração de O_2^- . Alguns estudos em humanos, no entanto, mostraram que o tratamento com eplerenona, em doses comparáveis, não promoveu aumentos na concentração sérica de K^+ (Delyani, 2000). Porém o grande estudo clínico EPHESUS mostrou incidência de hipercalemia nos indivíduos com disfunção ventricular esquerda tratados com eplerenona, após infarto do miocárdio (Pitt *et al.*, 2003). Outros efeitos seriam aqueles mediados pela inibição dos receptores de mineralocorticóides. O tratamento com o inibidor espironolactona atenua o efeito da aldosterona tanto no estresse oxidativo como em uma resposta pró-inflamatória (Sun *et al.*, 2002). Em coelhos alimentados com uma dieta pro-aterosclerótica, a eplerenona promoveu um efeito protetor normalizando a produção de ânions superóxido e melhorando a disfunção endotelial (Rajagopalan *et al.*, 2002). A espironolactona promoveu a normalização da produção vascular de ânions superóxido quando medida pela quimioluminescência aumentada por lucigenina, em ratos com IC crônica (Bauersachs *et al.*, 2002). Também a eplerenona em um tratamento crônico após infarto experimental, mostrou o mesmo benefício anteriormente descrito e também a normalização da produção de O_2^- quando avaliada *in situ* (Schafer *et al.*, 2003). Nestes dois estudos a melhoria da produção de radicais livres foi observada tanto quando associada a espironolactona ou eplerenona a um inibidor da ECA, como nos grupos tratados apenas com um destes fármacos. Nestes ratos com IC foi sugerido que tanto o aumento da expressão e atividade da eNOS como a normalização da formação de O_2^- devem ser cruciais para o efeito benéfico do tratamento com o inibidor do receptor de mineralocorticóides no balanço NO/O_2^- (Bauersachs *et al.*, 2002).

Após um período de incubação dos anéis com o inibidor das sintases de óxido nítrico (LNNA), foi observado uma tendência de aumento na porcentagem de produção de radicais livres nos grupos Sham e IM Eple quando comparados ao IM Pla, apesar de não haver significativa. Esta alteração percentual na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) com o uso do LNNA, mesmo que tendencial, pode sugerir a contribuição de uma disfunção na via da NOS na produção de ERO. Quando há um desacoplamento da eNOS, esta passa a representar uma fonte potencial de ânions superóxido (Wever *et al.*, 1997; Raman *et al.*, 1998; Vasquez-Vivar *et al.*, 1998). Um prejuízo do relaxamento dependente e independente do

endotélio, associado a uma menor produção de NO derivado de plaquetas foi relatado como associado ao desacoplamento desta enzima em pacientes com IC congestiva (Dixon *et al.*, 2003). Isto sugere ainda a possibilidade de haver uma menor liberação basal de NO para a proteção destes vasos contra a produção de ânions superóxido. Alguns relatos indicam uma redução na liberação basal de NO tanto em modelos animais (Teerlink *et al.*, 1994a) como em estudos em pacientes (Mohri *et al.*, 1997) ou não observam alterações nesta liberação (Kubo *et al.*, 1994). Para elucidar as outras possíveis fontes deste estresse oxidativo vascular associado à disfunção endotelial, foi investigada a participação relativa da enzima pró-oxidante NAD(P)H e antioxidante MnSOD.

Apesar de alguns sistemas de produção de ERO terem sido descritos na vasculatura, as niconidamida adenina dinucleotideo/nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato oxidases reduzidas (NAD(P)H oxidases) agora são reconhecidas como a principal fonte de ERO (Griendling *et al.*, 2000b; Gorlach *et al.*, 2002; Bokoch & Knaus, 2003; Lassegue & Clempus, 2003). A geração vascular de ânions superóxido tem sido relacionada à NAD(P)H oxidase presente nas células inflamatórias, células endoteliais, músculo liso e fibroblastos adventiciais (Mohazzab *et al.*, 1994; Pagano *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1996; Rajagopalan *et al.*, 1996a; Pagano *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998). A subunidade p22^{phox} da NAD(P)H-oxidase foi reconhecida como sendo de fundamental importância na atividade desta última no músculo liso vascular, um componente crítico para a geração vascular de ânions superóxido, bem como tendo um papel central para esse sistema oxidase na hipertrofia vascular (Ushio-Fukai *et al.*, 1996). Esta subunidade foi encontrada nas três camadas da vasculatura, nas células endoteliais, músculo liso da média e fibroblastos da adventícia, tanto em animais experimentais como em humanos (Van Heerebeek *et al.*, 2002). Um estudo demonstrou que para a indução de ERO no músculo liso vascular, foram necessárias diferentes concentrações de H₂O₂, sugerindo que as NAD(P)H oxidases do endotélio e músculo liso devem diferir com relação à sua sensibilidade redox e atividade (Li *et al.*, 2001). Recentemente foi demonstrado que antioxidantes reduzem a produção de ERO e a expressão da p22^{phox} em células endoteliais expostas a altas concentrações de glicose (Quagliaro *et al.*, 2003), o que fortaleceria a idéia de que ERO regulam a expressão e atividade da NAD(P)H oxidase nas células endoteliais. A depleção da p22^{phox} reduziu a proliferação das células endoteliais (Djordjevic *et al.*, 2005) e músculo liso vascular

(Jeong *et al.*, 2004) sugerindo que as NAD(P)H oxidases exercem um papel importante na regulação da proliferação destas células. Citocinas inflamatórias têm sido envolvidas no aumento da produção de ERO no tecido vascular. O TNF- α , que está elevado após o infarto, aumenta a p22^{phox} em cultura de células musculares lisas vasculares de ratos hipertensos, o que é abolido com um “antisense” para a p22^{phox}, indicando que esta subunidade da NAD(P)H oxidase seria de fundamental importância como fonte de ERO (De Keulenaer *et al.*, 1998). Também o uso deste “antisense” para p22^{phox} em células musculares lisas de aorta de ratos, inibiu a formação de ERO induzida por angiotensina II (Ushio-Fukai *et al.*, 1996). A infusão de angiotensina II por sete dias aumentou três vezes a expressão da subunidade p22^{phox} (Mollnau *et al.*, 2002). Viedt e colaboradores sugeriram que as ERO produzidas por p22^{phox} medeiam a ação da angiotensina sobre quinases protéicas que poderiam contribuir para a patogênese da aterosclerose (Viedt *et al.*, 2000). Interessantemente foi sugerido que a produção de ERO vascular, possivelmente gerada por NAD(P)H oxidase, leva ao aumento da expressão da p22^{phox} e daí uma geração sustentada de ERO é observada na disfunção endotelial, tornando-se um verdadeiro *feedback* positivo (Djordjevic *et al.*, 2005). A função endotelial prejudicada em modelos de hipertensão foi associada ao aumento da atividade da NAD(P)H oxidase e aumento da expressão da sua subunidade p22^{phox} (Rajagopalan *et al.*, 1996a; Fukui *et al.*, 1997; Ulker *et al.*, 2003). Nestes mesmos estudos o relaxamento foi parcialmente restaurado pela administração *in vivo* e *in vitro* de SOD (Rajagopalan *et al.*, 1996a; Fukui *et al.*, 1997). Polimorfismos da p22^{phox} são relacionados à atividade desta enzima e ao risco de doença coronariana (Gardemann *et al.*, 1999; Soccio *et al.*, 2005). Após o infarto foi demonstrado o aumento da expressão das subunidades p22^{phox} e gp91^{phox}, estando relacionadas ao remodelamento ventricular e à peroxidação lipídica (Fukui *et al.*, 2001). Também o aumento da expressão das subunidades p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e gp91^{phox} sugeriu que a NAD(P)H oxidase expressada em cardiomiócitos é a principal fonte de ERO envolvida na geração de sobrecarga de pressão na hipertrofia do ventrículo esquerdo, e pode também contribuir para mudanças fisiopatológicas como a ativação de quinases sensitivas ao redox e progressão da IC (Li *et al.*, 2002). Uma oxidase NAD(P)H-dependente também foi identificada na parede vascular aórtica, em ratos com IM crônico, como a principal fonte de ânions superóxido (Bauersachs *et al.*, 1999). Um relato de Widder e colaboradores encontraram em aortas de ratos

cronicamente infartados um aumento da geração de O_2^- acompanhado pelo aumento da expressão de outra subunidade da NAD(P)H, a $p47^{phox}$ (Widder *et al.*, 2004). Os resultados aqui apresentados relatam um aumento significativo da expressão protéica da subunidade $p22^{phox}$ da NAD(P)H oxidase nas aortas dos animais IM Pla quando comparados aos Sham. O tratamento com eplerenona foi capaz de reduzir significativamente este parâmetro. Isto poderia ser explicado em parte pela aldosterona promover a ativação da NAD(P)H oxidase (Sun *et al.*, 2002). Um aumento nos níveis de mRNA da subunidade $p22^{phox}$ da NAD(P)H oxidase em ratos DOCA-sal foi demonstrada quando em comparação aos sham, sugerindo que este fenômeno seria responsável pelo aumento da produção de O_2^- que contribuiria para o aumento da pressão arterial neste modelo experimental (Beswick *et al.*, 2001). Estes e os presentes resultados apresentados são confirmados pelo estudo de Bauersachs *et al.* (2002), no qual a espironolactona reduziu a expressão vascular do mRNA da $p22^{phox}$ em ratos após o infarto. Em parte esta seria a razão para a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio nos animais IM Pla quando comparados ao grupo IM Eple.

Outra explicação seria o aumento da expressão da subunidade vascular da NAD(P)H ou aumento da atividade da oxidase pela concentração elevada de angiotensina II (Griendling *et al.*, 1994; Rajagopalan *et al.*, 1996a; Mollnau *et al.*, 2002) ou da ECA vascular (Jalil *et al.*, 2005). Foi descrita a atividade aumentada da ECA tecidual e plasmática após infarto (Wollert *et al.*, 1994; Duncan *et al.*, 1997). A concentração de angiotensina II estava aumentada em extratos de aortas de ratos infartados aos sete dias após infarto (Duncan *et al.*, 1997). Isto poderia levar a uma indução do estresse oxidativo vascular por angiotensina II. Porém, mesmo o aumento da expressão da ECA nas aortas dos animais IM e com a redução aqui observada pelo tratamento com eplerenona da expressão e atividade da ECA vascular, este não parece ser o único meio para explicar a redução na produção de O_2^- observada com esta terapia. Em estudo prévio havia sido relatado que a monoterapia com espironolactona por nove semanas em ratos com IM, reduz a produção de O_2^- , efeito este apenas levemente observado no grupo tratado com um inibidor da ECA, o trandolapril (Bauersachs *et al.*, 2002). Da mesma forma, utilizando tratamento crônico com eplerenona, Shafer e colaboradores mostraram que a produção de O_2^- foi significativamente reduzida apenas com a administração de eplerenona (Shafer *et al.*, 2003). O mesmo efeito não foi observado utilizando-se trandolapril, bem como

a associação de eplerenona ao trandolapril, não trouxe benefício adicional a este parâmetro. Isto sugere que existem outros mecanismos independentes da estimulação pela angiotensina II, na indução do estresse oxidativo vascular após o infarto do miocárdio, provavelmente relacionados à aldosterona e via receptores de mineralocorticóides. Já foi relatado que o aumento da produção vascular de O_2^- pela angiotensina II é pelo menos em parte mediado por aldosterona (Virdis *et al.*, 2002). Por outro lado estudos demonstram que a aldosterona contribui para a toxicidade cardiovascular em humanos, independentemente dos efeitos da angiotensina II (Brown, 2003). Em um modelo de aterosclerose experimental a terapia com apenas eplerenona reduziu a atividade da NAD(P)H oxidase sugerindo pela primeira vez a interação do receptor de mineralocorticóides com oxidases geradores de O_2^- na vasculatura (Rajagopalan *et al.*, 2002), levando, assim como os dados do presente estudo, a uma melhoria da função endotelial nestes animais. Este último relato vem ao encontro dos resultados aqui apresentados, sugerindo um mecanismo da aldosterona “per se” na promoção do estresse oxidativo vascular, provavelmente por atuação nos receptores de mineralocorticóides.

O outro mecanismo proposto para elucidar a disfunção endotelial e o estresse oxidativo seria o desequilíbrio entre produção de ERO e sua degradação. Isto seria devido a um prejuízo no que diz respeito aos mecanismos antioxidantes. A principal defesa celular vascular contra os ânions superóxido tem sido descrita como sendo as diversas formas da enzima superóxio dismutase (SOD), a forma mitocondrial contendo Mn (SOD manganês – MnSOD ou SOD-2), a citosólica contendo Cu/Zn (CuZnSOD, SOD-1) e a extracelular (EC-SOD) (Wassmann *et al.*, 2004). As SODs têm um papel fundamental na inativação do O_2^- e formação do peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, protegendo o organismo contra os efeitos citotóxicos do O_2^- , além de proteger o NO e seus efeitos biológicos, já que a reatividade do NO com o O_2^- ocorre em uma frequência três vezes mais rápida que a sua dismutação pela SOD (Darley-Usmar *et al.*, 1995; Beckman & Koppenol, 1996). As três isoenzimas SOD são diferentemente reguladas, indicando papéis fisiológicos diferentes (Wong *et al.*, 1989; Marklund, 1992; Stralin & Marklund, 2000).

A infusão de SOD potencializa e aumenta a meia vida do fator de relaxamento derivado do endotélio (Gryglewski *et al.*, 1986; Rubanyi & Vanhoutte, 1986). A atividade da superóxido dismutase ligada ao endotélio (EC-SOD) está reduzida em pacientes com doença coronariana (Landmesser *et al.*, 2000). Um estudo

demonstrou que a redução do relaxamento à acetilcolina em aortas de ratos 3 semanas após o infarto do miocárdio era devida em parte a uma degradação excessiva do NO provavelmente relacionada a um decréscimo da atividade da SOD vascular, e parcialmente revertida pela adição de SOD (Indik *et al.*, 2001). Apesar da isoforma EC-SOD, localizada entre o endotélio e o músculo liso vascular, ter sido descrita inicialmente como a principal responsável por “varrer” (*scavenging*) os ânions superóxido e prevenir a degradação do NO (Stralin *et al.*, 1995) as demais isoformas da SOD têm recebido crescente atenção e importância em recentes estudos que demonstram sua participação em diversos processos fisiopatológicos.

