

**ATIVIDADE FUNCIONAL DA Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase SENSÍVEL À OUABAÍNA EM  
AORTA DE RATAS COM E SEM SINAIS DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA APÓS  
INFARTO DO MIOCÁRDIO**

**FERNANDA MOURA VARGAS DIAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
(FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR)

**Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, junho de 2007

**ATIVIDADE FUNCIONAL DA Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase SENSÍVEL À OUABAÍNA EM  
AORTA DE RATAS COM E SEM SINAIS DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA APÓS  
INFARTO DO MIOCÁRDIO**

**FERNANDA MOURA VARGAS DIAS**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências  
Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial  
para obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológicas**

**APROVADA EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ POR:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon – Orientadora, UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Venturini Rossoni – Co-orientadora, USP

---

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo, UFES

COORDENADOR DO CURSO PPGCF:

---

José Geraldo Mill

Prof. Dr.

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Vitória, Junho de 2007**  
**FERNANDA MOURA VARGAS DIAS**

**ATIVIDADE FUNCIONAL DA Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase SENSÍVEL À OUABAÍNA EM  
AORTA DE RATAS COM E SEM SINAIS DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA APÓS  
INFARTO DO MIOCÁRDIO**

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológicas.

**ORIENTADORA**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon**

**CO-ORIENTADORA**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Venturini Rossoni**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Vitória, junho de 2007**

Dedico este trabalho a uma família que sonhou unida. Que construiu toda a minha base como ser humano. Dedico este aos que eu mais amo, aos que me amam incondicionalmente, aos que me apóiam sempre, àqueles a quem eu devo tudo o que sou e tudo o que acredito. Mãe (Edna), Pai (Ricardo), Irmãos (Jú e Cau) e ao grande amor da minha vida (Fabiano). Todos eles constituem o meu grande tesouro. *"Porque onde estiver o vosso coração, aí estará também o vosso tesouro"* (Mt. 6:21).

## AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre iluminou meus caminhos e abençoou a minha vida.

Ao meu marido querido, Fabiano Moura Dias, companheiro, amigo e amor, pelo apoio nos momentos em que eu pensava que não conseguiria. Pela doçura, carinho e felicidade que preenchem a minha vida.

À minha família por me conduzir até aqui. Por me apoiarem em todas as minhas decisões. Pelo imenso amor, carinho e amizade. Pai, Mãe, Jú e Cau.

À minha sogra Laura, pelo exemplo de perseverança e coragem, pela sabedoria e por todo apoio.

À minha orientadora querida, Ivanita Stefanon, por ter aberto as portas do seu laboratório e do seu coração para que eu pudesse aprender um pouco mais. Pelo carinho, paciência, incentivo e dedicação ao meu trabalho.

À minha co-orientadora Luciana Venturini Rossoni por ter me recebido de braços abertos em sua casa e seu laboratório. Pelo carinho, por todos os ensinamentos e por suas sábias ponderações.

Ao querido chefe, Dalton Valentim Vassallo, por ser um exemplo de mestre, por sua sabedoria e por tornar agradáveis todos os locais por onde passa.

À minha amiga Wanize de Almeida Rocha por ter despertado em mim à vontade de pesquisar e por ter acreditado que eu era capaz. Além disso, pela paciência, força de vontade, coragem e pelo grande incentivo.

Às amigas queridas Edna e Aurélia por todo apoio, amizade e companheirismo. Por ouvirem meus desabafos, me apoiarem e me fazerem sorrir nos dias tristes.

Ao Patrik, meu companheiro de *aorta*, por sua dedicação, presteza e inteligência.

A todos os amigos do LEMC: Ju (gravidinha), Vivi querida, Lu, Nelson, Altemar (Alti), Núbia, Mírian, Lorena, Fabiana, Eduardo, Keli, Karina, Taís, Gabriel, Evandro, Saulo, Guilherme, Rogério, Alessandra e Cleci.

À Carmen e Raquel, pela ajuda e incentivo ao meu trabalho.

A todos os amigos do laboratório de reatividade vascular da USP. À Ana Paula e Gisele pela paciência para me ensinarem. Pelos *capuccinos* nas tardes frias de SP e por enfrentarem as baratas na hora da revelação.

As amigas Alice e Alana, pela compreensão e por terem me dado duas mãozinhas.

À amiga Flávia Marini Paro pelo exemplo, incentivo e apoio.

“Feliz aquele que rejeita maus conselhos, segue o exemplo da sabedoria. Este homem é como a árvore que cresce à beira do riacho. Dá bons frutos no tempo certo e suas folhas não murcham. E tudo o que este homem faz dá certo”.

Salmo 1 – 41.

## LISTA DE ABREVIÇÕES

1, 4, 5 - inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>)

3 - isobutil-1-metilxantina (IBMX –inibidor da fosfodiesterase)

3, 5 - monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)

5 - trifosfato de guanosina (GTP)

3,5 - monofosfato cíclico, 8 - bromoadenosina (8-brcamp – análogo do AMPc)

Acetilcolina (ACh)

Arginina vasopressina (AVP)

Concentração intracelular de Ca<sup>+2</sup> ([Ca<sup>+2</sup>]<sub>cit</sub>)

Concentração intracelular de Na<sup>+</sup> ([Na<sup>+</sup>]<sub>cit</sub>).

de Adenosina difosfato (ADP)

de Adenosina trifosfato (ATP)

Diacilglicerol (DAG)

Endotélio íntegro (E<sup>+</sup>)

Endotélio removido mecanicamente (E<sup>-</sup>)

Enzima conversora de angiotensina (ACE)

Espécies reativas do oxigênio (EROS)

Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α)

Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Fator natriurético atrial (FAN)

Fator natriurético cerebral (FNC)

Flavina adenina de nucleotídeo (FAD)

Flavina mononucleotídeo (FMN)

Frequência cardíaca (FC)

Grupo cirurgia fictícia (Sham)

Grupo infartadas (Inf)

Grupo infartadas que desenvolveram sinais de insuficiência cardíaca (Icc)

Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

Infarto do miocárdio (INF)

Inibidor “não-seletivo” da sintase do óxido nítrico (NOS) N<sup>(W)</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)



Insuficiência cardíaca (ICC)  
Monofosfato cíclico de adenosina (AMPc)  
Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)  
Ouabaína (OUA)  
Óxido nítrico (NO)  
Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)  
Prostaglandina A<sub>1</sub> (PGA<sub>1</sub>)  
Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)  
Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>)  
Prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>)  
Proteína cinase A (PKA)  
Proteína cinase C (PKC)  
Proteína cinase G (PKG)  
Razão entre o peso dos pulmões e o peso corporal (PP/PC)  
Razão entre o ventrículo direito e o peso corporal (VD/PC)  
Razão entre o ventrículo esquerdo e o peso corporal (VE/PC)  
Resistência vascular periférica (RVP)  
Retículo sarcoplasmático (RS)  
Serotonina (5-HT)  
Sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS)  
Sintase de óxido nítrico (NOS)  
Sistema nervoso central (SNC)  
Sistema nervoso simpático (SNS)  
Sistema renina-angiotensina (SRA)  
Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)  
Tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>)  
Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)  
Ventrículo esquerdo (VE)

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Dados ponderais dos animais 30 dias após o infarto..... | 56 |
|--|----|

## LISTA DE FIGURAS

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 1:</b>  | Organograma da divisão dos grupos experimentais 30 dias após o infarto do miocárdio.....   | 46 |
| <b>Figura 2:</b>  | Procedimento para a oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda.....  | 47 |
| <b>Figura 3:</b>  | Avaliação dos dados ponderais - Coração e pulmões removidos para pesagem.....  | 48 |
| <b>Figura 4:</b>  | Avaliação da área de infarto em papel milimetrado.....   | 49 |
| Figura 5:         | <b>Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “<i>in vitro</i>”. Sistema de aquisição de dados <i>Biopac Systems</i>.....</b>   | 50 |
| <b>Figura 6:</b>  | Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio.....   | 51 |
| <b>Figura 7:</b>  | Registro com curvas representando a avaliação da atividade funcional da Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase sensível à ouabaína em aortas de ratas com e sem sinais de insuficiência cardíaca após o infarto do miocárdio..... | 52 |
| <b>Figura 8:</b>  | Dados ponderais dos animais Sham, Infarto (Inf) e Infarto com sinais de insuficiência cardíaca (Icc), 30 dias após o infarto.....  | 57 |
| <b>Figura 9:</b>  | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica com endotélio intacto (E+) obtidas de ratas Sham.....  | 59 |
| <b>Figura 10:</b> | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica de ratas Sham sem endotélio (E-) e comparação entre os grupos com endotélio intacto (E+) e E-.....   | 61 |
| <b>Figura 11:</b> | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica de ratas Sham L-NAME. Anéis com endotélio intacto (E+), incubados por 30 minutos com L-NAME (100 µM).....  | 63 |
| <b>Figura 12:</b> | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica de ratas Sham, 30 dias após o infarto. A) Comparação entre os grupos Sham E+ com Sham L-NAME. B) Comparação entre os grupos Sham E- e Sham L-NAME.....                 | 64 |
| <b>Figura 13:</b> | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica com endotélio intacto (E+) provenientes de ratas Infartadas, sem sinais de insuficiência cardíaca (Inf), 30 dias após o infarto.....                                   | 65 |
| <b>Figura 14:</b> | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica sem endotélio (E-) de ratas Infartadas, sem sinais de  |    |

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
|                   | insuficiência cardíaca (Inf), 30 dias após o infarto e comparação entre Inf E- e Inf endotélio intacto (E+).....   | 67 |
| <b>Figura 15:</b> | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica de ratas Inf, 30 dias após o infarto. Anéis com endotélio intacto (E+), incubados por 30 minutos com L-NAME (100 $\mu$ M).....   | 69 |
| <b>Figura 16:</b> | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica de ratas Inf, 30 dias após o infarto. <b>A)</b> Comparação entre os grupos Inf com endotélio intacto (E+) e Inf L-NAME <b>B)</b> Comparação entre os grupos Inf com endotélio removido mecanicamente (E-) e Inf L-NAME.....                              | 70 |
| <b>Figura 17:</b> | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica com endotélio intacto (E+), de ratas Infartadas que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca (lcc), 30 dias após o infarto.....   | 71 |
| <b>Figura 18:</b> | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratas Infartadas que desenvolveram sinais de insuficiência cardíaca (lcc), 30 dias após o infarto. A) Anéis com endotélio removido (E-) provenientes de animais lcc. B) Comparação entre os grupos lcc com endotélio intacto (E+) e lcc E-.....                | 73 |
| <b>Figura 19:</b> | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica com endotélio intacto (E+) de ratas infartadas que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca (lcc), 30 dias após o infarto. Anéis E+, incubados por 30 minutos com L-NAME (100 $\mu$ M).....   | 74 |
| <b>Figura 20:</b> | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratas Infartadas, com sinais de insuficiência cardíaca (lcc), 30 dias após o infarto. A) Comparação entre os grupos lcc com endotélio intacto (E+) e lcc L-NAME. B) Comparação entre os grupos lcc com endotélio removido mecânicamente (E-) e lcc L-NAME..... | 76 |
| <b>Figura 21:</b> | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratas com endotélio íntegro (E+), 30 dias após o infarto. A) Grupo Sham E+ vs. Inf E+. B) Grupo Sham E+ vs. lcc E+. C) Grupo Inf E+ vs. lcc E+.....  | 78 |
| <b>Figura 22:</b> | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratas sem endotélio (E-), 30 dias após o infarto. A) Grupo Sham E- vs. Inf E-. B) Grupo Sham E- vs. lcc E-. C) Grupo Inf E- vs. lcc E-.....  | 80 |
| <b>Figura 23:</b> | Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta com endotélio intacto (E+), incubadas com L-NAME, proveniente de ratas, 30 dias após o infarto. A) Grupo Sham L-NAME vs. Inf L-NAME. B) Grupo Sham L-NAME vs. lcc L-NAME. C) Grupo Inf L-NAME vs. lcc L-NAME.....   | 82 |
| <b>Figura 24:</b> | Diagrama com principais resultados e hipótese da pesquisa..  | 95 |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INFARTO DO MIOCÁRDIO .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>2. INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CONGESTIVA PÓS-INFARTO DO MIOCÁRDIO .....</b>   | <b>21</b> |
| 2.1 REMODELAMENTO CARDÍACO .....   | 21        |
| 2.2 ATIVAÇÃO NEUROHUMORAL .....  | 22        |
| 2.3 REATIVIDADE VASCULAR E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL.....   | 25        |
| <b>3. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase .....</b>   | <b>30</b> |
| 3.1 AS SUBUNIDADES DA Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase .....   | 31        |
| <b>3.1.1 Subunidade catalítica α .....</b>   | <b>31</b> |
| <b>3.1.2 A subunidade glicosilada β .....</b>  | <b>32</b> |
| <b>3.1.3 A subunidade regulatória γ .....</b>  | <b>33</b> |
| 3.2 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase.....   | 34        |
| <b>3.2.1 Eventos que envolvem a sinalização das ações hormonais .....</b>  | <b>34</b> |
| <b>3.2.2 Regulação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase através da concentração dos substratos ..</b>             | <b>35</b> |
| <b>3.2.3 Hormônios na regulação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase .....</b>                                    | <b>37</b> |
| <b>3.2.4 Fatores vasoativos derivados do endotélio na regulação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase</b>          | <b>38</b> |
| <b>3.2.5 Regulação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase através dos seus inibidores</b><br><b>endógenos .....</b> | <b>41</b> |
| <b>4. OBJETIVOS .....</b>  | <b>44</b> |
| 4.1 OBJETIVO GERAL .....   | 44        |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 44        |
| <b>5. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>  | <b>45</b> |
| 5.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....  | 45        |
| 5.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....   | 46        |
| <b>5.2.1 Infarto agudo do miocárdio .....</b>  | <b>46</b> |
| <b>5.2.2 Avaliação dos dados ponderais.....</b>  | <b>47</b> |

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| 5.2.3            | Preparação dos anéis isolados de aorta e avaliação da reatividade vascular “ <i>in vitro</i> ”.   | 49        |
| <b>5.2.3.1</b>   | <b><i>Estudo da atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína em aortas de ratas com e sem sinais de insuficiência cardíaca após o infarto do miocárdio</i></b> | <b>52</b> |
| <b>5.2.3.1.1</b> | <b><i>Modulação do endotélio sobre a resposta de relaxamento ao KCl e sobre a capacidade da ouabaína de inibir a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase</i></b>              | <b>53</b> |
| <b>5.2.3.1.2</b> | <b><i>Efeito do bloqueio com L-NAME sobre a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína</i></b>   | <b>53</b> |
| 5.3              | EXPRESSÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA   | 54        |
| 5.4              | FÁRMACOS E REAGENTES  | 55        |
| <b>6.</b>        | <b>RESULTADOS</b>   | <b>56</b> |
| 6.1              | DADOS PONDERAIS   | 56        |
| 6.2              | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DA Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase SENSÍVEL À OUABAÍNA 30 DIAS APÓS O INFARTO   | 58        |
| <b>6.2.1</b>     | <b><i>Estudo da atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína, em aortas de ratas Sham</i></b>  | <b>59</b> |
| <b>6.2.1.1</b>   | <b><i>Modulação do endotélio sobre a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína em aorta de ratas Sham</i></b>   | <b>60</b> |
| <b>6.2.1.2</b>   | <b><i>Participação do NO sobre a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína em aorta de ratas Sham</i></b>   | <b>62</b> |
| <b>6.2.2</b>     | <b><i>Estudo da atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína em aortas de ratas infartadas</i></b>   | <b>65</b> |
| <b>6.2.2.1</b>   | <b><i>Modulação do endotélio sobre a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína em aortas de ratas infartadas</i></b>  | <b>66</b> |
| <b>6.2.2.2</b>   | <b><i>Participação do NO na modulação endotelial sobre a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína em aortas de ratas infartadas</i></b>                    | <b>68</b> |
| <b>6.2.3</b>     | <b><i>Estudo da atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase em aortas de ratas infartadas que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca</i></b>                               | <b>71</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6.2.3.1 Modulação do endotélio sobre a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase em aortas de ratas infartadas que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca.....</b>                               | <b>72</b> |
| <b>6.2.3.2 Participação do NO na modulação da atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase em aortas de ratas infartadas que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca.....</b>                           | <b>74</b> |
| <b>6.2.4 Comparação da atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, em aortas com endotélio intacto, proveniente de ratas Sham, Inf e lcc.....</b>   | <b>77</b> |
| <b>6.2.5 Comparação da modulação do endotélio sobre a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína nos anéis de aorta provenientes dos grupos Sham, Inf e lcc .....</b>                   | <b>79</b> |
| <b>6.2.6 Diferença na participação do NO na modulação endotelial sobre a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína nos anéis de aorta provenientes dos grupos Sham, Inf e lcc.....</b> | <b>81</b> |
| <b>7. DISCUSSÃO.....</b>   | <b>83</b> |
| <b>8. CONCLUSÃO.....</b>   | <b>96</b> |
| <b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>97</b> |

## RESUMO

A identificação de dois grupos experimentais distintos quando se induz ao infarto (INF) em ratos (Inf - sem sinais de ICC e Icc - com sinais de ICC), apresentando a mesma área de cicatriz (AI), poderia explicar, pelo menos em parte, alguns dos resultados contraditórios da função cardiovascular descritos na literatura. Sabe-se que a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase é importante para a homeostase vascular e o controle do tônus. Ela é influenciada por fatores vasoativos derivados do endotélio, glicosídeos cardíacos, hormônios, concentração iônica e até o *shear stress*, que freqüentemente estão alterados após o INF. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína (OUA) em anéis de aorta de ratas após o INF, com mesma AI, com e sem sinais de ICC. Ratas Wistar ( $220 \pm 8$  g) foram distribuídas em Sham (n= 13), INF sem sinais de ICC (Inf n= 11) e INF com sinais ICC (Icc n= 7). O INF foi induzido cirurgicamente através da oclusão da artéria coronariana descendente anterior esquerda. Após 30 dias, as ratas foram anestesiadas para retirada de anéis de aorta que foram perfundidos com solução de Krebs e gaseificados com mistura carbogênica em banho para estudo da reatividade em anéis com endotélio íntegro (E+), sem endotélio (E-) e com L-NAME. A avaliação da atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à OUA foi realizada pela técnica de relaxamento ao potássio. Não houve diferença entre a AI (Inf:  $30,2 \pm 1,6$ ; Icc:  $35,6 \pm 2,8$ ), o peso corporal (Sham:  $236 \pm 4$  g; Inf:  $236 \pm 5$  g; Icc:  $235 \pm 5$  g) e a razão VE/PC (Sham:  $2,12 \pm 0,05$ ; Inf:  $2,24 \pm 0,06$ ; Icc:  $2,21 \pm 0,07$ ). Verificou-se, porém, diferença entre as razões VD/PC (Sham:  $0,6 \pm 0,02$ ; Inf:  $0,6 \pm 0,03$ ; Icc:  $1,4 \pm 0,1^*$   $P < 0,01$ ) e PP/PC (Sham:  $5,7 \pm 0,3$ ; Inf:  $6,1 \pm 0,3$ ; Icc:  $13,6 \pm 1,0^*$   $P < 0,01$ ). No grupo Inf o relaxamento ao KCl apresentou-se diminuído, apesar da modulação basal nitrérgica do endotélio estar preservada. Por outro lado, a capacidade da OUA de inibir a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase mostrou-se aumentada nestes animais não apresentando modulação endotelial como visto nos grupos Sham e Icc. Em conclusão, a liberação de NO estimulada pela OUA esta prejudicada no grupo Inf, mas preservada no grupo Icc, Portanto, estes resultados demonstram, pela primeira vez na literatura, a participação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase nas mudanças de reatividade vascular após o INF, propondo que há diferenças nos mecanismos envolvidos na reatividade vascular após o INF, em animais com mesma AI, com e sem sinais de ICC.



## ABSTRACT

The identification of two distinct experimental groups (Icc – with, and Inf - without signals of heart failure (HF) following myocardial infarction in rats, presenting the same infarct area (IA), could explain, at least in part, the contradictory cardiovascular results in experimental models of HF. Recent research demonstrates the function of the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase in the vascular homeostasis in the control of tonus. The activity of the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase is influenced by vasoactive factors endothelium-derivatives, cardiac glycosides, hormones, ionic concentration and shear stress, frequently altered after INF and HF. The objective of this research was to study the ouabain-sensitive Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase functional activity in aortic rings of INF rats, with same IA, presenting or not signals of HF. Female Wistar rats (220 ± 8 g), were distributed in: Sham (n= 13), Infarct without signals of HF (Inf N = 11) and Infarct with signals of HF (Icc n= 7). MI was surgically induced by occluding left coronary artery. After 30 days the rats were anaesthetized, and the aortic rings were superfused with Krebs solution gasified with 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> mixture to study rings with intact endothelium (E+), denuded endothelium (E -) and with L-NAME. The ouabain-sensitive Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase functional activity was analyzed using the potassium relaxation technique. No differences were observed in IA (Inf: 30,2 ± 1,6; Icc: 35,6 ± 2,8), body weight (Sham: 236 ± 4 g; Inf: 236 ± 5 g; Icc: 235 ± 5 g) and VE/PC (Sham: 2,12 ± 0,05; Inf: 2,24 ± 0,06; Icc: 2,21 ± 0,07). However, the signals of HF appeared only in the Icc groups VD/PC (Sham: 0,6 ± 0,02; Inf: 0,6 ± 0,03; Icc: 1,4 ± 0,1\* P<0.05) and PP/PC (Sham: 5,7 ± 0,3; Inf: 6,1 ± 0,3; Icc: 13,6 ± 1,0\* P<0.05). The main results of this study are that in the Inf animals the KCl-induced relaxation was diminished and the endothelial modulation of this relaxation, for nitric oxide, was present. However, the capacity of the OUA to inhibit the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase was increased in these animals and it did not present endothelial modulation as seen in the groups Sham and Icc. These results demonstrate that OUA-dependent NO release is absent in the Inf group, but preserved in the Icc. Therefore, the results demonstrate for the first time in literature the participation of the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase in the changes of vascular reactivity following myocardial infarction in female rats. Moreover there are differences in the mechanisms involved in the aortic reactivity following myocardial infarction in female rats with same IA, presenting or not signals of HF.

## 1. INFARTO DO MIOCÁRDIO

A cardiopatia isquêmica pode ser considerada uma consequência do desequilíbrio entre o suprimento e a demanda de sangue oxigenado no coração. Uma isquemia miocárdica pode resultar da formação de placa de aterosclerose, do desenvolvimento de trombose e da vasoconstrição excessiva de origem patológica (Sharpe, 1993). A oclusão de uma das artérias coronárias pode levar à necrose das células do miocárdio, conhecida como infarto do miocárdio (INF). Os locais mais comuns de oclusão das coronárias por placas de aterosclerose são: 1) no ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda; 2) na artéria coronária direita; e 3) no ramo circunflexo da artéria coronária esquerda (Lee *et al.*, 1996).

Dentre as possibilidades relacionadas com o tempo de evolução, o miocárdio sofre progressiva agressão representada pelas áreas de isquemia, lesão e necrose, sucessivamente. Na primeira, predominam os distúrbios eletrolíticos, na segunda, as alterações morfológicas reversíveis e na última, danos definitivos. Da mesma forma, essas etapas se correlacionam com as várias formas de apresentação clínica que podem ocasionar desde a angina instável e infarto sem supradesnivelamento, até infarto com supra-desnivelamento do segmento ST. É por isso que o manejo atual do paciente com INF é baseado no rápido diagnóstico, na desobstrução imediata da coronária responsável pela manutenção do fluxo, na profilaxia da embolização distal e na reversão de suas complicações potencialmente fatais (arritmias, falência cardíaca e distúrbios mecânicos) (Pesaro, 2004).

O reparo cardíaco é um complexo processo envolvendo repostas neuroendócrinas, diversos componentes pró-inflamatórios e o remodelamento da matriz extracelular.

A ativação neuroendócrina após o infarto do miocárdio envolve basicamente três sistemas: o sistema nervoso simpático (SNS); a ativação da produção e liberação do fator natriurético atrial (FAN); e a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Mill *et al.*, 1990).

A ativação do SNS ocasiona um aumento de descarga nervosa nos troncos simpáticos periféricos dirigidos para os rins, coração, vasos e, particularmente, para a supra-renal. Há, portanto, um aumento da concentração circulante de adrenalina, proveniente da supra-renal, como também, há uma

elevação da noradrenalina, proveniente do aumento da atividade dos nervos simpáticos. O FAN é um hormônio peptídico liberado pelos miócitos atriais submetidos ao estiramento. Muitos estudos relacionam a elevação persistente do FAN aos casos que evoluem para insuficiência cardíaca (ICC). A ativação do SRAA resulta, em grande parte, no aumento da produção e liberação de renina pelos rins, e parácrina no coração. Como consequência da produção e liberação de renina pelo aparelho justaglomerular, aumenta a concentração plasmática de angiotensina II e de aldosterona. Os principais efeitos fisiológicos desta elevação no plasma estariam relacionados a uma tentativa de aumento da volemia, a fim de manter uma perfusão do tecido miocárdico adequada em situações de baixo débito (Mill *et al.*, 1990). Após o INF e a perda de tecido contrátil na área da cicatriz, o coração passa a usar, primeiramente, sua reserva sistólica (representada pelo aumento da atividade contrátil do miocárdio) a fim de manter a perfusão sistêmica. Isso ocorre basicamente pelo aumento da atividade simpática. Secundariamente, a manutenção do débito cardíaco depende da reserva diastólica, ou seja, do aumento da eficiência sistólica através da ativação do mecanismo de Frank-Starling.

À medida que o infarto se consolida, uma dilatação ventricular seria indispensável para manter o débito cardíaco em valores compatíveis com a vida. A necrose dos miócitos e o aumento da sobrecarga ventricular disparam uma cascata de sinalização bioquímica intracelular capaz de promover hipertrofia, dilatação e formação de cicatriz de colágeno. Inicialmente, a hipertrofia ventricular é uma resposta adaptativa benéfica à sobrecarga hemodinâmica por estabilizar a função contrátil, mas sua evolução colabora para a disfunção ventricular progressiva (Spann *et al.*, 1967). O enrijecimento da parede ventricular, secundário à instalação da hipertrofia causa elevação do estresse sistólico e diastólico de parede (Pfeffer & Braunwald, 1990). Essa hipertrofia pode ter um efeito benéfico do ponto de vista energético, já que, segundo a relação de Laplace o estresse gerado na parede ventricular depende da pressão multiplicada pelo raio dividido pelo dobro da espessura da parede da cavidade. Assim, um dado aumento da pressão ventricular pode ser compensado pelo aumento da hipertrofia concêntrica, normalizando o estresse de parede.

Por outro lado, o estresse diastólico final na sobrecarga de volume dispara a replicação dos sarcômeros em série, que resulta em alongamento individual dos miócitos. Este aumento do comprimento celular causa um aumento no volume

ventricular total resultando em hipertrofia excêntrica (Carabello, 2002). A deterioração progressiva dos ventrículos e a disfunção sistólica e diastólica instaladas pelo contínuo processo de remodelamento levam a diminuição da fração de ejeção, prejuízo no mecanismo de Frank-Starling e descompensação do estresse sistólico, anteriormente evitado de acordo com a Lei de Laplace. O aumento da pós-carga deixa efetivamente de resultar no aumento da pré-carga e o coração dependerá de alto consumo energético para realizar sua performance de bomba o que resultará em falência da bomba cardíaca (Gerdes, 2002).

Além da hipertrofia após o INF, ocorre aumento na deposição de colágeno na matriz extracelular, o que contribui para alterar o desempenho sistólico e reduzir a complacência da câmara, dificultando o enchimento do ventrículo (Mill *et al.*, 1990; Mill & Vassallo, 2001).

O tecido hipertrofiado não possui as mesmas características funcionais do tecido do miocárdio normal. A densidade capilar cai proporcionalmente à hipertrofia e a reserva do fluxo coronariano é reduzida (Marcus *et al.*, 1983). As reservas de substratos de alta energia, como a fosfocreatina, reduzem-se, principalmente no subendocárdio. Assim, a hipertrofia predispõe a crises recorrentes de isquemia, INF e, conseqüentemente, leva a um quadro crônico de mecanismos compensatórios que se tornam um ciclo vicioso, resultando na insuficiência cardíaca (Mill *et al.*, 1990; Olivetti *et al.*, 1991; Mill & Vassallo, 2001).

O tratamento após o INF é diferente de acordo com o estágio da doença. A escolha do tipo de intervenção varia de forma dependente do tempo transcorrido do episódio do infarto. O infarto do miocárdio lidera as causas de insuficiência cardíaca em todos os países. Portanto, reconhecê-lo precocemente é uma oportunidade de modificar os fatores que promovem o desenvolvimento de mudanças irreversíveis na função cardíaca (Sharpe, 1993; Francis *et al.*, 2001).

## **2. INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CONGESTIVA PÓS-INFARTO DO MIOCÁRDIO**

A insuficiência cardíaca congestiva é classicamente definida como uma síndrome clínica complexa em que há incapacidade do coração em bombear o sangue com suficiente pressão e volume para garantir a demanda dos tecidos (Hirsch *et al.*, 1991; *National Heart, Lung and Blood Institute*, 2003; Davidoff *et al.*, 2004). É uma desordem multissistêmica caracterizada por uma elevação da ativação

neuro-humoral que se inicia com alteração da função e dilatação da câmara cardíaca esquerda (VE), o que ocasiona a necessidade de um aumento na pressão de enchimento para sustentar o débito cardíaco adequado (Francis *et al.*, 2001; *National Heart, Lung and Blood Institute*, 2003).

A progressão da ICC, como uma síndrome de baixo débito, gera o desenvolvimento de mecanismos compensatórios responsáveis pela manutenção da pressão arterial e da adequada perfusão dos órgãos vitais, como a retenção de sódio e água, bem como a vasoconstrição periférica. O remodelamento cardíaco, a ativação neurohumoral e pró-inflamatória e a disfunção endotelial constituem uma ajuste de curto prazo. Em longo prazo, estes mecanismos podem tornar-se um ciclo vicioso, apresentando-se clinicamente como ICC (Nasa *et al.*, 1996; Braunwald & Bristow, 2000). Em seguida estes mecanismos são descritos sucintamente.

## 2.1 REMODELAMENTO CARDÍACO

Remodelamento é um termo utilizado para descrever os processos de reparo das câmaras cardíacas que resultam na alteração da geometria ventricular e diminuição da função cardíaca (Dorn, 2002). Após o INF, o remodelamento ventricular é o principal fator causador da ICC (Gaballa & Goldman, 2002). Segundo Sutton & Sharpe (2000), o INF pode ser dividido em duas fases: 1) fase precoce (dentro de 72 horas após o INF); 2) fase tardia (após 72 horas de INF). A fase tardia pode se estender enquanto persistam os estímulos bioquímicos que dependem do tamanho, local e transmuralidade do infarto (Sutton & Sharpe, 2000). Com a progressão do remodelamento os mecanismos compensatórios estruturais iniciais tornam-se prejudiciais e levam à deterioração da função cardíaca contribuindo para o desenvolvimento da ICC (Pfeffer, 2002).

## 2.2 ATIVAÇÃO NEUROHUMORAL

A ativação neurohumoral caracteriza um estado em que os sistemas neural e hormonal são ativados para manter a perfusão adequada dos órgãos vitais (como por exemplo, a circulação cerebral e coronariana) que poderiam sofrer com as conseqüências de uma disfunção cardíaca (Middlekauff & Mark, 1998). Esta ativação inclui o SNS, o SRAA, a arginina vasopressina (AVP), e o FAN.

A ativação do SNS é um aspecto presente nos estágios mais recentes da disfunção ventricular e está envolvida na progressão e no aumento da mortalidade na ICC (Francis *et al.*, 1993). Em estudos com animais, com disfunção do VE, mesmo antes da constatação da ICC, a concentração plasmática de norepinefrina já estava elevada (Stevens, 1995). Os mesmos resultados foram encontrados por Francis *et al.* (1990) quando foram estudados seres humanos com disfunção ventricular e sem sintomas de ICC. Utilizando uma técnica de registros através da microneurografia para avaliar a atividade do sistema nervoso simpático no nervo peroneal em humanos, Grassi *et al.* (1995), observaram que a atividade do SNS para os vasos sanguíneos dos músculos estava aumentada em pacientes com ICC secundária a disfunção do VE e Benedict *et al.* (1993) não encontraram os mesmos resultados quando avaliaram pacientes com ICC secundária à disfunção do VD. Contudo, estes achados indicam que a excitação do SNS mais do que a clínica da ICC reflete uma disfunção do VE. Em pacientes com ICC a atividade do SNS no coração está aumentada três vezes mais que o normal, sendo ele o primeiro órgão alvo desta ativação. Além disso, os rins e a circulação muscular são também precocemente envolvidos (Rundqvist *et al.*, 1997).