A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é uma fonte enzimática de ERO e também um alvo contra o dano causado por oxidação. O aumento na produção de ERO na mitocôndria pode levar a um ciclo vicioso, onde ocorre o dano do DNA mitocondrial, bem como um declínio funcional que gera ainda mais ERO e culmina com a lesão celular (Tsutsui, 2001). A isoforma da SOD localizada na mitocôndria (Weisiger & Fridovich, 1973) foi o alvo da investigação no presente estudo. A MnSOD tem um papel essencial para a manutenção da função mitocondrial, como demonstrada pela letalidade neonatal de camundongos *knockout* para esta enzima (Li *et al.*, 1995). A estimativa de que 1 a 2% de todos os elétrons da cadeia respiratória resultam na formação de superóxido, justifica a importância da MnSOD para a sobrevivência em mamíferos (Robinson, 1998). Esta importância foi ainda ressaltada pelo trabalho de Copin e colaboradores, onde o aumento da expressão da Cu/ZN-SOD não compensou a falta de MnSOD, e a letalidade destes animais mutantes permaneceu inalterada (Copin *et al.*, 2000). Esta enzima é sujeita a regulação positiva (*upregulation*) em resposta a ERO, TNF- α , IL-1- α , IFN- α e estresse de cisalhamento (*shear stress*) (McIntyre *et al.*, 1999; Stralin & Marklund, 2000). A MnSOD é normalmente abundante em células endoteliais relativamente a outros tipos celulares, e parece exercer um importante papel protetor contra o estresse oxidativo em situações como isquemia e inflamação (Suzuki *et al.*, 1993). A MnSOD teve a sua indução demonstrada em células endoteliais por níveis basais de ERO gerados por NAD(P)H-oxidase, via VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (Abid *et al.*, 2001). Os níveis aumentados de MnSOD protegeriam a mitocôndria dos efeitos tóxicos do peroxinitrito e da ativação de vias apoptóticas. Também a MnSOD, que é a principal defesa antioxidante da mitocôndria, é susceptível a rápida inativação por relativamente baixos níveis de peroxinitrito

(MacMillan-Crow *et al.*, 1998). O ONOO^- promove este efeito através da nitração da tirosina (Yamakura *et al.*, 1998), o que pode ocorrer em diversos estados patológicos, inclusive no infarto, onde o ONOO^- se encontra aumentado (Bauersachs *et al.*, 1999; Mihm *et al.*, 2001). Esses mecanismos levariam a um feedback positivo, gerando um verdadeiro ciclo vicioso envolvendo o metabolismo oxidativo e ressaltando a importância desta isoforma da SOD (Macmillan-Crow & Cruthirds, 2001). Também a aldosterona pelo marcante estímulo à citrato sintase miocárdica (Marver, 1984) uma enzima do ciclo de Krebs, ou Na^+/K^+ ATPase, pode estar envolvida no aumento da fosforilação oxidativa endotelial e formação de radicais livres de oxigênio (Stier *et al.*, 2002). Jones e colaboradores descreveram que o aumento da expressão da MnSOD previne a necrose miocárdica por isquemia e reperfusão, enquanto o aumento da expressão da glutathione peroxidase e Cu/Zn-SOD não promoveu efeito protetor nestes animais (Jones *et al.*, 2003). No presente estudo foi demonstrado um aumento significativo da expressão protéica da MnSOD após o tratamento com eplerenona com relação aos animais infartados. Não houve diferença significativa entre a expressão da MnSOD entre os animais Sham e aqueles submetidos ao infarto, o que indiretamente demonstra um débito na resposta antioxidante nos animais IM Pla, já que em uma situação de estresse oxidativo vascular, como foi anteriormente confirmada neste grupo IM Pla, seria esperado um aumento em paralelo das reservas antioxidantes como um mecanismo compensatório.

Na IC clínica e experimental, terapias que visam reduzir as espécies reativas de oxigênio, como pela administração de antioxidantes, têm se mostrado eficazes na promoção do aumento da biodisponibilidade do NO e função endotelial (Hornig *et al.*, 1998b; Bauersachs *et al.*, 2001). A redução da atividade da SOD vascular foi descrita como um dos mecanismos envolvidos na excessiva degradação do NO que leva à alteração no relaxamento dependente do endotélio em aortas de ratos com IC (Indik *et al.*, 2001). O relaxamento de anéis de aorta à ACh foi parcialmente restaurado pelo pré-tratamento com SOD exógena em animais com IC (Bauersachs *et al.*, 1999). Estudos posteriores mostraram que o tratamento antioxidante crônico com vitamina E normalizou o relaxamento induzido pela ACh, em aortas de ratos 12 semanas após infarto. Os mecanismos especulados para tal seriam o aumento na viabilidade do NO pela redução na produção de O_2^- , além do aumento na expressão e atividade da guanilato ciclase solúvel, sugerindo que uma redução dos

mecanismos antioxidantes estariam inicialmente reduzidos, promovendo a redução no relaxamento dependente do endotélio (Bauersachs *et al.*, 2001). Outros estudos mostraram que o relaxamento induzido por fluxo em pacientes com IC foi melhorado pelo antioxidante vitamina C, e este relaxamento não foi afetado em pacientes saudáveis. Isto ocorreria, ao menos em parte, como consequência do aumento na viabilidade do NO devido às propriedades antioxidantes da vitamina C (Hornig *et al.*, 1998b). Foi relatado posteriormente que a atividade vascular da SOD extracelular (EC-SOD) estava diminuída em artérias coronárias e radiais de pacientes com IC, sugerindo que a redução na atividade da SOD contribuiria para a reduzida viabilidade do NO na IC, bem como a vasodilatação mediada por NO prejudicada nestes pacientes (Landmesser *et al.*, 2000). Miller e colaboradores relataram redução na sensibilidade à ACh em mesentéricas de ratos 6 semanas após infarto, sem alteração na resposta máxima. Esta resposta vasodilatadora foi significativamente aumentada na presença de um mimético da SOD, o MnTMPyP (Miller *et al.*, 2000). Estes trabalhos, juntamente aos dados aqui apresentados, sugerem que o aumento da expressão da MnSOD nos animais IM Pla contaria como mecanismo antioxidante protetor que melhoraria consequentemente a função endotelial.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o tratamento com o antagonista específico para o receptor de aldosterona, eplerenona, promoveu melhoria na função endotelial em uma fase inicial após infarto. Os mecanismos envolvidos estão relacionados à inibição da expressão aumentada da ECA vascular, aumento da biodisponibilidade do NO derivado da eNOS e redução do estresse oxidativo. Este último fator foi constatado pela normalização da produção vascular de ânions superóxido, redução da expressão da NAD(P)H oxidase bem como pela melhoria das defesas antioxidantes.

Os dados aqui apresentados juntamente aos indícios fornecidos por alguns estudos clínicos realizados levantam a possibilidade de que a terapia com o bloqueio de aldosterona realizada em uma fase inicial após o IM possa ser indicada como uma medida terapêutica eficaz. Estudos clínicos e experimentais adicionais se fazem necessários para a confirmação destes e outros benefícios do bloqueio de aldosterona a curto prazo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. Referências bibliográficas

- ABID, M.R., TSAI, J.C., SPOKES, K.C., DESHPANDE, S.S., IRANI, K. & AIRD, W.C. (2001). Vascular endothelial growth factor induces manganese-superoxide dismutase expression in endothelial cells by a Rac1-regulated NADPH oxidase-dependent mechanism. *Faseb J*, **15**, 2548-50.
- ACKERMANN, A., FERNANDEZ-ALFONSO, M.S., SANCHEZ DE ROJAS, R., ORTEGA, T., PAUL, M. & GONZALEZ, C. (1998). Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. *Br J Pharmacol*, **124**, 291-8.
- AKASU, M., URATA, H., KINOSHITA, A., SASAGURI, M., IDEISHI, M. & ARAKAWA, K. (1998). Differences in tissue angiotensin II-forming pathways by species and organs in vitro. *Hypertension*, **32**, 514-20.
- ALBRECHT, E.W., STEGEMAN, C.A., HEERINGA, P., HENNING, R.H. & VAN GOOR, H. (2003). Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol*, **199**, 8-17.
- ALHENC-GELAS, F., SOUBRIER, F., HUBERT, C., ALLEGRI, J., LATTION, A.L. & CORVOL, P. (1990). The angiotensin I-converting enzyme (kininase II): progress in molecular and genetic structure. *J Cardiovasc Pharmacol*, **15 Suppl 6**, S25-9.
- ALPERT, J.S., THYGESEN, K., ANTMAN, E. & BASSAND, J.P. (2000). Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, **36**, 959-69.
- ANAND, I.S., FERRARI, R., KALRA, G.S., WAHI, P.L., POOLE-WILSON, P.A. & HARRIS, P.C. (1989). Edema of cardiac origin. Studies of body water and sodium, renal function, hemodynamic indexes, and plasma hormones in untreated congestive cardiac failure. *Circulation*, **80**, 299-305.
- ANDREW, P.J. & MAYER, B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*, **43**, 521-31.
- ANGUS, J.A. & COCKS, T.M. (1989). Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol Ther*, **41**, 303-52.
- ANVERSA, P. & SONNENBLICK, E.H. (1990). Ischemic cardiomyopathy: pathophysiologic mechanisms. *Prog Cardiovasc Dis*, **33**, 49-70.
- AOKI, N., SIEGFRIED, M. & LEFER, A.M. (1989). Anti-EDRF effect of tumor necrosis factor in isolated, perfused cat carotid arteries. *Am J Physiol*, **256**, H1509-12.
- ARNAL, J.F., BATTLE, T., RASETTI, C., CHALLAH, M., COSTEROUSSE, O., VICAUT, E., MICHEL, J.B. & ALHENC-GELAS, F. (1994). ACE in three tunicae of rat aorta: expression in smooth muscle and effect of renovascular hypertension. *Am J Physiol*, **267**, H1777-84.

- ARNOLD, W.P., MITTAL, C.K., KATSUKI, S. & MURAD, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 3203-7.
- ARRIZA, J.L., WEINBERGER, C., CERELLI, G., GLASER, T.M., HANDELIN, B.L., HOUSMAN, D.E. & EVANS, R.M. (1987). Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, **237**, 268-75.
- AYAJIKI, K., KINDERMANN, M., HECKER, M., FLEMING, I. & BUSSE, R. (1996). Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res*, **78**, 750-8.
- BABIOR, B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*, **93**, 1464-76.
- BAGGIA, S., PERKINS, K. & GREENBERG, B. (1997). Endothelium-dependent relaxation is not uniformly impaired in chronic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*, **29**, 389-96.
- BALLIGAND, J.L., KELLY, R.A., MARSDEN, P.A., SMITH, T.W. & MICHEL, T. (1993). Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 347-51.
- BAUERSACHS, J., BOULOUMIE, A., FRACCAROLLO, D., HU, K., BUSSE, R. & ERTL, G. (1999). Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation*, **100**, 292-8.
- BAUERSACHS, J., BOULOUMIE, A., MULSCH, A., WIEMER, G., FLEMING, I. & BUSSE, R. (1998). Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc Res*, **37**, 772-9.
- BAUERSACHS, J., FLEMING, I., FRACCAROLLO, D., BUSSE, R. & ERTL, G. (2001). Prevention of endothelial dysfunction in heart failure by vitamin E: attenuation of vascular superoxide anion formation and increase in soluble guanylyl cyclase expression. *Cardiovasc Res*, **51**, 344-50.
- BAUERSACHS, J., FRACCAROLLO, D., GALUPPO, P., WIDDER, J. & ERTL, G. (2000). Endothelin-receptor blockade improves endothelial vasomotor dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res*, **47**, 142-9.
- BAUERSACHS, J., HECK, M., FRACCAROLLO, D., HILDEMAN, S.K., ERTL, G., WEHLING, M. & CHRIST, M. (2002). Addition of spironolactone to angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: role of vascular superoxide anion formation and endothelial nitric oxide synthase expression. *J Am Coll Cardiol*, **39**, 351-8.
- BECKMAN, J.S. (1996). Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol*, **9**, 836-44.

- BECKMAN, J.S., BECKMAN, T.W., CHEN, J., MARSHALL, P.A. & FREEMAN, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1620-4.
- BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, **271**, C1424-37.
- BENETOS, A., LACOLLEY, P. & SAFAR, M.E. (1997). Prevention of aortic fibrosis by spironolactone in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 1152-6.
- BESWICK, R.A., DORRANCE, A.M., LEITE, R. & WEBB, R.C. (2001). NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension*, **38**, 1107-11.
- BEVERS, L.M., BRAAM, B., POST, J.A., VAN ZONNEVELD, A.J., RABELINK, T.J., KOOMANS, H.A., VERHAAR, M.C. & JOLLES, J.A. (2006). Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension*, **47**, 87-94.
- BHARGAVA, A., FULLERTON, M.J., MYLES, K., PURDY, T.M., FUNDER, J.W., PEARCE, D. & COLE, T.J. (2001). The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology*, **142**, 1587-94.
- BLAIS, C., JR., MARCEAU, F., ROULEAU, J.L. & ADAM, A. (2000). The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides*, **21**, 1903-40.
- BOKOCH, G.M. & KNAUS, U.G. (2003). NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci*, **28**, 502-8.
- BOLOTINA, V.M., NAJIBI, S., PALACINO, J.J., PAGANO, P.J. & COHEN, R.A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, **368**, 850-3.
- BOOTH, R.E., JOHNSON, J.P. & STOCKAND, J.D. (2002). Aldosterone. *Adv Physiol Educ*, **26**, 8-20.
- BORGHI, C., BOSCHI, S., AMBROSIONI, E., MELANDRI, G., BRANZI, A. & MAGNANI, B. (1993). Evidence of a partial escape of renin-angiotensin-aldosterone blockade in patients with acute myocardial infarction treated with ACE inhibitors. *J Clin Pharmacol*, **33**, 40-5.
- BOULOUMIE, A., BAUERSACHS, J., LINZ, W., SCHOLKENS, B.A., WIEMER, G., FLEMING, I. & BUSSE, R. (1997). Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension*, **30**, 934-41.
- BRAUNWALD, E. (2001). The Denolin lecture. Congestive heart failure: a half century perspective. *Eur Heart J*, **22**, 825-36.