A contínua e prolongada atividade adrenérgica, bem como a vasoconstrição periférica leva a um aumento da pós-carga, diminuição do débito cardíaco e da perfusão renal, contribuindo para o aumento da retenção de água e sódio. Ao mesmo tempo, aumenta a frequência cardíaca (FC) e o gasto energético do miocárdio, podendo ocasionar hipertrofia, isquemia, taquiarritmias e danos aos miócitos ([Middlekauff & Mark](#), 1998; Braunwald & Bristow, 2000).

Embora seja conhecida a ativação do SNS durante a ICC, as vias envolvidas neste processo ainda não estão completamente claras. Os possíveis mecanismos envolvidos são: atenuação da sensibilidade dos mecanorreceptores arteriais e cardíacos; alteração pressórica na artéria e no capilar pulmonar; exacerbação do quimiorreflexo periférico e central; ativação das aferências simpáticas cardíacas que estão relacionadas à sensação de dor cardíaca durante a isquemia coronariana; ativação dos aferentes renais sensíveis a estímulos mecânicos ou químicos; ativação do SRA, atenuação da resposta inibitória para o SNC; ativação da resposta excitatória para o sistema nervoso central (SNC); e mudanças nos fatores humorais e locais do cérebro afetando a regulação neural simpática central ([Middlekauff & Mark](#), 1998; De Angelis, *et al.*, 2004).

O aumento do tônus adrenérgico resulta no aumento da resistência vascular periférica (RVP) que acontece tanto por estimulação direta, quanto indireta, da contração do músculo liso. A liberação aumentada não só de catecolaminas, mas também de endotelinas, e indiretamente, a ativação do SRAA, contribuem para restaurar a pressão e a volemia (Ledoux *et al.*, 2003).

Na ICC há um aumento na quantidade de angiotensina II tecidual e circulante que aumenta a pré-carga e a pós-carga, causando remodelamento cardíaco e vascular. A angiotensina II estimula a liberação de endotelina-1, um potente vasoconstritor, bem como de aldosterona, que estimula a reabsorção de sódio. Outras ações importantes da angiotensina II são a facilitação da ativação do músculo liso vascular pelas catecolaminas, bem como a redução da sua recaptação pelos terminais pré-sinápticos e a ativação central do SNS (Falkenhahn *et al.*, 1994; Griendling *et al.*, 1997)

Uma importante função da angiotensina II refere-se ao seu envolvimento na modulação da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) por meio do estímulo à produção de ânion superóxido. Há evidências de que o ânion superóxido inativa o NO, alterando a função endotelial. A inibição da síntese de superóxido ou o uso de "varredores" de radicais livres pode melhorar a função endotelial. A diminuição do NO é encontrada em várias doenças que cursam com disfunção endotelial como a hipertensão arterial (Panza *et al.*, 1990; Drexler, 1998), a hipercolesterolemia (Creager *et al.*, 1990), a ICC (Lopez & Casado, 2001) e o diabetes (Vallance, 1992). A diminuição da biodisponibilidade do NO durante a ICC pode ocorrer por dois motivos: acentuada diminuição da expressão da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS); e aumento da liberação vascular de ânion superóxido (Schafer *et al.*, 2004).

Além disso, o tratamento de pacientes com ICC através da utilização dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) altera favoravelmente a hemodinâmica e auxilia na melhora dos sintomas. Porém, recentes estudos com captopril (inibidor da ECA) demonstraram que o mesmo falhou na supressão da contração induzida pela angiotensina II em artérias aorta de ratos, enquanto o Irbesartan (antagonista da angiotensina II) conseguiu inibir completamente a contração (Ledoux *et al.*, 2003). Estes estudos confirmam a hipótese de que há mecanismos independentes da ECA para a formação de angiotensina II que estão ativados nos casos de ICC e podem parcialmente contribuir para a falha dos inibidores da ECA em suprimirem, cronicamente, os efeitos da angiotensina II

(Schafer *et al.*, 2004). Segundo Urata (2000) esta via alternativa de produção da angiotensina II, independente da ECA, assumiu nos últimos anos um papel importante e contribuiu para explicar o aumento da concentração de angiotensina II plasmática após o INF. Este mecanismo de produção de angiotensina II envolve a quimase, uma potente enzima, liberada pelo miocárdio, rins, células musculares, endotélio e células mesenquimais (Urata, 2000).

Outros hormônios que também se apresentam em elevadas concentrações em pacientes com ICC são os peptídeos natriuréticos. O fator natriurético atrial e o fator natriurético cerebral (FNC) são secretados pelo coração em resposta ao estiramento do átrio desencadeado pelo aumento da pressão de enchimento ventricular. Suas ações sobre o músculo liso vascular (MLV), sobre os rins e supra-renais causam, respectivamente, vasodilatação, diminuição da secreção de renina, bem como diminuição da liberação de aldosterona e natriurese (Braunwald & Bristow, 2000; Nakayama, 2005). Quando Francis *et al.*, (2001) avaliaram a progressão da ICC após 8 semanas do infarto em rato, foi demonstrado que o FAN aumentou logo na primeira semana e manteve este aumento constante até o fim do experimento. Assim, segundo estes pesquisadores, há uma correlação entre FAN e a progressão temporal do INF para ICC.

Sintetizada pelo hipotálamo, armazenada e liberada pela neuro-hipófise, a AVP, também denominada hormônio antidiurético, tem a função de manter a volemia e a osmolaridade plasmática. Sua secreção é regulada pelo estiramento atrial, osmolaridade plasmática, concentrações plasmáticas de angiotensina II e de norepinefrina. Sua concentração está aumentada em pacientes com ICC, nos quais atua diretamente no músculo liso aumentando a contração muscular e produzindo vasoconstrição (via receptores  $V_1$ , sendo que o papel dos receptores  $V_2$  também já foi sugerido) (Schrier & Abraham, 1999), bem como retenção de água e hiponatremia dilucional (Goldsmith & Gheorghide, 2005).

A concentração de endotelina circulante também é um importante marcador prognóstico da ICC (Selvais *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2002). Em pacientes com ICC, a concentração plasmática de endotelina encontra-se aumentada, o que promove a formação de um ciclo vicioso para a liberação de angiotensina II. Além disso, a angiotensina II também estimula a liberação de endotelina (Shubeita *et al.*, 1990).



Além dos fatores humorais alterados na ICC, há também a superexpressão das citocinas pró-inflamatórias. Elas compõem um grupo heterogêneo de proteínas com peso molecular relativamente pequeno que se caracterizam por exercer seus efeitos a curtas distâncias de forma parácrina ou endócrina. No entanto, não são hormônios, pois não atuam pela via humoral. Duas classes de citocinas foram relacionadas ao desenvolvimento da ICC: 1) citocinas vasoconstritoras e inotrópicas positivas; e 2) citocinas pró-inflamatórias vasodilatadoras. As citocinas pró-inflamatórias como a Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e interleucina-1 $\beta$  enquadram-se na segunda classe. Elas desempenham papel expressivo na patogênese da ICC por diminuírem as reservas intracelulares de anti-oxidantes e promoverem a formação de espécies reativas de oxigênio. Além dos efeitos desses mediadores pró-inflamatórios na estrutura e na função cardíaca após o infarto do miocárdio, são crescentes as evidências de que existe contribuição das citocinas na disfunção endotelial. O TNF- $\alpha$ , encontrado no soro dos pacientes com ICC, já foi demonstrado por sua capacidade de modular a função endotelial, através da indução de apoptose das células endoteliais e diminuição da expressão eNOS da veia umbilical humana (Braunwald & Bristow, 2000; Douglas, 2002; Nian *et al.*, 2004).

### 2.3 REATIVIDADE VASCULAR E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

Sabe-se que a alteração da reatividade vascular é uma consequência da ICC. Porém, a causa da disfunção vascular possui várias hipóteses e diversos fatores para sua explicação. Não há um consenso sobre o exato papel da função vascular na ICC devido à heterogeneidade das alterações na reatividade vascular que dependem da duração da doença e do tipo de artéria estudada e do gênero (Stassen *et al.*, 1997; Baggia *et al.*, 1997; Palacios *et al.*, 2004).

Os mecanismos neuro-humorais compensatórios ativados na ICC, como o SNS, SRAA, peptídeos natriuréticos e AVP contribuem para a alteração da reatividade vascular, como descrito nos ítems anteriores. Porém, estes mecanismos não são os únicos a participar da homeostase circulatória, sendo o endotélio um importante modulador do tônus vascular (Furchgott & Zawadzki, 1980).

Substâncias locais derivadas do endotélio são importantes moduladores do tônus vascular. Os principais fatores vasoconstritores são: tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>),

prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), angiotensina II, endotelina-1 e espécies reativas do oxigênio (EROS). Os principais fatores vasodilatadores são: NO, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Os principais mediadores pró-inflamatórios são as citocinas liberadas localmente pelo endotélio, terminações nervosas, plaquetas e leucócitos (Fang & Marwick, 2002; Ledoux *et al.*, 2003).

Em condições basais, estas substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras são liberadas pelo endotélio promovendo a regulação e os ajustes finos para manutenção do tônus vasomotor. Um desequilíbrio entre a liberação, ou na síntese, de fatores vasoconstritores e vasodilatadores pode resultar em um processo denominado disfunção endotelial e assim, contribuir para o desenvolvimento e/ou manutenção de doenças como a ICC (Lopez & Casado, 2001), hipertensão arterial sistêmica (HAS) (Drexler, 1998), diabetes (Davel *et al.*, 2000), insuficiência renal crônica (Dierck & Schiffrin, 2004) e doença arterial coronariana (Behrendt & Ganz, 2002).

Felder *et al.* (2003) relataram em seu trabalho que os fatores derivados do endotélio apresentam um *feedback* com os centros cerebrais e hipotalâmicos que são responsáveis por estimular o tônus simpático e que também são considerados participantes do processo de desenvolvimento de remodelamento vascular induzido em doenças como a ICC.

A disfunção endotelial já está bem documentada e descrita em estudos com humanos (Fischer *et al.*, 2005) e em modelos de animais com ICC (Behrendt & Ganz, 2002). Porém, as causas e as conseqüências da disfunção endotelial na ICC não estão completamente esclarecidas.

A insuficiência cardíaca é caracterizada pela diminuição do débito cardíaco e aumento da resistência vascular periférica que pode ocorrer por causa do relaxamento anormal dependente do endotélio. Tanto a condutância quanto a resistência nos vasos sanguíneos de animais com ICC estão prejudicadas (Drexler, 1998; Endemann & Schiffrin, 2004). A vasodilatação dependente do endotélio tem-se mostrado prejudicada tanto em humanos quanto em animais com função cardíaca comprometida (Kubo *et al.*, 1991; Drexler *et al.*, 1992; Bauersachs *et al.*, 1999). O prejuízo funcional do endotélio é caracterizado por uma vasodilatação reduzida, ou por uma vasoconstrição aumentada. A vasodilatação mediada pelo endotélio, quando prejudicada na ICC, pode ser ocasionada pela diminuição da

produção de NO, aumento da sua degradação ou diminuição da resposta do MLV aos fatores vasodilatadores (Teerlink *et al.*, 1993; Teerlink *et al.*, 1994; Didion *et al.*, 1997; Stassen *et al.*, 1997; Bauersachs *et al.*, 1999; Indik *et al.*, 2001).

A diminuição da produção de NO pode ser atribuída ao prejuízo na biodisponibilidade de L-arginina (precursor do NO), a diminuição da expressão da eNOS e ao prejuízo no receptor que medeia a liberação de NO em resposta a estímulos farmacológico e mecânico (Drexler, 1998; Teerlink *et al.*, 1993; Behrendt & Ganz, 2002).

O aumento da degradação de NO pode ocorrer devido ao aumento das EROS produzidas pelas células endoteliais e do MLV (Lopez & Casado, 2001). A produção de EROS está aumentada no coração e na circulação após a ICC estando relacionada à sobrecarga cardíaca e à isquemia do miocárdio, ao aumento das citocinas semelhantes ao TNF- $\alpha$ , ao aumento da produção de catecolaminas circulantes e de angiotensina II (Fang & Marwick, 2002; Ledoux *et al.*, 2003).

Taddei *et al.* (2000) propuseram uma redução da sensibilidade do MLV ao NO devido à produção aumentada de endotelina-1 na ICC. A endotelina-1, ao interagir com os receptores ET<sub>A</sub> encontrados no MLV, causa vasoconstrição. Entretanto, ao interagir com os receptores ET<sub>B</sub> endoteliais, a endotelina-1 promove a liberação de substâncias vasodilatadoras, como o NO e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). Alguns receptores ET<sub>B</sub>, farmacologicamente diferentes dos ET<sub>B</sub> endoteliais, podem localizar-se no MLV, onde causam uma vasoconstrição ao serem estimulados (Kuc *et al.*, 2000).

Se por um lado à capacidade vasodilatadora pode estar prejudicada na ICC, por outro lado, a vasoconstrição pode estar aumentada. Gschwend *et al.* (2003) demonstraram pela primeira vez, um aumento da responsividade do MLV em artérias de resistência de animais insuficientes, abrindo um novo horizonte de perspectivas em relação à função vascular na ICC.

Bianchi *et al.* (2006) verificaram um aumento na reatividade a fenilefrina em aortas de ratas, 60 dias após o INF, que era dependente do endotélio e estava relacionada à diminuição da biodisponibilidade de NO. Neste mesmo estudo, embora a biodisponibilidade do NO estivesse diminuída, o relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) estava preservado. Pereira *et al.* (2005) demonstraram também que a reatividade vascular no leito arterial caudal de ratos 30 dias após o INF, com mesma área de cicatriz, dependia do fato destes animais apresentarem ou não sinais de ICC. Da mesma maneira, nos trabalhos de Giuberti *et al.* (2007) e

Fernandes (2006), a função cardíaca de ratos infartados também estava relacionada com a presença ou não de ICC. Um aspecto relevante do estudo de Pereira *et al.* (2005) foi à demonstração, pela primeira vez na literatura, de que a reatividade vascular do leito caudal, em resposta a fenilefrina, estava aumentada em animais que apresentaram infarto sem sinais de ICC, enquanto, nos animais com sinais de ICC, a reatividade vascular estava diminuída. A identificação de dois grupos experimentais distintos quando se induziu o infarto agudo do miocárdio em ratos, apresentando a mesma área de cicatriz, poderia explicar, pelo menos em parte, a variedade de resultados, muitas vezes com conclusões contraditórias, obtidos em modelos experimentais de ICC descritos na literatura. Assim, seria possível que diferentes fatores estivessem envolvidos nas alterações da reatividade vascular após o infarto do miocárdio em animais dependendo da presença ou não de ICC. Os resultados demonstrados por Pereira *et al.* (2005) sugeriram a existência de algum mecanismo que envolvesse também o acoplamento excitação-contração do MLV nessas diferentes respostas. Como a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase participa dos processos de manutenção do potencial de membrana, dos mecanismos envolvidos na despolarização e repolarização, bem como na manutenção da concentração iônica celular, sua função é fundamental durante a contração do MLV. Então, ela poderia estar relacionada a alterações da reatividade vascular durante o desenvolvimento das doenças.

Vários estudos demonstram a função da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase na homeostase vascular e no controle do tônus (Therien & Blostein, 2000; Skou, 2003). A atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase é influenciada por fatores vasoativos derivados do endotélio, glicosídeos cardíacos circulantes, hormônios, concentração iônica (alteração no balanço sal e água) e até o *shear stress*, os quais, frequentemente, estão alterados após o INF e ICC.

Considerando que têm sido descrito na literatura a participação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase nas alterações da reatividade vascular durante o desenvolvimento de doenças do sistema cardiovascular, como a hipertensão arterial e o diabetes (Rose & Valdes, 1994; Davel *et al.*, 2000; Rossoni *et al.*, 2002; Xavier *et al.*, 2004; Callera *et al.*, 2004), seria possível que as alterações na reatividade vascular após infarto descritas por Pereira *et al.* (2005) também envolvessem esta enzima.

### 3. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase

O prêmio Nobel de química, em 1997, foi dado ao investigador dinamarquês Jens C. Skou por sua identificação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Embora a existência da "bomba de sódio" já fosse previamente idealizada, Skou foi o primeiro a postular, em 1957, a relação entre o transporte de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> através da membrana e a ativação enzimática da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase (Skou, 1957; Therien & Blostein, 2000; Skou, 2003).

A Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, conhecida como bomba de Na<sup>+</sup> ou bomba de Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> é uma proteína integral de membrana da família das P-ATPase, caracterizada por um número específico de seqüências relacionadas a sua função hidrolítica e a presença de vários domínios hidrofóbicos necessários para a formação das  $\alpha$ -hélices transmembrana (Horisberger, 2004).

Ela é encontrada na maioria das células eucariotas e participa da regulação da concentração intracelular de Na<sup>+</sup>, que é de grande importância para o controle da homeostase celular. Sua função básica é manter elevados gradientes de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> através da membrana plasmática que são utilizados como fonte de energia para a manutenção do potencial de membrana, para os eventos da despolarização e repolarização, bem como para a regulação da composição iônica citoplasmática. A Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase também possui importante papel na regulação do volume celular, do tônus vascular, do crescimento e diferenciação celular, do pH e da concentração de Ca<sup>+2</sup>, além de influenciar inúmeros transportes secundários como o transporte de glicose dependente de Na<sup>+</sup>, transporte de aminoácidos e transporte trans-epitelial (Vassalle, 1987; [Skou](#) & [Esmann](#), 1992; Rose & Valdes, 1994; Therien & Blostein, 2000; Frasen, 2005).

O mecanismo de funcionamento da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase acontece pelo transporte de 3 íons sódio do meio intra para o meio extracelular e 2 íons potássio do meio extra para o meio intracelular, utilizando a energia liberada da hidrólise de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) (Blaustein, 1977). A Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase possui estados conformacionais denominados E1 e E2, que diferem, por instantes, em relação à afinidade por Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, adenosina difosfato (ADP) e ATP. Esta transição conformacional cíclica é resultado da fosforilação da enzima pelo ATP em presença de íons magnésio e Na<sup>+</sup> e, pela desfosforilação na presença dos íons K<sup>+</sup>. Assim, ela se liga aos íons, os transporta e também assume o estado ocluído, onde os dois

portões da proteína estão fechados (Sen & Tobin, 1969; [Skou](#) & [Esmann](#), 1992; Horisberger, 2004).

### 3.1 AS SUBUNIDADES DA Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase

A Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase é uma proteína heterodimérica, um tetrâmero, constituído por dois dímeros compostos por uma subunidade alfa ( $\alpha$ , peso molecular  $\approx$  100 kDa) e uma subunidade beta ( $\beta$ , peso molecular  $\approx$  55 kDa). Além disso, uma pequena subunidade ( $\gamma$ , peso molecular 14 kDa) foi identificada e várias hipóteses sobre sua atividade funcional, têm sido recentemente postuladas (Forbush *et al.*, 1978; Sweadner, 1979; Rose & Valdes, 1994; Lopina, 2000; Therien & Blostein, 2000; Cortes *et al.*, 2006).

#### 3.1.1 Subunidade catalítica $\alpha$

A subunidade catalítica  $\alpha$  possui aproximadamente 8 domínios transmembrana e 4 isoformas:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$ . Ela contém sítios de ligação para Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, ATP e compostos digitálicos (como por exemplo, a ouabaína) que são ligantes conhecidos por estimular ou inibir a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase (Sweadner, 1969; Rose & Valdes, 1994; Shamraj & Lingrel, 1994; Dostanic-Larson *et al.*, 2006).

Muitos estudos propõem que a apresentação das isoformas da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase varia com a espécie e é tecido específica, indicando que cada isoforma exibe uma função particular associada com o tecido no qual é expressada (Orlowski & Lingrel, 1988; Gick *et al.*, 1993; Juhaszova & Blaustein, 1997). Além disso, recentes pesquisas demonstram que a distribuição e o local de expressão das isoformas da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase pode variar, inclusive, no interior de uma mesma célula. Por exemplo, a isoforma  $\alpha 1$ , que se distribui uniformemente na membrana plasmática dos neurônios, astrócitos e miócitos arteriais da mesentérica. Ao contrário da  $\alpha 3$  (presente em neurônios e miócitos arteriais) e  $\alpha 2$  (presente em astrócitos, miócito arterial) que parecem estar confinadas a microdomínios na membrana plasmática, adjacentes a elementos periféricos ou juncionais do retículo sarcoplasmático, como trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup>, canais de K<sup>+</sup> e canais operados por estoque (Juhaszova & Blaustein, 1997; Arnon *et al.*, 2000).

Sobre a isoforma  $\alpha 1$ , sabe-se que ela é predominantemente encontrada nos rins, mas pode ser expressa em quase todos os tecidos. Enquanto a isoforma  $\alpha 2$  pode ser encontrada no músculo esquelético, coração, cérebro, adipócitos e olhos, bem como em inúmeros outros tecidos. Em relação à isoforma  $\alpha 3$ , estudos demonstram que ela é encontrada abundantemente nos neurônios e ovários, mas também nas células sanguíneas e coração de muitas espécies, inclusive em humanos (Shamray *et al.*, 1991; Stengelin & Hoffman, 1997; Dostanic-Larson *et al.*, 2006). Já a isoforma  $\alpha 4$  é expressa nos espermatozoides, e desempenha um papel fundamental na motilidade destas células. Ela é especificamente sintetizada durante a espermatogênese, no processo de divisão celular (meiose) das espermatogonias (Shamray & Lingrel, 1994; Woo *et al.*, 2000).

As isoformas  $\alpha$  da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase apresentam diferentes afinidades em relação aos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$ , bem como aos glicosídeos cardíacos. Este fato é fisiologicamente importante, pois permite compreender a influência da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase na regulação da concentração iônica e sua participação em processos como a manutenção do tônus vascular. No MLV da artéria aorta são expressas três isoformas  $\alpha$ :  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , e  $\alpha 3$  (Herrera *et al.*, 1988; Sahin-Erdemli *et al.*, 1994). Porém, Rossoni *et al.* (2002) não conseguiram detectar  $\alpha 3$  nestas artérias. Estes pesquisadores explicaram o prejuízo na detecção de  $\alpha 3$ , pela pequena quantidade dessa isoforma no MLV de aorta, e pela utilização de um anticorpo de baixa sensibilidade, que poderia causar reação cruzada com  $\alpha 2$ . As isoformas  $\alpha 2$ , e  $\alpha 3$  são as que possuem maior afinidade à ouabaína e menor afinidade ao  $\text{Na}^+$ . Enquanto a isoforma  $\alpha 1$  possui alta afinidade ao  $\text{Na}^+$ , ao  $\text{K}^+$  e baixa à ouabaína. A isoforma  $\alpha 2$  possui maior afinidade ao  $\text{Ca}^{+2}$  que as outras duas isoformas (Herrera *et al.*, 1988; Arnon *et al.*, 2000).

### **3.1.2 A subunidade glicosilada $\beta$**

A subunidade  $\beta$  foi identificada por Brotherus *et al.*, (1983) em preparações experimentais nas quais se realizava purificação enzimática da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase. Ela possui um pequeno domínio N-terminal citoplasmático, um segmento único que atravessa a membrana e um grande domínio extracelular C-terminal. O domínio transmembrana é hidrofóbico, altamente glicosilado e possui 3 anéis de bissulfeto que se ancoram na superfície da membrana (Farley *et al.*, 1986; Chow & Forte,

1995). Também são encontrados sítios para ligação com o  $K^+$  na porção extracelular desta subunidade. Assim, Hiatt *et al.* (1984) postularam que ela serviria para orientar e estabilizar a subunidade alfa na membrana, facilitando o seu ancoramento e participaria também, na mudança conformacional da  $Na^+K^+$ -ATPase dependente da ligação com o  $K^+$ . Assim, quando os íons  $K^+$  ligam-se aos sítios da subunidade  $\beta$ , há uma mudança conformacional da  $Na^+K^+$ -ATPase do estado E1 para o E2, sendo que este último estado, seria considerado a conformação mais estável da  $Na^+K^+$ -ATPase, visto que os anéis de bissulfeto estariam mais fortemente ligados à membrana. Além disso, a  $Na^+K^+$ -ATPase no estado conformacional E2 apresenta-se desfosforilada, e a subunidade  $\beta$  seria a responsável pela oclusão à passagem de  $K^+$  (McDonough *et al.*, 1990; Chow *et al.*, 1992; Chow & Forte, 1995; Pontiggia & Gloor, 1997).

Três isoformas da subunidade  $\beta$  são descritas:  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  (Horisberger *et al.*, 1991; Rose & Valdes, 1994; Chow & Forte, 1995). A isoforma  $\beta 1$  é detectada em muitos tecidos de vertebrados, mas é encontrada principalmente nos rins.  $\beta 2$  pode ser encontrada no cérebro, músculo esquelético e glândula pineal. Enquanto a isoforma  $\beta 3$  está presente nas células da retina, testículos, fígado e pulmões (Shyjan *et al.*, 1990; Hundal *et al.*, 1993; Blanco & Mecer, 1998).

### **3.1.3 A subunidade regulatória $\gamma$**

Para compreender um dos papéis funcionais propostos para a subunidade  $\gamma$ , em relação à atividade da  $Na^+K^+$ -ATPase, deve-se considerar o estudo de Aw & Jones (1985). Eles observaram, pelo método de captação de rubídio, em hepatócitos que há relação entre a hipóxia e a diminuição da atividade da  $Na^+K^+$ -ATPase. Estudos recentes mostraram também que mesmo em organismos normais, livres de doença, ao menos um tecido, como o da medula renal, deve funcionar sob as circunstâncias próximo a hipóxia (Brezis & Rosen, 1995). Um exemplo é o caso da maioria dos segmentos do néfron, onde a reabsorção da água e a secreção de soluto, estão sob o controle da  $Na^+K^+$ -ATPase. Como a contínua atividade desta enzima é crucial para a função apropriada dos rins, a existência de um regulador reversível da afinidade do ATP à  $Na^+K^+$ -ATPase, como a isoforma  $\gamma$ , permitiria o ajuste fino da atividade da  $Na^+K^+$ -ATPase sob circunstâncias onde o ATP estivesse esgotado (Therien & Blostein, 2000; Cortes *et al.*, 2006).



## 3.2 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase

### 3.2.1 Eventos que envolvem a sinalização das ações hormonais

A regulação da atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase ocorre por diferentes mecanismos celulares e pode realizar-se pela modulação de um número de enzimas presentes na membrana plasmática, ou por influenciar diretamente a atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase na superfície da célula (Blanco & Mecer, 1998).

Um conjunto de enzimas na membrana celular pode ser modificada por uma mudança na taxa de síntese ou degradação de polipeptídeos da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, bem como pela mobilização de moléculas desta proteína de membrana dos estoques endossomais da célula, exemplificando uma forma de modulação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase (Ewart & Klip, 1995).

Outras evidências sugerem que os mensageiros intracelulares podem também afetar a atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase através de um mecanismo importante de regulação chamado de fosforilação. Assim, muitos hormônios que regulam a atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase o fazem através de mecanismos que modulam a atividade de um grupo de cinases, fosfolipases e fosfatases (Frasen, 2005). Dependendo do tecido, a ativação de cinases pode induzir um aumento ou uma diminuição na atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Os agentes que aumentam o 3', 5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) intracelular conduzem à inibição Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase em MLV de artéria aorta (Borin, 1995; Therien & Blostein, 2000). A pesquisa de Borin (1995) forneceu diversas evidências de que, células de MLV de aorta de ratos, estimuladas por diferentes agentes que aumentam o AMPc, como 3,5 - monofosfato cíclico, 8 - bromoadenosina (8-BrcAMP – análogo do AMPc), a combinação do forskolin (estimulador do AMPc) e do 3 - isobutil-l-metilxantina (IBMX –inibidor da fosfodiesterase), e o isoproterenol, causam um aumento do Na<sup>+</sup> intracelular mediado pela inibição da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Assim, o aumento de AMPc ativa a proteína cinase A (PKA) , que por sua vez, pode fosforilar a subunidade α da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, inibindo-a de forma direta, ou estimular a fosfolipase A<sub>2</sub> e aumentar a liberação de produtos da via do ácido araquidônico, como a Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que também podem inibir a atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Funcionalmente, a inibição da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase pode levar a uma aumento da resposta a agentes

vasoconstrictores e a um aumento do tônus vascular (Sato *et al.*, 1993; Borin, 1995; Blanco & Mecer, 1998; Therien & Blostein, 2000; Chen *et al.*, 2005).

A fosforilação da subunidade  $\alpha$  da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase é reversível. Isto sugere que um evento de fosforilação/desfosforilação pode dinamicamente regular a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Therien & Blostein, 2000).

Além disso, a proteína cinase C (PKC) também regula a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, embora sua participação neste processo ainda seja controversa. Os resultados das pesquisas demonstram informações contraditórias, mas sabe-se que a função da PKC depende da isoforma estudada, da concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  e da espécie do animal. Contudo, Chen *et al.*, (2005) verificaram que a PKC inibe a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase no MLV de aortas de ratos, enquanto Lahaye *et al.*, (1998) observaram que no mesmo tecido e animal, a PKC aumentava a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase através da fosforilação da subunidade  $\alpha$  (Beguin *et al.*, 1994; Therien & Blostein, 2000). Além disso, Beguin *et al.*, (1996) mostraram em seus estudos, que em a PKC era capaz de fosforilar a isoforma  $\alpha_2$  e, de forma menos intensa, a isoforma  $\alpha_1$ , em tecidos de rato.

Uma outra importante via de regulação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase é a proteína cinase G (PKG) que é conhecida, por exemplo, por estimular a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase nos rins e no MLV, através do aumento do 3', 5'- monofosfato cíclico de guanosina (GMPC) (Therien & Blostein, 2000).

Por estas vias descritas anteriormente, muitos estímulos fisiológicos e patológicos desencadeiam aumento ou diminuição da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase. Portanto, mudanças nas condições do meio celular, como a concentração iônica dos substratos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e ATP) e a secreção de hormônios, podem alterar o transporte transmembrana e modular a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase.

### **3.2.2 Regulação da $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase através da concentração dos substratos**

Um importante regulador da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase é o íon  $\text{Na}^+$ , que se liga aos sítios intracelulares desta proteína. Pequenas mudanças na concentração citoplasmática de  $\text{Na}^+$  secundárias a ativação de vários transportadores ou canais para  $\text{Na}^+$  possuem um efeito intenso sobre a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase. Muitos hormônios alteram a atividade desta proteína através da mudança na sua afinidade

ao  $\text{Na}^+$ . Além dos efeitos diretos sobre a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, também são atribuídos aos íons  $\text{Na}^+$ , mecanismos de super-expressão e aumento da densidade destas proteínas na membrana (Therien & Blostein, 2000; Aperia, 2001). Um exemplo pode ser observado nos estudos de Liu & Songu-Mize (1998), onde uma elevação da concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular, aumentou a expressão das isoformas  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , e foi responsável pelo aumento da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase em cultura de MLV de aorta.

Quanto aos íons  $\text{K}^+$ , já em 1978, Webb & Bohr demonstraram que, após uma contração induzida pela norepinefrina, em uma solução livre de  $\text{K}^+$ , a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase do MLV de artérias caudais aumentava sua atividade conforme KCl era adicionado ao banho. Assim, eles sugeriram que o relaxamento do MLV, derivado do aumento da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, era resultante do aumento do transporte eletrogênico de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , e conseqüentemente, da hiperpolarização. Então, este estudo propôs que o relaxamento induzido pelo KCl poderia ser utilizado para avaliação da atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase no MLV, tornando-se uma técnica amplamente utilizada. Outros estudos demonstraram também que uma dieta rica em  $\text{K}^+$ , em animais espontaneamente hipertensos (SHR), associava-se com o aumento da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase vascular e com a redução da pressão arterial (Lee *et al.*, 1992; Dolson *et al.*, 1995).

Em relação ao ATP, sabe-se que variações na concentração e na afinidade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase a este nucleotídeo pode constituir um relevante mecanismo de regulação da atividade desta proteína, principalmente em tecidos que trabalham sob condições hipóxicas, como a medula renal (Therien & Blostein, 2000; Cortes *et al.*, 2006).

Se por um lado a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase pode ser influenciada pela concentração dos substratos descritos acima, por outro lado, sua regulação pode ocorrer também a curto prazo (efeitos diretos sobre o seu comportamento e cinética) por uma variedade de hormônios (Therien & Blostein, 2000). A aldosterona, as catecolaminas (dopamina e norepinefrina) e a insulina são alguns dos exemplos de hormônios reguladores. Os fatores derivados do endotélio, como por exemplo, óxido nítrico, endotelina-1, angiotensina II e prostaglandinas também são importantes moduladores da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase.

### 3.2.3 Hormônios na regulação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase

A aldosterona, produzida pelo córtex da supra renal, possui efeitos genômicos e não-genômicos sobre a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. A curto prazo (efeitos não genômicos), Alzamora *et al.* (2003), demonstraram que a aldosterona possui um efeito transiente inibitório sobre a atividade desta enzima. Quando células de MLV de aorta foram estimuladas pela aldosterona, nos primeiros 20 minutos, houve uma diminuição da atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, que foi inibida por bloqueadores da PKC e não foi afetada quando bloqueadores da transcrição ou translação foram utilizados. Sugerindo assim, que os efeitos não-genômicos da aldosterona sobre a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase incluiriam o aumento do Ca<sup>+2</sup> intracelular, a via do 1, 4, 5 – inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e da PKC, além de mecanismos envolvendo o sistema de microtúbulos. Um dos efeitos, a longo prazo (genômicos), da aldosterona sobre a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase é o aumento da sua expressão em MLV de aorta. Oguchi *et al.* (1993) foram os primeiros a demonstrar, por exemplo, que α1, mas não α2 e α3, está super-expressa em cultura de MLV de aortas estimulada pela aldosterona (Oguchi *et al.*, 1993; Michea *et al.*, 1998; Therien & Blostein, 2000).

Ao contrário, a dopamina, uma catecolamina sintetizada nos túbulos proximais dos rins, inibe a atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase no MLV de artérias aorta (Rashed & Songu-Mize, 1996) e da cauda de ratos (Rashed & Songu-Mize, 1995). Nos rins, ela representa um importante mecanismo fisiológico de regulação da reabsorção de sal durante o aumento da ingestão de Na<sup>+</sup> e envolve vias dependentes de PKC (Therien & Blostein, 2000).

Já as catecolaminas adrenérgicas, como a norepinefrina, possuem ações contraditórias e dependentes do tecido estudado. Sabe-se contudo, que atuam por dois mecanismos: efeito direto sobre a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase; efeito via estimulação α e β-adrenérgica, através de receptores na membrana celular. Nos vasos sanguíneos, já em 1984, [Vanhoutte & Lorenz](#) descreveram o efeito inibidor da norepinefrina sobre a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase e seu papel na contratilidade vascular.

A insulina é um hormônio peptídico que regula os estoques de glicose e possui uma importante ação na homeostase do K<sup>+</sup>, através da modulação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Ela é capaz de ativar a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase em aorta de coelhos, de forma independente do NO derivado do endotélio e provavelmente, esta ativação é mediada pelo aumento da atividade da PKC (Gupta *et al.*, 1996; Therien & Blostein, 2000). Davel *et al.* (2000) estudaram a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase no leito

caudal da ratos diabéticos e verificaram que a diminuição da insulina diminui a atividade desta proteína, o que leva a um aumento da reatividade vascular e da pressão arterial.

Além destes hormônios envolvidos na regulação da função da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, os fatores vasoativos derivados do endotélio, como descrito a seguir, também assumem um importante papel na modulação da atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase.

### **3.2.4 Fatores vasoativos derivados do endotélio na regulação da $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase**

Sabe-se que o óxido nítrico (NO) é um fator de relaxamento do MLV, com meia-vida curta, produzido por muitas células a partir do aminoácido L-arginina que é metabolizado em NO e L-citrulina. A enzima óxido nítrico sintase cataliza esta reação e possui co-fatores como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida da NADPH), tetrahydrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), flavina adenina de nucleotídeo (FAD) e a flavina mononucleotídeo (FMN) (Furchgott & Zawadzki, 1980; Palmer *et al.*, 1987; Angus & Cocks, 1989; Moncada *et al.*, 1991; Behrendt & Ganz, 2002). Vários estímulos são capazes de induzir a liberação de NO pelo endotélio. Dentre eles, podem ser citados, por exemplo, o estresse de cisalhamento promovido pelo atrito entre o fluxo sanguíneo e a parede vascular (“shear stress”), estiramento vascular, agregação plaquetária, serotonina (5-HT), ACh, bradicinina, trombina, substância P, ADP, endotelina-1 e angiotensina II (Moncada *et al.*, 1991; Songu-Mize *et al.*, 2001; Behrendt & Ganz, 2002). Ele se difunde para o MLV e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, que catalisa a reação de transformação do 5'-trifosfato de guanosina (GTP) em GMPc. O aumento de GMPc ativa a PKG que é responsável pela fosforilação de várias proteínas e pelo relaxamento do MLV, através da diminuição da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  (Rapoport & Murad, 1984; Ignarro & Kadowitz, 1985). Sabe-se que a remoção do endotélio inibe a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase. Além disso, o papel do endotélio intacto na manutenção da atividade basal da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase é inibido por um inibidor “não-seletivo” da NOS (L-NAME) (Rossoni *et al.*, 2003; Dos Santos *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). Portanto, o NO é considerado um estimulador da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase. Um dos mecanismos propostos para o NO ativar a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase e promover o

relaxamento do MLV é o aumento dos níveis intracelulares de GMPc (Rapoport *et al.*, 1985). Porém, Gupta *et al.*, (1994) propuseram que o mecanismo de ativação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase ocorreria por uma independente do aumento do GMPc. Como no MLV, a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase é estimulada por agonistas que aumentam a concentração intracelular de  $\text{Na}^+$ , o trocador  $\text{Na}^+\text{H}^+$ , o principal responsável pelo influxo de  $\text{Na}^+$  nos vasos sanguíneos, poderia participar da regulação da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase. Assim, as hipóteses para o mecanismo de ativação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase seria o próprio NO ativá-la, ou a estimulação do trocador  $\text{Na}^+\text{H}^+$  pelo NO, o que aumenta a concentração intracelular de  $\text{Na}^+$ , ativando a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, promovendo assim, relaxamento vascular (Ando *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 1994).

Dentre os fatores derivados do endotélio, a endotelina é um polipeptídeo, sintetizado pelas células endoteliais que possui, principalmente, ação vasoconstritora. Além disso, a endotelina promove retenção de sódio e água, ativação do SNS e do SRAA, exerce estímulo proliferativo sobre os músculos lisos, miócitos e fibroblastos. Sob condições fisiológicas, sua concentração plasmática é baixa (Yanagisawa *et al.*, 1988; Attina, 2005). Sua liberação é estimulada por muitos fatores, tais como o “shear stress”, hipóxia, epinefrina, Angiotensina II, cortisol, trombina, citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-2) e o fatores de crescimento (Haynes & Webb, 1998). Três isopeptídeos da endotelina já foram identificados, a endotelina-1, -2, -3. Suas ações são realizadas através da interação com receptores  $\text{ET}_A$  e  $\text{ET}_B$ . A estimulação destes receptores aumenta a concentração de cálcio intracelular, produzindo vasoconstrição. A endotelina-1 liga-se aos receptores  $\text{ET}_A$  que são expressados preferencialmente nos MLV produzindo contração. Já os receptores  $\text{ET}_B$ , podem se ligar a endotelina-1, -2, e -3. Eles são expressados no endotélio vascular, e quando ativados, estimulam a liberação de NO e prostaciclina pelo endotélio (Masaki & Vane, 1994; Pinet, 2004). Os receptores de endotelina estão acoplados à fosfolipase C, via proteína G regulatória, e quando ativados, aumentam a formação de 2º mensageiros como  $\text{IP}_3$  e diacilglicerol (DAG), e ativam a PKC (Takuwa *et al.*, 1990). Então, Gupta *et al.* (1991) observaram em seus experimentos que a endotelina estimula a atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína em aorta de coelhos. Sugerindo que esta estimulação era resultado do aumento da atividade do trocador  $\text{Na}^+\text{H}^+$  e do co-transporte  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ , mediada pela PKC.

A angiotensina II é um octapeptídeo, biologicamente ativo, integrante do SRAA, produzido por uma série de reações químicas ocorridas na circulação. Seu efeito vasoconstritor é possível via os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, presentes no MLV. As alterações da permeabilidade ao Na<sup>+</sup> parecem estar envolvidas na vasoconstrição induzida pela angiotensina II. O aumento da concentração de Na<sup>+</sup> no banho, com anéis de aorta, potencializa a contração induzida pela angiotensina II nestes vasos. E a diminuição da concentração de Na<sup>+</sup> no banho que perfunde artérias caudais, diminui a contração induzida pela angiotensina II (Moore & Khairallah, 1979). Já em 1982, Brock *et al.* relatavam que havia um aumento da permeabilidade ao Na<sup>+</sup> e um aumento da atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, em cultura de MLV de aorta estimulada por angiotensina II. Mas os mecanismos implicados na ação da angiotensina II sobre o MLV ainda não podiam ser elucidados. Em 2004, Isenovic *et al.* propuseram que a angiotensina II, estimula a atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase do MLV, através dos receptores AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub>, via sinalização do IP<sub>3</sub> e da proteína cinase serina/treonina (p42/44MAPK), possibilitando uma “*up-regulation*” da transcrição do gene da subunidade catalítica α<sub>1</sub> da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Além disso, propuseram que a sustentação do efeito constritor da Angiotensina II sobre o MLV via Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, envolveria o trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Como a angiotensina II é um fator tecidual com produção autócrina/parácrina, que pode ter seus níveis alterados na presença de diversas doenças, a regulação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase pela angiotensina II assume um importância fisiológica na manutenção da homeostase, por exemplo através do controle do tônus vascular (Brock *et al.*, 1982; Isenovic *et al.*, 2004).

As prostaglandinas, derivadas do endotélio, também participam da regulação da atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Elas podem induzir a um aumento ou a uma diminuição da atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, de acordo com o tecido, a espécie animal estudada e o tipo de prostaglandina. PGE<sub>2</sub>, por exemplo, age estimulando a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase e induzindo um aumento no relaxamento em artérias coronárias de grande e pequeno calibre em porcos (Fukuda *et al.*, 1992). Lockette *et al.* já em 1980 demonstraram que a vasodilatação induzida pelas prostaglandinas era causada pela ativação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Então, em suas pesquisas com anéis de artéria caudal, em solução livre de K<sup>+</sup>, eles observaram que a prostaglandina A<sub>1</sub> (PGA<sub>1</sub>), PGE<sub>2</sub> e prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) aumentavam a magnitude do relaxamento do MLV. O relaxamento do MLV induzido pela PGE<sub>2</sub> foi inibido quando adicionou-se ouabaína ao banho e a indometacina reduziu o

relaxamento 30% em relação ao grupo controle (Lockette *et al.*, 1980). Ao contrário, Satoh & Karaki em 1988, sugeriram que a contração da aorta induzida pela ouabaína e pela solução livre de  $K^+$ , não se devia somente a despolarização da membrana e ao trocador  $Na^+/Ca^{+2}$ , mas também à liberação de prostaglandinas.

### **3.2.5 Regulação da $Na^+K^+$ -ATPase através dos seus inibidores endógenos**

Os glicosídeos digitálicos são estudados a mais de dois séculos para o tratamento da ICC. Sua função clássica é a inibição da  $Na^+K^+$ -ATPase que afeta vários tipos de células e regula diversos processos fisiológicos e patológicos (Blaustein, 1993; Schoner, 2002). Os bufodienolídeos, cardenolídeos e a ouabaína (OUA) são exemplos de glicosídeos cardiotônicos sintetizados por plantas e utilizados, por egípcios, chineses, romanos e algumas tribos africanas para o controle de pragas, envenenamentos e propostas terapêuticas. Nas décadas de 60, 70 e 80 várias pesquisas foram realizadas com o objetivo de estudar a ação e a origem de uma substância, semelhante a OUA, presente no plasma sanguíneo de animais submetidos à expansão aguda de volume, que ao ser colocada em contato com o plasma de animais normotensos, reduzia a atividade da  $Na^+K^+$ -ATPase nos mesmos (Buckalew *et al.*, 1970; Overbeck *et al.*, 1976; Hamlyn *et al.*, 1982). Mais tarde, foi demonstrado que o fator endógeno *digitalis-like*, presente no plasma de humanos, possuía características bioquímicas, imunológicas e fisiológicas semelhantes as da OUA (Ludens *et al.*, 1991; Mathews *et al.*, 1991; Bova *et al.*, 1991). A OUA desde então é descrita como uma substância endógena presente no plasma de vários mamíferos, inclusive em humanos, produzida pelo córtex da supra-renal, pela região hipotalâmica e pela região anteroventral do terceiro ventrículo (Pamnani *et al.*, 1981; Songu-Mize *et al.*, 1982; Morgan *et al.*, 1985; Hamlyn *et al.*, 1991; Schoner, 2000).

A OUA é descrita por inibir a atividade da  $Na^+K^+$ -ATPase (Skou & Esmann, 1992; Schoner, 2002) e assim, aumentar o tônus vascular. Logo, é importante saber os mecanismos pelos quais a OUA interfere no funcionamento da  $Na^+K^+$ -ATPase. No MLV, a ouabaína plasmática liga-se à subunidade  $\alpha$  da  $Na^+K^+$ -ATPase inibindo sua atividade (Fedorova & Bagrov, 1997), elevando a concentração intracelular de  $Na^+$  ( $[Na^+]_{cit}$ ). Logo, a membrana é despolarizada e o trocador  $Na^+/Ca^{+2}$  reduz sua



atividade, aumentando a concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  no citosol ( $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{cit}}$ ) (Blaustein, 1977; Blaustein, 1993; Nishimura, 2006). O retículo sarcoplasmático (RS) então, seqüestra rapidamente boa parte deste  $\text{Ca}^{+2}$ , permitindo que uma maior quantidade da  $\text{Ca}^{+2}$  seja estocada e possa ser mobilizada para a contração da célula. Estas etapas são verificadas nas concentrações de ouabaína de 1-1000  $\mu\text{M}$  e induzem a contração do MLV e aumento da reatividade vascular (Blaustein, 1993; Arnon *et al.*; 2000). Porém, um grande enigma é que em concentrações nanomolares de ouabaína (1-100 nM) também há aumento da contração do MLV (Weiss *et al.*, 1993; Vassallo *et al.*, 1997), indução à hipertensão (Rossoni *et al.*; 2001) em ratos e outros efeitos, mas com pequena ou nenhuma modificação da  $[\text{Na}^{+}]_{\text{cit}}$  (Levi *et al.*, 1994). Recentes trabalhos têm contribuído para esclarecer este processo. Por exemplo, foram demonstradas regiões na membrana plasmática, próximas ao retículo sarcoplasmático (RS) e ao trocador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ , que apresentavam alta afinidade à OUA. Os chamados “microdomínios da membrana plasmática”, descritos no MLV de artérias de ratos (Juhaszova & Blaustein, 1997) e em outros tipos de células. Eles poderiam mediar os efeitos cardiotônicos das baixas concentrações de OUA (Han *et al.*, 2006). Nestes microdomínios, foram encontradas, em grande quantidade, as subunidades  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  da  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPase, que possuem alta afinidade à OUA (Juhaszova & Blaustein, 1997). Além disso, verificou-se que no pequeno compartimento entre a membrana plasmática e a membrana do RS juncional uma elevada concentração de  $\text{Na}^{+}$  não correspondia a uma elevação da  $[\text{Na}^{+}]_{\text{cit}}$  (Wendt-Gallitelli *et al.*, 1993). Varias evidências também foram demonstradas de que a entrada e a saída de  $\text{Ca}^{+2}$ , bem como a modulação dos estoques do RS, era realizada nesta região (Van Breemen *et al.*, 1995). Estas unidades funcionais seriam análogas às tríades e as diades do músculo esquelético e cardíaco, e foram chamadas de *plasmersomes* (Blaustein & Lederer, 1999). Contudo, a hipótese mais aceita é que doses nanomolares de OUA, inibiriam as subunidades  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  da  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPase e, conseqüentemente, aumentariam concentração de  $\text{Na}^{+}$  nos *plasmersomes*, sem ocorrer aumento da  $[\text{Na}^{+}]_{\text{cit}}$ . Assim, a extrusão de  $\text{Ca}^{+2}$  pelo trocador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$  estaria inibida, aumentando a concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  local. O aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  nos *plasmersomes*, poderia aumentar a concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  global através da sensibilização dos receptores  $\text{IP}_3$  ou pelo aumento do conteúdo de  $\text{Ca}^{+2}$  no RS (Arnon *et al.*, 2000). Portanto, a ouabaína tanto em baixas quanto em elevadas concentrações, pode regular a atividade da  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPase e auxiliar no controle da

concentração iônica de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$ , participando do aumento da resistência periférica, do controle do tônus vascular e do fluxo sanguíneo (Juhaszova & Blaustein, 1997; Arnon *et al.*, 2000).

Trabalhos demonstram que a OUA pode aumentar o tônus simpático ou sensibilizar o leito vascular, aumentando a sua responsividade a substâncias vasoconstritoras como a noradrenalina, angiotensina II e fenilefrina (Marin *et al.*, 1988; Vassallo *et al.*, 1997; Schoner, 2002). Assim, ela pode estar associada ao desenvolvimento de doenças como HAS, INF e ICC, que cursam com a alteração da concentração plasmática destas substâncias. Além disso, são considerados como principais estímulos para a liberação de OUA: 1) aumento da concentração plasmática de  $\text{Na}^+$ ; e a 2) expansão de volume extracelular (Blaustein, 1993; Schoner, 2002), sendo que ambos, são facilmente encontrados nos pacientes com ICC. Portanto, não pode ser considerado surpresa o fato de Gottlieb *et al.* (1992) terem encontrado concentração elevada de OUA no plasma de humanos com ICC. A função da ouabaína nos indivíduos com ICC pode ser entendida com o objetivo de: 1) manter o estado inotrópico do miocárdio, através da inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase do miócito; 2) promover a natriurese, através da inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase nos túbulos renais; 3) promover vasoconstrição, mantendo ou aumentando a PA, através da inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase no MLV. Estas possíveis conseqüências da inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase explicam a importância dos glicosídeos cardíacos em pacientes com ICC e sugerem que a deficiência de ouabaína endógena pode exacerbar a doença (Gottlieb *et al.*, 1992).

A OUA é descrita como um hormônio capaz de inibir a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Blaustein, 1993). Considerando que alterações na atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase envolvidas com a modificação da reatividade vascular têm sido descritas na literatura em doenças do sistema cardiovascular, como a hipertensão arterial e o diabetes (Rose & Valdes, 1994; Davel *et al.*, 2000; Rossoni *et al.* 2002; Xavier *et al.*, 2004; Callera *et al.*, 2004), é possível, que as alterações na reatividade vascular após INF descritas por Pereira *et al.* (2005) também envolvam esta enzima.

Porém, nenhum estudo avaliou a participação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase na alteração da reatividade vascular em aortas de animais infartados. Então, o propósito deste estudo foi realizar uma análise comparativa entre ratas com e sem insuficiência cardíaca, após trinta dias de infarto do miocárdio, em relação à atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína em anéis de aorta de ratas após o infarto do miocárdio, com mesma área de cicatriz, com e sem sinais de insuficiência cardíaca.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar as diferenças nos dados ponderais das ratas com mesma área de cicatriz, com e sem sinais de insuficiência cardíaca, decorridos 30 dias do infarto do miocárdio;

Verificar a atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína nas mudanças de reatividade vascular após o infarto do miocárdio;

Comparar a atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína em ratas, com área de infarto semelhante, com e sem sinais de insuficiência cardíaca;

Verificar a participação do endotélio vascular sobre a atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína nas artérias aorta de ratas com e sem sinais insuficiência cardíaca, após o infarto do miocárdio;

Analisar a participação do NO sobre a atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína nas artérias aorta de ratas com e sem sinais insuficiência cardíaca, após o infarto do miocárdio.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas ratas Wistar, de  $8 \pm 1$  semanas de idade, pesando entre 220 e 240 g, cedidas pelo biotério da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, mantidas em caixas de polipropileno, com controle de claro/escuro (12/12 horas), com livre acesso à água e à ração.

Trinta dias após o INF, os animais foram distribuídos em 3 grupos:

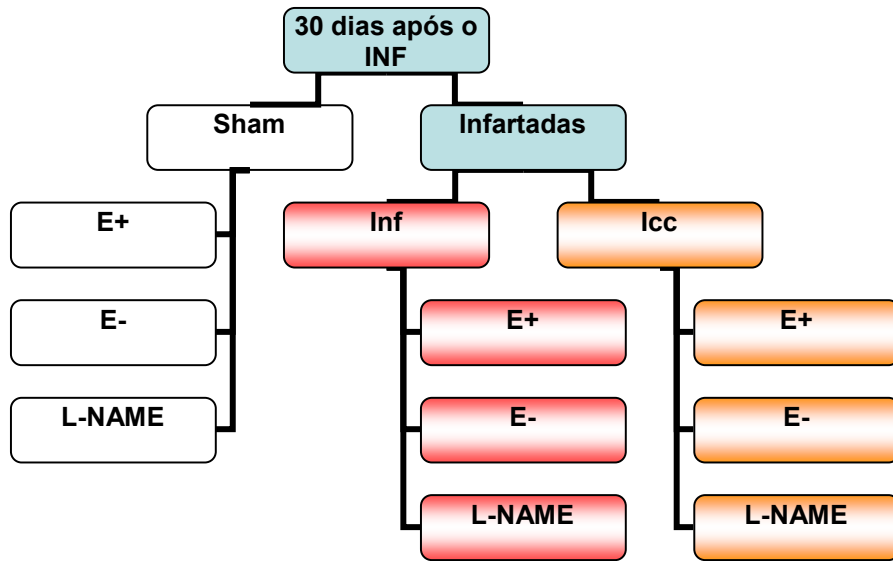
Cirurgia fictícia de Infarto (Sham), n= 13

Infartadas (Inf), n= 11

Infartadas que desenvolveram sinais de insuficiência cardíaca (Icc), n= 7

Todos os animais foram necropsiados, tendo seus corações e pulmões coletados para análise ponderal. As ratas com trinta dias após o infarto do miocárdio foram consideradas integrantes do grupo com insuficiência cardíaca considerando 2 critérios: 1) a razão entre o peso dos pulmões e o peso corporal dos animais Icc apresentar-se maior que a mesma razão dos animais Sham, mais duas vezes o desvio padrão ( $Icc = PP/PC_{Icc} > PP/PC_{Sham} + 2DP$ ) (Francis *et al.*, 2001), sugerindo aumento do volume de fluido na vasculatura pulmonar; 2) à razão entre o ventrículo direito e o peso corporal apresentar-se maior que a mesma razão nos animais Sham, mais duas vezes o desvio padrão ( $ICC = VD/PC_{ICC} > VD/PC_{Sham} + 2DP$ ) (Davidoff *et al.*, 2004).

Em cada grupo foram realizados experimentos com anéis de aorta com endotélio íntegro ( $E^+$ ), com endotélio removido mecanicamente ( $E^-$ ) e com endotélio íntegro mais adição de um inibidor “não-seletivo” da sintase do óxido nítrico (NOS)  $N^{(W)}$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME= 100  $\mu$ M). A distribuição dos grupos pode ser observada no organograma a seguir (Figura 1):

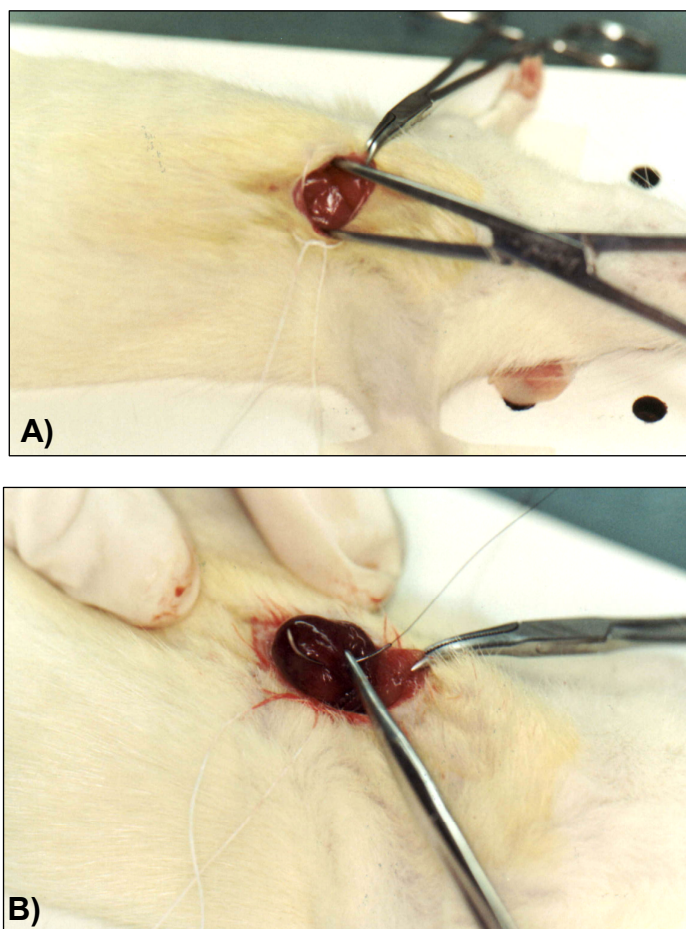


**Figura 1:** Organograma da divisão dos grupos experimentais trinta dias após o infarto do miocárdio. Cirurgia fictícia de infarto do miocárdio (Sham) – cor branca; Ratas infartadas sem sinais de insuficiência (Inf) - cor vermelha; Ratas infartadas com sinais de insuficiência (Icc) – cor laranja; anéis de aorta com endotélio íntegro (E+); com endotélio removido mecanicamente (E-); e com endotélio íntegro mais adição de um inibidor “não-seletivo” da sintase do óxido nítrico (NOS) N<sup>(W)</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME= 100 µM).

## 5.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

### 5.2.1 Infarto agudo do miocárdio

Para indução do infarto, os animais foram anestesiados e mantidos sob anestesia com éter etílico. Em seguida foi realizada uma toracotomia do lado esquerdo entre o terceiro e quarto espaço intercostal. O músculo peitoral foi separado e as costelas expostas. O coração foi gentilmente exteriorizado e a artéria coronariana descendente anterior esquerda ligada aproximadamente a 3 mm distal à sua origem, utilizando fio mononylon 6.0 (Pfeffer *et al.*, 1979) (Figura 2 A e B). Após o coração ter sido colocado no lugar e o tórax fechado, os animais retornavam à respiração normal. O procedimento cirúrgico do infarto, após abertura do tórax, durou no máximo 40 segundos. Através de tal procedimento visamos obter infartos do miocárdio transmuraais, caracterizados por necrose isquêmica envolvendo toda ou quase toda a espessura da parede ventricular.



**Figura 2:** Procedimento para a oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda. A) Toracotomia entre o 3º e 4º espaços intercostais; B) Exteriorização do coração e amarradura da artéria coronária descendente anterior esquerda.

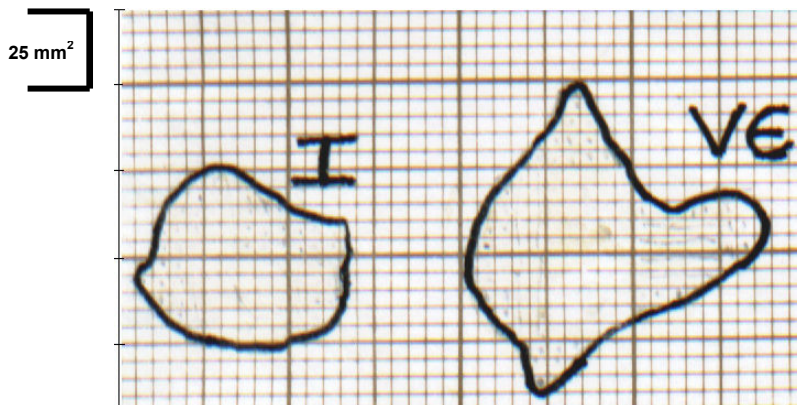
### 5.2.2 Avaliação dos dados ponderais

Trinta dias após o infarto, as ratas foram pesadas, anestesiadas com uretana na dose de 1,2 g/Kg, i. p., e em seguida, eutanaziadas com exanguinação. A aorta torácica descendente foi gentilmente retirada para realização do protocolo de reatividade vascular que será descrito no tópico 3.2.3. O coração e os pulmões foram removidos (Figura 3) e imersos em solução salina (NaCl, 0,9 %) para limpeza tecidual.



**Figura 3:** Avaliação dos dados ponderais - Coração e pulmões removidos para pesagem. Órgãos dispostos do lado esquerdo da figura referem-se a animal trinta dias após a cirurgia fictícia para indução ao infarto do miocárdio (Sham). Órgãos do lado direito, representam animal trinta dias após cirurgia para indução ao infarto do miocárdio (Inf).

Após secagem em papel de filtro, foi realizada a mensuração do peso total dos pulmões e este valor foi normalizado pelo peso corporal do animal. Para avaliação da área de infarto e hipertrofia cardíaca, a presença do infarto foi inicialmente determinada pela observação grosseira do coração. Após sua remoção, os ventrículos foram separados e pesados e seus pesos úmidos eram normalizados pelo respectivo peso corporal para estimar a hipertrofia cardíaca. O tecido infartado foi dissecado do músculo remanescente sob visualização macroscópica. Os contornos de cada fatia foram delineados sobre papel milimetrado e as áreas medidas por contagem de pontos, para avaliação da área correspondente em mm<sup>2</sup> (Mill *et al.*, 1990) (Figura 4). A borda do infarto é claramente delineada uma vez que o infarto transmural resulta em um tecido fino e fibroso (Kim *et al.*, 2002). A área de infarto foi expressa como porcentagem da área do ventrículo esquerdo remanescente. O septo interventricular foi sempre considerado parte do ventrículo esquerdo. Corações com área de infarto menores que 20% foram descartados do estudo.



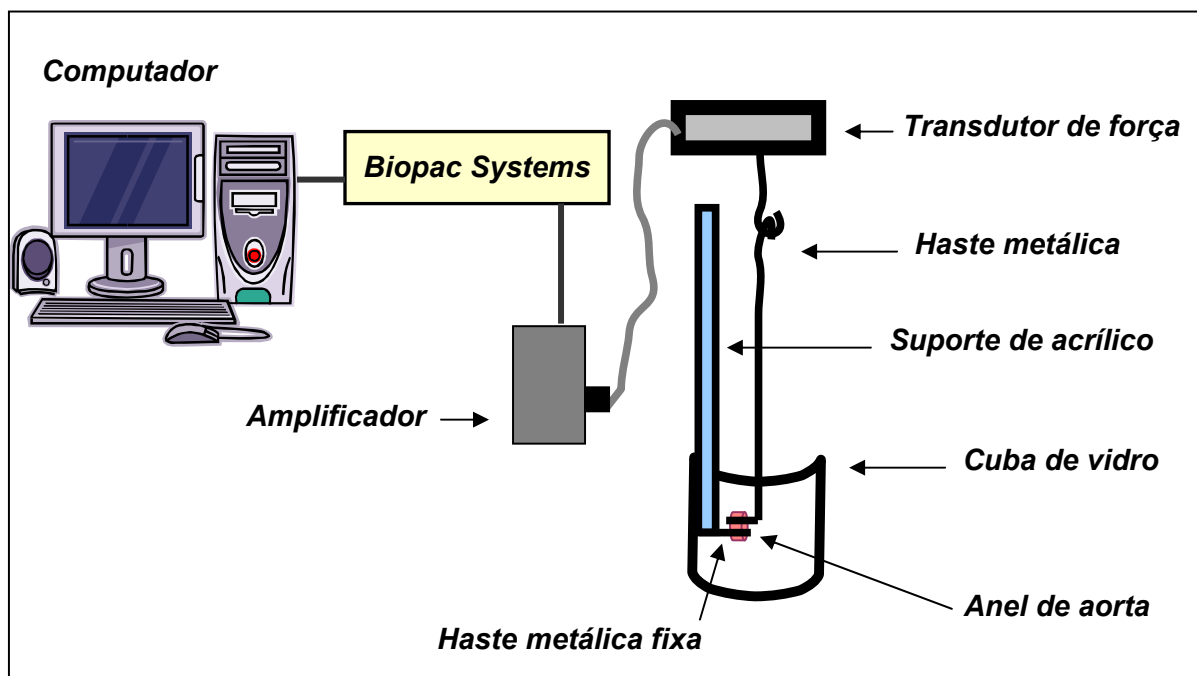
**Figura 4:** Avaliação da área de infarto em papel milimetrado. **I** representa a área de infarto e **VE** representa o tecido do miocárdio remanescente. As bordas das fatias eram contornadas em papel milimetrado e as medidas realizadas por contagem de pontos, com área calculada em  $\text{mm}^2$ . Cada quadrado pequeno equivale a  $1 \text{ mm}^2$  e cada quadrado grande delimita uma área de  $25 \text{ mm}^2$ .