- BRAUNWALD, E. & KLONER, R.A. (1982). The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, **66**, 1146-9.
- BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*, **63**, 175-95.
- BREST, A.N. (1986). Spironolactone in the treatment of hypertension: a review. *Clin Ther*, **8**, 568-85.
- BROWN, N.J. (2003). Eplerenone: cardiovascular protection. *Circulation*, **107**, 2512-8.
- BROWN, N.J., KIM, K.S., CHEN, Y.Q., BLEVINS, L.S., NADEAU, J.H., MERANZE, S.G. & VAUGHAN, D.E. (2000). Synergistic effect of adrenal steroids and angiotensin II on plasminogen activator inhibitor-1 production. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 336-44.
- BURKART, F. (1995). Heart failure syndrome. Rationale for current drug treatment. *Eur Heart J*, **16 Suppl F**, 2-3.
- BUSSE, R., FLEMING, I. & HECKER, M. (1993). Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation. *Eur Heart J*, **14 Suppl I**, 2-9.
- BUSSE, R., HECKER, M. & FLEMING, I. (1994). Control of nitric oxide and prostacyclin synthesis in endothelial cells. *Arzneimittelforschung*, **44**, 392-6.
- BUSSE, R. & MULSCH, A. (1990). Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett*, **265**, 133-6.
- CAHILLY, C., BALLANTYNE, C.M., LIM, D.S., GOTTO, A. & MARIAN, A.J. (2000). A variant of p22(phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Circ Res*, **86**, 391-5.
- CAI, H. & HARRISON, D.G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, **87**, 840-4.
- CAMPBELL, D.J. & HABENER, J.F. (1986). Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest*, **78**, 31-9.
- CAMPBELL, J.H. & CAMPBELL, G.R. (1986). Endothelial cell influences on vascular smooth muscle phenotype. *Annu Rev Physiol*, **48**, 295-306.
- CARR, A. & FREI, B. (2000). The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, **28**, 1806-14.
- CARTER, W.O., NARAYANAN, P.K. & ROBINSON, J.P. (1994). Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol*, **55**, 253-8.
- CARVILLE, C., ADNOT, S., SEDIAME, S., BENACERRAF, S., CASTAIGNE, A., CALVO, F., DE CREMOU, P. & DUBOIS-RANDE, J.L. (1998). Relation between impairment in

nitric oxide pathway and clinical status in patients with congestive heart failure. In *J Cardiovasc Pharmacol*. pp. 562-70.

- CEILER, D.L., NELISSEN-VRANCKEN, M., DE MEY, J.G. & SMITS, J.F. (1999). Role of basal nitric oxide synthesis in vasoconstrictor hyporeactivity in the perfused rat hindlimb after myocardial infarction: effect of captopril. *Cardiovasc Res*, **43**, 779-87.
- CHAI, W., GARRELD, I.M., DE VRIES, R., BATENBURG, W.W., VAN KATS, J.P. & DANSER, A.H. (2005). Nongenomic effects of aldosterone in the human heart: interaction with angiotensin II. *Hypertension*, **46**, 701-6.
- CHEN, S.Y., BHARGAVA, A., MASTROBERARDINO, L., MEIJER, O.C., WANG, J., BUSE, P., FIRESTONE, G.L., VERREY, F. & PEARCE, D. (1999a). Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2514-9.
- CHEN, X.L. & REMBOLD, C.M. (1995). Phenylephrine contracts rat tail artery by one electromechanical and three pharmacomechanical mechanisms. *Am J Physiol*, **268**, H74-81.
- CHEN, Z.P., MITCHELHILL, K.I., MICHELL, B.J., STAPLETON, D., RODRIGUEZ-CRESPO, I., WITTERS, L.A., POWER, D.A., ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. & KEMP, B.E. (1999b). AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett*, **443**, 285-9.
- CHOR, D., DA FONSECA, M.J. & DE ANDRADE, C.R. (1995). [Cardiovascular diseases. Comments on early mortality in Brazil]. *Arq Bras Cardiol*, **64**, 15-9.
- CHRIST, M., DOUWES, K., EISEN, C., BECHTNER, G., THEISEN, K. & WEHLING, M. (1995a). Rapid effects of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **25**, 117-23.
- CHRIST, M., MEYER, C., SIPPEL, K. & WEHLING, M. (1995b). Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, **213**, 123-9.
- CICOIRA, M., ZANOLLA, L., FRANCESCHINI, L., ROSSI, A., GOLIA, G., ZENI, P., CARUSO, B. & ZARDINI, P. (2002). Relation of aldosterone "escape" despite angiotensin-converting enzyme inhibitor administration to impaired exercise capacity in chronic congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, **89**, 403-7.
- COMINI, L., BACHETTI, T., GAIA, G., PASINI, E., AGNOLETTI, L., PEPI, P., CECONI, C., CURELLO, S. & FERRARI, R. (1996). Aorta and skeletal muscle NO synthase expression in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, **28**, 2241-8.
- COPIN, J.C., GASCHE, Y. & CHAN, P.H. (2000). Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase does not prevent neonatal lethality in mutant mice that lack manganese superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med*, **28**, 1571-6.

- CORNWELL, T.L., PRYZWANSKY, K.B., WYATT, T.A. & LINCOLN, T.M. (1991). Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, **40**, 923-31.
- CORSON, M.A., JAMES, N.L., LATTA, S.E., NEREM, R.M., BERK, B.C. & HARRISON, D.G. (1996). Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res*, **79**, 984-91.
- CRESPO, M.J. (1999). Vascular alterations during the development and progression of experimental heart failure. *J Card Fail*, **5**, 55-63.
- CUSHMAN, D.W. & CHEUNG, H.S. (1971). Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta*, **250**, 261-5.
- DA CUNHA, V., STEFANON, I. & MILL, J.G. (2004). Role of nitric oxide in mediating cardiovascular alterations accompanying heart failure in rats. *Can J Physiol Pharmacol*, **82**, 372-9.
- DARLEY-USMAR, V., WISEMAN, H. & HALLIWELL, B. (1995). Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett*, **369**, 131-5.
- DE ARTINANO, A.A. & GONZALEZ, V.L. (1999). Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. *Pharmacol Res*, **40**, 113-24.
- DE BELDER, A.J., RADOMSKI, M.W., WHY, H.J., RICHARDSON, P.J., BUCKNALL, C.A., SALAS, E., MARTIN, J.F. & MONCADA, S. (1993). Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *Lancet*, **341**, 84-5.
- DE GASPARO, M., JOSS, U., RAMJOU, H.P., WHITEBREAD, S.E., HAENNI, H., SCHENKEL, L., KRAEHNBUHL, C., BIOLLAZ, M., GROB, J., SCHMIDLIN, J. & ET AL. (1987). Three new epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, **240**, 650-6.
- DE KEULENAER, G.W., ALEXANDER, R.W., USHIO-FUKAI, M., ISHIZAKA, N. & GRIENDLING, K.K. (1998). Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J*, **329 (Pt 3)**, 653-7.
- DE RESENDE, M.M., KAUSER, K. & MILL, J.G. (2006). Regulation of cardiac and renal mineralocorticoid receptor expression by captopril following myocardial infarction in rats. *Life Sci*.
- DE TOMBE, P.P. (1998). Altered contractile function in heart failure. *Cardiovasc Res*, **37**, 367-80.
- DEFELICE, A., FRERING, R. & HORAN, P. (1989). Time course of hemodynamic changes in rats with healed severe myocardial infarction. *Am J Physiol*, **257**, H289-96.
- DELL'ITALIA, L.J. & HUSAIN, A. (2002). Dissecting the role of chymase in angiotensin II formation and heart and blood vessel diseases. *Curr Opin Cardiol*, **17**, 374-9.

- DELYANI, J.A. (2000). Mineralocorticoid receptor antagonists: the evolution of utility and pharmacology. *Kidney Int*, **57**, 1408-11.
- DELYANI, J.A., ROBINSON, E.L. & RUDOLPH, A.E. (2001). Effect of a selective aldosterone receptor antagonist in myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **281**, H647-54.
- DENNINGER, J.W. & MARLETTA, M.A. (1999). Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*, **1411**, 334-50.
- DIDION, S.P., CARMINES, P.K., IKENAGA, H. & MAYHAN, W.G. (1997). Enhanced constrictor responses of skeletal muscle arterioles during chronic myocardial infarction. *Am J Physiol*, **273**, H1502-8.
- DIDION, S.P. & FARACI, F.M. (2005). Ceramide-induced impairment of endothelial function is prevented by CuZn superoxide dismutase overexpression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 90-5.
- DIMMELER, S., FLEMING, I., FISSLTHALER, B., HERMANN, C., BUSSE, R. & ZEIHNER, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, **399**, 601-5.
- DIXON, L.J., MORGAN, D.R., HUGHES, S.M., MCGRATH, L.T., EL-SHERBEENY, N.A., PLUMB, R.D., DEVINE, A., LEAHEY, W., JOHNSTON, G.D. & McVEIGH, G.E. (2003). Functional consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling in congestive cardiac failure. *Circulation*, **107**, 1725-8.
- DJORDJEVIC, T., POGREBNAK, A., BELAIBA, R.S., BONELLO, S., WOTZLAW, C., ACKER, H., HESS, J. & GORLACH, A. (2005). The expression of the NADPH oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, **38**, 616-30.
- DREXLER, H., HAYOZ, D., MUNZEL, T., HORNIG, B., JUST, H., BRUNNER, H.R. & ZELIS, R. (1992). Endothelial function in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol*, **69**, 1596-601.
- DREXLER, H. & HORNIG, B. (1999). Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol*, **31**, 51-60.
- DREXLER, H. & LU, W. (1992). Endothelial dysfunction of hindquarter resistance vessels in experimental heart failure. *Am J Physiol*, **262**, H1640-5.
- DROGE, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, **82**, 47-95.
- DUNCAN, A.M., BURRELL, L.M., KLADIS, A. & CAMPBELL, D.J. (1997). Angiotensin and bradykinin peptides in rats with myocardial infarction. *J Card Fail*, **3**, 41-52.
- DUPREZ, D., DE BUYZERE, M., RIETZSCHEL, E.R. & CLEMENT, D.L. (2000). Aldosterone and vascular damage. *Curr Hypertens Rep*, **2**, 327-34.

- DUPREZ, D.A., DE BUYZERE, M.L., RIETZSCHEL, E.R., TAES, Y., CLEMENT, D.L., MORGAN, D. & COHN, J.N. (1998). Inverse relationship between aldosterone and large artery compliance in chronically treated heart failure patients. *Eur Heart J*, **19**, 1371-6.
- DZAU, V.J. (1992). Autocrine and paracrine mechanisms in the pathophysiology of heart failure. *Am J Cardiol*, **70**, 4C-11C.
- DZAU, V.J. (1988a). Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation*, **77**, 14-13.
- DZAU, V.J. (1988b). Molecular and physiological aspects of tissue renin-angiotensin system: emphasis on cardiovascular control. *J Hypertens Suppl*, **6**, S7-12.
- DZAU, V.J., BERNSTEIN, K., CELERMAJER, D., COHEN, J., DAHLOF, B., DEANFIELD, J., DIEZ, J., DREXLER, H., FERRARI, R., VAN GILST, W., HANSSON, L., HORNIG, B., HUSAIN, A., JOHNSTON, C., LAZAR, H., LONN, E., LUSCHER, T., MANCINI, J., MIMRAN, A., PEPINE, C., RABELINK, T., REMME, W., RUILOPE, L., RUZICKA, M., SCHUNKERT, H., SWEDBERG, K., UNGER, T., VAUGHAN, D. & WEBER, M. (2001). The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am J Cardiol*, **88**, 1L-20L.
- DZAU, V.J. & HIRSCH, A.T. (1990). Emerging role of the tissue renin-angiotensin systems in congestive heart failure. *Eur Heart J*, **11 Suppl B**, 65-71.
- DZAU, V.J., SASAMURA, H. & HEIN, L. (1993). Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. *J Hypertens Suppl*, **11**, S13-8.
- ERDOS, E.G. (1990). Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension*, **16**, 363-70.
- ERTL, G. & KOCHSIEK, K. (1993). Development, early treatment, and prevention of heart failure. Introduction. *Circulation*, **87**, IV1-3.
- ESTHER, C.R., MARINO, E.M., HOWARD, T.E., MACHAUD, A., CORVOL, P., CAPECCHI, M.R. & BERNSTEIN, K.E. (1997). The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest*, **99**, 2375-85.
- FARACI, F.M. & DIDION, S.P. (2004). Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 1367-73.
- FARQUHARSON, C.A. & STRUTHERS, A.D. (2002a). Aldosterone induces acute endothelial dysfunction in vivo in humans: evidence for an aldosterone-induced vasculopathy. *Clin Sci (Lond)*, **103**, 425-31.
- FARQUHARSON, C.A. & STRUTHERS, A.D. (2002b). Gradual reactivation over time of vascular tissue angiotensin I to angiotensin II conversion during chronic lisinopril therapy in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, **39**, 767-75.

- FARQUHARSON, C.A. & STRUTHERS, A.D. (2000). Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation*, **101**, 594-7.
- FEJES-TOTH, G., PEARCE, D. & NARAY-FEJES-TOTH, A. (1998). Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2973-8.
- FELETOU, M. & VANHOUTTE, P.M. (1988). Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol*, **93**, 515-24.
- FENG, Q.P., BERGDAHL, A., LU, X.R., SUN, X.Y., EDVINSSON, L. & HEDNER, T. (1996). Vascular alpha-2 adrenoceptor function is decreased in rats with congestive heart failure. *Cardiovasc Res*, **31**, 577-84.
- FERNANDEZ-ALFONSO, M.S., MARTORANA, P.A., LICKA, I., VAN EVEN, P., TROBISCH, D., SCHOLKENS, B.A. & PAUL, M. (1997). Early induction of angiotensin I-converting enzyme in rat carotid artery after balloon injury. *Hypertension*, **30**, 272-7.
- FERON, O., SALDANA, F., MICHEL, J.B. & MICHEL, T. (1998). The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem*, **273**, 3125-8.
- FERRARI, R., AGNOLETTI, L., COMINI, L., GAIA, G., BACHETTI, T., CARGNONI, A., CECONI, C., CURELLO, S. & VISIOLI, O. (1998). Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J*, **19 Suppl B**, B2-11.
- FISHBEIN, M.C., MACLEAN, D. & MAROKO, P.R. (1978). The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest*, **73**, 843-9.
- FISSLTHALER, B., DIMMELER, S., HERMANN, C., BUSSE, R. & FLEMING, I. (2000). Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand*, **168**, 81-8.
- FLAVAHAN, N.A. (1992). Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation*, **85**, 1927-38.
- FLAVAHAN, N.A. & VANHOUTTE, P.M. (1995). Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. *Am J Hypertens*, **8**, 28S-41S.
- FLEMING, I., BAUERSACHS, J., FISSLTHALER, B. & BUSSE, R. (1998). Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ Res*, **82**, 686-95.
- FLEMING, I. & BUSSE, R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **284**, R1-12.
- FLEMING, I., FISSLTHALER, B., DIMMELER, S., KEMP, B.E. & BUSSE, R. (2001). Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res*, **88**, E68-75.