### 5.2.3 Preparação dos anéis isolados de aorta e avaliação da reatividade vascular “*in vitro*”

Trinta dias após a cirurgia de infarto, a aorta torácica descendente foi gentilmente retirada e rapidamente colocada em uma placa de Petri imersa em solução de Krebs-Henseleit (composição em  $\text{mmol/L}$ :  $\text{NaCl}$  118;  $\text{KCl}$  4,7;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,17;  $\text{NaHCO}_3$  25;  $\text{EDTA}$  0,01 e glicose 11), gaseificada com mistura carbogênica contendo 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de  $\text{O}_2$ ,  $\text{pH} = 7,4$  e temperatura de  $36,5^\circ \text{C}$ . Então, foi removido o tecido conjuntivo e adiposo adjacente à artéria e o vaso foi cortado em anéis de 4 a 5 mm de comprimento. Para a obtenção do registro de tensão isométrica, cada anel vascular foi colocado em um banho, de acordo com o método descrito por Marin *et al.* (1998). As cubas continham 5 mL de solução de Krebs-Henseleit, aquecida a  $36,5^\circ \text{C}$ , continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o  $\text{pH}$  estável em 7,4. Os anéis isolados foram montados em uma preparação com suportes de acrílico fixadas em cubas de vidro. Uma haste de aço inoxidável estava conectada ao suporte de acrílico, preso ao banho, e a outra haste conectada verticalmente ao transdutor de tensão, os anéis foram montados de forma que as duas hastes metálicas estivessem paralelas na luz do vaso, sendo assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era



captada pelo transdutor de força (modelo FT 03, Grass Instrument Co) acoplado a um sistema de aquisição de dados (MP 100, Biopac Systems, Inc. AS) (Figura 5).

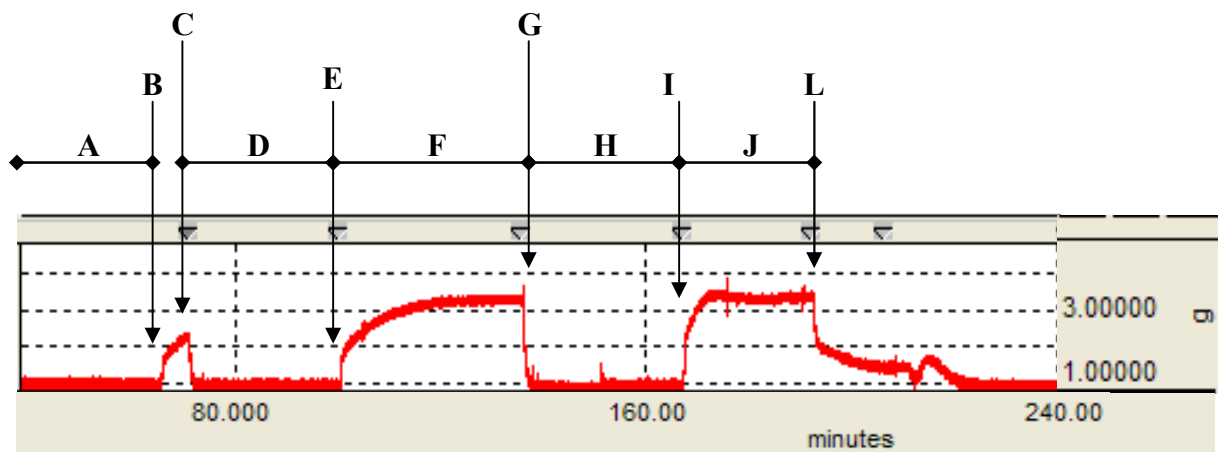


**Figura 5:** Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*”. Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems*.

Uma tensão de repouso de 1 g foi aplicada aos anéis, eles foram lavados quatro vezes e a tensão foi ajustada caso necessário a cada 15 minutos, durante um período de 45 minutos de estabilização (Figura 6A).

Após a estabilização, foi adicionado cloreto de potássio (KCl) 75 mM ao banho para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização e assim, avaliar a viabilidade das artérias. Após atingirem uma variação de 1 grama de força, os anéis foram lavados três vezes com solução Krebs. Os anéis que não contraíram um grama foram descartados. 30 minutos após a lavagem, uma nova concentração de KCl 75 mM foi adicionada ao banho e aguardados aproximadamente 30 minutos até que se atingisse um platô no registro da contração. Após o platô, os anéis foram novamente lavados três vezes e submetidos a um período de 30 minutos de estabilização, caso a tensão do anel não

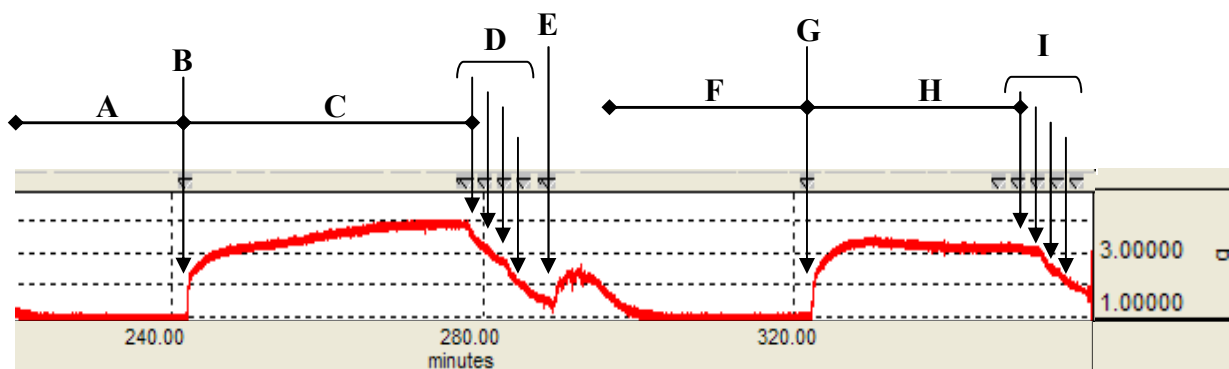
retornasse ao basal, ele era submetido a uma nova lavagem. Foi realizada então, uma avaliação da integridade funcional do endotélio. Os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (Fe)  $10^{-4}$  M ou o quanto fosse necessário para se atingir 50-75% da contração máxima ao segundo KCl. Ao final da contração, quando o platô fosse atingido, uma dose única de acetilcolina (ACh)  $10^{-3}$  M era adicionada (Figura 6, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L). Os anéis que relaxavam menos que 90% do platô eram descartados. Os anéis sem endotélio relaxaram no máximo 10% ou até contraíram.



**Figura 6:** Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. **Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl:** **A)** Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 1g); **B)** Adição de KCl (75 mM) ao banho; **C)** Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; **D)** Período de estabilização (30 min); **E)** Adição de KCl (75 mM) ao banho; **F)** Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); **G)** Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; **H)** Período de estabilização (30 min). **Avaliação da integridade funcional do endotélio:** **I)** Pré-contração com fenilefrina (Fe)  $10^{-4}$  M; **J)** Platô da contração induzida pela Fe; **L)** Adição de acetilcolina (ACh)  $10^{-3}$  M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical.

### 5.2.3.1 Estudo da atividade funcional da $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína em aortas de ratas com e sem sinais de insuficiência cardíaca após o infarto do miocárdio

Para a realização da avaliação funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína foi utilizada a técnica de relaxamento induzido pelo potássio, previamente descrita por Webb & Bohr (1978). Após o teste do endotélio descrito no item 5.2.3, a preparação foi perfundida por 30 minutos com solução Krebs sem potássio (para a obtenção da solução livre de potássio, o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foi substituído por  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Em seguida foi realizada uma pré-contracção com fenilefrina ( $10^{-4}$  M). Quando o platô foi atingido, KCl (1, 2, 5 e 10 mM) foi adicionado em intervalos de dois minutos e meio. Foi analisada a resposta de relaxamento do vaso em presença das concentrações crescentes e cumulativas de potássio, sendo que este relaxamento é atribuído à ativação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase. Em seguida, as preparações foram incubadas agudamente com solução livre de potássio e com ouabaína (OUA)  $10^{-4}$  M por 30 minutos. Novamente foi repetida a adição KCl (1, 2, 5 e 10 mM) ao banho, com o objetivo de avaliar a resposta de relaxamento do vaso ao KCl na presença de um inibidor da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Figura 7, A, B, C, D, E, F, G, H, I).



**Figura 7:** Registro com curvas representando avaliação da atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase sensível à OUA em aortas de ratas com e sem sinais de insuficiência cardíaca após o infarto do miocárdio. **A)** Perfusão por 30 minutos com solução Krebs sem potássio; **B)** Pré-contracção com fenilefrina (Fe)  $10^{-4}$  M; **C)** Platô da contracção induzida pela Fe; **D)** Primeira curva de KCl (adição de 1, 2, 5 e 10 mM ao banho em intervalos de 2' 30"); **E)** Lavagem com solução Krebs sem potássio; **F)** Adição de OUA  $10^{-4}$  M e estabilização por 30 minutos; **G)** Pré-contracção com Fe  $10^{-4}$  M; **H)** Platô da contracção induzida pela Fe; **I)** Segunda curva de KCl (adição de 1, 2, 5 e 10 mM ao banho em intervalos de 2' 30"). O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical.

#### **5.2.3.1.1 Modulação do endotélio sobre a resposta de relaxamento ao KCl e sobre a capacidade da ouabaína de inibir a atividade funcional da $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase**

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio de modular a resposta de relaxamento vascular induzida pelo KCl foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro e sem endotélio. As células endoteliais foram removidas mecanicamente através do uso de fios metálicos. Estes foram inseridos na luz do vaso e friccionados à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio.

#### **5.2.3.1.2 Efeito do bloqueio com L-NAME sobre a atividade funcional da $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína**

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico na modulação endotelial da atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína, os anéis foram incubados com L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ).

Após o período de estabilização em solução normal de Krebs-Henseleit, a preparação foi perfundida por mais 30 minutos com solução Krebs sem potássio e L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ). Em seguida foi realizada uma pré-contração com fenilefrina ( $10^{-4}$  M) em solução livre de potássio. Quando o platô foi atingido, KCl (1, 2, 5 e 10 mM) foi adicionado em intervalos de dois minutos e meio. Em seguida, as preparações foram incubadas agudamente com solução livre de potássio, com ouabaína  $10^{-4}$  M e com L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos e, novamente repetida a curva ao KCl, como descrita anteriormente.

### 5.3 EXPRESSÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (média  $\pm$  EPM). O n corresponde ao número de animais utilizados. A resposta de relaxamento ao KCl dos anéis vasculares foram expressas como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. As curvas de relaxamento ao KCl foram construídas através da análise de regressão não-linear das curvas concentração-resposta obtidas. Para tal foi utilizado o programa *GraphPad Prism Software* (San Diego, CA, USA).

Para comparar a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína entre os grupos estudados foi realizada ANOVA duas vias, com *post hoc* de Bonferroni, entre as curvas de relaxamento induzido pelo KCl. Assim, analisou-se tanto o relaxamento induzido por doses cumulativas de KCl (1, 2, 5, 10 mM), quanto a capacidade da ouabaína de inibir este relaxamento. A análise estatística dos demais dados foi realizada por análise de variância, ANOVA uma via, seguida de *post hoc* de Tukey. O teste *t* não pareado também foi utilizado. Os valores foram considerados significantes quando o  $P < 0,05$  era obtido.

#### 5.4 FÁRMACOS E REAGENTES

Acetilcolina, cloridrato (Sigma)

Bicarbonato de sódio (Merck)

Cloreto de cálcio (Merck)

Cloreto de potássio (Merck)

Cloreto de sódio (Merck)

EDTA (Hoescht)

Éter etílico (Reagen)

Fosfato de potássio (Merck)

Fosfato de sódio (Merck)

Glicose (Reagen)

L-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)

N<sup>(W)</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), dicloreto (Sigma)

Ouabaína, octahidrato (Sigma)

Sulfato de magnésio heptahidratado (Merck)

Uretana (Sigma)

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e mantidas no congelador a -20° C.

## 6. RESULTADOS

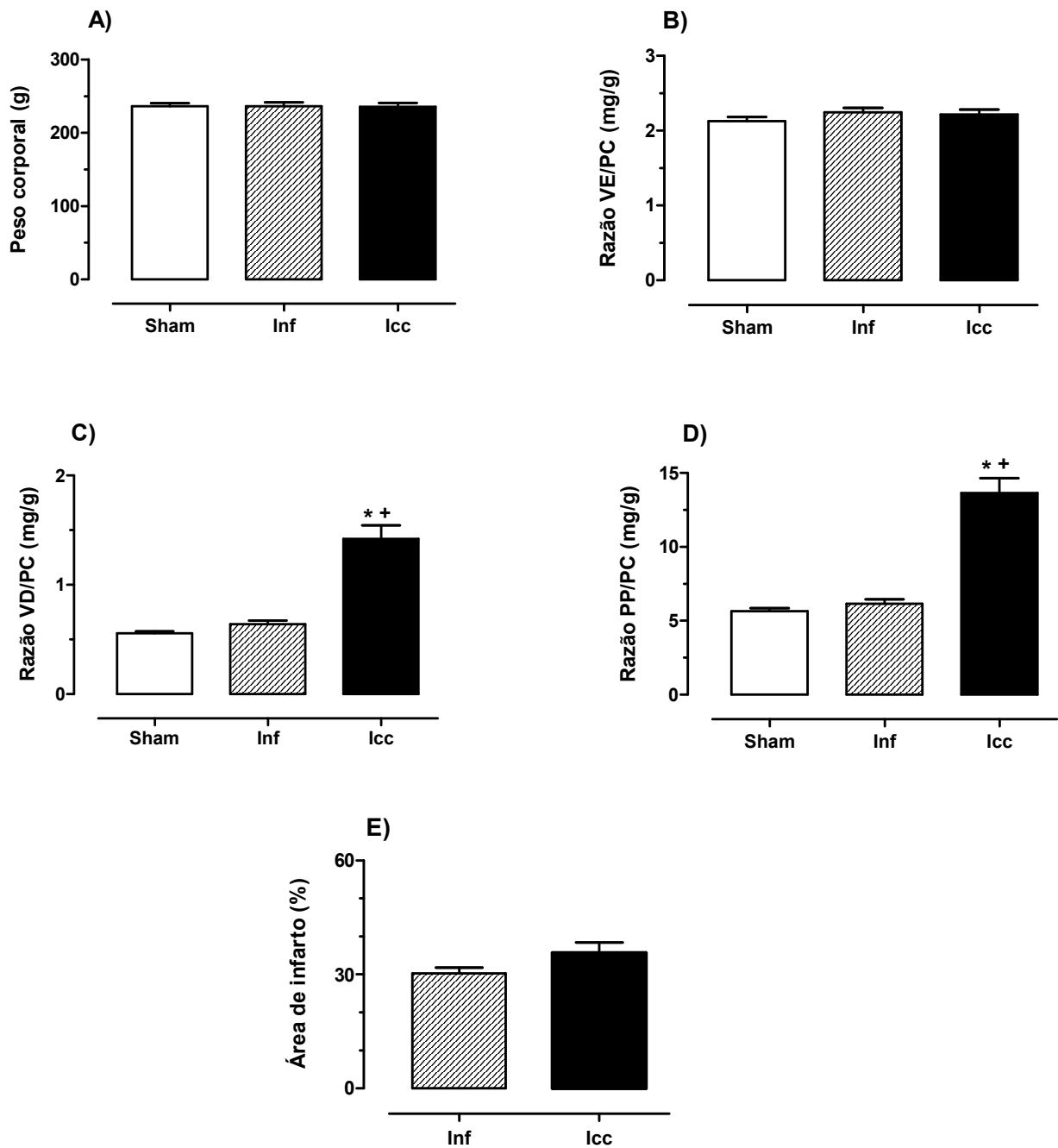
### 6.1 DADOS PONDERAIS

Trinta dias após a oclusão coronariana, 39% (N= 7) das ratas desenvolveram sinais de ICC. A área de infarto e a razão entre o ventrículo esquerdo e o peso corporal (VE/PC) não foram diferentes entre os grupos de ratas Inf e lcc quando foi realizado Teste *t* Student's não pareado (Figura 8 – B, E; Tabela 1). Entretanto, as razões entre o VD/PC, bem como o PP/PC estavam aumentadas no grupo lcc quando o mesmo foi comparado com os grupos Sham e Inf (Figura 8 C, D; Tabela 1). Não houve diferença significativa no peso corporal entre os grupos estudados (Figura 8 A; Tabela 1).

**Tabela 1:** Dados ponderais dos animais 30 dias após o infarto.

|                     | <b>Sham</b><br>(n= 13) | <b>Inf</b><br>(n= 11) | <b>lcc</b><br>(n= 7)       |
|---------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|
| <b>PC (g)</b>       | 236 ± 4                | 236 ± 5               | 235 ± 5                    |
| <b>VE/PC (mg/g)</b> | 2,12 ± 0,05            | 2,24 ± 0,06           | 2,21 ± 0,07                |
| <b>VD/PC (mg/g)</b> | 0,56 ± 0,01            | 0,64 ± 0,03           | 1,42 ± 0,12* <sup>+</sup>  |
| <b>PP/PC (mg/g)</b> | 5,70 ± 0,21            | 6,14 ± 0,29           | 13,63 ± 1,01* <sup>+</sup> |
| <b>AI (% do VE)</b> | ----                   | 30,2 ± 1,6            | 35,6 ± 2,8                 |

Valores de peso corporal (PC); Razão entre o peso do ventrículo esquerdo e o peso corporal (VE/PC); Razão entre o peso do ventrículo direito e o peso corporal (VD/PC); Razão entre o peso dos pulmões e o peso corporal (PP/PC); Porcentagem da área de infarto (AI). Os resultados foram expressos como média ± EPM, considerando significantes as diferenças para  $P < 0,05$ . ANOVA uma via com *post hoc* de Tukey: \* $P < 0,05$  vs. Sham; <sup>+</sup> $P < 0,05$  vs. Inf. O Teste *t* Student's não pareado foi utilizado para avaliar a diferença da AI entre os grupos Inf e lcc, com  $P = 0,088$ .



**Figura 8:** Dados ponderais dos animais Sham, Infarto (Inf) e Infarto com sinais de insuficiência cardíaca (lcc), 30 dias após o infarto: **A)** Peso corporal (PC); **B)** Razão entre o peso do ventrículo esquerdo e o peso corporal (VE/PC); **C)** Razão entre o peso do ventrículo direito e o peso corporal (VD/PC); **D)** Razão entre o peso dos pulmões e o peso corporal (PP/PC); **E)** Porcentagem da área de infarto. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM, considerando significantes as diferenças para  $P < 0,05$ . ANOVA uma via, *pos hoc* de Tukey:  $*P < 0,05$  vs. Sham;  $^+P < 0,001$  vs. Inf. O Teste *t* Student's pareado foi utilizado para avaliar a área de infarto entre os grupos Inf e lcc e o resultado encontrado foi  $P = 0,088$ .



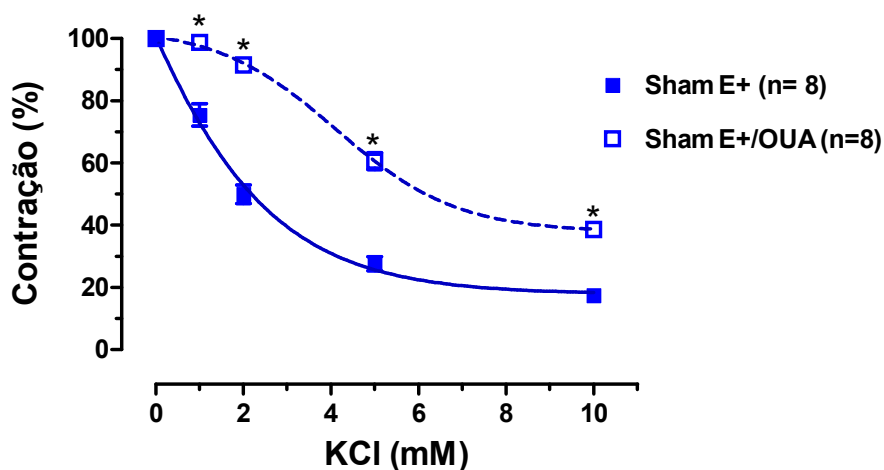
## 6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DA Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase SENSÍVEL À OUABAÍNA 30 DIAS APÓS O INFARTO

A atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína foi avaliada através da curva de relaxamento induzido pelo cloreto de potássio (Webb & Bohr, 1978). Como será observado nas curvas a seguir, a adição de KCl ao meio, de modo concentração-dependente (1, 2, 5, 10 mM), após 30 minutos de incubação dos anéis vasculares em solução sem potássio, diminuiu a contração induzida pela fenilefrina (10<sup>-4</sup> M) em todos os grupos estudados, promovendo relaxamento dos vasos. A incubação dos anéis em um banho contendo ouabaína (10<sup>-4</sup> M) reduziu o relaxamento induzido pelo KCl em todos os grupos.

Para a descrição dos resultados, primeiramente, serão apresentadas as diferenças dentro de um mesmo grupo e, posteriormente, serão apresentadas as comparações entre os grupos Sham, Inf e Icc.

### 6.2.1 Estudo da atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína, em aortas de ratas Sham

Como observado na figura 9, nas aortas com endotélio intacto, provenientes das ratas Sham, houve um relaxamento induzido pela adição de concentrações crescentes de KCl ao banho, sendo este significativamente reduzido após a incubação dos anéis com OUA (10<sup>-4</sup> M) por 30 minutos.



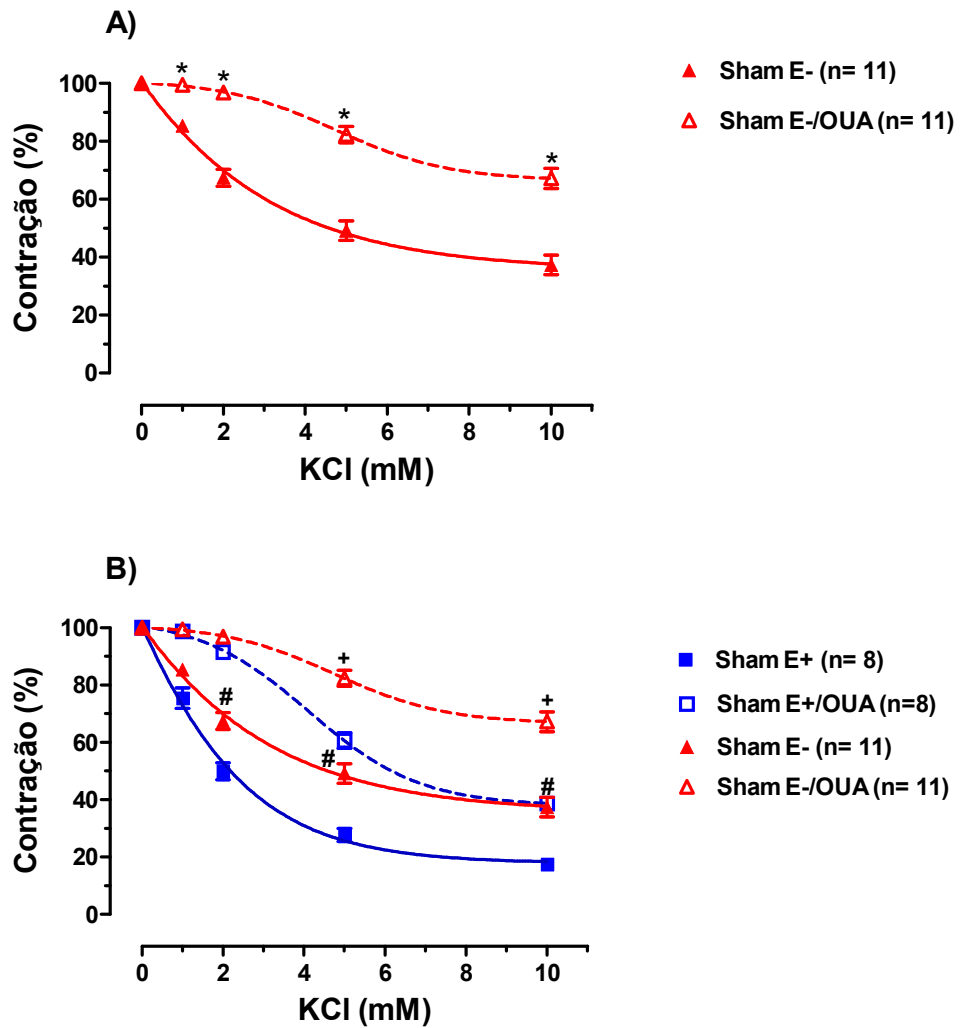
**Figura 9:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica com endotélio intacto (E+) obtidas de ratas Sham. Sham E+, antes (linha contínua, quadrado cheio, azul), e Sham E+/OUA, após a incubação com OUA (10<sup>-4</sup> M) durante 30 minutos (linha pontilhada, quadrado vazio, azul). Resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média ± EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

\*P < 0,05, Sham E+/OUA vs. Sham E+.

### **6.2.1.1 Modulação do endotélio sobre a atividade funcional da $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína em aorta de ratas Sham**

A capacidade do endotélio em modular a resposta de relaxamento vascular induzida pelo KCl foi avaliada através da remoção mecânica das células endoteliais com uma haste metálica. Nas aortas sem endotélio, provenientes de ratas Sham, também observou-se um relaxamento, induzido pelo KCl, o qual foi reduzido significativamente após a incubação dos anéis com OUA ( $10^{-4}$  M) por 30 minutos (Figura 10 A).

Quando os grupos com E+ e sem E- foram comparados, os resultados demonstraram que a remoção do endotélio diminuiu o relaxamento vascular induzido pelo KCl ( $\#P < 0,05$ , nas concentrações de 2, 5 e 10 mM de KCl). Além disso, houve um aumento significativo da capacidade da OUA de inibir o relaxamento induzido pelo KCl ( $^+P < 0,05$ , nas concentrações de 5 e 10 mM de KCl) (Figura 10 B).



**Figura 10:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica de ratas Sham sem endotélio (E-) e comparação entre os grupos com endotélio intacto (E+) e E-. **A)** Curva de relaxamento nos anéis E-, antes (linha contínua, triângulo cheio, vermelho), e Sham E-/OUA, após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos (linha pontilhada, triângulo vazio, vermelho). **B)** Comparação entre os grupos com E+ e sem E- endotélio, antes e após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos. Resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

\*P < 0,05, Sham E-/OUA vs. Sham E-;

#P < 0,05, Sham E- vs. Sham E+;

+P < 0,05, Sham E-/OUA vs. Sham E+/OUA.

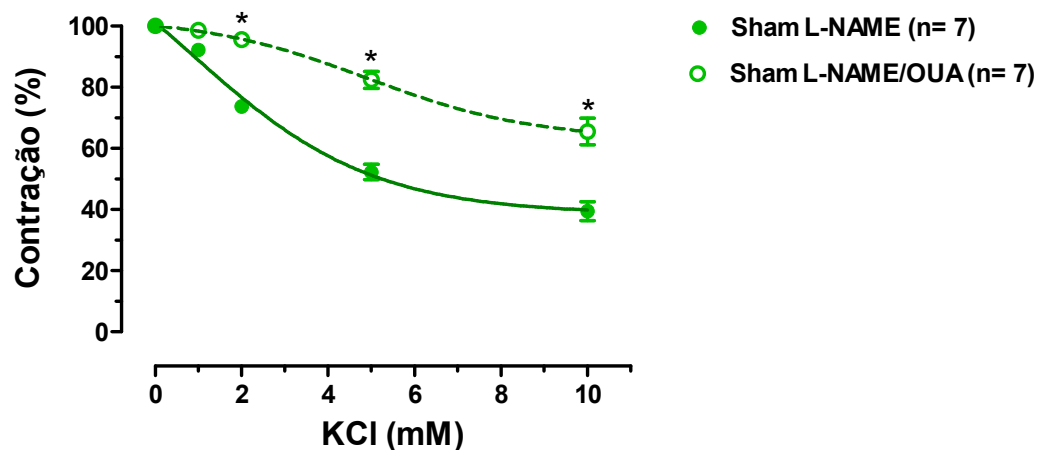
### **6.2.1.2 Participação do NO sobre a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína em aorta de ratas Sham**

A participação do óxido nítrico na modulação endotelial sobre a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase foi avaliada em anéis incubados com um inibidor “não-seletivo” da sintase de óxido nítrico, L-NAME (100 μM).

Como observado na figura 11, houve relaxamento, induzido pelo KCl, o qual foi reduzido de forma significativa, após a incubação dos anéis com OUA (10<sup>-4</sup> M) por 30 minutos.

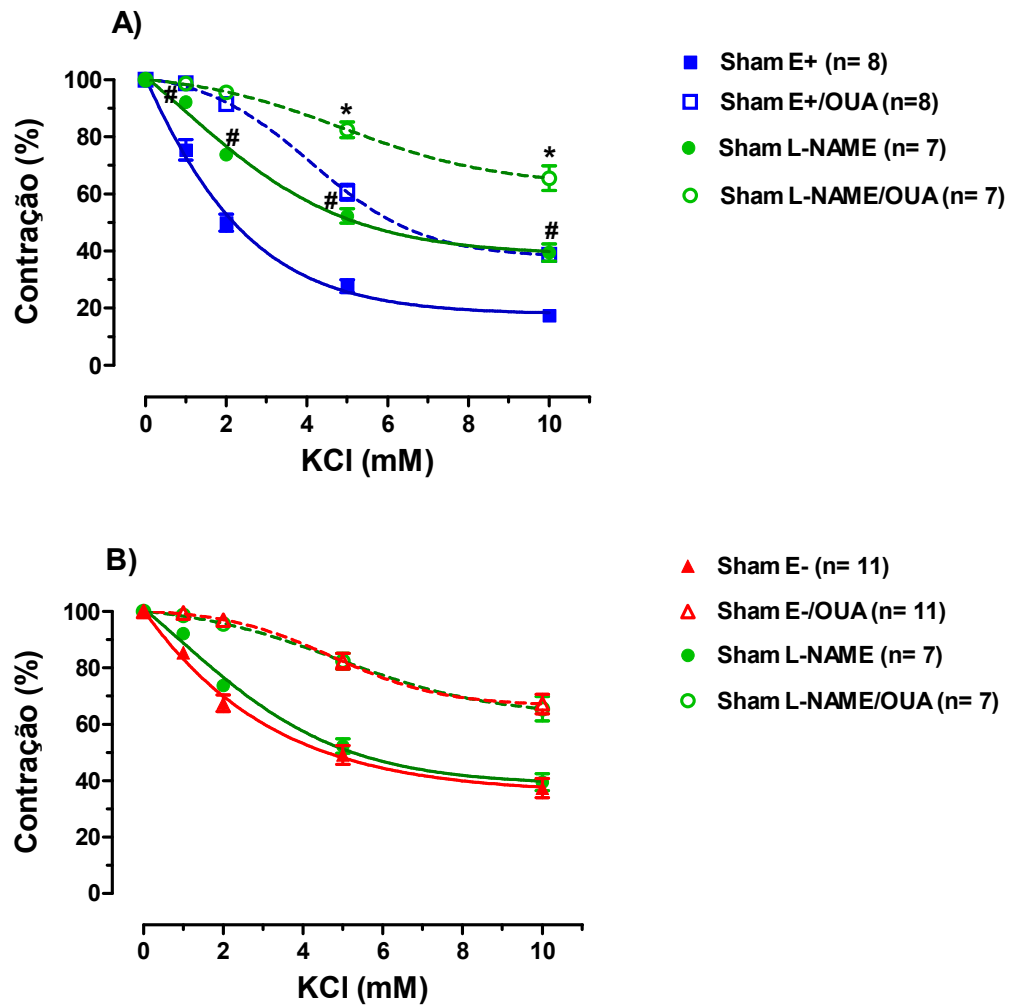
Quando os grupos Sham E+ e Sham L-NAME foram comparados (Figura 12 A), os resultados demonstraram que a inibição da NOS, através da incubação com L-NAME, diminuiu o relaxamento induzido pelo KCl (<sup>#</sup>P < 0,05, nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 mM de KCl). Houve também um aumento significativo da capacidade da OUA de inibir o relaxamento induzido pelo KCl (\*P < 0,001, nas concentrações de 5 e 10 mM de KCl) (Figura 12 A).