- FORSTERMANN, U., CLOSS, E.I., POLLOCK, J.S., NAKANE, M., SCHWARZ, P., GATH, I. & KLEINERT, H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, **23**, 1121-31.
- FOX, K.A., BIRKHEAD, J., WILCOX, R., KNIGHT, C. & BARTH, J. (2004). British Cardiac Society Working Group on the definition of myocardial infarction. *Heart*, **90**, 603-9.
- FRACCAROLLO, D., GALUPPO, P., HILDEMAN, S., CHRIST, M., ERTL, G. & BAUERSACHS, J. (2003). Additive improvement of left ventricular remodeling and neurohormonal activation by aldosterone receptor blockade with eplerenone and ACE inhibition in rats with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, **42**, 1666-73.
- FRACCAROLLO, D., GALUPPO, P., SCHMIDT, I., ERTL, G. & BAUERSACHS, J. (2005). Additive amelioration of left ventricular remodeling and molecular alterations by combined aldosterone and angiotensin receptor blockade after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, **67**, 97-105.
- FRANCIS, G.S. (1985). Neurohumoral mechanisms involved in congestive heart failure. *Am J Cardiol*, **55**, 15A-21A.
- FROLICH, J.C. & FORSTERMANN, U. (1989). Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, **19**, 211-5.
- FUKAI, T., SIEGFRIED, M.R., USHIO-FUKAI, M., CHENG, Y., KOJDA, G. & HARRISON, D.G. (2000). Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest*, **105**, 1631-9.
- FUKAI, T., SIEGFRIED, M.R., USHIO-FUKAI, M., GRIENDLING, K.K. & HARRISON, D.G. (1999). Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res*, **85**, 23-8.
- FUKUI, T., ISHIZAKA, N., RAJAGOPALAN, S., LAURSEN, J.B., CAPERS, Q.T., TAYLOR, W.R., HARRISON, D.G., DE LEON, H., WILCOX, J.N. & GRIENDLING, K.K. (1997). p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res*, **80**, 45-51.
- FUKUI, T., YOSHIYAMA, M., HANATANI, A., OMURA, T., YOSHIKAWA, J. & ABE, Y. (2001). Expression of p22-phox and gp91-phox, essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 1200-6.
- FULTON, D., FONTANA, J., SOWA, G., GRATTON, J.P., LIN, M., LI, K.X., MICHELL, B., KEMP, B.E., RODMAN, D. & SESSA, W.C. (2002). Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J Biol Chem*, **277**, 4277-84.
- FULTON, D., GRATTON, J.P., MCCABE, T.J., FONTANA, J., FUJIO, Y., WALSH, K., FRANKE, T.F., PAPAPETROPOULOS, A. & SESSA, W.C. (1999). Regulation of endothelium-

- derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, **399**, 597-601.
- FUNDER, J.W., PEARCE, P.T., SMITH, R. & CAMPBELL, J. (1989). Vascular type I aldosterone binding sites are physiological mineralocorticoid receptors. *Endocrinology*, **125**, 2224-6.
- FUNDER, J.W., PEARCE, P.T., SMITH, R. & SMITH, A.I. (1988). Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*, **242**, 583-5.
- FURCHGOTT, R.F. & VANHOUTTE, P.M. (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J*, **3**, 2007-18.
- FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**, 373-6.
- FURUKAWA, K., OHSHIMA, N., TAWADA-IWATA, Y. & SHIGEKAWA, M. (1991). Cyclic GMP stimulates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J Biol Chem*, **266**, 12337-41.
- GABALLA, M.A. & GOLDMAN, S. (1999). Overexpression of endothelium nitric oxide synthase reverses the diminished vasorelaxation in the hindlimb vasculature in ischemic heart failure in vivo. *J Mol Cell Cardiol*, **31**, 1243-52.
- GARCIA-CARDENA, G., FAN, R., STERN, D.F., LIU, J. & SESSA, W.C. (1996). Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem*, **271**, 27237-40.
- GARCIA-CARDENA, G., MARTASEK, P., MASTERS, B.S., SKIDD, P.M., COUET, J., LI, S., LISANTI, M.P. & SESSA, W.C. (1997). Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem*, **272**, 25437-40.
- GARDEMANN, A., MAGES, P., KATZ, N., TILLMANN, H. & HABERBOSCH, W. (1999). The p22 phox A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis*, **145**, 315-23.
- GARG, R., PACKER, M., PITT, B. & YUSUF, S. (1993). Heart failure in the 1990s: evolution of a major public health problem in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*, **22**, 3A-5A.
- GARG, U.C. & HASSID, A. (1989). Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*, **83**, 1774-7.
- GAZIANO, T.A. (2005). Cardiovascular disease in the developing world and its cost-effective management. *Circulation*, **112**, 3547-53.

- GHOSH, S., GACHHUI, R., CROOKS, C., WU, C., LISANTI, M.P. & STUEHR, D.J. (1998). Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric-oxide synthase. Consequences for catalysis. *J Biol Chem*, **273**, 22267-71.
- GO, Y.M., PARK, H., MALAND, M.C., DARLEY-USMAR, V.M., STOYANOV, B., WETZKER, R. & JO, H. (1998). Phosphatidylinositol 3-kinase gamma mediates shear stress-dependent activation of JNK in endothelial cells. *Am J Physiol*, **275**, H1898-904.
- GOETZ, R.M., MORANO, I., CALOVINI, T., STUDER, R. & HOLTZ, J. (1994). Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun*, **205**, 905-10.
- GOHLKE, P., PEES, C. & UNGER, T. (1998). AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension*, **31**, 349-55.
- GOKCE, N., KEANEY, J.F., JR., HUNTER, L.M., WATKINS, M.T., MENZOIAN, J.O. & VITA, J.A. (2002). Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation*, **105**, 1567-72.
- GOMEZ-SANCHEZ, C.E., ZHOU, M.Y., COZZA, E.N., MORITA, H., FOECKING, M.F. & GOMEZ-SANCHEZ, E.P. (1997). Aldosterone biosynthesis in the rat brain. *Endocrinology*, **138**, 3369-73.
- GOPALAKRISHNA, R., CHEN, Z.H. & GUNDIMEDA, U. (1993). Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J Biol Chem*, **268**, 27180-5.
- GORLACH, A., BRANDES, R.P., NGUYEN, K., AMIDI, M., DEHGHANI, F. & BUSSE, R. (2000). A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res*, **87**, 26-32.
- GORLACH, A., KIETZMANN, T. & HESS, J. (2002). Redox signaling through NADPH oxidases: involvement in vascular proliferation and coagulation. *Ann N Y Acad Sci*, **973**, 505-7.
- GRIENDLING, K.K. & ALEXANDER, R.W. (1997). Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation*, **96**, 3264-5.
- GRIENDLING, K.K., MINIERI, C.A., OLLERENSHAW, J.D. & ALEXANDER, R.W. (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **74**, 1141-8.
- GRIENDLING, K.K., SORESCU, D., LASSEGUE, B. & USHIO-FUKAI, M. (2000a). Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 2175-83.

- GRIENDLING, K.K., SORESCU, D. & USHIO-FUKAI, M. (2000b). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, **86**, 494-501.
- GRYGLEWSKI, R.J., PALMER, R.M. & MONCADA, S. (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, **320**, 454-6.
- GUNARUWAN, P., SCHMITT, M., TAYLOR, J., LEE, L., STRUTHERS, A. & FRENNEAUX, M. (2002). Lack of rapid aldosterone effects on forearm resistance vasculature in health. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, **3**, 123-5.
- GUPTA, S., PHIPPS, K. & RUDERMAN, N.B. (1996). Differential stimulation of Na⁺ pump activity by insulin and nitric oxide in rabbit aorta. *Am J Physiol*, **270**, H1287-93.
- HABIB, F., DUTKA, D., CROSSMAN, D., OAKLEY, C.M. & CLELAND, J.G. (1994). Enhanced basal nitric oxide production in heart failure: another failed counter-regulatory vasodilator mechanism? *Lancet*, **344**, 371-3.
- HAMILTON, C.A., MILLER, W.H., AL-BENNA, S., BROSNAN, M.J., DRUMMOND, R.D., MCBRIDE, M.W. & DOMINICZAK, A.F. (2004). Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*, **106**, 219-34.
- HARADA, E., YOSHIMURA, M., YASUE, H., NAKAGAWA, O., NAKAGAWA, M., HARADA, M., MIZUNO, Y., NAKAYAMA, M., SHIMASAKI, Y., ITO, T., NAKAMURA, S., KUWAHARA, K., SAITO, Y., NAKAO, K. & OGAWA, H. (2001). Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation*, **104**, 137-9.
- HARRISON, D.G. (1997). Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*, **100**, 2153-7.
- HASEGAWA, T., MIURA, T., TSUCHIDA, A., MIKI, T., NAKANO, A., KUNO, A. & SHIMAMOTO, K. (2000). Endothelium-dependent coronary response is impaired in the myocardium at an early phase of post-infarct remodeling. *Jpn Heart J*, **41**, 743-55.
- HASSAN, H.M. (1988). Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free Radic Biol Med*, **5**, 377-85.
- HATAKEYAMA, H., MIYAMORI, I., FUJITA, T., TAKEDA, Y., TAKEDA, R. & YAMAMOTO, H. (1994). Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **269**, 24316-20.
- HATTORI, Y., KAWASAKI, H., ABE, K. & KANNO, M. (1991). Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol*, **261**, H1086-94.
- HAYASHI, M., TSUTAMOTO, T., WADA, A., TSUTSUI, T., ISHII, C., OHNO, K., FUJII, M., TANIGUCHI, A., HAMATANI, T., NOZATO, Y., KATAOKA, K., MORIGAMI, N., OHNISHI, M., KINOSHITA, M. & HORIE, M. (2003). Immediate administration of mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents post-infarct left ventricular remodeling associated with suppression of a marker of myocardial

- collagen synthesis in patients with first anterior acute myocardial infarction. *Circulation*, **107**, 2559-65.
- HEBA, G., KRZEMINSKI, T., PORC, M., GRZYB, J., RATAJSKA, A. & DEMBINSKA-KIEC, A. (2001). The time course of tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor expression in an experimental model of chronic myocardial infarction in rats. *J Vasc Res*, **38**, 288-300.
- HECKER, M., CATTARUZZA, M. & WAGNER, A.H. (1999). Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol*, **32**, 9-16.
- HECKER, M., MULSCH, A., BASSENGE, E., FORSTERMANN, U. & BUSSE, R. (1994). Subcellular localization and characterization of nitric oxide synthase(s) in endothelial cells: physiological implications. *Biochem J*, **299** (Pt 1), 247-52.
- HIBBS, J.B., JR., TAINTOR, R.R., VAVRIN, Z. & RACHLIN, E.M. (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*, **157**, 87-94.
- HODSMAN, G.P., KOHZUKI, M., HOWES, L.G., SUMITHRAN, E., TSUNODA, K. & JOHNSTON, C.I. (1988). Neurohumoral responses to chronic myocardial infarction in rats. *Circulation*, **78**, 376-81.
- HOFFMANN, A., GLOE, T. & POHL, U. (2001). Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. *J Cell Physiol*, **188**, 33-44.
- HOFMANN, L.M., DUTT, J.E., DEYSACH, L.G., LONCIN, H. & TAO, L. (1974). Comparison of spironolactone tablet dosage forms in healthy humans. *J Pharm Sci*, **63**, 1248-53.
- HORNIG, B., ARAKAWA, N., HAUSSMANN, D. & DREXLER, H. (1998a). Differential effects of quinaprilat and enalaprilat on endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation*, **98**, 2842-8.
- HORNIG, B., ARAKAWA, N., KOHLER, C. & DREXLER, H. (1998b). Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation*, **97**, 363-8.
- HOROWITZ, A., MENICE, C.B., LAPORTE, R. & MORGAN, K.G. (1996). Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev*, **76**, 967-1003.
- HOWARD, T.E., SHAI, S.Y., LANGFORD, K.G., MARTIN, B.M. & BERNSTEIN, K.E. (1990). Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Mol Cell Biol*, **10**, 4294-302.
- IKEDA, U., KANBE, T., NAKAYAMA, I., KAWAHARA, Y., YOKOYAMA, M. & SHIMADA, K. (1995). Aldosterone inhibits nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells induced by interleukin-1 beta. *Eur J Pharmacol*, **290**, 69-73.

- INDIK, J.H., GOLDMAN, S. & GABALLA, M.A. (2001). Oxidative stress contributes to vascular endothelial dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **281**, H1767-70.
- INOUE, K., NISHIMURA, H., KUBOTA, J. & KAWAMURA, K. (1999). Alternative angiotensin II formation in rat arteries occurs only at very high concentrations of angiotensin I. *Hypertension*, **34**, 525-30.
- INOUE, N., RAMASAMY, S., FUKAI, T., NEREM, R.M. & HARRISON, D.G. (1996). Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ Res*, **79**, 32-7.
- ITO, H., TAKAKI, M., YAMAGUCHI, H., TACHIBANA, H. & SUGA, H. (1996). Left ventricular volumetric conductance catheter for rats. *Am J Physiol*, **270**, H1509-14.
- ITOH, H., MUKOYAMA, M., PRATT, R.E., GIBBONS, G.H. & DZAU, V.J. (1993). Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest*, **91**, 2268-74.
- JACKSON, W.F. (2000). Ion channels and vascular tone. *Hypertension*, **35**, 173-8.
- JALIL, J.E., PEREZ, A., OCARANZA, M.P., BARGETTO, J., GALAZ, A. & LAVANDERO, S. (2005). Increased aortic NADPH oxidase activity in rats with genetically high angiotensin-converting enzyme levels. *Hypertension*, **46**, 1362-7.
- JASPARD, E., WEI, L. & ALHENC-GELAS, F. (1993). Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem*, **268**, 9496-503.
- JEONG, H.Y., JEONG, H.Y. & KIM, C.D. (2004). p22phox-derived superoxide mediates enhanced proliferative capacity of diabetic vascular smooth muscle cells. *Diabetes Res Clin Pract*, **64**, 1-10.
- JONES, S.A., O'DONNELL, V.B., WOOD, J.D., BROUGHTON, J.P., HUGHES, E.J. & JONES, O.T. (1996). Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol*, **271**, H1626-34.
- JONES, S.P., HOFFMEYER, M.R., SHARP, B.R., HO, Y.S. & LEFER, D.J. (2003). Role of intracellular antioxidant enzymes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **284**, H277-82.
- JORDE, U.P., VITTORIO, T., KATZ, S.D., COLOMBO, P.C., LATIF, F. & LE JEMTEL, T.H. (2002). Elevated plasma aldosterone levels despite complete inhibition of the vascular angiotensin-converting enzyme in chronic heart failure. *Circulation*, **106**, 1055-7.
- KAGIYA, T., HORI, M., IWAKURA, K., IWAI, K., WATANABE, Y., UCHIDA, S., YOSHIDA, H., KITABATAKE, A., INOUE, M. & KAMADA, T. (1991). Role of increased alpha 1-adrenergic activity in cardiomyopathic Syrian hamster. *Am J Physiol*, **260**, H80-8.

- KALINOWSKI, L. & MALINSKI, T. (2004). Endothelial NADH/NADPH-dependent enzymatic sources of superoxide production: relationship to endothelial dysfunction. *Acta Biochim Pol*, **51**, 459-69.
- KARIM, A., ZAGARELLA, J., HUTSELL, T.C. & DOOLEY, M. (1976). Spironolactone. III. Canrenone--maximum and minimum steady-state plasma levels. *Clin Pharmacol Ther*, **19**, 177-82.
- KATUSIC, Z.S. & SHEPHERD, J.T. (1991). Endothelium-derived vasoactive factors: II. Endothelium-dependent contraction. *Hypertension*, **18**, III86-92.
- KATZ, S.D., BIASUCCI, L., SABBA, C., STROM, J.A., JONDEAU, G., GALVAO, M., SOLOMON, S., NIKOLIC, S.D., FORMAN, R. & LEJEMTEL, T.H. (1992). Impaired endothelium-mediated vasodilation in the peripheral vasculature of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*, **19**, 918-25.
- KATZ, S.D., KHAN, T., ZEBALLOS, G.A., MATHEW, L., POTHARLANKA, P., KNECHT, M. & WHELAN, J. (1999). Decreased activity of the L-arginine-nitric oxide metabolic pathway in patients with congestive heart failure. *Circulation*, **99**, 2113-7.
- KATZ, S.D., RAO, R., BERMAN, J.W., SCHWARZ, M., DEMOPOULOS, L., BIJOU, R. & LEJEMTEL, T.H. (1994). Pathophysiological correlates of increased serum tumor necrosis factor in patients with congestive heart failure. Relation to nitric oxide-dependent vasodilation in the forearm circulation. *Circulation*, **90**, 12-6.
- KATZ, S.D., SCHWARZ, M., YUEN, J. & LEJEMTEL, T.H. (1993). Impaired acetylcholine-mediated vasodilation in patients with congestive heart failure. Role of endothelium-derived vasodilating and vasoconstricting factors. *Circulation*, **88**, 55-61.
- KAWADA, T., TOYOSATO, A., ISLAM, M.O., YOSHIDA, Y. & IMAI, S. (1997). cGMP-kinase mediates cGMP- and cAMP-induced Ca²⁺ desensitization of skinned rat artery. *Eur J Pharmacol*, **323**, 75-82.
- KAWAGUCHI, H., SAWA, H. & YASUDA, H. (1990). Endothelin stimulates angiotensin I to angiotensin II conversion in cultured pulmonary artery endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*, **22**, 839-42.
- KEIDAR, S., KAPLAN, M., PAVLOTZKY, E., COLEMAN, R., HAYEK, T., HAMOUD, S. & AVIRAM, M. (2004). Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone. *Circulation*, **109**, 2213-20.
- KIFOR, I. & DZAU, V.J. (1987). Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res*, **60**, 422-8.
- KING, S.J., BOOYSE, F.M., LIN, P.H., TRAYLOR, M., NARKATES, A.J. & OPARIL, S. (1989). Hypoxia stimulates endothelial cell angiotensin-converting enzyme antigen synthesis. *Am J Physiol*, **256**, C1231-8.

- KING, S.J. & OPARIL, S. (1992). Converting-enzyme inhibitors increase converting-enzyme mRNA and activity in endothelial cells. *Am J Physiol*, **263**, C743-9.
- KLATT, P., PFEIFFER, S., LIST, B.M., LEHNER, D., GLATTER, O., BACHINGER, H.P., WERNER, E.R., SCHMIDT, K. & MAYER, B. (1996). Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem*, **271**, 7336-42.
- KNOLLER, S., SHPUNGIN, S. & PICK, E. (1991). The membrane-associated component of the amphiphile-activated, cytosol-dependent superoxide-forming NADPH oxidase of macrophages is identical to cytochrome b559. *J Biol Chem*, **266**, 2795-804.
- KOHLSTEDT, K., BRANDES, R.P., MULLER-ESTERL, W., BUSSE, R. & FLEMING, I. (2004). Angiotensin-converting enzyme is involved in outside-in signaling in endothelial cells. *Circ Res*, **94**, 60-7.
- KOHLSTEDT, K., BUSSE, R. & FLEMING, I. (2005). Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. *Hypertension*, **45**, 126-32.
- KOHLSTEDT, K., SHOGHI, F., MULLER-ESTERL, W., BUSSE, R. & FLEMING, I. (2002). CK2 phosphorylates the angiotensin-converting enzyme and regulates its retention in the endothelial cell plasma membrane. *Circ Res*, **91**, 749-56.
- KORNEL, L., RAFELSON, M.E., JR., HAYASHI, T., KANAMARLAPUDI, N. & ANDERSON, K.M. (1988). Arterial receptors for adrenal steroids and transport of electrolytes in vascular smooth muscle. *Clin Physiol Biochem*, **6**, 188-200.
- KRANZHOFFER, R., SCHMIDT, J., PFEIFFER, C.A., HAGL, S., LIBBY, P. & KUBLER, W. (1999). Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**, 1623-9.
- KRUM, H., NOLLY, H., WORKMAN, D., HE, W., RONIKER, B., KRAUSE, S. & FAKOUHI, K. (2002). Efficacy of eplerenone added to renin-angiotensin blockade in hypertensive patients. *Hypertension*, **40**, 117-23.
- KUBO, S.H., RECTOR, T.S., BANK, A.J., RAIJ, L., KRAEMER, M.D., TADROS, P., BEARDSLEE, M. & GARR, M.D. (1994). Lack of contribution of nitric oxide to basal vasomotor tone in heart failure. *Am J Cardiol*, **74**, 1133-6.
- KUBO, S.H., RECTOR, T.S., BANK, A.J., WILLIAMS, R.E. & HEIFETZ, S.M. (1991). Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation*, **84**, 1589-96.
- LANDMESSER, U., MERTEN, R., SPIEKERMANN, S., BUTTNER, K., DREXLER, H. & HORNIG, B. (2000). Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*, **101**, 2264-70.

- LARAGH, J.H. (1962). Interrelationships between angiotensin, norepinephrine, epinephrine, aldosterone secretion, and electrolyte metabolism in man. *Circulation*, **25**, 203-11.
- LASSEGUE, B. & CLEMPUS, R.E. (2003). Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **285**, R277-97.
- LAUFS, U., ADAM, O., STREHLOW, K., WASSMANN, S., KONKOL, C., LAUFS, K., SCHMIDT, W., BOHM, M. & NICKENIG, G. (2003). Down-regulation of Rac-1 GTPase by Estrogen. *J Biol Chem*, **278**, 5956-62.
- LE CRAS, T.D., XUE, C., RENGASAMY, A. & JOHNS, R.A. (1996). Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol*, **270**, L164-70.
- LEE, A.F., MACFADYEN, R.J. & STRUTHERS, A.D. (1999). Neurohormonal reactivation in heart failure patients on chronic ACE inhibitor therapy: a longitudinal study. *Eur J Heart Fail*, **1**, 401-6.
- LI, J.M., GALL, N.P., GRIEVE, D.J., CHEN, M. & SHAH, A.M. (2002). Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension*, **40**, 477-84.
- LI, J.M. & SHAH, A.M. (2004). Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **287**, R1014-30.
- LI, W.G., MILLER, F.J., JR., ZHANG, H.J., SPITZ, D.R., OBERLEY, L.W. & WEINTRAUB, N.L. (2001). H(2)O(2)-induced O(2) production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem*, **276**, 29251-6.
- LI, Y., HUANG, T.T., CARLSON, E.J., MELOV, S., URSELL, P.C., OLSON, J.L., NOBLE, L.J., YOSHIMURA, M.P., BERGER, C., CHAN, P.H., WALLACE, D.C. & EPSTEIN, C.J. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*, **11**, 376-81.
- LIAO, J.K., SHIN, W.S., LEE, W.Y. & CLARK, S.L. (1995). Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, **270**, 319-24.
- LINCOLN, T.M., KOMALAVILAS, P. & CORNWELL, T.L. (1994). Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension*, **23**, 1141-7.
- LINZ, W., WIEMER, G., GOHLKE, P., UNGER, T. & SCHOLKENS, B.A. (1995). Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev*, **47**, 25-49.
- LIST, B.M., KLOSCH, B., VOLKER, C., GORREN, A.C., SESSA, W.C., WERNER, E.R., KUKOVETZ, W.R., SCHMIDT, K. & MAYER, B. (1997). Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated

- uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. *Biochem J*, **323** (Pt 1), 159-65.
- LIU, J., GARCIA-CARDENA, G. & SESSA, W.C. (1996). Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry*, **35**, 13277-81.
- LIU, S.L., SCHMUCK, S., CHORAZCYZEWSKI, J.Z., GROS, R. & FELDMAN, R.D. (2003). Aldosterone regulates vascular reactivity: short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation. *Circulation*, **108**, 2400-6.
- LOMBES, M., ALFAIDY, N., EUGENE, E., LESSANA, A., FARMAN, N. & BONVALET, J.P. (1995). Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation*, **92**, 175-82.
- LOW, A.M., KOTECHEA, N., NEILD, T.O., KWAN, C.Y. & DANIEL, E.E. (1996). Relative contributions of extracellular Ca²⁺ and Ca²⁺ stores to smooth muscle contraction in arteries and arterioles of rat, guinea-pig, dog and rabbit. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **23**, 310-6.
- LUCKHOFF, A., POHL, U., MULSCH, A. & BUSSE, R. (1988). Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *Br J Pharmacol*, **95**, 189-96.
- LUSCHER, T.F. & NOLL, G. (1995). The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis*, **118 Suppl**, S81-90.
- LUSCHER, T.F. & TANNER, F.C. (1993). Endothelial regulation of vascular tone and growth. *Am J Hypertens*, **6**, 283S-293S.
- MACDONALD, J.E., KENNEDY, N. & STRUTHERS, A.D. (2004). Effects of spironolactone on endothelial function, vascular angiotensin converting enzyme activity, and other prognostic markers in patients with mild heart failure already taking optimal treatment. *Heart*, **90**, 765-70.
- MACDONALD, J.E. & STRUTHERS, A.D. (2004). What is the optimal serum potassium level in cardiovascular patients? *J Am Coll Cardiol*, **43**, 155-61.
- MACFADYEN, R.J., LEE, A.F., MORTON, J.J., PRINGLE, S.D. & STRUTHERS, A.D. (1999). How often are angiotensin II and aldosterone concentrations raised during chronic ACE inhibitor treatment in cardiac failure? *Heart*, **82**, 57-61.
- MACMILLAN-CROW, L.A., CROW, J.P. & THOMPSON, J.A. (1998). Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry*, **37**, 1613-22.
- MACMILLAN-CROW, L.A. & CRUTHIRDS, D.L. (2001). Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res*, **34**, 325-36.

- MALEK, A.M., IZUMO, S. & ALPER, S.L. (1999). Modulation by pathophysiological stimuli of the shear stress-induced up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Neurosurgery*, **45**, 334-44; discussion 344-5.
- MANCINI, G.B., HENRY, G.C., MACAYA, C., O'NEILL, B.J., PUCILLO, A.L., CARERE, R.G., WARGOVICH, T.J., MUDRA, H., LUSCHER, T.F., KLIBANER, M.I., HABER, H.E., UPRICHARD, A.C., PEPINE, C.J. & PITT, B. (1996). Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation*, **94**, 258-65.
- MARIN, J. (1993). Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *J Auton Pharmacol*, **13**, 127-76.
- MARIN, J. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, M.A. (1997). Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther*, **75**, 111-34.
- MARKLUND, S.L. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 7634-8.
- MARKLUND, S.L. (1992). Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J Biol Chem*, **267**, 6696-701.
- MARLETTA, M.A. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*, **268**, 12231-4.
- MARVER, D. (1984). Influence of adrenalectomy and steroid replacement on heart citrate synthase levels. *Am J Physiol*, **246**, E452-7.
- MASSON, S., STASZEWSKY, L., ANNONI, G., CARLO, E., AROSIO, B., BAI, A., CALABRESI, C., MARTINOLI, E., SALIO, M., FIORDALISO, F., SCANZIANI, E., RUDOLPH, A.E. & LATINI, R. (2004). Eplerenone, a selective aldosterone blocker, improves diastolic function in aged rats with small-to-moderate myocardial infarction. *J Card Fail*, **10**, 433-41.
- MAZAK, I., FIEBELER, A., MULLER, D.N., PARK, J.K., SHAGDARSUREN, E., LINDSCHAU, C., DECHEND, R., VIEDT, C., PILZ, B., HALLER, H. & LUFT, F.C. (2004). Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, **109**, 2792-800.
- MCCABE, R.D., BAKARICH, M.A., SRIVASTAVA, K. & YOUNG, D.B. (1994). Potassium inhibits free radical formation. *Hypertension*, **24**, 77-82.
- MCCABE, T.J., FULTON, D., ROMAN, L.J. & SESSA, W.C. (2000). Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem*, **275**, 6123-8.
- MCCORD, J.M. & FRIDOVICH, I. (1969). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem*, **244**, 6056-63.