Comparando-se o grupo Sham L-NAME com o grupo Sham E- (Figura 12 B), demonstrou-se que não houve diferença significativa no relaxamento induzido pelo KCl, entre os grupos. Nenhuma diferença estatística foi observada também em relação à capacidade da ouabaína em inibir o relaxamento induzido pelo KCl entre os grupos Sham L-NAME e Sham E-.



**Figura 11:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica de ratas Sham L-NAME. Anéis com endotélio intacto (E+), incubados por 30 minutos com L-NAME (100  $\mu$ M). Sham L-NAME, antes (linha contínua, círculo cheio, verde); e Sham L-NAME/OUA, após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos (linha pontilhada, círculo vazio, verde). Resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

\* $P < 0,05$ , Sham L-NAME/OUA vs. Sham L-NAME.



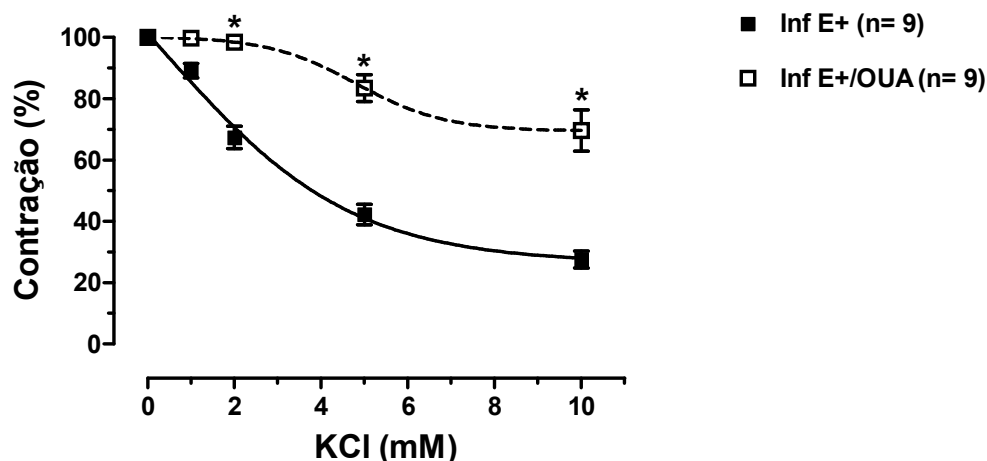
**Figura 12:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica de ratas Sham, 30 dias após o infarto. **A)** Comparação entre os grupos Sham com endotélio intacto (E+) (antes - linha contínua, quadrado cheio, azul; e após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos - linha pontilhada, quadrado vazio, azul) com o Sham L-NAME (antes - linha contínua, círculo cheio, verde e após a incubação com OUA - linha pontilhada, círculo vazio, verde); **B)** Comparação entre os grupos Sham E- (antes - linha contínua, triângulo cheio, vermelho; e após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos - linha pontilhada, triângulo vazio, vermelho), com o grupo Sham L-NAME. Resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

#P < 0,05, Sham L-NAME vs. Sham E+;

\*P < 0,05, Sham L-NAME/OUA vs. Sham E+/OUA.

### 6.2.2 Estudo da atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína em aortas de ratas infartadas

Como demonstrado na figura 13, houve relaxamento induzido por concentrações crescentes de KCl (2, 5, 10 mM), nos anéis de aorta com endotélio intacto (E+) de ratas 30 dias após o infarto. Porém, quando OUA (10<sup>-4</sup> M) foi adicionada ao banho e incubada por 30 minutos, houve uma redução, estatisticamente significativa, no relaxamento ocasionado pela adição de KCl (\*P< 0,05, nas concentrações 2, 5 e 10 mM).



**Figura 13:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica com endotélio intacto (E+) provenientes de ratas Infartadas, sem sinais de insuficiência cardíaca (Inf), 30 dias após o infarto. Inf E+, antes (linha contínua, quadrado cheio, preto); e, Inf E+/OUA, após a incubação com OUA (10<sup>-4</sup> M) durante 30 minutos (linha pontilhada, quadrado vazio, preto). Resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. Resultados expressos como média ± EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

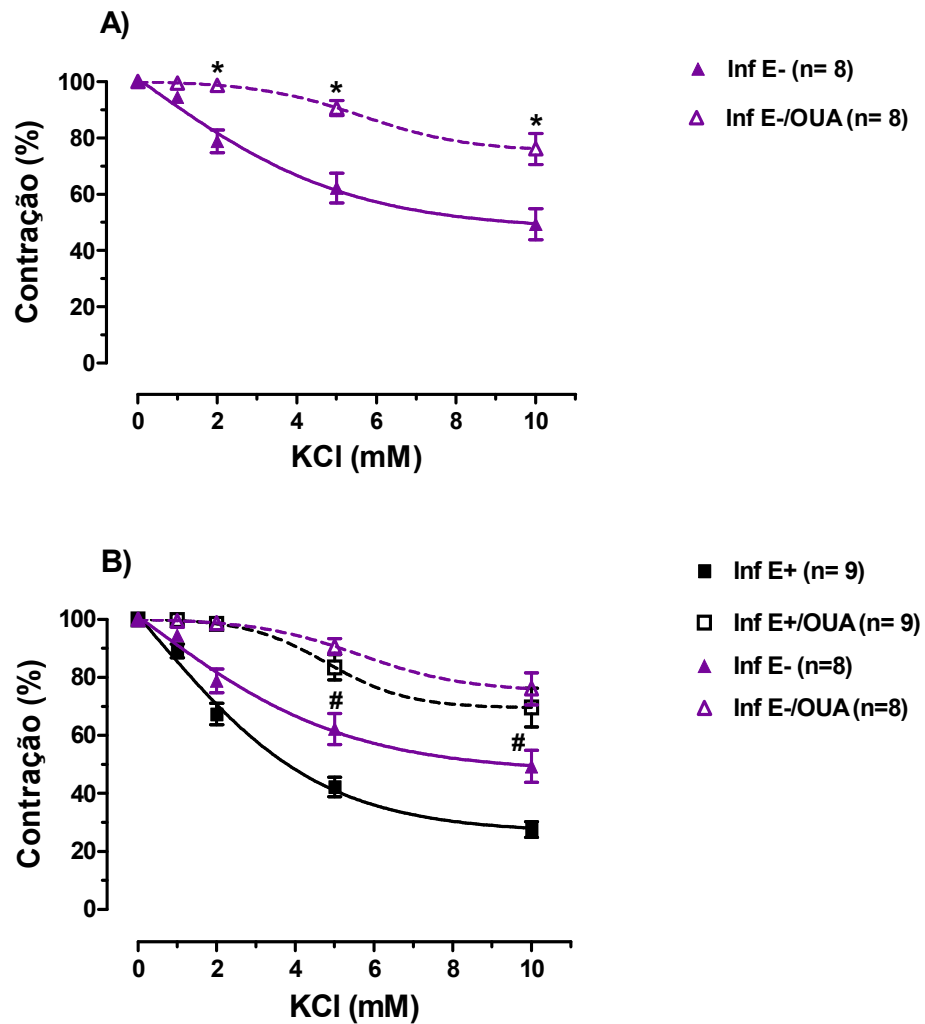
\*P< 0,05, Inf E+/OUA vs. Inf E+.



### **6.2.2.1 Modulação do endotélio sobre a atividade funcional da $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína em aortas de ratas infartadas**

Nos anéis de aorta provenientes das ratas infartadas, sem sinais de insuficiência cardíaca, nos quais foi realizada a remoção mecânica do endotélio (E-), o relaxamento, induzido pelo KCl, pôde ser observado (Figura 14 A). Além disso, a adição de OUA ao banho foi capaz de inibir o relaxamento induzido pelo KCl (\*P< 0.05, nas concentrações 2, 5 e 10 mM).

A comparação entre os grupos Inf E+ e Inf E- (Figura 14 B) demonstrou que o relaxamento induzido pelo KCl, diminuiu com a remoção do endotélio (<sup>#</sup>P< 0,05, nas concentrações de 5 e 10 mM de KCl). Porém, a capacidade da ouabaína de inibir o relaxamento induzido pelo KCl não foi alterada pela remoção do endotélio nestes animais.



**Figura 14:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica sem endotélio (E-) de ratas Infartadas, sem sinais de insuficiência cardíaca (Inf), 30 dias após o infarto e comparação entre Inf E- e Inf endotélio intacto (E+) **A)** Curva de relaxamento nos anéis Inf E-, antes (linha contínua, triângulo cheio, cor roxa); e Inf E-/OUA, após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos (linha pontilhada, triângulo vazio, cor roxa); **B)** Comparação entre os grupos Inf E+ (antes - linha contínua, quadrado cheio, preto; e Inf E+/OUA, após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos- linha pontilhada, quadrado vazio, preto) e o grupo Inf E-. O relaxamento ao KCl foi expresso como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

\* $P < 0,05$ , Inf E-/OUA vs. Inf E-;

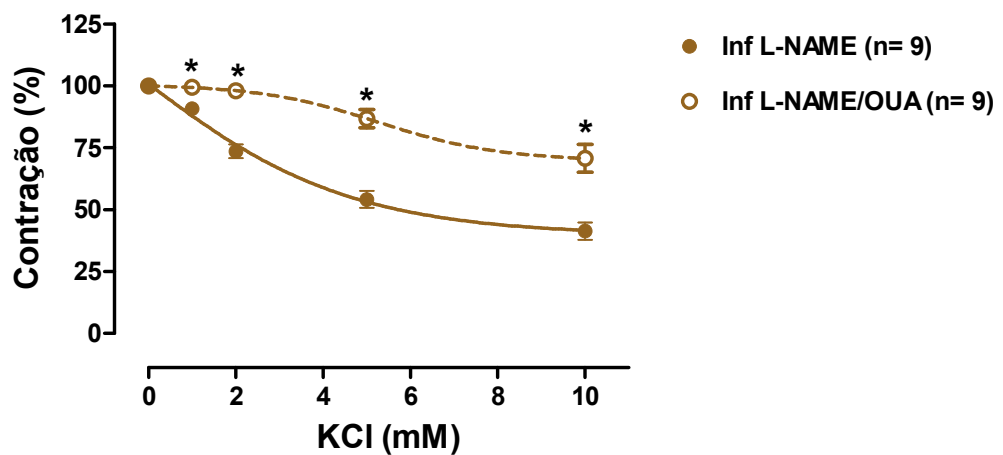
# $P < 0,05$ , Inf E- vs. Inf E+.

### **6.2.2.2 Participação do NO na modulação endotelial sobre a atividade funcional da $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína em aortas de ratas infartadas**

Como demonstrado na Figura 15, os anéis de aorta das ratas infartadas, que não apresentaram sinais de insuficiência cardíaca, os quais foram incubados por 30 minutos com L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), apresentaram relaxamento, induzido pelo KCl. Porém, este relaxamento foi reduzido na presença da ouabaína (\* $P < 0,05$ , nas concentrações 1, 2, 5 e 10 mM de KCl).

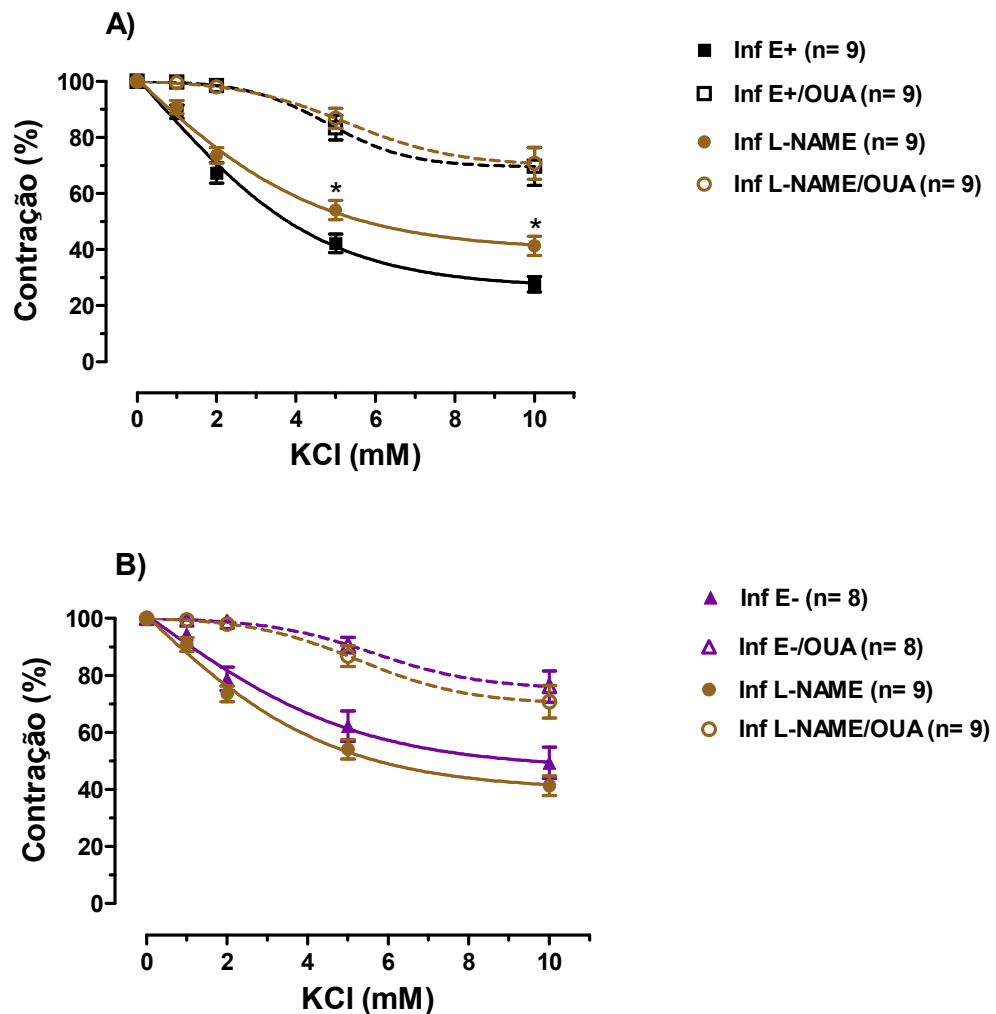
Ao comparar os grupos Inf E+ e Inf L-NAME (Figura 16 A), os resultados demonstraram que a adição de L-NAME ao banho, diminuiu o relaxamento induzido pelo KCl (\* $P < 0,05$ , na concentração de 5 e 10 de KCl). Entretanto, nestes grupos, observou-se que o L-NAME não foi capaz de alterar a capacidade da OUA de inibir o relaxamento induzido pelo KCl ( $P > 0,05$ ).

Relacionando o grupo Inf L-NAME com o Inf E-, tanto o relaxamento induzido pelo KCl, quanto à capacidade da OUA de inibir este relaxamento, não foram estatisticamente diferentes (Figura 16 B).



**Figura 15:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica de ratas Inf, 30 dias após o infarto. Anéis com endotélio intacto (E+), incubados por 30 minutos com L-NAME (100  $\mu$ M). Inf L-NAME, antes (linha contínua, círculo cheio, marron); e Inf L-NAME/OUA, após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos (linha pontilhada, círculo vazio, marron). Resposta de relaxamento ao KCl expressa como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

\* $P < 0,05$ , Inf L-NAME/OUA vs. Inf L-NAME.

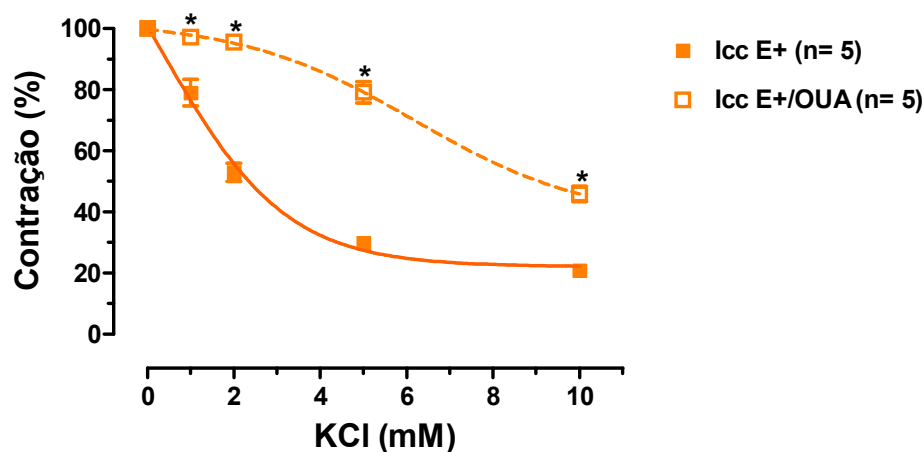


**Figura 16:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica de ratas Inf, 30 dias após o infarto. **A)** Comparação entre os grupos Inf com endotélio intacto (E+) (antes -linha contínua, quadrado cheio, preto; e Inf E+/OUA, após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos -linha pontilhada, quadrado vazio, preto) e Inf L-NAME (antes - linha contínua, círculo cheio, marron; e Inf L-NAME/OUA após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos - linha pontilhada, círculo vazio, marron); **B)** Comparação entre os grupos Inf com endotélio removido mecanicamente (E-) (antes - linha contínua, triângulo cheio, cor roxa; e Inf E-/OUA, após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos - linha pontilhada, triângulo vazio, cor roxa) e Inf L-NAME. Resposta de relaxamento ao KCl expressa como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

\*P< 0,05, Inf L-NAME vs. Inf E+ .

### 6.2.3 Estudo da atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína em aortas de ratas infartadas que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca

Nos anéis de aorta, com endotélio intacto, proveniente das ratas infartadas que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca, 30 dias após o infarto, observou-se que o relaxamento induzido pelo potássio estava presente e que a adição da ouabaína ao banho, era capaz de reduzi-lo (Figura 17).



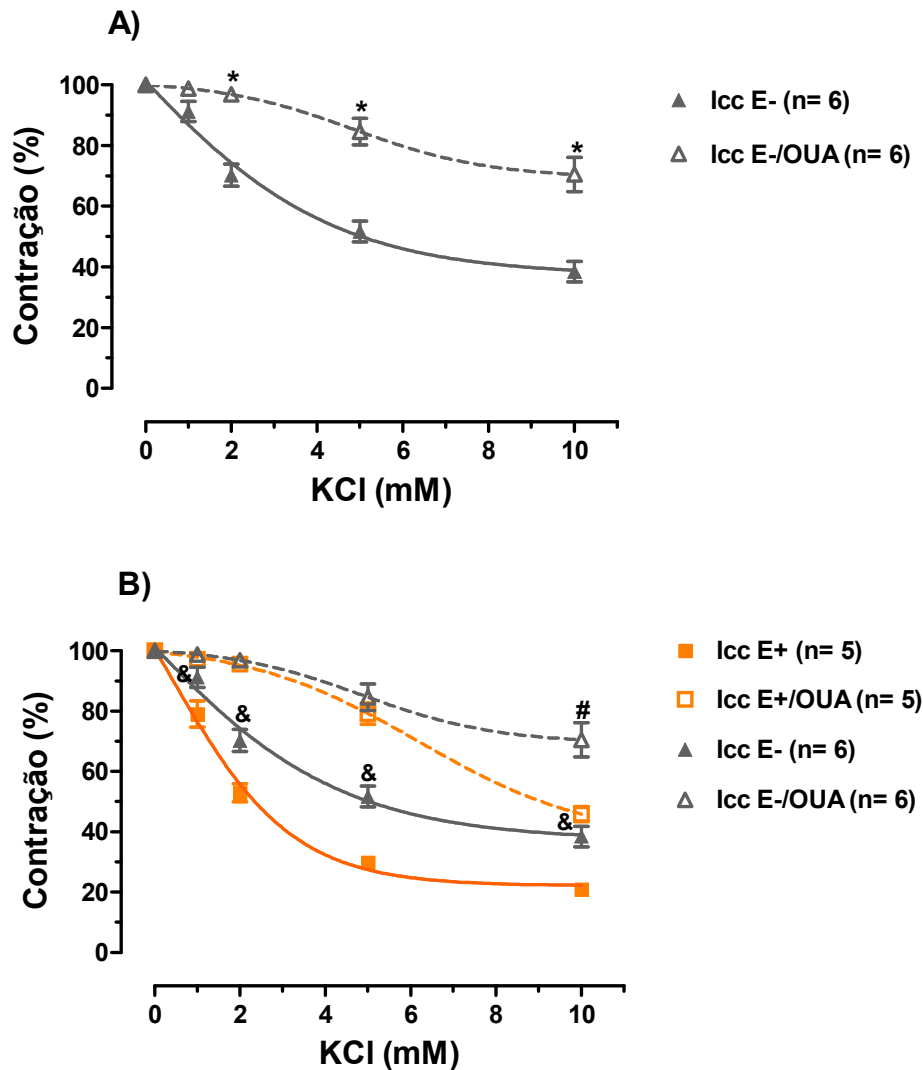
**Figura 17:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica com endotélio intacto (E+), de ratas Infartadas que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca (Icc), 30 dias após o infarto (Icc). Icc E+ , antes (linha contínua, quadrado cheio, laranja), e Icc E+/OUA, após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos (linha pontilhada, quadrado vazio, laranja). Resposta de relaxamento ao KCl expressa como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

\* $P < 0,05$ , Icc E+/OUA vs. Icc E+.

### **6.2.3.1 Modulação do endotélio sobre a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína em aortas de ratas infartadas que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca**

Nos anéis das ratas Icc, nos quais, removeu-se o endotélio (Figura 18 A), foi demonstrado relaxamento induzido pelo KCl. Contudo, este relaxamento apresentou-se diminuído após 30 minutos da adição da OUA ao banho (\*P< 0,05, concentrações 2, 5 e 10 mM de KCl).

Quando o endotélio foi removido (Figura 18 B), constatou-se também que o relaxamento induzido pelo KCl diminuiu em relação aos anéis vasculares com endotélio íntegro (&P< 0,05, nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 mM de KCl). Porém, a capacidade da OUA de inibir a o relaxamento induzido pelo KCl aumentou nos anéis sem endotélio na concentração de 10 mM de KCl (#P< 0,05) (Figura 18 B).



**Figura 18:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratas Infartadas que desenvolveram sinais de insuficiência cardíaca (Icc), 30 dias após o infarto. **A)** Anéis com endotélio removido (E-) provenientes de animais Icc, antes (linha contínua, triângulo cheio, cinza) e após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos (linha pontilhada, triângulo vazio, cinza). **B)** Comparação entre os grupos Icc com endotélio intacto (E+) (antes - linha contínua, quadrado cheio, laranja; e após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos - linha pontilhada, quadrado vazio, laranja) e Icc E-. Relaxamento ao KCl expresso como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

\* $P < 0,05$ , Icc E-/OUA vs. Icc E-;

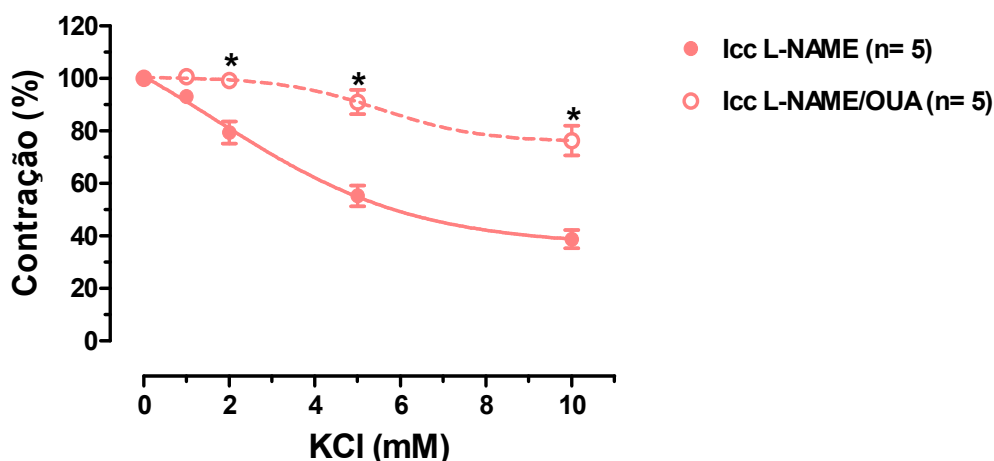
& $P < 0,05$ , Icc E-/OUA vs. Icc E+/OUA.

# $P < 0,05$ , Icc E+ vs. Icc E-.



### 6.2.3.2 Participação do NO na modulação da atividade funcional da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ sensível à ouabaína em aortas de ratas infartadas que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca

Os anéis de aorta provenientes das ratas Inf, que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca, que foram incubados por 30 minutos com L-NAME, apresentaram relaxamento, induzido pelo KCl (Figura 19). Este relaxamento estava diminuído na presença da OUA (\* $P < 0,05$ , nas concentrações 2, 5 e 10 mM de KCl).

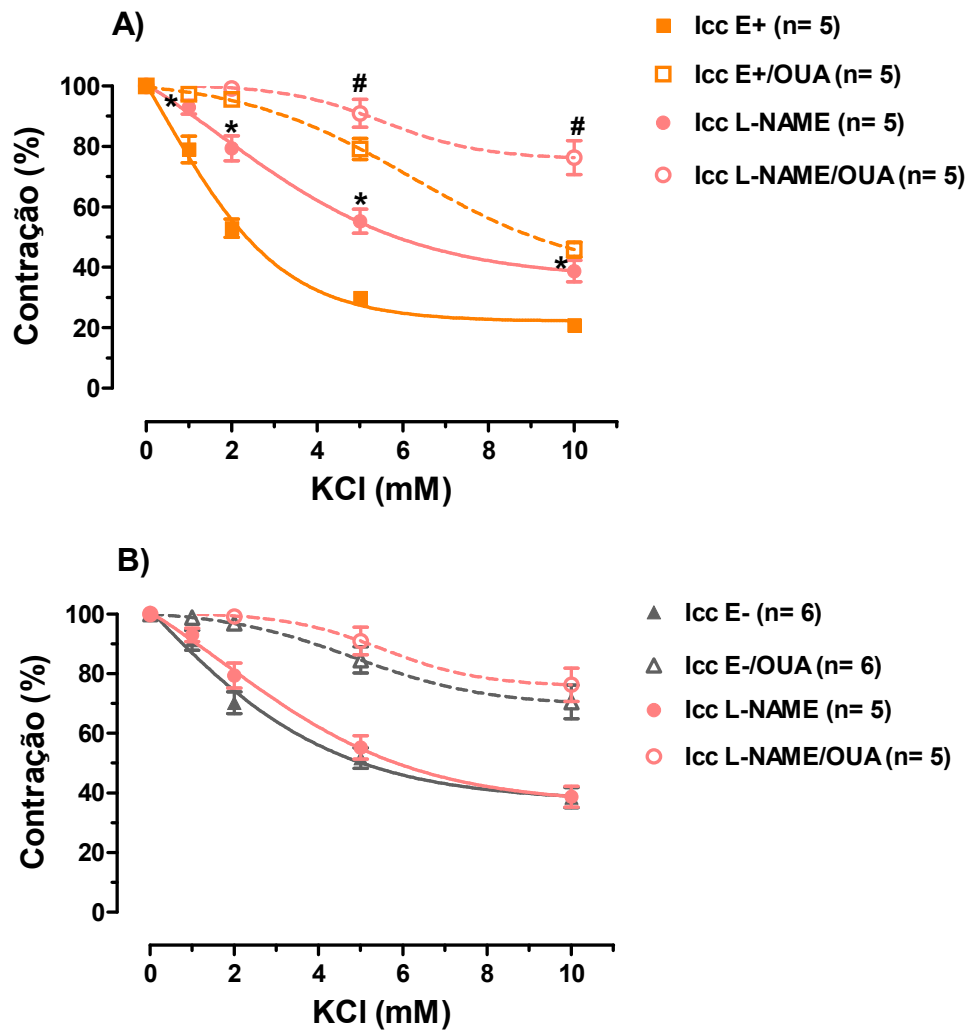


**Figura 19:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta torácica com endotélio intacto (E+) de ratas infartadas que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca (Icc), 30 dias após o infarto. Anéis E+, incubados por 30 minutos com L-NAME (100 $\mu\text{M}$ ). Icc L-NAME, antes (linha contínua, círculo cheio, rosa); e Icc L-NAME/OUA, após a incubação com OUA (10<sup>-4</sup> M) durante 30 minutos (linha pontilhada, círculo vazio, rosa). Resposta de relaxamento ao KCl expressa como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

\* $P < 0,05$ , Icc L-NAME/OUA vs. Icc L-NAME.

Quando os grupos lcc E+ e lcc L-NAME foram relacionados (Figura 20 A), demonstrou-se que a adição de L-NAME ao banho, diminuiu o relaxamento induzido pelo KCl (\*P< 0,05, concentrações de 1, 2, 5 e 10 mM de KCl). Além disso, observou-se que o L-NAME foi capaz de aumentar a capacidade da OUA em inibir o relaxamento induzido pelo KCl (#P< 0,05, nas concentrações de 5 e 10 mM de KCl) (Figura 20 A).

Relacionando o grupo lcc L-NAME com o lcc E- (Figura 20 B), tanto o relaxamento ao KCl, quanto à capacidade da OUA em inibir este relaxamento, não foram estatisticamente diferentes (P> 0,05).