- MCINTYRE, M., BOHR, D.F. & DOMINICZAK, A.F. (1999). Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*, **34**, 539-45.
- MCMAHON, E.G. (2003). Eplerenone, a new selective aldosterone blocker. *Curr Pharm Des*, **9**, 1065-75.
- MCMAHON, E.G. (2001). Recent studies with eplerenone, a novel selective aldosterone receptor antagonist. *Curr Opin Pharmacol*, **1**, 190-6.
- MEERSON, F.Z., MASHINA, S., LAPSHIN, A.V. & MANUKHINA, E.B. (1993). [Decrease in constrictor response and increase in dilator response of the resistant artery in experimental myocardial infarction: effect of adaptation to hypoxia on this phenomenon]. *Biull Eksp Biol Med*, **115**, 464-6.
- MEILHAC, O., ZHOU, M., SANTANAM, N. & PARTHASARATHY, S. (2000). Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. *J Lipid Res*, **41**, 1205-13.
- MENDELSON, F.A., LLOYD, C.J., KACHEL, C. & FUNDER, J.W. (1982). Induction by glucocorticoids of angiotensin converting enzyme production from bovine endothelial cells in culture and rat lung in vivo. *J Clin Invest*, **70**, 684-92.
- MENDES RIBEIRO, A.C., BRUNINI, T.M., ELLORY, J.C. & MANN, G.E. (2001). Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. *Cardiovasc Res*, **49**, 697-712.
- MERY, P.F., LOHMANN, S.M., WALTER, U. & FISCHMEISTER, R. (1991). Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 1197-201.
- MICHEL, J.B., FERON, O., SASE, K., PRABHAKAR, P. & MICHEL, T. (1997). Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, **272**, 25907-12.
- MICHEL, J.B., XU, Y., BLOT, S., PHILIPPE, M. & CHATELLIER, G. (1996). Improved survival in rats administered NG-nitro L-arginine methyl ester due to converting enzyme inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol*, **28**, 142-8.
- MICHEL, T., LI, G.K. & BUSCONI, L. (1993). Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6252-6.
- MICHELL, B.J., GRIFFITHS, J.E., MITCHELHILL, K.I., RODRIGUEZ-CRESPO, I., TIGANIS, T., BOZINOVSKI, S., DE MONTELLANO, P.R., KEMP, B.E. & PEARSON, R.B. (1999). The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol*, **9**, 845-8.
- MIHM, M.J., COYLE, C.M., SCHANBACHER, B.L., WEINSTEIN, D.M. & BAUER, J.A. (2001). Peroxynitrite induced nitration and inactivation of myofibrillar creatine kinase in experimental heart failure. *Cardiovasc Res*, **49**, 798-807.

- MILLER, A.A., MEGSON, I.L. & GRAY, G.A. (2000). Inducible nitric oxide synthase-derived superoxide contributes to hypereactivity in small mesenteric arteries from a rat model of chronic heart failure. *Br J Pharmacol*, **131**, 29-36.
- MILLER, F.J., JR., GUTTERMAN, D.D., RIOS, C.D., HEISTAD, D.D. & DAVIDSON, B.L. (1998). Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res*, **82**, 1298-305.
- MIYAZAKI, M. & TAKAI, S. (2001). Local angiotensin II-generating system in vascular tissues: the roles of chymase. *Hypertens Res*, **24**, 189-93.
- MOHAZZAB, K.M., KAMINSKI, P.M. & WOLIN, M.S. (1994). NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol*, **266**, H2568-72.
- MOHRI, M., EGASHIRA, K., TAGAWA, T., KUGA, T., TAGAWA, H., HARASAWA, Y., SHIMOKAWA, H. & TAKESHITA, A. (1997). Basal release of nitric oxide is decreased in the coronary circulation in patients with heart failure. *Hypertension*, **30**, 50-6.
- MOLINA Y VEDIA, L., McDONALD, B., REEP, B., BRUNE, B., DI SILVIO, M., BILLIAR, T.R. & LAPETINA, E.G. (1992). Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. *J Biol Chem*, **267**, 24929-32.
- MOLLNAU, H., WENDT, M., SZOCS, K., LASSEGUE, B., SCHULZ, E., OELZE, M., LI, H., BODENSCHATZ, M., AUGUST, M., KLESCHYOV, A.L., TSILIMINGAS, N., WALTER, U., FORSTERMANN, U., MEINERTZ, T., GRIENDLING, K. & MUNZEL, T. (2002). Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res*, **90**, E58-65.
- MOMBOULI, J.V., NEPHTALI, M. & VANHOUTTE, P.M. (1991). Effects of the converting enzyme inhibitor cilazaprilat on endothelium-dependent responses. *Hypertension*, **18**, 1122-9.
- MONCADA, S., HERMAN, A.G., HIGGS, E.A. & VANE, J.R. (1977). Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res*, **11**, 323-44.
- MONCADA, S., PALMER, R.M. & HIGGS, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, **43**, 109-42.
- MULDER, P., ELFERTAK, L., RICHARD, V., COMPAGNON, P., DEVAUX, B., HENRY, J.P., SCALBERT, E., DESCHE, P., MACE, B. & THUILLIE, Z.C. (1996). Peripheral artery structure and endothelial function in heart failure: effect of ACE inhibition. *Am J Physiol*, **271**, H469-77.
- MULLER, J. (1987). Regulation of aldosterone biosynthesis. Physiological and clinical aspects. *Monogr Endocrinol*, **29**, 1-364.

- MUNZEL, T., DAIBER, A., ULLRICH, V. & MULSCH, A. (2005). Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 1551-7.
- NAGAO, T., ILLIANO, S. & VANHOUTTE, P.M. (1992). Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am J Physiol*, **263**, H1090-4.
- NAKAZONO, K., WATANABE, N., MATSUNO, K., SASAKI, J., SATO, T. & INOUE, M. (1991). Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10045-8.
- NG, K.K. & VANE, J.R. (1968). Fate of angiotensin I in the circulation. *Nature*, **218**, 144-50.
- O'BRIEN, A.J., YOUNG, H.M., POVEY, J.M. & FURNESS, J.B. (1995). Nitric oxide synthase is localized predominantly in the Golgi apparatus and cytoplasmic vesicles of vascular endothelial cells. *Histochem Cell Biol*, **103**, 221-5.
- OKAMURA, T., AIMI, Y., KIMURA, H., MURAKAMI, K. & TODA, N. (1992). Existence of renin in the endothelium of human artery. *J Hypertens*, **10**, 49-53.
- OKUNISHI, H., MIYAZAKI, M. & TODA, N. (1984). Evidence for a putatively new angiotensin II-generating enzyme in the vascular wall. *J Hypertens*, **2**, 277-84.
- OKUNISHI, H., OKA, Y., SHIOTA, N., KAWAMOTO, T., SONG, K. & MIYAZAKI, M. (1993). Marked species-difference in the vascular angiotensin II-forming pathways: humans versus rodents. *Jpn J Pharmacol*, **62**, 207-10.
- ONTKEAN, M., GAY, R. & GREENBERG, B. (1991). Diminished endothelium-derived relaxing factor activity in an experimental model of chronic heart failure. *Circ Res*, **69**, 1088-96.
- ORTEGA MATEO, A. & AMAYA ALEIXANDRE DE, A. (2000). Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. *Pharmacol Res*, **42**, 421-7.
- PAGANO, P.J., CLARK, J.K., CIFUENTES-PAGANO, M.E., CLARK, S.M., CALLIS, G.M. & QUINN, M.T. (1997). Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14483-8.
- PAGANO, P.J., ITO, Y., TORNHEIM, K., GALLOP, P.M., TAUBER, A.I. & COHEN, R.A. (1995). An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol*, **268**, H2274-80.
- PALMER, R.M., ASHTON, D.S. & MONCADA, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, **333**, 664-6.
- PALMER, R.M., FERRIGE, A.G. & MONCADA, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**, 524-6.

- PALMIERI, E.A., BIONDI, B. & FAZIO, S. (2002). Aldosterone receptor blockade in the management of heart failure. *Heart Fail Rev*, **7**, 205-19.
- PANDA, K., ROSENFELD, R.J., GHOSH, S., MEADE, A.L., GETZOFF, E.D. & STUEHR, D.J. (2002). Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. *J Biol Chem*, **277**, 31020-30.
- PARMLEY, W.W. (1985). Pathophysiology of congestive heart failure. *Am J Cardiol*, **56**, 7A-11A.
- PAULUS, W.J. (1994). Endothelial control of vascular and myocardial function in heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther*, **8**, 437-46.
- PEACH, M.J. (1977). Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev*, **57**, 313-70.
- PEARCE, P. & FUNDER, J.W. (1987). High affinity aldosterone binding sites (type I receptors) in rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **14**, 859-66.
- PERAZELLA, M.A. & SETARO, J.F. (2003). Renin-angiotensin-aldosterone system: fundamental aspects and clinical implications in renal and cardiovascular disorders. *J Nucl Cardiol*, **10**, 184-96.
- PEREIRA, R.B., SARTORIO, C.L., VASSALLO, D.V. & STEFANON, I. (2005). Differences in tail vascular bed reactivity in rats with and without heart failure following myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther*, **312**, 1321-5.
- PFEFFER, M.A. & BRAUNWALD, E. (1990). Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*, **81**, 1161-72.
- PFEFFER, M.A., PFEFFER, J.M., FISHBEIN, M.C., FLETCHER, P.J., SPADARO, J., KLONER, R.A. & BRAUNWALD, E. (1979). Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*, **44**, 503-12.
- PITT, B., REMME, W., ZANNAD, F., NEATON, J., MARTINEZ, F., RONIKER, B., BITTMAN, R., HURLEY, S., KLEIMAN, J. & GATLIN, M. (2003). Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*, **348**, 1309-21.
- PITT, B., WHITE, H., NICOLAU, J., MARTINEZ, F., GHEORGHIADE, M., ASCHERMANN, M., VAN VELDHUISEN, D.J., ZANNAD, F., KRUM, H., MUKHERJEE, R. & VINCENT, J. (2005). Eplerenone reduces mortality 30 days after randomization following acute myocardial infarction in patients with left ventricular systolic dysfunction and heart failure. *J Am Coll Cardiol*, **46**, 425-31.
- PITT, B., ZANNAD, F., REMME, W.J., CODY, R., CASTAIGNE, A., PEREZ, A., PALENSKY, J. & WITTES, J. (1999). The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*, **341**, 709-17.

- PLUNKETT, L.M., CORREA, F.M. & SAAVEDRA, J.M. (1985). Quantitative autoradiographic determination of angiotensin-converting enzyme binding in rat pituitary and adrenal glands with 125I-351A, a specific inhibitor. *Regul Pept*, **12**, 263-72.
- POLLMAN, M.J., YAMADA, T., HORIUCHI, M. & GIBBONS, G.H. (1996). Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res*, **79**, 748-56.
- PRESTA, A., LIU, J., SESSA, W.C. & STUEHR, D.J. (1997). Substrate binding and calmodulin binding to endothelial nitric oxide synthase coregulate its enzymatic activity. *Nitric Oxide*, **1**, 74-87.
- QI, X.L., STEWART, D.J., GOSSELIN, H., AZAD, A., PICARD, P., ANDRIES, L., SYS, S.U., BRUTSAERT, D.L. & ROULEAU, J.L. (1999). Improvement of endocardial and vascular endothelial function on myocardial performance by captopril treatment in postinfarct rat hearts. *Circulation*, **100**, 1338-45.
- QUAGLIARO, L., PICONI, L., ASSALONI, R., MARTINELLI, L., MOTZ, E. & CERIELLO, A. (2003). Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes*, **52**, 2795-804.
- RADI, R., BECKMAN, J.S., BUSH, K.M. & FREEMAN, B.A. (1991a). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, **288**, 481-7.
- RADI, R., BECKMAN, J.S., BUSH, K.M. & FREEMAN, B.A. (1991b). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*, **266**, 4244-50.
- RAJAGOPALAN, S., DUQUAINE, D., KING, S., PITT, B. & PATEL, P. (2002). Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. *Circulation*, **105**, 2212-6.
- RAJAGOPALAN, S., KURZ, S., MUNZEL, T., TARPEY, M., FREEMAN, B.A., GRIENDLING, K.K. & HARRISON, D.G. (1996a). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*, **97**, 1916-23.
- RAJAGOPALAN, S., MENG, X.P., RAMASAMY, S., HARRISON, D.G. & GALIS, Z.S. (1996b). Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*, **98**, 2572-9.
- RAKUGI, H., JACOB, H.J., KRIEGER, J.E., INGELFINGER, J.R. & PRATT, R.E. (1993). Vascular injury induces angiotensinogen gene expression in the media and neointima. *Circulation*, **87**, 283-90.