**Figura 20:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratas Infartadas, com sinais de insuficiência cardíaca (Icc), 30 dias após o infarto. **A)** Comparação entre os grupos Icc com endotélio intacto (E+) (antes -linha contínua, quadrado cheio, laranja; e Icc E+/OUA, após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos - linha pontilhada, quadrado vazio, laranja) e Icc L-NAME (antes - linha contínua, círculo cheio, rosa; e Icc L-NAME/OUA após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos- linha pontilhada, círculo vazio, rosa); **B)** Comparação entre os grupos Icc com endotélio removido mecânicamente (E-) (antes - linha contínua, triângulo cheio, cinza; e Icc E-/OUA, após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos - linha pontilhada, triângulo vazio, cinza) e Icc L-NAME. Resposta de relaxamento ao KCl expressa como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

\* $P < 0,05$ , Icc L-NAME vs. Icc E+;

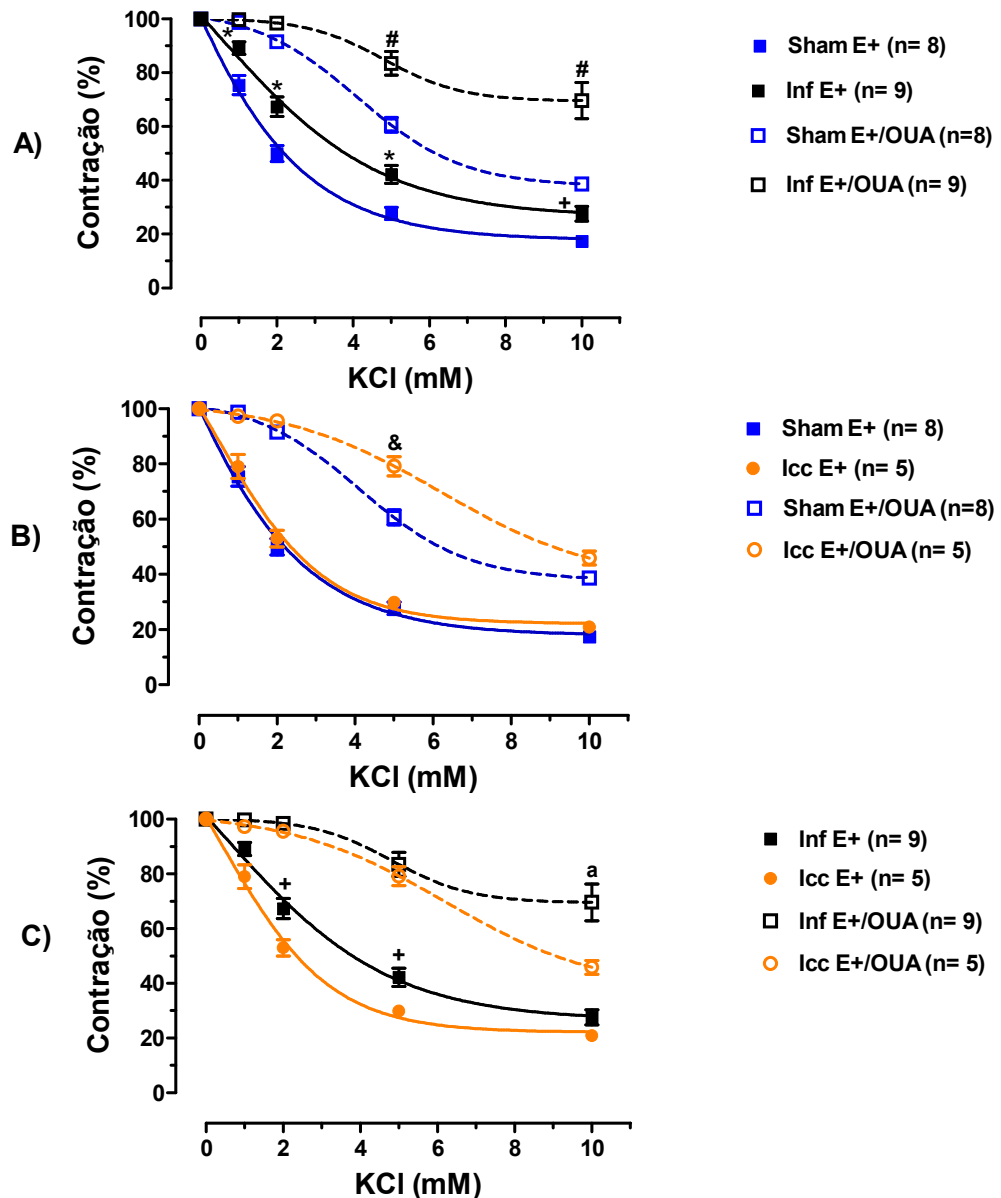
# $P < 0,05$ , Icc L-NAME/OUA vs. Icc E+/OUA.

#### **6.2.4 Comparação da atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína, em aortas com endotélio intacto, proveniente de ratas Sham, Inf e lcc**

Na figura 21 A, os anéis de aorta torácica dos animais infartados que não apresentaram sinais de insuficiência cardíaca, 30 dias após o infarto do miocárdio, demonstraram redução no relaxamento induzido pelo KCl (\*P< 0,05, nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 mM de KCl) e aumento da capacidade da ouabaína de inibir este relaxamento (#P< 0,05, concentrações 5 e 10 mM de KCl).

Comparando o grupo infartado, que apresentou sinais de insuficiência cardíaca, após o infarto do miocárdio, com o grupo cirurgia fictícia (Figura 21 B) observou-se que o relaxamento induzido pelo KCl não apresentou diferença significativa. Porém, a capacidade da ouabaína em inibir este relaxamento apresentou um aumento significativo no grupo lcc, na concentração de 5 mM de KCl (&P< 0,05) (Figura 21 B).

Como pode ser observado na figura 20 C, o grupo infartado que não apresentou sinais de insuficiência cardíaca, demonstrou um menor relaxamento induzido pelo KCl, quando comparado com o grupo lcc com endotélio íntegro (E+) (<sup>+</sup>P< 0,05, nas concentrações de 2 e 5 mM de KCl). Contudo, a capacidade da ouabaína de inibir o relaxamento ao KCl estava aumentada no grupo Inf, na concentração de 10 mM (<sup>a</sup>P< 0,05).



**Figura 21:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratas com endotélio íntegro (E+), 30 dias após o infarto. **A)** Grupo Sham E+ vs. Inf E+. **B)** Grupo Sham E+ vs. lcc E+. **C)** Grupo Inf E+ vs. lcc E+. Sham E+: antes - linha contínua, quadrado cheio, azul; e após a OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos - linha pontilhada, quadrado vazio, azul; Inf E+: antes - linha contínua, quadrado cheio, preto; e após a OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos - linha pontilhada, quadrado vazio, preto; lcc E+: antes - linha contínua, quadrado cheio, laranja; e após a OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos - linha pontilhada, quadrado vazio, laranja. Resposta de relaxamento ao KCl expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

\* $P < 0,05$  Inf E+ vs. Sham E+;

# $P < 0,05$ , Inf E+/OUA vs. Sham E+/OUA;

& $P < 0,05$  lcc E+/OUA vs. Sham E+/OUA;

+ $P < 0,05$  lcc E+ vs. Inf E+;

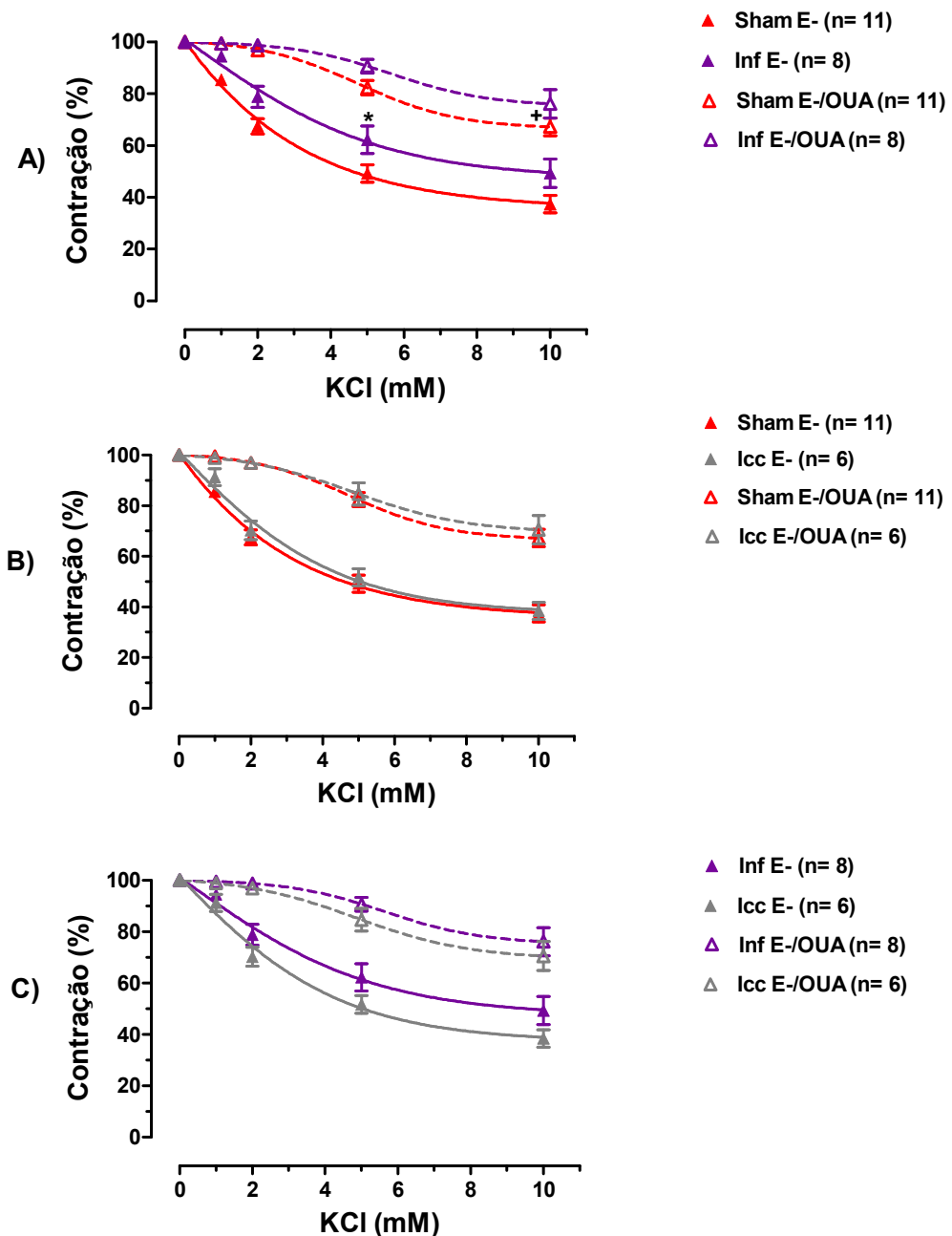
<sup>a</sup> $P < 0,05$  lcc E+/OUA vs. Inf E+/OUA.

### **6.2.5 Comparação da modulação do endotélio sobre a atividade funcional da $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína nos anéis de aorta provenientes dos grupos Sham, Inf e lcc**

Nos animais infartados que não apresentaram sinais de insuficiência cardíaca, 30 dias após o infarto do miocárdio, houve uma redução no relaxamento, induzido pelo KCl, nos anéis vasculares sem endotélio, (\* $P < 0,05$ , concentração de 5 mM de KCl), bem como, constatou-se um aumento da capacidade da ouabaína de inibir este relaxamento (<sup>+</sup> $P < 0,05$ , concentração 10 mM de KCl) (Figura 22 A).

Comparando o grupo lcc E- com o Sham E-, os resultados demonstraram que tanto o relaxamento induzido pelo KCl, quanto a capacidade da ouabaína de inibi-lo, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) (Figura 22 B).

Relacionando o grupo Inf E- com o grupo lcc E-, também não houve diferença estatisticamente significativa entre o relaxamento induzido pelo KCl e a capacidade da ouabaína de inibi-lo ( $P > 0,05$ ) (Figura 22 C).



**Figura 22:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratas sem endotélio (E-), 30 dias após o infarto. **A)** Grupo Sham E- vs. Inf E-. **B)** Grupo Sham E- vs. lcc E-. **C)** Grupo Inf E- vs. lcc E-. Sham E-: antes - linha contínua, triângulo cheio, vermelho; e após a OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos – linha pontilhada, triângulo vazio, vermelho; Inf E-: antes - linha contínua, triângulo cheio, cor roxa; e após a OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos – linha pontilhada, triângulo vazio, cor roxa; lcc E-: antes - linha contínua, triângulo cheio, cinza; e após a OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos – linha pontilhada, triângulo vazio, cinza. Resposta de relaxamento ao KCl expressa como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

\* $P < 0,05$  Inf E- vs. Sham E-;

<sup>†</sup> $P < 0,05$  Inf E-/OUA vs. Sham E-/OUA.

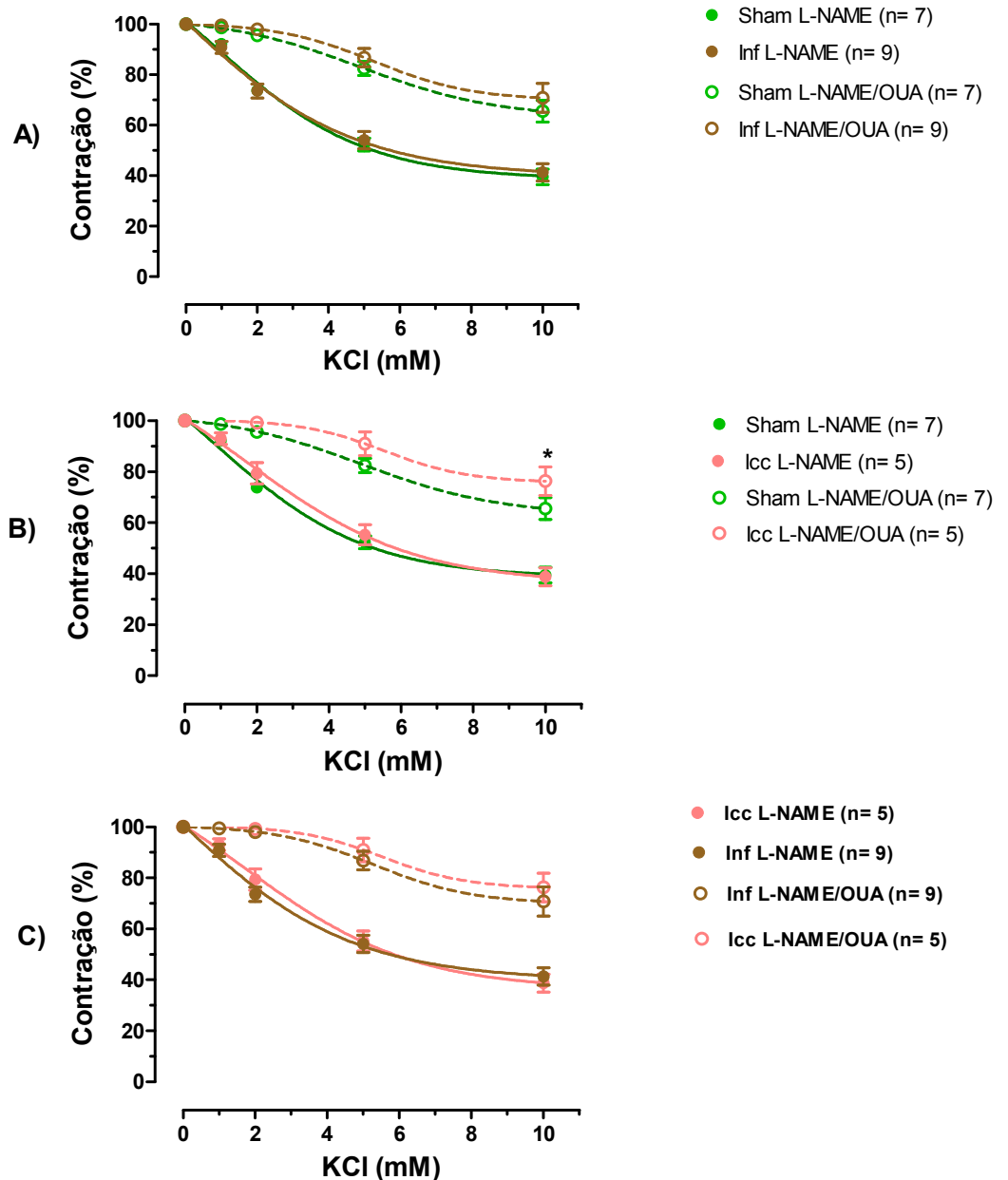
### **6.2.6 Diferença na participação do NO na modulação endotelial sobre a atividade funcional da $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína nos anéis de aorta provenientes dos grupos Sham, Inf e Icc**

Nos anéis de artéria aorta dos animais infartados que foram incubados com um inibidor da NOS, L-NAME, não foram verificadas diferenças no relaxamento induzido pelo KCl, quando os mesmos foram comparados com anéis de aorta do grupo Sham L-NAME. Também não houve diferença na capacidade da ouabaína de inibir o relaxamento induzido pelo KCl entre estes grupos ( $P > 0,05$ ) (Figura 23 A).

Comparando o grupo Icc L-NAME com o Sham L-NAME, os resultados demonstraram que o relaxamento induzido pelo KCl não estava alterado nas ratas que desenvolveram sinais de insuficiência cardíaca após o infarto. Contudo, a capacidade da ouabaína de inibir o relaxamento promovido pela adição de KCl aumentou significativamente no grupo Icc L-NAME, quando comparado com Sham L-NAME ( $*P < 0,05$ , concentração de 10 mM de KCl) (Figura 23 B).

Relacionando o grupo Inf L-NAME com o grupo Icc L-NAME, não foram verificadas diferenças significantes ( $P > 0,05$ ) (Figura 23 C).





**Figura 23:** Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta com endotélio intacto (E+), incubados com L-NAME, proveniente de ratas, 30 dias após o infarto. **A)** Grupo Sham L-NAME vs. Inf L-NAME. **B)** Grupo Sham L-NAME vs. lcc L-NAME. **C)** Grupo Inf L-NAME vs. lcc L-NAME. Sham L-NAME: antes - linha contínua, círculo cheio, verde; e após a OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos – linha pontilhada, círculo vazio, verde; Inf L-NAME: antes - linha contínua, círculo cheio, marron; e após a OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos – linha pontilhada, círculo vazio, marron; lcc L-NAME: antes - linha contínua, círculo cheio, rosa; e após a OUA ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos – linha pontilhada, círculo vazio, rosa. Resposta de relaxamento ao KCl expressa como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni.

\* $P < 0,05$ , lcc L-NAME/OUA vs. Sham L-NAME/OUA.

## 7. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína, em anéis de aorta de ratas após o infarto do miocárdio, com mesma área de cicatriz, com e sem sinais de insuficiência cardíaca. Assim, uma condição essencial para a realização deste trabalho foi a de que os corações dos animais infartados apresentassem a mesma área de infarto, como pode ser observado na tabela 1 e figura 8 E. Porém, mesmo com áreas de cicatriz semelhantes, alguns animais apresentaram sinais de insuficiência cardíaca, enquanto outros não.

Após o infarto, a perda do miocárdio na área em que se forma a cicatriz, resulta em um aumento abrupto da sobrecarga cardíaca que leva ao remodelamento da AI e do miocárdio remanescente. O miocárdio consiste em 3 componentes integrados: miócitos, matriz extracelular e a microcirculação capilar, que em conjunto, mantém a unidade contrátil. A necrose dos miócitos promove uma cascata de processos de sinalização bioquímica intracelular que inicia e modula as alterações reparativas, que incluem a dilatação, a hipertrofia e a formação de uma cicatriz de colágeno. O remodelamento ventricular pode durar de semanas e há meses, até que a força de distensão seja contrabalançada pela tensão da cicatriz. Então, o remodelamento depende do tamanho, posição, e da transmuralidade do infarto, além da patência da artéria coronária relacionada, dos fatores locais e do estresse de parede ventricular (Pfeffer & Braunwald, 1990; Sutton & Sharpe, 2000). A maioria dos trabalhos tem correlacionado a insuficiência cardíaca a episódios de infarto com grande área de cicatriz (Anversa *et al.*, 1985; Pfeffer *et al.*, 1991, Olivetti *et al.*, 1991). Porém, de acordo com o trabalho de Pfeffer *et al.* (1979), as áreas de infarto encontradas em nosso estudo classificam-se como moderadas (AI: 32,3 ± 1,5%), o que possibilitou a avaliação de um grupo mais homogêneo de animais infartados, desconsiderando aqueles com cicatriz muito pequena (menor que 30 %), ou muito grande (maior que 46 %). Através da observação macroscópica dos corações, pela técnica descrita por Mill *et al.* (1990) foi possível constatar AI semelhantes (Tabela 1, Figura 8E). Os animais infartados, com mesma área de cicatriz foram separados em dois subgrupos: os que apresentavam sinais de insuficiência cardíaca e os que não apresentavam. Para isso, foram utilizados dois

critérios de classificação. O primeiro, foi a razão entre o peso dos pulmões e o peso corporal dos animais lcc apresentar-se maior que a mesma razão dos animais Sham, mais duas vezes o desvio padrão ( $lcc = PP/PC_{lcc} > PP/PC_{Sham} + 2DP$ ) (Francis *et al.*, 2001; Davidoff *et al.*, 2004). E o segundo, foi à razão entre o ventrículo direito e o peso corporal apresentar-se maior que a mesma razão nos animais Sham, mais duas vezes o desvio padrão ( $ICC = VD/PC_{ICC} > VD/PC_{Sham} + 2DP$ ) (Davidoff *et al.*; 2004).

Portanto, decorridos 30 dias do INF, além da área da cicatriz, foram avaliados: peso corporal e as razões VE/PC, VD/PC e PP/PC (Tabela 1, Figura 8). Após o INF, a hipertrofia é quantitativa e qualitativamente diferente no VD e no VE. A hipertrofia do VD está associada com o aumento no diâmetro dos miócitos (hipertrofia concêntrica) e no VE há um aumento no diâmetro, e no comprimento dos miócitos, culminando em hipertrofia concêntrica e excêntrica, respectivamente (Anversa *et al.*, 1985). A característica da hipertrofia a ser desenvolvida dependerá do tipo de estresse inicial na parede do ventrículo (Grossman *et al.*, 1975).

Contudo, quando a razão entre o peso do VE e o peso corporal foi avaliada, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, semelhante aos resultados encontrados nos trabalhos de Vargas *et al.* (2004), Pereira *et al.* (2005), Bianchi *et al.* (2006), Fernandes (2006) e Gilbert *et al.* 2007. O aumento da razão do VE/PC é um indicativo indireto de hipertrofia, porém, a técnica de avaliação utilizada neste trabalho, pode não detectar a existência de hipertrofia no tecido remanescente, visto que o cálculo da razão VE/PC é realizado utilizando o peso total VE. O aumento do peso do VE remanescente é compensado pela redução do peso da cicatriz, justificando a inalteração desta razão, apesar de existir hipertrofia do VE remanescente ao INF (Mill *et al.*, 1990).

Ao avaliar a razão VD/PC, constatou-se que no grupo lcc houve um aumento da mesma, em relação aos demais grupos estudados. Este resultado também foi encontrado no trabalho de Pereira *et al.* (2005). Após o INF, à sobrecarga pressórica imposta a câmara cardíaca direita e a hipertrofia concêntrica do VD são amplamente descritas e estão correlacionadas com os resultados do presente estudo. A hipertrofia do VD pode ser desencadeada pelas alterações hemodinâmicas iniciadas no VE (Anversa *et al.*, 1986; Pfeffer *et al.*, 1995), por fatores de ativação humoral

(Nahrendorf *et al.*, 2003) e pela congestão pulmonar que se instala na ICC (Jasmin *et al.*, 2004).

A observação dos dados do peso pulmonar corrigido pelo peso corporal demonstrou que no grupo lcc esta razão foi maior que a mesma razão dos animais Sham, mais duas vezes o desvio padrão. Além disso, houve uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo lcc e o grupo Inf. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados nos trabalhos de Francis *et al.* (2001), Pereira *et al.* (2005), Bianchi *et al.* (2006), Fernandes (2006) e Giubert *et al.* (2007). Estes pesquisadores demonstraram que a razão entre o peso pulmonar e o peso corporal dos animais lcc era maior que a mesma razão nos animais Sham, e também utilizaram este resultado como um critério para classificar os animais com insuficiência cardíaca. A razão PP/PC pode evidenciar hipertensão pulmonar, que é considerada como uma complicação secundária a ICC (Butler *et al.*, 1999; Francis *et al.*, 2001). Ela provavelmente está aumentada devido à congestão pulmonar e ao edema decorrente da ICC. A pressão aumentada nas veias pulmonares é transmitida de modo retrógrado aos capilares e artérias o que resulta no remodelamento do parênquima pulmonar. O remodelamento pulmonar, causando aumento de peso dos pulmões, deve-se à deposição de colágeno e reticulina, o que promove o enrijecimento do septo alveolar (Jasmin *et al.*, 2004).

Em relação ao peso corporal, não houve, diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Fundamentando este resultado, vários estudos apresentam peso corporal entre grupos Sham, Inf e lcc semelhantes até 16 semanas após o INF (Francis *et al.*, 2001; Nahrendorf *et al.*, 2003).

No presente estudo, 18 ratas, sofreram a oclusão cirúrgica da artéria coronária esquerda, das quais 7 (39%) desenvolveram sinais de ICC, 30 dias após o INF. Em trabalho realizado por Pereira *et al.* (2005), semelhante porcentagem de desenvolvimento de sinais de ICC, em animais infartados, foi observada. Segundo Francis *et al.* (2001), este modelo de INF, através da ligação da artéria coronária descendente anterior esquerda, simula a causa mais comum de ICC em humanos e permite avaliar o momento preciso do início das mudanças no sistema neuro-humoral e da função do VE, durante a progressão da ICC.

Fernandes (2006) demonstrou como resultados do seu trabalho que os animais infartados com sinais de ICC apresentaram redução da resposta inotrópica no VD e VE. Porém, os animais que não apresentaram ICC só tinham prejuízo

contrátil do VE, e preservavam a contratilidade do VD. Giuberti *et al.* (2007) também verificaram diferenças entre os animais Inf e Icc, quando avaliaram músculo papilar de ratas. Segundo este estudo, na presença de isoproterenol e cálcio, a força isométrica dos papilares estava reduzida nos grupos Icc. Estes dados contribuem para explicar que existem diferenças na contratilidade cardíaca entre animais com mesma área de infarto que apresentaram ou não sinais de ICC.

Quando as diferenças na resposta vascular em ratos que desenvolveram ou não sinais de ICC foram avaliadas por Pereira *et al.* (2005), esses autores encontraram uma hiporreatividade a fenilefrina em artéria caudal de animais Icc quando comparada ao Sham. Esta foi atribuída a um aumento da biodisponibilidade de NO, pois era acompanhada de um aumento do relaxamento dependente do endotélio. Nos animais Inf sem sinais de ICC demonstrou-se aumento da contração induzida pela fenilefrina, paralelo a diminuição do relaxamento dependente do endotélio. Quando o endotélio dos animais Inf foi removido, as diferenças entre os grupos eram atenuadas, sugerindo uma disfunção endotelial após o INF e a participação de algum fator originado do MLV nesta resposta. Em outro estudo realizado por Bianchi *et al.* (2006), também houve um aumento da reatividade a fenilefrina em anéis de aorta de ratas com Inf. Segundo os autores, este aumento da contração induzida pela fenilefrina, provavelmente devia-se a diminuição da biodisponibilidade de NO, mas não podia ser relacionado ao aumento dos prostanoídes vasoconstritores.

Em humanos com INF e ICC, estudos realizados com diferentes vasos demonstram redução do relaxamento dependente do endotélio (Belardinelli, 2001; Annuk *et al.*, 2003; Linke *et al.*, 2003). Outros trabalhos com diferentes vasos de ratos mostraram redução e até mesmo preservação do relaxamento dependente do endotélio em diferentes estágios do INF (Teerlink *et al.*, 1993; Baggia *et al.*, 1997; Bauersachs *et al.*, 1999; Indik *et al.*, 2001). Teerlink *et al.* (1993) verificaram, em anéis de aorta de ratos 1, 4 e 16 semanas após o INF, um relaxamento induzido pelo NP semelhante. Porém, o relaxamento induzido pela ACh apresentou-se prejudicado após a 4<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup> semanas. Enquanto, Takahashi *et al.* (2005) encontraram uma redução no relaxamento induzido pela ACh quando avaliaram diferentes vasos de resistência com o mesmo diâmetro, no estágio inicial da ICC. No trabalho de Baggia *et al.* (1997) o relaxamento induzido pela ACh estava alterado

nos anéis de aorta abdominal e mesentérica, porém mostrou-se diminuído em artéria pulmonar de ratos com ICC.

Assim, para avaliar os mecanismos de relaxamento dependentes do endotélio, deve-se considerar: espécie utilizada para estudo; leito vascular (Hirooka *et al.*, 1994; Baggia *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 2005); diâmetro do vaso (Mohri *et al.*, 1997); estágio de desenvolvimento da ICC (Takahashi *et al.*, 2005); apresentação, ou não, de sinais de ICC após o INF (Pereira *et al.*, 2005).

Em relação ao relaxamento independente do endotélio, induzido pelo NP, a maior parte dos estudos indicam que não há alteração entre os grupos Sham, Inf e Icc (Teerlink *et al.*, 1993; Nasa *et al.*, 1996; Pereira *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2005). Isto sugere que esta função vasodilatadora muscular dependente da ativação do GMPc permanece preservada, mesmo nos estágios mais avançados da ICC (Takahashi *et al.*, 2005). Porém, outros trabalhos contradizem estes resultados e demonstram uma diminuição da sensibilidade do MLV ao GMPc e redução da sensibilidade da guanilato ciclase ao NO (Katz *et al.*, 1992).

Vários mecanismos podem estar envolvidos na anormalidade do relaxamento dependente do endotélio no modelo de ICC: 1) Redução da liberação ou aumento da degradação de NO (Drexler *et al.*, 1994; Bauersachs *et al.*, 1999; Indik *et al.*, 2001); 2) Redução da expressão da eNOS (Comini *et al.*, 1996; Schafer *et al.*, 2004); 3) Aumento da liberação de substâncias vasoconstritoras (Kubo *et al.*, 1991; Katz *et al.*, 1993); 4) Dessensibilização da guanilato ciclase ao NO (Katz *et al.*, 1992); e, 5) Diminuição da sensibilidade do MLV ao GMPc (Katz *et al.*, 1992).

O NO é um fator endotelial que estimula a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Gupta *et al.*, 1996; Vrbjar *et al.*, 1999; Rossoni *et al.*, 2003; Dos Santos *et al.*, 2003). Vários estudos sobre doenças que cursam com disfunção endotelial e modificação da biodisponibilidade de NO têm correlacionado a alteração do relaxamento vascular, com a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase.

O diabetes, por exemplo, é uma doença caracterizada por hiperglicemia (Ozturk *et al.*, 1996) e que pode estar associado a HAS (Davel *et al.*, 2000). A insulina é capaz de modular a reatividade vascular, induzindo vasodilatação (Zemel *et al.*, 1992; Ozturk *et al.*, 1996), sendo que este efeito parece estar parcialmente relacionado à ativação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Ewart & Klip, 1995; Gupta *et al.*, 1996; Tack *et al.*, 1996). Chen *et al.* 1993 relataram que a diminuição da insulina no diabetes poderia levar a um aumento da concentração plasmática de OUA. Como a

OUA é um inibidor da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, alterações na concentração iônica do meio intracelular e conseqüentemente do tônus vascular poderiam ocorrer (Hamlyn *et al.*, 1982). A redução da insulina também é descrita sendo capaz de induzir a uma diminuição da expressão protéica da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase (Ver *et al.*, 1997). Portanto, a diminuição da insulina pode estar associada com o aumento da OUA e a redução da atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase no MLV (Gupta *et al.*, 1996; Tack *et al.*, 1996), bem como pode estar envolvida em mecanismos que modulam a reatividade vascular e a pressão arterial. Segundo estudo de Davel *et al.* (2000) ratos com diabetes, induzido por streptozotocina, apresentaram uma redução no relaxamento induzido pela ACh em artéria caudal e uma diminuição da atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Os pesquisadores sugeriram que estes resultados seriam provenientes da redução da insulina e da diminuição da biodisponibilidade de NO nos animais diabéticos.

Uma alteração no relaxamento vascular dependente do endotélio também tem sido descrita em diferentes ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e em humanos com hipertensão arterial (Marín & Rodríguez-Martínez, 1995). Em artéria mesentérica e cerebral de SHR há um aumento do EDHF e do NO via iNOS, eNOS, nNOS, que pode participar dos mecanismos compensatórios na HA nestes animais (Nava *et al.*, 1995; Boulanger *et al.*, 1998 Briones *et al.*, 1999; Briones *et al.*, 2000). Além disso, os elevados níveis da pressão arterial podem estar associados a alterações na modulação do endotélio a respostas de vasoconstritores, incluindo a resposta  $\alpha$ -adrenérgica (Dohi *et al.*, 1996).

Outra importante consideração é que vários trabalhos demonstram uma concentração plasmática de ouabaína aumentada em modelos de hipertensão em ratos e também, na hipertensão primária em humanos (Overbeck *et al.*, 1976; Hamlyn *et al.*, 1982; Hamlyn *et al.*, 1996; Schoner & Scheiner-Bobis, 2007). A ouabaína parece contribuir para a regulação da pressão arterial e está associada ao desenvolvimento e manutenção da mesma, através de mecanismos de ação central e periférica (Blaustein, 1993). Em 2001, Rossoni *et al.* verificaram aumento da resposta pressora em animais hipertensos DOCA-sal quando doses extremamente baixas de OUA foram administradas (0,18  $\mu$ g/Kg). Em 2002, Rossoni *et al.* demonstraram que o tratamento crônico com OUA induzia a hipertensão, e este modelo estava associado: 1) a diminuição da contração induzida pela fenilefrina em aorta de ratos; 2) aumento da modulação endotelial negativa sobre a ação da fenilefrina; 3) aumento da expressão da eNOS e nNOS. Estes pesquisadores

supõem que a diminuição da contração induzida pela fenilefrina pode estar relacionada ao aumento da produção e liberação de NO e EDHF. O aumento do NO, pode então, estimular a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase e a hiperpolarização via canais para potássio dependentes de  $\text{Ca}^{+2}$ , contrapondo-se aos efeitos contráteis da fenilefrina em aortas de animais tratados cronicamente com OUA. Nesse mesmo estudo, Rossoni *et al.* (2002) avaliaram se o tratamento crônico com OUA em Wistar induzia hipertensão; se ele estava associado a mudanças na reatividade vascular à fenilefrina e a ACh e se a atividade e a expressão da bomba de  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase estava alterada em artéria aorta, mesentérica e caudal. Os resultados encontrados demonstraram a presença de hipertensão induzida pelo tratamento com OUA, um inalterado relaxamento induzido pela ACh em todos os vasos, uma diminuição da resposta contrátil a fenilefrina na aorta, um aumento da expressão das isoformas  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2, bem como da atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase na aorta.

Portanto, fica clara a existência da relação entre reatividade vascular e atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase. Porém, nenhum estudo, até o presente momento, avaliou a participação desta proteína nas alterações da reatividade vascular que ocorrem pós-infarto do miocárdio e na progressão da ICC. Mesmo sendo amplamente conhecido que estas doenças apresentam-se com alterações capazes de influenciar a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, como modificação da homeostase de sal e água (Rose & Valdes, 1994), aumento na concentração plasmática de ouabaína (Gottlieb *et al.*, 1992), angiotensina II (Xavier *et al.*, 2004b; Isenovic *et al.*, 2004), aldosterona (Alzamora *et al.*, 2003), endotelina (Gupta *et al.*, 1991), AVP (Mujais *et al.*, 1992) e espécies reativas de oxigênio (Kourie, 1998), além de diminuição da produção de NO, e da resposta do MLV aos fatores vasodilatadores (Drexler, 1998; Teerlink *et al.*, 1993; Bauersachs *et al.*, 1999; Behrendt & Ganz, 2002; Indik *et al.*, 2001).

Assim, o objetivo pioneiro deste trabalho foi estudar a atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína em anéis de aorta de ratas após o infarto do miocárdio, com mesma área de cicatriz, com e sem sinais de insuficiência cardíaca.

Para isso, foi utilizada a técnica descrita por Webb & Bohr (1978) que avalia a atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível a OUA. Estes pesquisadores propuseram que o relaxamento do MLV, devido à estimulação da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, era resultante do aumento do transporte eletrogênico de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ,



em um meio livre de potássio, que gerava hiperpolarização das células musculares lisas. Portanto, a adição de KCl (1, 2, 5 e 10 mM) ao banho induz ao relaxamento e é capaz de reverter, quase completamente, a contração induzida pela fenilefrina em um banho com solução livre de  $K^+$ . Sabendo que a ouabaína é um potente inibidor da  $Na^+K^+$ -ATPase (Blaustein, 1993), uma outra curva de relaxamento induzido pelo KCl era realizada, após a incubação com OUA ( $10^{-4}$  M) por 30 minutos.

Assim, quando anéis de aorta dos animais Sham, 30 dias após a cirurgia fictícia de indução ao INF, foram avaliados, verificou-se que a remoção do endotélio diminuiu o relaxamento vascular induzido pelo KCl. Além disso, houve um aumento significativo da capacidade da OUA de inibir o relaxamento induzido pelo KCl (Figura 10).

Resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho foram descritos por Marin & Rodríguez-Martínez (1995) e Marin & Redondo (1999). Rossoni *et al.* (2002) também verificaram em anéis de artéria caudal, mesentérica e aorta, que a remoção do endotélio foi capaz de diminuir o relaxamento induzido pelo KCl em todos os vasos. Além disso, a capacidade OUA de inibir o relaxamento induzido pelo KCl também estava aumentada.

Já no fim da década de 80, Feletou & Vanhoutte (2002) propuseram que o EDHF poderia participar do processo de ativação da  $Na^+K^+$ -ATPase em anéis de coronária. Além disso, em 1992, Lee *et al.* afirmavam que a  $Na^+K^+$ -ATPase participava do relaxamento vascular dependente do endotélio, induzido pela ACh. Em 2004, Palacios *et al.* estudaram o efeito da ACh sobre a atividade funcional da  $Na^+K^+$ -ATPase em anéis de aorta de ratas e verificaram que a incubação dos anéis vasculares com solução contendo ACh, aumentava significativamente a atividade da  $Na^+K^+$ -ATPase. Porém, quando o endotélio era removido, a resposta de relaxamento do MLV apresentava-se diminuída, sugerindo a direta influência de um fator endotelial sobre a atividade da  $Na^+K^+$ -ATPase.

Vários trabalhos demonstram a existência de fatores endoteliais capazes de modular a atividade da  $Na^+K^+$ -ATPase e parcialmente, reduzir os efeitos da ouabaína sobre a mesma (Lee *et al.*, 1992; Marin & Redondo, 1999; Vavilova *et al.*, 2000). Os fatores derivados do endotélio, como por exemplo, NO (Rapoport *et al.*, 1985), endotelina-1 (Gupta *et al.*, 1991), angiotensina II (Isenovic *et al.*, 2004) e

prostaglandinas (Lockette *et al.*, 1980) são amplamente descritos na literatura por influenciar a atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase.

O NO liberado pelo endotélio ou gerado pelo metabolismo dos nitrovasodilatadores, como o NP e a nitroglicerina, causa relaxamento, crescimento e hiperpolarização do MLV (Furchgott & Zawadzki, 1980). Ele é descrito como um fator estimulador da atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase (Rapoport *et al.*, 1985; Ando *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 1996). Suas funções são atribuídas a sua capacidade de ativar a guanilato ciclase solúvel e de aumentar o GMPc, embora efeitos independentes do GMPc têm sido descritos (Ando *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2005).

Então, após a constatação da modulação positiva do endotélio sobre a atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase na aorta das ratas Sham, e sabendo da capacidade do NO em modular a atividade desta enzima, os anéis vasculares foram estudados após incubação, por 30 minutos, com um inibidor da NOS, o L-NAME (100 µM). Este procedimento foi realizado a fim de verificar a participação do NO na estimulação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase.

Quando o grupo Sham E<sup>+</sup> foi comparado com o Sham L-NAME, houve uma redução no relaxamento induzido pelo KCl e um aumento na capacidade da OUA de inibir o relaxamento vascular. Entretanto, não houve diferenças significativas entre os grupos Sham E- e Sham L-NAME, confirmando a hipótese de que a ativação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase nos animais Sham ocorre por uma via nitrérgica (Figura 12).

O mesmo resultado demonstrado no presente trabalho foi encontrado por Dos Santos *et al.* (2003) e Rossoni *et al.* (2003). Chen *et al.* (2005) que avaliaram anéis de aorta torácica, também verificaram inibição do relaxamento induzido pelo KCl após a incubação dos anéis vasculares com L-NAME.

Os resultados encontrados no presente trabalho confirmam a existência de uma modulação endotelial positiva da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, via NO, em aorta, como previamente descrito na literatura.

No grupo Sham, parte do relaxamento induzido pelo acréscimo de KCl ao banho foi abolido na presença de OUA. Tal resposta sugere a participação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase neste processo. Como esperado, no grupo Inf, também ocorreu perda parcial da capacidade de relaxamento ao KCl após a adição de OUA (Figura 13). Muito embora, o relaxamento ao KCl do grupo Inf tenha sido de menor magnitude do que no grupo Sham, a adição de OUA promoveu uma inibição muito mais pronunciada no grupo Inf comparado ao que foi observado no grupo Sham

(Figura 21A). Este resultado poderia ser um indicativo de uma maior participação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase nos animais infartados sem sinais de insuficiência cardíaca quando comparado com a resposta obtida no grupo Sham (Figura 21A).

Além disso, quando o endotélio foi removido, também houve redução do relaxamento induzido pelo KCl. Estes resultados demonstram a existência de uma modulação positiva do endotélio sobre o relaxamento induzido pelo KCl. Porém, não quer dizer que exista modulação endotelial sobre a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase já que a capacidade da OUA inibir esta enzima, no grupo Inf E<sup>-</sup>, foi semelhante ao grupo Inf E<sup>+</sup>. Assim, a remoção do endotélio não foi capaz de aumentar a capacidade da OUA de inibir a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Figura 14B).

Estes resultados nos induzem a concluir que a modulação endotelial sobre a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase deve estar prejudicada nos animais infartados sem sinais de ICC. Entretanto, não se pode dizer que a modulação endotelial sobre o relaxamento induzido pelo KCl esteja prejudicada nos animais Inf, já que a remoção do endotélio diminuiu o relaxamento induzido pelo KCl. Diante desses resultados poder-se-ia especular que o menor relaxamento induzido pelo KCl em aorta de ratas infartadas sem sinais de ICC não se deva exclusivamente a uma alteração funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, mas tenha participação de outros mecanismos que influenciam a via de acoplamento excitação–contração do MLV que ainda precisam ser estudados.

Considerando o fato de que, no grupo Inf, a retirada do endotélio não modificou o relaxamento induzido pelo KCl na presença de OUA, é possível especular que no grupo Inf a OUA tenha perdido sua influencia sobre o endotélio, mas preservado sua ação sobre o MLV. Esse comportamento é diferente do que acontece com o grupo Sham em que a resposta de relaxamento induzido pelo KCl, com OUA, é modulada pelo endotélio. De fato, Xie *et al.* (1993) demonstraram que a OUA é capaz de estimular uma isoenzima da NOS endotelial aumentando a liberação de NO. Assim, se por um lado a OUA é capaz de inibir a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Blaustein, 1993), tanto endotelial quanto a do MLV, por outro, ela também estimula a produção de NO através de sua ação sobre o endotélio (Xie *et al.*, 1993). Eva *et al.* (2006) demonstraram também que a OUA estimula a eNOS e a produção de NO em células endoteliais do cordão umbilical humano. O NO então, promove o relaxamento do MLV tanto diretamente, quanto devido a uma ativação da própria  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Gupta *et al.*, 1996). Se o endotélio contrabalança a inibição da bomba pela OUA por que estimula a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, a remoção do endotélio deveria

aumentar a capacidade da OUA de inibir esta proteína. No entanto, nos animais com Inf sem sinais de ICC a produção endotelial de NO, estimulada pela OUA, parece ter sido perdida (Figura 24). É interessante ressaltar que a perda da produção de NO parece ter sido específica desta via mediada pela OUA, visto que a produção basal de NO, independente de OUA, permaneceu preservada, como demonstrado pela redução do relaxamento ao KCl na presença de L-NAME (Figura 16A e B).

No grupo de animais infartados com sinais de insuficiência, o relaxamento induzido pela adição de KCl ao banho foi reduzido na presença de OUA (Figura 17). A remoção do endotélio foi capaz de diminuir o relaxamento induzido pelo KCl e também, aumentar a capacidade da OUA de inibir este relaxamento. Portanto, pode-se inferir que o relaxamento induzido pelo KCl, na presença e na ausência de OUA, é regulado pelo endotélio, assim como foi observado no grupo Sham (Figura 18B).

Quando os animais Sham foram comparados com os lcc, na presença do endotélio, o relaxamento vascular gerado pela adição de KCl ao banho foi idêntico. Contudo, a capacidade da OUA de inibir a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase foi um pouco maior no grupo lcc, na concentração de 5 mM de KCl (Figura 21B). Portanto, a capacidade de relaxamento induzido pelo KCl possivelmente está preservada na insuficiência cardíaca. Porém, a OUA parece inibir um pouco mais a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase nos animais lcc comparados com os animais Sham.

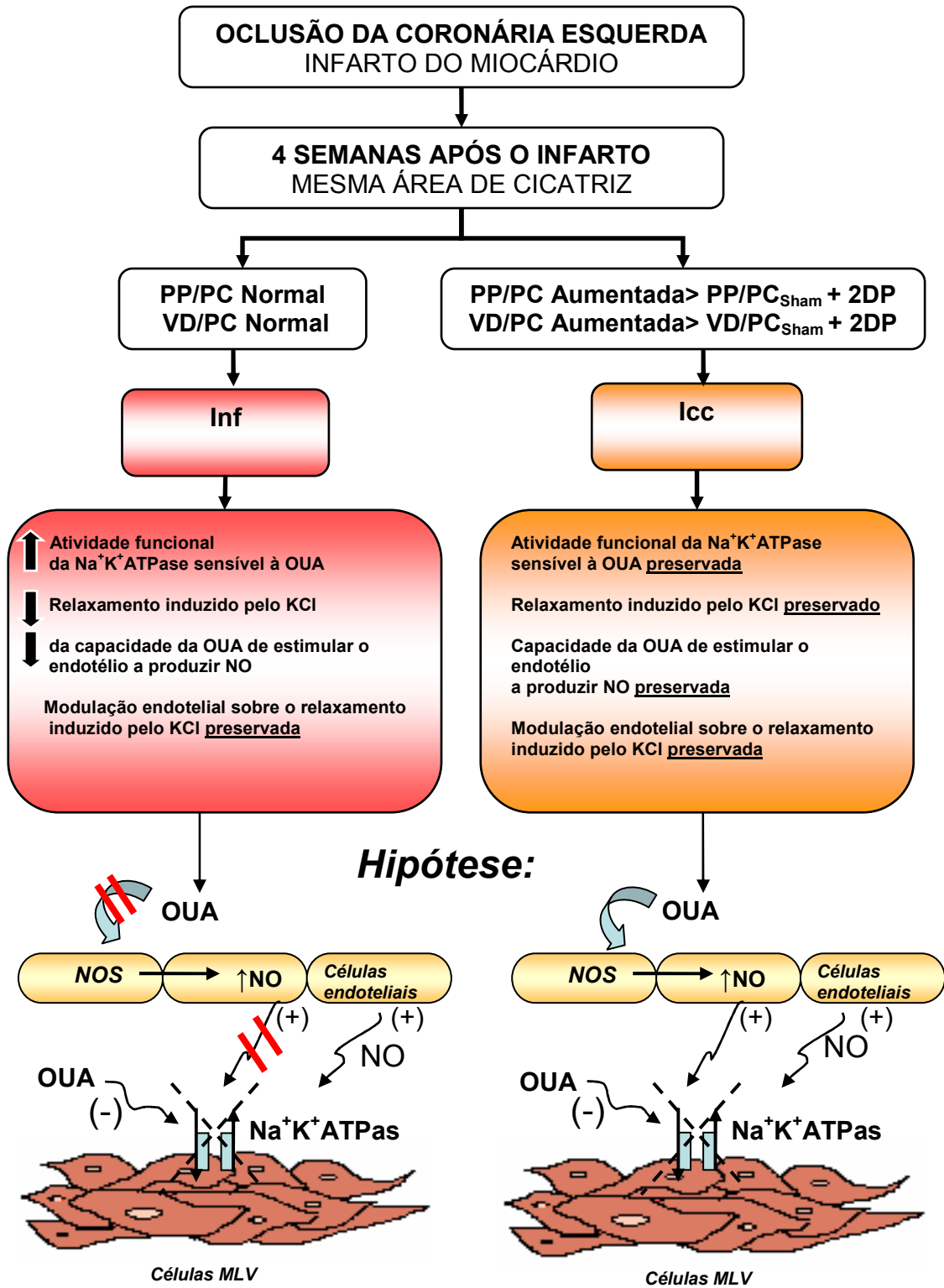
Na ausência de endotélio vascular não há diferença na resposta de relaxamento ao KCl entre os animais Sham e os infartados com sinais de ICC (Figura 22B). Este resultado é sugestivo de que nos animais infartados com sinais de lcc não houve prejuízo do endotélio capaz de reduzir o relaxamento induzido pelo KCl, ou então, mecanismos compensatórios estariam ativados a fim de mantê-lo normal. Da mesma forma que ocorreu nos animais Sham, a capacidade do endotélio de produzir NO, via estimulação pela OUA, estava preservada nos animais infartados com sinais de ICC. Assim, quando o endotélio é removido, ou mesmo quando o L-NAME é adicionado ao banho (Figura 20 A), o relaxamento a OUA é menor, o que sugere uma menor atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sensível à OUA. Logo, deduz-se que o relaxamento induzido pelo KCl e a capacidade inibidora da OUA são influenciadas pelo endotélio, através da liberação de NO.

Não há diferenças significativas quando são comparadas as curvas dos animais lcc E- com lcc L-NAME como pode ser observado na Figura 20B. Este

resultado reafirma a participação do endotélio no relaxamento apresentado nos grupos lcc.

De maneira geral, os resultados apresentados aqui indicam que a reatividade do anel de aorta de ratos infartados sem sinais de ICC, mas não os infartados com sinais de ICC está alterada. Ocorreu um menor relaxamento destes anéis ao KCl na presença e ausência de OUA. Resultados semelhantes foram descritos por Bianchi *et al.* (2006), os quais verificaram um aumento na reatividade a fenilefrina em aortas de ratas, após o INF, que era dependente do endotélio e estava relacionado à diminuição da biodisponibilidade de NO, mas não observaram redução do relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh). De fato, esta não é a primeira vez que se descreve diferenças funcionais significantes sobre a reatividade vascular de ratos infartados em função da presença ou não de sinais de ICC. Recentemente, um trabalho publicado por Pereira *et al.* (2005) demonstrou que a reatividade do leito arterial caudal de ratos 30 dias após infarto, sem sinais de ICC, é bem distinta daquela dos animais infartados com sinais de ICC. Os autores demonstraram que a reatividade vascular em resposta a fenilefrina estava aumentada em animais que apresentaram infarto sem sinais de ICC, enquanto o relaxamento em resposta à ACh estava diminuída. Já nos animais infartados com sinais de ICC a reatividade a fenilefrina foi menor do que a observada no grupo Sham, com manutenção do relaxamento a ACh.

Considerando que tem sido descrito na literatura a participação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase do MLV nas alterações da reatividade vascular durante o desenvolvimento de doenças do sistema cardiovascular, como a hipertensão arterial e o diabetes (Rose & Valdes, 1994; Davel *et al.*, 2000; Rossoni *et al.*, 2002; Xavier *et al.*, Callera *et al.*, 2004), seria possível que as alterações na reatividade vascular após infarto descritas por Pereira *et al.* (2005) também envolvessem a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase.



**Figura 24:** Diagrama com principais resultados e hipótese da pesquisa. Razão peso do ventrículo direito e peso corporal (VD/PC), peso do pulmão e peso corporal (PP/PC), infarto sem sinais de insuficiência (Inf), infarto com sinais de insuficiência (Icc), desvio padrão (DP), ouabaína (OUA), óxido nítrico (NO).

## 8. CONCLUSÃO

O principal resultado deste trabalho foi que nos animais infartados sem sinais de insuficiência o relaxamento induzido pelo KCl apresentou-se diminuído e a modulação endotelial desse relaxamento, por uma via nitrérgica, estava presente. Porém, a capacidade da ouabaína de inibir a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase estava aumentada nestes animais e não apresentou modulação endotelial como visto nos grupos Sham e Icc. Estes resultados nos induzem a concluir que a capacidade da OUA de estimular a liberação de NO ou de deixá-lo biodisponível através do endotélio deve estar prejudicada nos animais infartados sem sinais de ICC, mas preservada nos animais infartados com sinais de ICC. É interessante ressaltar que a perda da produção de NO parece ter sido específica desta via mediada pela OUA, visto que a produção basal de NO, independente de OUA, permaneceu preservada.

Nos animais infartados com sinais de ICC não houve prejuízo do endotélio capaz de reduzir o relaxamento induzido pelo KCl, ou então, mecanismos compensatórios estariam ativados a fim de mantê-lo normal. Assim, deduz-se que o relaxamento induzido pelo KCl e a capacidade inibidora da OUA são influenciadas pelo endotélio, através da liberação de NO.

Portanto, os resultados apresentados neste trabalho demonstram a participação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase nas mudanças de reatividade vascular após o infarto do miocárdio. Além disso, propõem que há diferenças nos mecanismos envolvidos na reatividade vascular ocasionada após o INF, em animais com mesma área de cicatriz, com e sem sinais de ICC.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alzamora, R.; Marusic, E. T., Gonzalez, M.; Michea, L. Nongenomic effect of aldosterone on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase in arterial vessels. *Endocrinology*. 144 (4): 1266-1272, 2003.

Ando, K.; Takahashi, K.; Ono, A.; Shimosawa, T.; Ogata, E.; Fujita, T. Possible role of sodium-hydrogen antiport in acetylcholine-induced relaxation of rat aorta. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 177(1): 407-413, 1991.

Angus, J. A.; Cocks, T. M. Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacology & Therapeutics*. 41(1-2): 303-352, 1989.

Annuk, M.; Zilmer, M.; Fellstrom, B. (2003) Endothelium-dependent vasodilation and oxidative stress in chronic renal failure: impact on cardiovascular disease. *Kidney International*. 84: 50–53, 2003.

Anversa, P.; Beghi, C.; Kikkawa, Y.; Olivetti, G. Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. *Circulation Research*. 58: 26-37, 1986.

Anversa, P.; Beghi, C.; Kikkawa, Y.; Olivetti, G. Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. *The American Journal of Pathology*. 118(3): 484-492, 1985.

Aperia, A. Regulation of sodium/potassium ATPase activity: impact on salt balance and vascular contractility. *Current Hypertension Reports*. [3\(2\): 165-171, 2001.](#)

[Arnon, A.](#); [Hamlyn, J. M.](#); [Blaustein, M. P.](#) Ouabain augments Ca<sup>2+</sup> transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na<sup>+</sup>. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 279(2): 679-691, 2000.

Attina, T.; Camidge, R.; Newby, D. E.; Webb, D. J. Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart*. [91\(6\): 825-831, 2005.](#)



Aw, T. Y.; Jones, D. P. ATP concentration gradients in cytosol of liver cells during hypoxia. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 249: 385–392, 1985.

Baggia, S.; Perkins, K.; Greenberg, B. Endothelium-dependent relaxation is not uniformly impaired in chronic heart failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 29: 389–396, 1997.

Bauersachs, J.; Bouloumié, A.; Fraccarollo, D.; Hu, K.; Busse, R.; Ertl, G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression. *Circulation*. 100: 292–298, 1999.

Beguin, P.; Peitsch, M. C.; Geering, K.  $\alpha 1$  but not  $\alpha 2$  or  $\alpha 3$  isoforms of Na,K-ATPase are efficiently phosphorylated in a novel protein kinase C motif. *Biochemistry*. 35: 14098–14108, 1996.

Beguin, P.; Beggah, A. T.; Chibalin, A. V.; Burgener-Kairuz, P.; Jaisser, F.; Mathews, P. M.; Rossier, B. C.; Cotecchia, S.; Geering, K. Phosphorylation of the Na,K-ATPase  $\alpha$  subunit by protein kinase A and C in vitro and in intact cells. Identification of a novel motif for PKC-mediated phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 24437–24445, 1994.

Behrendt, D.; Ganz, P. Endothelial function: from vascular. Biology to clinical applications. *The American Journal of Cardiology*. 90: 40–48, 2002.

Belardinelli, R. Endothelial dysfunction in chronic heart failure: clinical implications and therapeutic options. *International Journal of Cardiology*. 81: 1–8, 2001.

Benedict, C. R.; Weiner, D. H.; Johnstone, D. E.; Bourassa, M. G.; Ghali, J. K.; Nicklas, J.; Kirlin, P.; Greenberg, B.; Quinones, M. A.; Yusuf, S. Comparative neurohormonal responses in patients with preserved and impaired left ventricular ejection fraction: results of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) Registry. The SOLVD Investigators. *Journal of the American College of Cardiology*. 22(4): 146–153, 1993.

Bianchi, P. R.; Gumz, B. P.; Giuberti, K.; Stefanon, I. Myocardial infarction increases reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings of ovariectomized rats. *Life Sciences*. 78(8): 875- 881, 2006.

Blanco, G.; Mercer, R. W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal Physiology*. 275: 633-650, 1998.

Blaustein, M. P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and cell responsiveness. *American Journal Physiology*. 264: 1367-1387, 1993.

Blaustein, M. P. Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 232: 165-173, 1977.

Blaustein, M. P.; Lederer, W. J. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological Reviews*. 79: 763–854, 1999.

Borin, M. L. cAMP evokes a rise in intracellular Na<sup>+</sup> mediated by Na<sup>+</sup> pump inhibition in rat aortic smooth muscle cells. *American Journal Physiology*. 269 (38): 884-891, 1995.

Boulanger, C. M.; Heymes, C.; Benessiano, J.; Geske, R. S.; Levy, B. I.; Vanhoutte, P. M. Neuronal nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. Activation by angiotensin II in hypertension. *Circulation Research*. 83: 1271–78, 1998.

Bova, S.; Blaustein, M. P.; Ludens, J. H.; Harris, D. W.; DuCharme, D. W.; Hamlyn, J. M. Related effects of an endogenous ouabainlike compound on heart and aorta. *Hypertension*. 17: 944-950, 1991.

Braunwald, E.; Bristow, M. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation*, 102: 14-23, 2000.

Brezis, M.; Rosen, S. Hypoxia of the renal medulla—its implications for disease. *The New England Journal of Medicine*. 332: 647–655, 1995.

Briones, A. M.; Alonso, M. J.; Marin, J.; Balfagon, G.; Salaices, M. Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in rat mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology*. 131(2): 185-194, 2000.

Briones, A. M.; Alonso, M. J.; Marin, J.; Salaices, M. Role of iNOS in the vasodilator responses induced by L-arginine in the middle cerebral artery from normotensive and hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*. 126(1): 111-120, 1999.

Brock, T. A.; Lewis, L. J.; Smith, J. B. Angiotensin increases Na<sup>+</sup> entry and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump activity in cultures of smooth muscle from rat aorta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 79(5): 1438-1442, 1982.

Brotherus, J. R.; Jacobsen, L.; Jorgensen, P. L. Soluble and enzymatically stable (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase from mammalian kidney consisting predominantly of protomer - units. *Biochimica et biophysica acta*. 731: 290–303, 1983.

Buckalew, V. M. J.; Martinez, F. J.; Green, W. E. The effect of dialysates and ultrafiltrates of plasma of saline-loaded dogs on toad bladder sodium transport. *The Journal of Clinical Investigation*. 49(5): 926-935, 1970.

Butler, J.; Chomsky, D. B.; Wilson, J. R. Pulmonary hypertension and exercise intolerance in patients with heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 34: 1802– 1806, 1999.

Callera, G. E.; Yogi, A.; Tostes, R. C.; Rossoni, L. V.; Bendhack, L. M. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilation in 2K-1C hypertensive rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 309(3): 1036-1042, 2004.

Carabello, B. A. Concentric versus eccentric remodeling. *Journal of Cardiac Failure*. 8 (6): 258-263, 2002.

Chen, S.; Yuan, C.; Clough, D.; Haddy, F. J.; Pamnani, M. B. Role of digitalis-like substance in experimental insulin-dependent diabetes mellitus hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2: 20-21, 1993.

Chen, K. H.; Chen, S. J.; Wu, C. C. Regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in rat aortas: pharmacological and functional evidence. *The Chinese Journal of Physiology*. 48(2): 86-92, 2005.

Chow, D. C.; Browning, C. M.; Forte, J. G. Gastric H<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase activity is inhibited by reduction of disulfide bonds in beta-subunit. *American Journal Physiology*. 263: 39-46, 1992.

Chow, D. C.; Forte, J. G. Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. *The Journal of Experimental Biology*. 198: 1–17, 1995.

Comini, L.; Bachetti, T.; Gaia, G.; Pasini, E.; Agnoletti, L.; Pepi, P.; Ceconi, C.; Curello, S.; Ferrari, R. Aorta and skeletal muscle NO synthase expression in experimental heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 28: 2241-2248, 1996.

Cortes, V. F.; Veiga-Lopes, F. E.; Barrabin, H.; Alves-Ferreira, M.; Fontes, C. F. The gamma subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: role on ATPase activity and regulatory phosphorylation by PKA. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 38(11): 1901-1913, 2006.

Creager, M. A.; Cooke, J. P.; Mendelsohn, M. E.; Gallagher, S. J.; Coleman, S.M.; Loscalzo, J.; Dzau, V. J. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *The Journal of Clinical Investigation*. 86: 228-234, 1990.

Davel, A. P.; Rossoni, L. V.; Vassallo, D. V. Effects of ouabain on the pressor response to phenylephrine and on the sodium pump activity in diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*. 406(3): 419-427, 2000.

Davidoff, A. W.; Boyden, P. A.; Schwartz, K.; Michel, J. B.; Zhang, Y. M.; Obayashi, M.; Crabbe, D.; Ter Keus, H. E. D. J. Congestive heart failure after myocardial infarction in the rat: cardiac force and spontaneous sarcomere activity. *New York Academy of Sciences*. 1015: 84-95, 2004.

Davis, M.J.; Hill, M.A. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiological Reviews*. 79: 387 – 423, 1999.

De Angelis, K.; Dos Santos, M. B.; Irigoyen, M. C. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul*. 3, 2004.

Didion, S. P.; Carmines, P. K.; Ikenaga, H.; Mayhan, W. G. Enhanced constrictor responses of skeletal muscle arterioles during chronic myocardial infarction. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 273: 1502–1508, 1997.

Dohi, Y.; Kojima, M.; Sato, K. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. *Hypertension*. 28: 732–37, 1996.

Dolson, G. M.; Wesson, D. E.; Adroque, H. J. Vascular relaxation probably mediates the antihypertensive effect of a high-potassium diet: a role for enhanced vascular Na,K-ATPase activity. *Journal of Hypertension*. 13: 1433-1439, 1995.

Dorn, G. W. Adrenergic pathways and left ventricular remodeling. *Journal of Cardiac Failure*. 8 (6): 370-373, 2002.

Dos Santos, L.; Xavier, F. E.; Vassallo, D. V.; Rossoni, L. V. Cyclooxygenase pathway is involved in the vascular reactivity and inhibition of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the tail artery from L-NAME-treated rats. *Life Sciences*. 74(5): 613-627, 2003.

Dostanic-Larson, I.; Lorenz, J. N.; Van Huysse, J. W.; Neumann, J. C.; Moseley, A. E.; Lingrel, J. B. Physiological role of the  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2- isoforms of the Na-K-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 290: 524–528, 2006.

Douglas, L. M. Mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future inflammatory. *Circulation Research*. 91: 988-998, 2002.

Drexler, H. Hypertension, heart failure, and endothelial function. *The American Journal of Cardiology*. 82(10): 20-22, 1998.

Drexler, H.; Hayoz, D.; Munzel, T.; Just, H.; Zelis, R.; Brunner, H. R. Endothelial dysfunction in chronic heart failure: experimental and clinical studies. *Arzneimittelforschung*. 44: 455-458, 1994.

Drexler, H.; Lu, W. Endothelial dysfunction of hindquarter resistance vessels in experimental heart failure. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 31: 1640–1645, 1992.

Endemann, D. H.; Schiffrin, E. L. Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*. 15(8): 1983-1992, 2004.

Eva, A.; Kirch, U.; Scheiner-Bobis, G. Signaling pathways involving the sodium pump stimulate NO production in endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758(11): 1809-1814, 2006.

Ewart, H. S.; Klip, A. Hormonal regulation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 269 (38): 295–311, 1995.

Falkenhahn, M.; Gohlke, P.; Paul, M.; Stoll, M.; Unger, T. The renin-angiotensin system in the heart and vascular wall: new therapeutic aspects. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 24(2): 6-13, 1994.

Fang, Z.Y.; Marwick, T.H. Vascular dysfunction and heart failure: epiphenomenon or etiologic agent? *American Heart Journal*. 143: 383-390, 2002.

Farley, R. A.; Miller, R. P.; Kudrow, A. Orientation of the beta subunit polypeptide of (Na<sup>++</sup>K<sup>+</sup>)ATPase in the cell membrane. *Biochimica et Biophysic Acta*. 873: 136-142, 1986.

Fedorova, O. V.; Bagrov, A. Y. Inhibition of Na/KATPase from rat aorta by two Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin: evidence of interaction with different alpha-subunit isoforms. *American Journal of Hypertension*. 10(8): 929-935, 1997.

Felder, R. B.; Francis, J.; Zhang, Z. H.; Wei, S. G.; Weiss, R. M.; Johnson, A. K. Heart failure and the brain: new perspectives. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 284: 259-276, 2003.

Feletou, M.; Vanhoutte, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 21(1): 1-18, 2000.

Fernandes, A. A. Diferença na contratilidade de ventrículos direito e esquerdo de ratos com e sem insuficiência cardíaca após o infarto do miocárdio. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, 2006.

Fischer, D.; Rossa, S.; Landmesser, U.; Spiekermann, S.; Engberding, N.; Hornig, B.; Drexler, H. Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. *European Heart Journal*. 26(1): 65-69, 2005.