- RAMAN, C.S., LI, H., MARTASEK, P., KRAL, V., MASTERS, B.S. & POULOS, T.L. (1998). Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell*, **95**, 939-50.
- RAMASAMY, S., PARTHASARATHY, S. & HARRISON, D.G. (1998). Regulation of endothelial nitric oxide synthase gene expression by oxidized linoleic acid. *J Lipid Res*, **39**, 268-76.
- RAMSEY, M.W., GOODFELLOW, J., JONES, C.J., LUDDINGTON, L.A., LEWIS, M.J. & HENDERSON, A.H. (1995). Endothelial control of arterial distensibility is impaired in chronic heart failure. *Circulation*, **92**, 3212-9.
- RAPOPORT, R.M. & MURAD, F. (1983). Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res*, **52**, 352-7.
- REMBOLD, C.M. (1992). Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension*, **20**, 129-37.
- REY, F.E. & PAGANO, P.J. (2002). The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**, 1962-71.
- RIDKER, P.M., GABOURY, C.L., CONLIN, P.R., SEELY, E.W., WILLIAMS, G.H. & VAUGHAN, D.E. (1993). Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation*, **87**, 1969-73.
- RIETZSCHEL, E., DUPREZ, D.A., DE BUYZERE, M.L. & CLEMENT, D.L. (2000). Inverse relation between aldosterone and venous capacitance in chronically treated congestive heart failure. *Am J Cardiol*, **85**, 977-80.
- ROBINSON, B.H. (1998). The role of manganese superoxide dismutase in health and disease. *J Inherit Metab Dis*, **21**, 598-603.
- ROCHA, R., CHANDER, P.N., KHANNA, K., ZUCKERMAN, A. & STIER, C.T., JR. (1998). Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension*, **31**, 451-8.
- ROCHA, R., MARTIN-BERGER, C.L., YANG, P., SCHERRER, R., DELYANI, J. & MCMAHON, E. (2002). Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology*, **143**, 4828-36.
- ROCHA, R., STIER, C.T., JR., KIFOR, I., OCHOA-MAYA, M.R., RENNKE, H.G., WILLIAMS, G.H. & ADLER, G.K. (2000). Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology*, **141**, 3871-8.
- ROIG, E., PEREZ-VILLA, F., MORALES, M., JIMENEZ, W., ORUS, J., HERAS, M. & SANZ, G. (2000). Clinical implications of increased plasma angiotensin II despite ACE inhibitor therapy in patients with congestive heart failure. *Eur Heart J*, **21**, 53-7.
- ROLAND, B.L., KROZOWSKI, Z.S. & FUNDER, J.W. (1995). Glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptors, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 and -2

- expression in rat brain and kidney: in situ studies. *Mol Cell Endocrinol*, **111**, R1-7.
- ROMAGNI, P., ROSSI, F., GUERRINI, L., QUIRINI, C. & SANTIEMMA, V. (2003). Aldosterone induces contraction of the resistance arteries in man. *Atherosclerosis*, **166**, 345-9.
- ROSSONI, L.V., SALAICES, M., MIGUEL, M., BRIONES, A.M., BARKER, L.A., VASSALLO, D.V. & ALONSO, M.J. (2002). Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **283**, H2110-8.
- ROTH, M., WEITZMAN, A.F. & PIQUILLOU, Y. (1969). Converting enzyme content of different tissues of the rat. *Experientia*, **25**, 1247.
- ROTHER, G. & VALET, G. (1990). Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol*, **47**, 440-8.
- ROULEAU, J.L., PACKER, M., MOYE, L., DE CHAMPLAIN, J., BICHET, D., KLEIN, M., ROULEAU, J.R., SUSSEX, B., ARNOLD, J.M., SESTIER, F. & ET AL. (1994). Prognostic value of neurohumoral activation in patients with an acute myocardial infarction: effect of captopril. *J Am Coll Cardiol*, **24**, 583-91.
- RUBANYI, G.M. (1993). The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*, **22 Suppl 4**, S1-14.
- RUBANYI, G.M. & VANHOUTTE, P.M. (1986). Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol*, **250**, H815-21.
- RUBBO, H., RADI, R., TRUJILLO, M., TELLERI, R., KALYANARAMAN, B., BARNES, S., KIRK, M. & FREEMAN, B.A. (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*, **269**, 26066-75.
- RUDOLPH, A.E., ROCHA, R. & MCMAHON, E.G. (2004). Aldosterone target organ protection by eplerenone. *Mol Cell Endocrinol*, **217**, 229-38.
- RUEHLMANN, D.O. & MANN, G.E. (2000). Rapid non-genomic vasodilator actions of oestrogens and sex steroids. *Curr Med Chem*, **7**, 533-41.
- RYAN, U.S., RYAN, J.W., WHITAKER, C. & CHIU, A. (1976). Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). II. Immunocytochemistry and immunofluorescence. *Tissue Cell*, **8**, 125-45.
- SADEE, W., DAGCIOGLU, M. & RIEGELMAN, S. (1972). Fluorometric microassay for spironolactone and its metabolites in biological fluids. *J Pharm Sci*, **61**, 1126-9.

- SADEE, W., DAGCIOGLU, M. & SCHRODER, R. (1973). Pharmacokinetics of spironolactone, canrenone and canrenoate-K in humans. *J Pharmacol Exp Ther*, **185**, 686-95.
- SAM, F., SAWYER, D.B., CHANG, D.L., EBERLI, F.R., NGOY, S., JAIN, M., AMIN, J., APSTEIN, C.S. & COLUCCI, W.S. (2000). Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **279**, H422-8.
- SARTORIO, C.L., PINTO, V.D., CUTINI, G.J., VASSALLO, D.V. & STEFANON, I. (2005). Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition on the rat tail vascular bed reactivity three days after myocardium infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, **45**, 321-6.
- SAYE, J.A., SINGER, H.A. & PEACH, M.J. (1984). Role of endothelium in conversion of angiotensin I to angiotensin II in rabbit aorta. *Hypertension*, **6**, 216-21.
- SCAVONE, C., GLEZER, I., DEMARCHI MUNHOZ, C., DE SENA BERNARDES, C. & PEKELMANN MARKUS, R. (2000). Influence of age on nitric oxide modulatory action on Na(+), K(+)-ATPase activity through cyclic GMP pathway in proximal rat trachea. *Eur J Pharmacol*, **388**, 1-7.
- SCAVONE, C., SCANLON, C., MCKEE, M. & NATHANSON, J.A. (1995). Atrial natriuretic peptide modulates sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase through a mechanism involving cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther*, **272**, 1036-43.
- SCHAFER, A., FRACCAROLLO, D., HILDEMAN, S.K., TAS, P., ERTL, G. & BAUERSACHS, J. (2003). Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res*, **58**, 655-62.
- SCHAFER, A., FRACCAROLLO, D., TAS, P., SCHMIDT, I., ERTL, G. & BAUERSACHS, J. (2004). Endothelial dysfunction in congestive heart failure: ACE inhibition vs. angiotensin II antagonism. *Eur J Heart Fail*, **6**, 151-9.
- SCHIFFRIN, E.L., FRANKS, D.J. & GUTKOWSKA, J. (1985). Effect of aldosterone on vascular angiotensin II receptors in the rat. *Can J Physiol Pharmacol*, **63**, 1522-7.
- SCHMIDT, B.M., MONTEALEGRE, A., JANSON, C.P., MARTIN, N., STEIN-KEMMESIES, C., SCHERHAG, A., FEURING, M., CHRIST, M. & WEHLING, M. (1999). Short term cardiovascular effects of aldosterone in healthy male volunteers. *J Clin Endocrinol Metab*, **84**, 3528-33.
- SCHRIER, R.W. & ABRAHAM, W.T. (1999). Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med*, **341**, 577-85.
- SCHULZ, R., SMITH, J.A., LEWIS, M.J. & MONCADA, S. (1991). Nitric oxide synthase in cultured endocardial cells of the pig. *Br J Pharmacol*, **104**, 21-4.

- SCOTT-BURDEN, T., RESINK, T.J., HAHN, A.W. & VANHOUTTE, P.M. (1991). Induction of endothelin secretion by angiotensin II: effects on growth and synthetic activity of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, **17 Suppl 7**, S96-100.
- SESHIAH, P.N., WEBER, D.S., ROCIC, P., VALPPU, L., TANIYAMA, Y. & GRIENDLING, K.K. (2002). Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res*, **91**, 406-13.
- SESSA, W.C., GARCIA-CARDENA, G., LIU, J., KEH, A., POLLOCK, J.S., BRADLEY, J., THIRU, S., BRAVERMAN, I.M. & DESAI, K.M. (1995). The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, **270**, 17641-4.
- SHAI, S.Y., FISHEL, R.S., MARTIN, B.M., BERK, B.C. & BERNSTEIN, K.E. (1992). Bovine angiotensin converting enzyme cDNA cloning and regulation. Increased expression during endothelial cell growth arrest. *Circ Res*, **70**, 1274-81.
- SILVESTRE, J.S., HEYMES, C., OUBENAÏSSA, A., ROBERT, V., AUPETIT-FAISANT, B., CARAYON, A., SWYNGHEDAUW, B. & DELCAYRE, C. (1999). Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation*, **99**, 2694-701.
- SILVESTRE, J.S., ROBERT, V., HEYMES, C., AUPETIT-FAISANT, B., MOUAS, C., MOALIC, J.M., SWYNGHEDAUW, B. & DELCAYRE, C. (1998). Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem*, **273**, 4883-91.
- SIMPSON, S.A. & TAIT, J.F. (1953). The nature of the circulating hormones of the adrenal cortex in man. *Arch Middx Hosp*, **3**, 209-18.
- SKATCHKOV, M.P., SPERLING, D., HINK, U., MULSCH, A., HARRISON, D.G., SINDERMAN, I., MEINERTZ, T. & MUNZEL, T. (1999). Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production. *Biochem Biophys Res Commun*, **254**, 319-24.
- SKEGGS, L.T., DORER, F.E., KAHN, J.R., LENTZ, K.E. & LEVINE, M. (1976). The biochemistry of the renin-angiotensin system and its role in hypertension. *Am J Med*, **60**, 737-48.
- SKEGGS, L.T., JR., KAHN, J.R. & SHUMWAY, N.P. (1956). The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med*, **103**, 295-9.
- SMITH, C.J., SUN, D., HOEGLER, C., ROTH, B.S., ZHANG, X., ZHAO, G., XU, X.B., KOBARI, Y., PRITCHARD, K., JR., SESSA, W.C. & HINTZE, T.H. (1996). Reduced gene expression of vascular endothelial NO synthase and cyclooxygenase-1 in heart failure. *Circ Res*, **78**, 58-64.
- SOCCIO, M., TONIATO, E., EVANGELISTA, V., CARLUCCIO, M. & DE CATERINA, R. (2005). Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *Eur J Clin Invest*, **35**, 305-14.

- SOMLYO, A.V. & SOMLYO, A.P. (1968). Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, **159**, 129-45.
- STAESSEN, J., LIJNEN, P., FAGARD, R., VERSCHUEREN, L.J. & AMERY, A. (1981). Rise in plasma concentration of aldosterone during long-term angiotensin II suppression. *J Endocrinol*, **91**, 457-65.
- STASSEN, F.R., FAZZI, G.E., LEENDERS, P.J., SMITS, J.F. & DE MEY, J.G. (1997). Coronary arterial hyperreactivity and mesenteric arterial hyporeactivity after myocardial infarction in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol*, **29**, 780-8.
- STATHOPOULOS, P.B., LU, X., SHEN, J., SCOTT, J.A., HAMMOND, J.R., MCCORMACK, D.G., ARNOLD, J.M. & FENG, Q. (2001). Increased L-arginine uptake and inducible nitric oxide synthase activity in aortas of rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **280**, H859-67.
- STEG, P.G., DABBOUS, O.H., FELDMAN, L.J., COHEN-SOLAL, A., AUMONT, M.C., LOPEZ-SENDON, J., BUDAJ, A., GOLDBERG, R.J., KLEIN, W. & ANDERSON, F.A., JR. (2004). Determinants and prognostic impact of heart failure complicating acute coronary syndromes: observations from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Circulation*, **109**, 494-9.
- STEWART, D.J., KUBAC, G., COSTELLO, K.B. & CERNACEK, P. (1991). Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, **18**, 38-43.
- STIER, C.T., JR., CHANDER, P.N. & ROCHA, R. (2002). Aldosterone as a mediator in cardiovascular injury. *Cardiol Rev*, **10**, 97-107.
- STRALIN, P., KARLSSON, K., JOHANSSON, B.O. & MARKLUND, S.L. (1995). The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **15**, 2032-6.
- STRALIN, P. & MARKLUND, S.L. (2000). Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **151**, 433-41.
- STRALIN, P. & MARKLUND, S.L. (2001). Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **281**, H1621-9.
- STRUTHERS, A.D. (2004a). Aldosterone blockade in cardiovascular disease. *Heart*, **90**, 1229-34.
- STRUTHERS, A.D. (1996). Aldosterone escape during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in chronic heart failure. *J Card Fail*, **2**, 47-54.
- STRUTHERS, A.D. (2004b). The clinical implications of aldosterone escape in congestive heart failure. *Eur J Heart Fail*, **6**, 539-45.
- STULL, J.T., GALLAGHER, P.J., HERRING, B.P. & KAMM, K.E. (1991). Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation. *Hypertension*, **17**, 723-32.

- SUGIYAMA, T., YOSHIMOTO, T., TSUCHIYA, K., GOCHOU, N., HIRONO, Y., TATENO, T., FUKAI, N., SHICHIRI, M. & HIRATA, Y. (2005). Aldosterone induces angiotensin converting enzyme gene expression via a JAK2-dependent pathway in rat endothelial cells. *Endocrinology*, **146**, 3900-6.
- SUMIMOTO, H., HATA, K., MIZUKI, K., ITO, T., KAGE, Y., SAKAKI, Y., FUKUMAKI, Y., NAKAMURA, M. & TAKESHIGE, K. (1996). Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase. *J Biol Chem*, **271**, 22152-8.
- SUN, Y., RATAJSKA, A., ZHOU, G. & WEBER, K.T. (1993). Angiotensin-converting enzyme and myocardial fibrosis in the rat receiving angiotensin II or aldosterone. *J Lab Clin Med*, **122**, 395-403.
- SUN, Y., ZHANG, J., LU, L., CHEN, S.S., QUINN, M.T. & WEBER, K.T. (2002). Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *Am J Pathol*, **161**, 1773-81.
- SUTTON, M.G. & SHARPE, N. (2000). Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, **101**, 2981-8.
- SUWAIDI, J.A., HAMASAKI, S., HIGANO, S.T., NISHIMURA, R.A., HOLMES, D.R., JR. & LERMAN, A. (2000). Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*, **101**, 948-54.
- SUZUKI, G., MORITA, H., MISHIMA, T., SHAROV, V.G., TODOR, A., TANHEHCO, E.J., RUDOLPH, A.E., MCMAHON, E.G., GOLDSTEIN, S. & SABBAH, H.N. (2002). Effects of long-term monotherapy with eplerenone, a novel aldosterone blocker, on progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. *Circulation*, **106**, 2967-72.
- SUZUKI, K., TATSUMI, H., SATOH, S., SENDA, T., NAKATA, T., FUJII, J. & TANIGUCHI, N. (1993). Manganese-superoxide dismutase in endothelial cells: localization and mechanism of induction. *Am J Physiol*, **265**, H1173-8.
- SWEDBERG, K., ENEROTH, P., KJEKSHUS, J. & WILHELMSEN, L. (1990). Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation*, **82**, 1730-6.
- TAKAGISHI, T., MURAHASHI, N., AZAGAMI, S., MORIMATSU, M. & SASAGURI, Y. (1995). Effect of angiotensin II and thromboxane A2 on the production of matrix metalloproteinase by human aortic smooth muscle cells. *Biochem Mol Biol Int*, **35**, 265-73.
- TAKAI, S., JIN, D., MURAMATSU, M., KIRIMURA, K., SAKONJO, H. & MIYAZAKI, M. (2005). Eplerenone inhibits atherosclerosis in nonhuman primates. *Hypertension*, **46**, 1135-9.

- TAKAI, S., SHIOTA, N., KOBAYASHI, S., MATSUMURA, E. & MIYAZAKI, M. (1997). Induction of chymase that forms angiotensin II in the monkey atherosclerotic aorta. *FEBS Lett*, **412**, 86-90.
- TAKAI, S., SHIOTA, N., YAMAMOTO, D., OKUNISHI, H. & MIYAZAKI, M. (1996). Purification and characterization of angiotensin II-generating chymase from hamster cheek pouch. *Life Sci*, **58**, 591-7.
- TAKEDA, Y., MIYAMORI, I., INABA, S., FURUKAWA, K., HATAKEYAMA, H., YONEDA, T., MABUCHI, H. & TAKEDA, R. (1997). Vascular aldosterone in genetically hypertensive rats. *Hypertension*, **29**, 45-8.
- TAKEDA, Y., MIYAMORI, I., YONEDA, T., HATAKEYAMA, H., INABA, S., FURUKAWA, K., MABUCHI, H. & TAKEDA, R. (1996). Regulation of aldosterone synthase in human vascular endothelial cells by angiotensin II and adrenocorticotropin. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**, 2797-800.
- TAKEDA, Y., MIYAMORI, I., YONEDA, T., IKI, K., HATAKEYAMA, H., BLAIR, I.A., HSIEH, F.Y. & TAKEDA, R. (1995). Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension*, **25**, 170-3.
- TAKEMOTO, M., EGASHIRA, K., TOMITA, H., USUI, M., OKAMOTO, H., KITABATAKE, A., SHIMOKAWA, H., SUEISHI, K. & TAKESHITA, A. (1997a). Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade: effects on cardiovascular remodeling in rats induced by the long-term blockade of nitric oxide synthesis. *Hypertension*, **30**, 1621-7.
- TAKEMOTO, M., EGASHIRA, K., USUI, M., NUMAGUCHI, K., TOMITA, H., TSUTSUI, H., SHIMOKAWA, H., SUEISHI, K. & TAKESHITA, A. (1997b). Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *J Clin Invest*, **99**, 278-87.
- TARE, M., PARKINGTON, H.C., COLEMAN, H.A., NEILD, T.O. & DUSTING, G.J. (1990). Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature*, **346**, 69-71.
- TEERLINK, J.R., CLOZEL, M., FISCHLI, W. & CLOZEL, J.P. (1993). Temporal evolution of endothelial dysfunction in a rat model of chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, **22**, 615-20.
- TEERLINK, J.R., GRAY, G.A., CLOZEL, M. & CLOZEL, J.P. (1994a). Increased vascular responsiveness to norepinephrine in rats with heart failure is endothelium dependent. Dissociation of basal and stimulated nitric oxide release. *Circulation*, **89**, 393-401.
- TEERLINK, J.R., LOFFLER, B.M., HESS, P., MAIRE, J.P., CLOZEL, M. & CLOZEL, J.P. (1994b). Role of endothelin in the maintenance of blood pressure in conscious rats with chronic heart failure. Acute effects of the endothelin receptor antagonist Ro 47-0203 (bosentan). *Circulation*, **90**, 2510-8.

- TOMASIAN, D., KEANEY, J.F. & VITA, J.A. (2000). Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc Res*, **47**, 426-35.
- TRAPP, T. & HOLSBOER, F. (1995). Ligand-induced conformational changes in the mineralocorticoid receptor analyzed by protease mapping. *Biochem Biophys Res Commun*, **215**, 286-91.
- TSUTSUI, H. (2001). Oxidative stress in heart failure: the role of mitochondria. *Intern Med*, **40**, 1177-82.
- UEMATSU, M., OHARA, Y., NAVAS, J.P., NISHIDA, K., MURPHY, T.J., ALEXANDER, R.W., NEREM, R.M. & HARRISON, D.G. (1995). Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol*, **269**, C1371-8.
- ULKER, S., MCMASTER, D., MCKEOWN, P.P. & BAYRAKTUTAN, U. (2003). Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res*, **59**, 488-500.
- ULLIAN, M.E. & FINE, J.J. (1994). Mechanisms of enhanced angiotensin II-stimulated signal transduction in vascular smooth muscle by aldosterone. *J Cell Physiol*, **161**, 201-8.
- ULLIAN, M.E., HUTCHISON, F.N., HAZEN-MARTIN, D.J. & MORINELLI, T.A. (1993). Angiotensin II-aldosterone interactions on protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **264**, C1525-31.
- ULLIAN, M.E., SCHELLING, J.R. & LINAS, S.L. (1992). Aldosterone enhances angiotensin II receptor binding and inositol phosphate responses. *Hypertension*, **20**, 67-73.
- ULLIAN, M.E., WALSH, L.G. & MORINELLI, T.A. (1996). Potentiation of angiotensin II action by corticosteroids in vascular tissue. *Cardiovasc Res*, **32**, 266-73.
- URATA, H., NISHIMURA, H. & GANTEN, D. (1995). Mechanisms of angiotensin II formation in humans. *Eur Heart J*, **16 Suppl N**, 79-85.
- USHIO-FUKAI, M., ZAFARI, A.M., FUKUI, T., ISHIZAKA, N. & GRIENDLING, K.K. (1996). p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **271**, 23317-21.
- VAN BREEMEN, C. & SAIDA, K. (1989). Cellular mechanisms regulating $[Ca^{2+}]_i$ smooth muscle. *Annu Rev Physiol*, **51**, 315-29.
- VAN HEEREBEEK, L., MEISCHL, C., STOOKER, W., MEIJER, C.J., NIESSEN, H.W. & ROOS, D. (2002). NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system? *J Clin Pathol*, **55**, 561-8.
- VANHOUTTE, P.M. (2003). Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circ J*, **67**, 572-5.

- VANHOUTTE, P.M. (1997). Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J*, **18 Suppl E**, E19-29.
- VANHOUTTE, P.M. (1996). Endothelium-dependent responses in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, **28**, 2233-40.
- VANHOUTTE, P.M., AUCH-SCHWELK, W., BIONDI, M.L., LORENZ, R.R., SCHINI, V.B. & VIDAL, M.J. (1989). Why are converting enzyme inhibitors vasodilators? *Br J Clin Pharmacol*, **28 Suppl 2**, 95S-103S; discussion 103S-104S.
- VASQUEZ-VIVAR, J., KALYANARAMAN, B., MARTASEK, P., HOGG, N., MASTERS, B.S., KAROUI, H., TORDO, P. & PRITCHARD, K.A., JR. (1998). Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9220-5.
- VENEMA, R.C., JU, H., ZOU, R., RYAN, J.W. & VENEMA, V.J. (1997). Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem*, **272**, 1276-82.
- VIEDT, C., SOTO, U., KRIEGER-BRAUER, H.I., FEI, J., ELSING, C., KUBLER, W. & KREUZER, J. (2000). Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 940-8.
- VIRDIS, A., NEVES, M.F., AMIRI, F., VIEL, E., TOUYZ, R.M. & SCHIFFRIN, E.L. (2002). Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension*, **40**, 504-10.
- VITA, J.A. & KEANEY, J.F., JR. (2002). Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation*, **106**, 640-2.
- WAGNER, A.H., SCHROETER, M.R. & HECKER, M. (2001a). 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *Faseb J*, **15**, 2121-30.
- WAGNER, J.A., HU, K., BAUERSACHS, J., KARCHER, J., WIESLER, M., GOPARAJU, S.K., KUNOS, G. & ERTL, G. (2001b). Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, **38**, 2048-54.
- WANG, H.D., PAGANO, P.J., DU, Y., CAYATTE, A.J., QUINN, M.T., BRECHER, P. & COHEN, R.A. (1998). Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. *Circ Res*, **82**, 810-8.
- WANG, J., YU, L., SOLENBERG, P.J., GELBERT, L., GERINGER, C.D. & STEINBERG, M.I. (2002). Aldosterone stimulates angiotensin-converting enzyme expression and activity in rat neonatal cardiac myocytes. *J Card Fail*, **8**, 167-74.
- WANG, W. (1994). Chronic administration of aldosterone depresses baroreceptor reflex function in the dog. *Hypertension*, **24**, 571-5.

- WASSMANN, S., WASSMANN, K. & NICKENIG, G. (2004). Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*, **44**, 381-6.
- WEBER, K.T., SUN, Y., KATWA, L.C. & CLEUTJENS, J.P. (1995). Connective tissue: a metabolic entity? *J Mol Cell Cardiol*, **27**, 107-20.
- WEHLING, M., SPES, C.H., WIN, N., JANSON, C.P., SCHMIDT, B.M., THEISEN, K. & CHRIST, M. (1998). Rapid cardiovascular action of aldosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 3517-22.
- WEHLING, M., ULSENHEIMER, A., SCHNEIDER, M., NEYLON, C. & CHRIST, M. (1994). Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. *Biochem Biophys Res Commun*, **204**, 475-81.
- WEINBERGER, M.H., RONIKER, B., KRAUSE, S.L. & WEISS, R.J. (2002). Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in mild-to-moderate hypertension. *Am J Hypertens*, **15**, 709-16.
- WEIR, M.R. & DZAU, V.J. (1999). The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens*, **12**, 205S-213S.
- WEISIGER, R.A. & FRIDOVICH, I. (1973). Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem*, **248**, 4793-6.
- WEISS, J.L., FREDERIKSEN, J.W. & WEISFELDT, M.L. (1976). Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J Clin Invest*, **58**, 751-60.
- WEVER, R.M., VAN DAM, T., VAN RIJN, H.J., DE GROOT, F. & RABELINK, T.J. (1997). Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, **237**, 340-4.
- WHITE, C.R., BROCK, T.A., CHANG, L.Y., CRAPO, J., BRISCOE, P., KU, D., BRADLEY, W.A., GIANTURCO, S.H., GORE, J., FREEMAN, B.A. & ET AL. (1994). Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1044-8.
- WIDDER, J., BEHR, T., FRACCAROLLO, D., HU, K., GALUPPO, P., TAS, P., ANGERMANN, C.E., ERTL, G. & BAUERSACHS, J. (2004). Vascular endothelial dysfunction and superoxide anion production in heart failure are p38 MAP kinase-dependent. *Cardiovasc Res*, **63**, 161-7.
- WINK, D.A., OSAWA, Y., DARBYSHIRE, J.F., JONES, C.R., ESHENAU, S.C. & NIMS, R.W. (1993). Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Biophys*, **300**, 115-23.
- WOLLERT, K.C. & DREXLER, H. (1999). The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovasc Res*, **43**, 838-49.

- WOLLERT, K.C., STUDER, R., VON BULOW, B. & DREXLER, H. (1994). Survival after myocardial infarction in the rat. Role of tissue angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation*, **90**, 2457-67.
- WONG, G.H., ELWELL, J.H., OBERLEY, L.W. & GOEDDEL, D.V. (1989). Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell*, **58**, 923-31.
- WU, A.H., PARSONS, L., EVERY, N.R. & BATES, E.R. (2002). Hospital outcomes in patients presenting with congestive heart failure complicating acute myocardial infarction: a report from the Second National Registry of Myocardial Infarction (NRMI-2). *J Am Coll Cardiol*, **40**, 1389-94.
- XAVIER, F.E., SALAICES, M., MARQUEZ-RODAS, I., ALONSO, M.J., ROSSONI, L.V., VASSALLO, D.V. & BALFAGON, G. (2004). Neurogenic nitric oxide release increases in mesenteric arteries from ouabain hypertensive rats. *J Hypertens*, **22**, 949-57.
- XIA, Y. & ZWEIER, J.L. (1997). Direct measurement of nitric oxide generation from nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12705-10.
- XIAO, F., PUDDEFOOT, J.R. & VINSON, G.P. (2000). Aldosterone mediates angiotensin II-stimulated rat vascular smooth muscle cell proliferation. *J Endocrinol*, **165**, 533-6.
- YAMAKURA, F., TAKA, H., FUJIMURA, T. & MURAYAMA, K. (1998). Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem*, **273**, 14085-9.
- YAMAWAKI, H., HAENDELER, J. & BERK, B.C. (2003). Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis. *Circ Res*, **93**, 1029-33.
- YAMAZAKI, T., KOMURO, I., SHIOJIMA, I. & YAZAKI, Y. (1996). The renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy. *Heart*, **76**, 33-5.
- YAN, C., KIM, D., AIZAWA, T. & BERK, B.C. (2003). Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 26-36.
- YANAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y., YAZAKI, Y., GOTO, K. & MASAKI, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**, 411-5.
- YANG, B.C., LI, D.Y., WENG, Y.F., LYNCH, J., WINGO, C.S. & MEHTA, J.L. (1998). Increased superoxide anion generation and altered vasoreactivity in rabbits on low-potassium diet. *Am J Physiol*, **274**, H1955-61.
- YEE, K.M. & STRUTHERS, A.D. (1998). Aldosterone blunts the baroreflex response in man. *Clin Sci (Lond)*, **95**, 687-92.

- YOSHIZUMI, M., PERRELLA, M.A., BURNETT, J.C., JR. & LEE, M.E. (1993). Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res*, **73**, 205-9.
- YOUNG, D.B., LIN, H. & MCCABE, R.D. (1995). Potassium's cardiovascular protective mechanisms. *Am J Physiol*, **268**, R825-37.
- YOUNG, M. & FUNDER, J.W. (2004). Eplerenone, but not steroid withdrawal, reverses cardiac fibrosis in deoxycorticosterone/salt-treated rats. *Endocrinology*, **145**, 3153-7.
- ZANNAD, F. (1995). Aldosterone and heart failure. *Eur Heart J*, **16 Suppl N**, 98-102.
- ZIEGLER, T., SILACCI, P., HARRISON, V.J. & HAYOZ, D. (1998). Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension*, **32**, 351-5.
- ZILLICH, A.J. & CARTER, B.L. (2002). Eplerenone--a novel selective aldosterone blocker. *Ann Pharmacother*, **36**, 1567-76.