Forbush, B.; Kaplan, J. H.; Hoffman, J. F. Characterization of new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na,K-ATPase. *Biochemistry*. 17: 3667-3676, 1978.

Francis, G. S.; Benedict, C.; Johnstone, D. E.; Kirlin, P. C.; Nicklas, J.; Liang, C. S.; Kubo, S. H.; Rudin-Toretzky, E.; Yusuf, S. Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation*. 82(5): 1724-1729, 1990.

Francis, G. S.; Cohn, J. N.; Johnson, G.; Rector, T. S.; Goldman, S.; Simon, A. Plasma norepinephrine, plasma renin activity, and congestive heart failure: relations to survival and the effects of Therapy in V-HeFT II. *Circulation*. 87: 140-148, 1993.

Francis, J.; Weiss, R. M.; Wei, S. G.; Johnson, A. K.; Felder, R. B. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 281(5): 1734-1745, 2001.

Frasen, P. Phospholemman, a chaperone of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase? *Cardiovascular Research*. 65: 13-15, 2005.

Fukuda, S.; Morioka, M.; Tanaka, T.; Shimoji, K. Prostaglandin E1-induced vasorelaxation in porcine coronary arteries. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 260(3): 1128-1132, 1992.

Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288(5789): 373-376, 1980.

Gaballa, M. A.; Goldman, S. Ventricular remodeling in the heart. *Journal Cardiac Failure*. 8 (6): 476-485, 2002.

Gerdes, A. M. Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failures. *Journal of Cardiac Failures*. 8 (6): 264-268, 2002.



Gick, G. G.; Hatala, M. A.; Chon, D.; Ismail-Beigi, F. Na,K-ATPase in several tissues of the rat: tissue-specific expression of subunit mRNAs and enzyme activity. *The Journal of Membrane Biology*. 131(3): 229-236, 1993.

Giuberti, K.; Pereira, R. B.; Bianchi, P. R.; Paigel, A. S.; Vassallo, D. V.; Stefanon, I. Influence of ovariectomy in the right ventricular contractility in heart failure rats. *Archives of Medical Research*. 38(2): 170-175, 2007.

Goldsmith, S. R.; Gheorghide, M. Vasopressin antagonism in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 46 (10): 1785-1791, 2005.

Gottlieb, S. S.; Rogowski, A. C.; Weinberg, M.; Krichten, C. M.; Hamilton, B. P.; Hamlyn, J. M. Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 86(2): 420-425, 1992.

Grassi, G.; Seravalle, G.; Cattaneo, B. M.; Lanfranchi, A.; Vailati, S.; Giannattasio, C.; Del Bo, A.; Sala, C.; Bolla, G. B.; Pozzi, M. Sympathetic activation and loss of reflex sympathetic control in mild congestive heart failure. *Circulation*. 92: 3206-3211, 1995.

Griendling, K. K.; Ushio-Fukai, M.; Lassegue, B.; Alexander, R. W. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension*. 29: 366-373, 1997.

Grossman, W.; Jones, D.; MacLaurin, L. P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *The Journal of Clinical Investigation*. 56: 56-64, 1975.

Gschwend, S.; Henning, R. H.; Pinto, Y. M.; de Zeeuw, W.; Van Glist, W. H.; Buikema, H. Myogenic constriction is increased in mesenteric resistance arteries from rats with chronic heart failure: instantaneous counteraction by acute AT1 receptor blockade. *British Journal of Pharmacology*. 139: 1313-1325, 2003.

Gupta, S.; McArthur, C.; Grady, C.; Ruderman, N. B. Stimulation of vascular Na(+)-K(+)-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *American Journal Physiology*. 266: 2146-2151, 1994.

Gupta, S.; Phipps, K.; Ruderman, N. B. Differential stimulation of Na<sup>+</sup> pump activity by insulin and nitric oxide in rabbit aorta. *American Journal Physiology*. 270: 1287-1293, 1996.

Gupta, S.; Ruderman, N. B.; Cragoe, E. J. J.; Sussman, I. Endothelin stimulates Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by a protein kinase C-dependent pathway in rabbit aorta. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 261(30): 38-45, 1991.

Hamlyn, J. M.; Blaustein, M. P.; Bova, S.; DuCharme, D. W.; Harris, D. W.; Mandel, F.; Mathews, W. R.; Ludens, J. H. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88(14): 6259-6263, 1991.

Hamlyn, J. M.; Ringel, R.; Schaeffer, J.; Levinson, P. D.; Hamilton, B. P.; Kowarski, A. A.; Blaustein, M. P. A circulating inhibitor of (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPase associated with essential hypertension. *Nature*. 300(5893): 650-652, 1982.

Hamlyn, J. M.; Hamilton, B. P.; Manunta, P. Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and a hypothesis. *Journal of Hypertension*. 14: 151-171, 1996.

Han, F.; Bossuyt, J.; Despa, S.; Tucker, A. L.; Bers, D. M. Phospholemman phosphorylation mediates the protein kinase C-dependent effects on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump function in cardiac myocytes. *Circulation Research*. 99:1376-1383, 2006.

Haynes, W. G.; Webb, D. J. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *Journal of Hypertension*. 16: 1081–1098, 1998.

Herrera, V. L.; Chobanian, A. V.; Ruiz-Opazo, N. Isoform-specific modulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunit gene expression in hypertension. *Science*. 241(4862): 221-223, 1988.

Hiatt, A.; McDonough, A. A.; Edelman, I. S. Assembly of the (Na,K)-adenosine triphosphatase: post translational membrane integration of the alpha-subunit. *The Journal of Biological Chemistry*. 259: 2629-2635, 1984.

Hirooka, Y.; Egashira, K.; Imaizumi, T.; Tagawa, T.; Kai, H.; Sugimachi, M.; Takeshita, A. Effect of L-arginine on acetylcholine-induced endothelium-dependent vasodilation differs between the coronary and forearm vasculatures in humans. *Journal of the American College of Cardiology*. 24(4): 948-55, 1994.

Hirsch, A. T.; Talsness, C. E.; Schunkert, H.; Paul, M.; Dzau, V. J. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circulation Research*. 69(2): 475-482, 1991.

Horisberger, J. D. Recent insight into structure and mechanism of sodium pump. *Physiology*. 19: 377-387, 2004.

Horisberger, J. D.; Lemas, V., Kraehenbuhl, J. P. Rossier, B. C. Structure–function relationship of Na,K-ATPase. *Annual Review of Physiology*. 53: 565–584, 1991.

Hundal, H. S.; Marette, A.; Ramlal, T.; Lie, Z.; Klip, A. Expression of  $\beta$ -subunit isoforms of the Na,K-ATPase is muscle type-specific. *FEBS letters*. 328: 253-258, 1993.

Ignarro, L. J.; Kadowitz, P. J. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 25:171-191, 1985.

Indik, J. H.; Goldman, S.; Gaballa, M. A. Oxidative stress contributes to vascular endothelial dysfunction in heart failure. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 281: 1767–1770, 2001.

Isenovic, E. R.; Jacobs, D. B.; Kedees, M. H.; Sha, Q.; Milivojevic, N.; Kawakami, K.; Gick, G.; Sowers, J. R. Angiotensin II regulation of the Na<sup>+</sup> pump involves the phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*. 145(3): 1151-1160, 2004.

Jasmin, J. F.; Calderone, A.; Leung, T. K.; Villeneuve, L.; Dupuis, J. Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal by irbesartan. *Cardiovascular Research*. 58: 621-631, 2004.

Juhaszova, M.; Blaustein, M. P. Na<sup>+</sup> pump low and high ouabain affinity a subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(5): 1800–1805, 1997.

Katz S. D.; Biasucci, L.; Sabba, C.; Strom, J. A.; Jondeau, G.; Galvao, M.; Solomon, S.; Nikolic, S. D.; Forman, R.; LeJemtel, T. H. Impaired endothelium-mediated vasodilation in the peripheral vasculature of patients with congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 19: 918-25, 1992.

Katz, S. D.; Schwarz, M.; Yuen, J.; LeJemtel, T. H. Impaired acetylcholine-mediated vasodilation in patients with congestive heart failure. Role of endothelium-derived vasodilating and vasoconstricting factors. *Circulation*. 88:55-61, 1993.

Kim, Y. K.; Kim, S. J.; Kramer, C. M.; Yatani, A.; Takagi, G.; Mankad, S.; Sziget, G. P.; Singh, D.; Bishop, S. P.; Shannon, R. P.; Vatner, D. E.; Vatner, S. F. Altered excitation-contraction coupling in myocytes from remodeled myocardium after chronic myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 34(1): 63-73, 2002.

Kourie, J. I.; Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *The American Journal of Physiology*. 275: 1-24, 1998.

Kubo, S. H.; Rector, T. S.; Bank, A. J.; Williams, R. E.; Heifetz, S. M. Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation*. 84(4): 1589-1596, 1991.

Kuc, R. E.; Davenport, A. P. Endothelin-A-receptors in human aorta and pulmonary arteries are downregulated in patients with cardiovascular disease: an adaptive response to increased levels of endothelin-1? *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 36: 377-379, 2000.

Lahaye, P.; Tazi, K. A.; Rona, J. P.; Dellis, O.; Lebrec, D.; Moreau, R. Effects of protein kinase C modulators on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> adenosine triphosphatase activity and phosphorylation in aortae from rats with cirrhosis. *Hepatology*. 28: 663–669, 1998.

Ledoux, J.; Gee, D. M.; Leblanc, N. Increased peripheral resistance in heart failure: new evidence suggest an alteration in vascular smooth muscle function. *British Journal Pharmacology*, 139: 1245-1248, 2003.

Lee, R. T.; Schoen, F. J.; Loree, H. M.; Lark, M. W.; Libby, P. Circumferential stress and matrix metalloproteinase 1 in human coronary atherosclerosis. Implications for plaque rupture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 16(8): 1070-1073, 1996.

Lee, Y. H.; Ahn, D. S.; Song, H. J.; Kim, Y. H.; Kim, H. S.; Ahn, S. H.; Kang, S. Effects of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> -Pump inhibitors on acetylcholine-induced relaxation in the rabbit aorta. *Yonsei Medical Journal*. 33(1): 8-13, 1992.

Levi, A. J.; Boyett, M. R.; Lee, C. O. The cellular actions of digitalis glycosides on the heart. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 61: 1–54, 1994.

Linke, A. Recchia, F.; Zhang, X.; Hintze, T. H. Acute and chronic endothelial dysfunction: implications for the development of heart failure. *Heart Failure Reviews*. 8: 87–97, 2003.

Liu, X.; Songu-Mize, E. Effect of Na<sup>+</sup> on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunit expression and Na<sup>+</sup>-pump activity in aortic smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*. 351(1): 113-119, 1998.

Lockette, W. E.; Webb, R. C.; Bohr, D. F. Prostaglandins and potassium relaxation in vascular smooth muscle of the rat. The role of Na-K ATPase. *Circulation Research*. 46(5): 714-720, 1980.

Lopez, F. A.; Casado, S. Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction. *Hypertension*. 38(6): 1400-1405, 2001.

Lopina, O. D. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: structure, mechanism, and regulation. *Membrane & Cell Biology*. 13(6): 721-744, 2000.

Ludens, J. H.; Clark, M. A.; DuCharme, D. W.; Harris, D. W.; Lutzke, B. S.; Mandel, F.; Mathews, W. R.; Sutter, D. M.; Hamlyn, J. M. Purification of an endogenous digitalislike factor from human plasma for structural analysis. *Hypertension*. 17: 923-929, 1991.

Marcus, M. L.; Koyanagi, S.; Harrison, D. G.; Doty, D. B.; Hiratzka, L. F.; Eastham, C. L. Abnormalities in the coronary circulation that occur as a consequence of cardiac hypertrophy. *The American Journal of Medicine*. 75(3): 62-66, 1983.

Marín, J.; Rodríguez-Martínez, M. A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacology & Therapeutics*. 75: 111-134, 1995.

Marín, J.; Redondo, J. Vascular sodium pump: endothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging. *Pharmacology & Therapeutics*. 84:249-71, 1999.

Marín, J.; Sánchez-Ferrer, C. F.; Salaices, M. Effects of ouabain on isolated cerebral and femoral arteries of cat: a functional and biochemical study. *British Journal of Pharmacology*. 93: 43-52, 1988.

Masaki, T.; Vane, J. R.; Vanhoutte, P. M. International Union of Pharmacology nomenclature for endothelin receptors. *Pharmacological Reviews*. 46: 137, 1994.

Mathews, W. R.; DuCharme, D. W.; Hamlyn, J. M.; Harris, D. W.; Mandel, F.; Clark, M. A.; Ludens, J. H. Mass spectral characterization of an endogenous digitalislike factor from human plasma. *Hypertension*. 17: 930-935, 1991.

McDonough, A. A.; Geering, K.; Farley, R. A. The sodium pump needs its beta subunit. *The FASEB journal*. 4(6): 1598-1605, 1990.

Michea, L.; Valenzuela, V.; Bravo, I.; Schuster, A.; Marusic, E. T. Adrenal-dependent modulation of the catalytic subunit isoforms of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in aorta. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 275(38): 1072–1081, 1998.

Middlekauff, H. R.; Mark, A. L. The treatment of heart failure: the role of neurohumoral activation. *Internal Medicine*. 37(2): 112-122, 1998.

Mill, J. G.; Vassallo, D. V. Hipertrofia cardíaca. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 8(1): 63-75, 2001.

Mill, J.G.; Stefanon, I.; Leite, C. M.; Vassallo, D. V. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovascular Research*. 24(9): 748-53, 1990.

Mohri, M.; Egashira, K.; Tagawa, T.; Kuga, T.; Tagawa, H.; Harasawa, Y.; Shimokawa, H.; Takeshita, A. Basal release of nitric oxide is decreased in the coronary circulation in patients with heart failure. *Hypertension*. 30:50-6, 1997.

Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 43(2): 109-142, 1991.

Moore, A. F.; Khairallah, P. A. The role of sodium and potassium ions in the contractile response and development of tachyphylaxis to angiotensin II on vascular smooth muscle. *Blood Vessels*. 16(4): 169-176, 1979.

Morgan, K.; Lewis, M. D.; Spurlock, G.; Collins, P. A.; Foord, S. M.; Southgate, K.; Scanlon, M. F.; Mir, M. A. Characterization and partial purification of the sodium-potassium-ATPase inhibitor released from cultured rat hypothalamic cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 260(25): 13595-13600, 1985.

Most, P.; Remppis, A.; Pleger, S. T.; Löffler, E.; Ehlermann, P.; Bernotat, J.; Kleuss, C.; Heierhorst, J.; Ruiz, P.; Witt, H.; Karczewski, P.; Mao, L.; Rockman, H. A.; Duncan, S. J.; Katus, H. A.; Koch, W. J. Transgenic overexpression of the Ca<sup>2+</sup>-binding protein S100A1 in the heart leads to increased in vivo myocardial contractile performance. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 33809–33817, 2003.

Most, P.; Seifert, H.; Gao, E.; Funakoshi, H.; Volkers, M.; Heierhorst, J.; Remppis, A.; Pleger, S. T.; DeGeorge, B. R. J.; Eckhart, A. D.; Feldman, A. M.; Koch, W. J. Cardiac S100A1 protein levels determine contractile performance and propensity toward heart failure after myocardial infarction. *Circulation*. 114(12): 1258-1268, 2006.

Mujais, S. K. L.; Chen, Y.; Nora, N. A.; Vasopressin resistance in potassium depletion: role of Na-K pump. *The American Journal of Physiology*. 263: 705-10, 1992.

Nahrendorf, M.; Hu, K.; Fraccarollo, D.; Hilldr, K. H.; Haase, A.; Bauer, W. R.; Ertl, G. Time course of right ventricular remodeling in rats with experimental myocardial infarction. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 284: 241-248, 2003.

Nakayama, T. The genetic contribution of the natriuretic peptide system to cardiovascular diseases. *Endocrine Journal*. 52 (1): 11-21, 2005.

Nasa, Y.; Toyoshima, H.; Ohaku, H.; Hashizume, Y.; Sanbe, A.; Takeo, S. Prejuízo do relaxamento vascular mediado pelo GMPc e AMPc em ratos com ICC. *American Journal Physiology*, 271: 2228-2237, 1996.

National Heart, Lung and Blood Institute, 2003. What is heart failure?

Nava, E.; Noll, G.; Luñscher, T. F. Increased activity of constitutive nitric oxide synthase in cardiac endothelium in spontaneous hypertension. *Circulation*. 91: 2310–2313, 1995.



Nian, M.; Lee, P.; Khaper, N.; Liu, P. Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circulation Research*. 94: 1543-1553, 2004.

Nishimura, J. Topics on the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger: involvement of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in the vasodilator-induced vasorelaxation. *Journal of Pharmacological Sciences*. 102(1): 27-31, 2006.

Oguchi, A.; Ikeda, U.; Kanbe, T.; Tsuruya, Y.; Yamamoto, K.; Kawakami, K.; Medford, R. M.; Shimada, K. Regulation of Na-K-ATPase gene expression by aldosterone in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 265: 1167–1172, 1993.

Olivetti, G.; Capasso, J. M.; Meggs, L. G.; Sonnenblick, E. H.; Anversa, P. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Circulation Research*. 68(3): 856-69, 1991.

Orlowski, J.; Lingrel, J. B. Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic alpha isoform and beta subunit mRNAs. *The Journal of Biological Chemistry*. 263(21): 10436-10442, 1988.

Overbeck, H. W.; Pamnani, M. B.; Akera, T.; Brody, T. M.; Haddy, F. J. Depressed function of a ouabain-sensitive sodium-potassium pump in blood vessels from renal hypertensive dogs. *Circulation Research*. 38: 48-52, 1976.

Ozturk, Y.; Altan, V. M.; Yildizoglu-Ari, N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacological Reviews*. 48(1):69-112, 1996.

Palacios, J.; Marusic, E. T.; Lopez, N. C.; Gonzalez, M.; Michea, L. Estradiol-induced expression of N(+)-K(+)-ATPase catalytic isoforms in rat arteries: gender differences in activity mediated by nitric oxide donors. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 286(5): 1793-1800, 2004.

Palmer, R. M.; Ferrige, A. G.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327 (6122): 524-526, 1987.

Pamnani, M.; Huot, S.; Buggy, J.; Clough, D.; Haddy, F. Demonstration of a humoral inhibitor of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump in some models of experimental hypertension. *Hypertension*. 3: 96-101, 1981.

Panza, J. A.; Quyyumi, A. A.; Brush, J. E. J.; Epstein, S. E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 323: 22-27, 1990.

Pereira, R. B.; Sartorio, C. L.; Vassallo, D. V.; Stefanon, I. Differences in tail vascular bed reactivity in rats with and without heart failure following myocardial infarction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 312(3): 1321-1325, 2005.

Pesaro, A. E. P.; Serrano Jr. C. V.; Nicolau, J. C. Infarto agudo do miocárdio: síndrome coronariana aguda com supradesnivelamento de ST. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 50(2): 214-220, 2004.

Pfeffer, J. M. Memorial lecture. *Journal of Cardiac Failure*. 8: 248-252, 2002.

Pfeffer, J. M.; Fischer, T. A.; Pfeffer, M. A. Angiotensin-converting enzyme inhibition and ventricular remodeling after myocardial infarction. *Annual Review of Physiology*. 57: 805-826, 1995.

Pfeffer, J. M.; Pfeffer, M. A.; Fletcher, P. J.; Braunwald, E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 260: 1406-1414, 1991.

Pfeffer, M. A.; Braunwald, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 81: 1161-1172, 1990.

Pfeffer, M. A.; Pfeffer, J. M.; Fishbein, M. C.; Fletcher, P. J.; Spadaro, J.; Kloner, R. A.; Braunwald, E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circulation Research*. 44(4): 503-512, 1979.

Pinet, F. What is the role of endothelin system? *Medical Science*. 20(3): 339-345, 2004.

Pontiggia, L.; Gloor, S. M. The extracellular domain of the sodium pump beta isoforms determines complex stability with alpha 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 231(3): 755-9, 1997.

Rapoport, R. M.; Murad, F. Effect of cyanide on nitrovasodilator-induced relaxation, cyclic GMP accumulation and guanylate cyclase activation in rat aorta. *European Journal of Pharmacology*. 104: 61-70, 1984.

Rapoport, R. M.; Schwartz, K.; Murad, F.; Effect of sodium-potassium pump inhibitors and membrane-depolarizing agents on sodium nitroprusside-induced relaxation and cyclic guanosine monophosphate accumulation in rat aorta. *Circulation Research*. 57(1): 164-170, 1985.

Rashed, S. M.; Songu-Mize, E. Regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by dopamine in cultured rat aortic smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*. 305: 223–230, 1996.

Rashed, S. M.; Songu-Mize, E. Regulation of Na<sup>+</sup>-pump activity by dopamine in rat tail arteries. *European Journal of Pharmacology*. 284: 289–297, 1995.

Rose, A. M.; Valdes, R. J. Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clinical Chemistry*. 40 (9): 1674-1685, 1994.

Rossoni, L. V.; Salices, M.; Marin, J.; Vassallo, D. V.; Alonso, M. J. Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in ouabain-induced hypertension. *British Journal of Pharmacology*. 135(3): 771-781, 2002.

[Rossoni, L.V.; Pinto, V. D.; Vassallo, D. V.](#) Effects of small doses of ouabain on the arterial blood pressure of anesthetized hypertensive and normotensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34(8): 1065-1077, [2001](#).

[Rossoni, L. V.; Dos Santos, L.; Barker, L. A.; Vassallo, D. V.](#) Ouabain changes arterial blood pressure and vascular reactivity to phenylephrine in L-NAME-induced hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 41(1): 105-116, [2003](#).

Rundqvist, B.; Elam, M.; Bergmann-Sverrisdottir, Y.; Eisenhofer, G.; Friberg, P. Increased cardiac adrenergic drive precedes generalized sympathetic activation in human heart failure. *Circulation*. 95(1): 169-175, 1997.

Sahin-Erdemli, I.; Rashed, S. M.; Songu-Mize, E. Rat vascular tissues express all three alpha-isoforms of Na(+)-K(+)-ATPase. *American Journal Physiology*. 266: 350-353, 1994.

Satoh, T.; Cohen, H. T.; Katz, A. I. Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATPase. II. Role of eicosanoids. *The Journal of Clinical Investigation*. 91: 409-415, 1993.

Satoh, T.; Karaki, H. Release of Prostaglandins during the Contraction of Rat Aorta Induced by Ouabain and K<sup>+</sup>-Free Solution. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 48 (2): 249-255, 1988.

Schafer, A.; Fraccarollo, D.; Tas, P.; Schmidt, I.; Ertl, G.; Bauersachs, J. Endothelial dysfunction in congestive heart failure: ACE inhibition vs. angiotensin II antagonism. *European Journal of Heart Failure*. 6(2): 151-159, 2004.

Schoner, W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *European Journal of Biochemistry/FEBS*. 269(10): 2440-2448, 2002.

Schoner, W. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 108(7): 449-454, 2000.

Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and Exogenous Cardiac Glycosides and their Mechanisms of Action. *American Journal of Cardiovascular Drugs: Drugs, Devices, and other Interventions*. 7(3): 173-189, 2007.

Schrier, R. W.; Abraham, W. T. Hormones and hemodynamics in heart failure. *The New England Journal of Medicine*. 341(8): 577-585, 1999.

Selvais, P. L.; Robert, A.; Ahn, S.; Van Linden, F.; Ketelslegers, J. M.; Pouleur, H. Rousseau, M. F. Direct comparison between endothelin-1, N-terminal proatrial natriuretic factor, and brain natriuretic peptide as prognostic markers of survival in congestive heart failure. *Journal of Cardiac Failure*. 6(3): 201-207, 2000.

Sen, A. K.; Tobin, T. A cycle for ouabain inhibition of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*. 244(24): 6596-6604, 1969.

Shamraj, O. I.; Melvin, D.; Lingrel, J. B. Expression of Na,K-ATPase isoforms in human heart. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 179: 1434-1440, 1991.

Shamraj, O. I.; Lingrel, J. B. A putative fourth Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(26): 12952-12956, 1994.

Sharpe, N. Myocardial infarction and heart failure. The common ground. *Circulation*. 87(3): 1037-1039, 1993.

Shubeita, H. E.; McDonough, P. M.; Harris, A. N.; Knowlton, K. U.; Glembotski, C. C.; Brown, J. H.; Chien, K. R. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *The Journal of Biological Chemistry*. 265(33): 20555-20562, 1990.

Shyjan, A. W.; Gottardi, C.; Levenson, R. The Na,K-ATPase  $\beta$ 2 subunit is expressed in rat brain and copurifies with Na,K-ATPase activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 265: 5166-5169, 1990.

Skou, J. C. The Identification of the Sodium-Potassium Pump. Nobel Lectures, World Scientific Publishing Co., Singapore, 1996-2000. 2003. Disponível em: <[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1997/skou-lecture.pdf](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1997/skou-lecture.pdf)>. Acesso em: 16 de abril de 2007.

Skou, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerve. *Biochimica et Biophysica Acta*. 23: 394-401, 1957.

Skou, J. C.; Esmann, M. The Na,K-ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 24(3): 249-261, 1992.

Songu-Mize, E.; Bealer, S. L.; Caldwell, R. W. Effect of AV3V lesions on development of DOCA-salt hypertension and vascular Na<sup>+</sup>-pump activity. *Hypertension*. (5): 575-580, 1982.

Songu-Mize, E.; Sevieux, N.; Liu, X.; Jacobs, M. Effect of short-term cyclic stretch on sodium pump activity in aortic smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 281(5): 2072-2078, 2001.

Spann, J. F.; Buccino, R. A.; Sonnenblick, E. H.; Braunwald, E. Contractile state of cardiac muscle obtained from cats with experimentally produced ventricular hypertrophy and heart failure. *Circulation Research*. 21: 341-354, 1967.

Stassen, F. R.; Fazzi, G. E.; Leenders, P. J.; Smits, J. F.; De Mey, J. G. Coronary arterial hyperreactivity and mesenteric arterial hyporeactivity after myocardial infarction in the rat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 29(6): 780-788, 1997.

Stengelin, M. K.; Hoffman, J. F. Na,K-ATPase subunit isoforms in human reticulocytes: evidence from reverse transcription-PCR for the presence of alpha1,

alpha3, beta2, beta3, and gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 5943–5948, 1997.

Stevens, T. L.; Burnett, J. C. J.; Kinoshita, M.; Matsuda, Y.; Redfield, M. M. A functional role for endogenous atrial natriuretic peptide in a canine model of early left ventricular dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*. 95(3): 1101-1108, 1995.

Sutton, M. G. J.; Sharpe, N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction; pathophysiology and therapy. *Circulation*. 101: 2981-88, 2000.

Sweadner, K. J. Two molecular forms of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. *Journal of Biological Chemistry*. 254(13): 6060-6067, 1979.

Tack, C. J.; Lutterman, J. A.; Vervoort, G.; Thien, T.; Smits, P. Activation of the sodium-potassium pump contributes to insulin-induced vasodilation in humans. *Hypertension*. 28: 426-32, 1996.

Taddei, S.; Viridis, A.; Ghiadoni, L.; Salvetti, A. Vascular effects of endothelin-1 in essential hypertension: relationship with cyclooxygenase-derived endothelium-dependent contracting factors and nitric oxide. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 35: 37-40, 2000.

Takahashi, K.; Ohyanagi, M.; Ikeoka, K.; Ueda, A.; Koida, S. Variations of endothelium-dependent vasoresponses in congestive heart failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 45: 14-21, 2005.

Takuwa, M. K.; Yanagisawa, M.; Goto, K.; Masaki, T.; Yamashita, K. Endothelin receptor is coupled to phospholipase C via a pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 85: 653-658, 1990.

Teerlink, J. R.; Clozel, M.; Fischli, W.; Clozel, J. P. Temporal evolution of endothelial dysfunction in a rat model of chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 22: 615-620, 1993.

Teerlink, J. R.; Gray, G. A.; Clozel, M.; Clozel, J. P. Increased vascular responsiveness to norepinephrine in rats with heart failure is endothelium dependent. Dissociation of basal and stimulated nitric oxide release. *Circulation*. 89(1): 393-401, 1994.

Therien, A. G.; Blostein, R. Mechanisms of sodium pump regulation. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 279 (3): 541-566, 2000.

Urata, H. Pathological involvement of chymase-dependent angiotensin II formation in the development of cardiovascular disease. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 1(2): 35-37, 2000.

Vallance, P.; Calver, A.; Collier, J. The vascular endothelium in diabetes and hypertension. *Journal of hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension*. 10(1): 25-29, 1992.

Van Breemen, C.; Chen, Q.; Laher, I. Superficial buffer barrier function of smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Trends in Pharmacological Sciences*. 16: 98-105, 1995.

Vanhoutte, P. M.; Lorenz, R. R. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibitors and the adrenergic neuroeffector interaction in the blood vessel wall. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 6 (1): 88-94, 1984.

Vargas, F. M.; Favarato, F. F.; Santos, F. Stefanon, I.; De Almeida Rocha, W. Efeitos da irradiação laser de baixa intensidade no coração de ratas após o infarto do miocárdio. In: XIX Reunião Anual – Fesbe - Federação de Sociedades de Biologia Experimental. 25 a 28/08 de 2004. Águas de Lindóia – SP.



Vassalle, M. Contribution of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pump to the membrane potential. *Experientia*. 43: 1135-1140, 1987.

Vassallo, D. V.; Songu-Mize, E.; Rossoni, L. V.; Amaral, S. M. Effects of ouabain on vascular reactivity. *Brazilian Journal of Medical And Biological Research*. 30(4): 545-552, 1997.

Vavilova, H. L.; Akopova, O. V.; Sahach VF. Endothelial factors in the regulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase. *Fiziologicheskiĭ Zhurnal*. 46: 101-17, 2000.

Ver, A.; Szanto, I.; Banyasz, T.; Csermely, P.; Vegh, E.; Somogyi, J. Changes in the expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase isoenzymes in the left ventricle of diabetic rat hearts: effect of insulin treatment. *Diabetologia*. 40: 1255-62, 1997.

Vidal, B.; Roig, E.; Perez-Villa, F.; Orus, J.; Perez, J.; Jimenez, V.; Leivas, A.; Cuppoletti, A.; Roque, M.; Sanz, G. Prognostic value of cytokines and neurohormones in severe heart failure. *Revista Española de Cardiología*. 55(5): 481-486, 2002.

Vrbjar, N.; Bernatova, I.; Pechanova, O. Changes of sodium and ATP affinities of the cardiac (Na,K)-ATPase during and after nitric oxide deficient hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 202: 141-147, 1999.

Webb, R. C.; Bohr, D. F. Potassium-induced relaxation as an indicator of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity in vascular smooth muscle. *Blood vessels*. 15: 198-207, 1978.

Weiss, D. N.; Podberesky, D. J.; Heidrich, J.; Blaustein, M. P. Nanomolar ouabain augments caffeine-evoked contractions in rat arteries. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 265: 1443–1448, 1993.

Wendt-Gallitelli, M. F.; Voigt, T.; Isenberg, G. Microheterogeneity of subsarcolemmal sodium gradients. Electron probe microanalysis in guinea-pig ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*. 472: 33–44, 1993.

Woo, A. L.; James, P. F.; Lingrel, J. B. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(27): 20693–20699, 2000.

Xavier, F. E.; Rossoni, L. V.; Alonso, M. J.; Balfagon, G.; Vassallo, D. V.; Salaices, M. Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in alpha-adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology*. 143(1): 215-225, 2004a.

Xavier, F.E.; Yogi, A.; Callera, G. E.; Tostes, R.C.; Alvarez, Y.; Salaices, M.; Alonso, M. J.; Rossoni, L. V. Contribution of the endothelin and renin-angiotensin systems to the vascular changes in rats chronically treated with ouabain. *British Journal of Pharmacology*. 143(6): 794-802, 2004b.

Xie, J.; Wang, Y.; Summer, W. R.; Greenberg, S. S. Ouabain enhances basal release of nitric oxide from carotid artery. *The American Journal of the Medical Sciences*. 305(3): 157-163, 1993.

Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S.; Goto, K.; Masaki, T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels. *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension*. 6(4): 188-191, 1988.

Zemel, M. B.; Johnson, B. A.; Ambrozy, S. A. Insulin-stimulated vascular relaxation. Role of Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *American Journal of Hypertension*. 9: 637-641, 1992.