

**BAIXA CONCENTRAÇÃO DE OUABAÍNA PROMOVE  
AUMENTO DA LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO  
MEDIADA PELA AKT, EM ANÉIS DE AORTA DE  
RATOS COM E SEM SINAIS DE INSUFICIÊNCIA  
CARDÍACA APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO**

Fabiana Dayse Magalhães Siman

**Tese de doutorado em Ciências Fisiológicas**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, Março de 2011

---

Siman, Fabiana Dayse Magalhães, 1981

**Baixa concentração de ouabaína promove aumento da liberação de óxido nítrico mediada pela Akt, em anéis de aorta de ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio.** [Vitória] 2011

154 p. 29;7 cm (UFES, D. Sc., Ciências Fisiológicas, 2011)

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF

1. Ouabaína 2. Reatividade vascular 3. Infarto do miocárdio 4. Insuficiência Cardíaca

---

# **Baixa Concentração de Ouabaína Promove Aumento da Liberação de Óxido Nítrico Mediada pela Akt, em Anéis de Aorta de Ratos com e sem Sinais de Insuficiência Cardíaca após Infarto do Miocárdio**

**Fabiana Dayse Magalhães Siman**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Apresentada e aprovada em \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_, por:

---

Profª. Drª. Alessandra Simão Padilha – Orientadora - UFES.

---

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Co-orientador - UFES.

---

Profª. Drª. Denise Coutinho Endringer – IFES, UUV.

---

Profª. Drª. Ivanita Stefanon – UFES.

---

Profª. Drª. Luciana Venturini Rossoni – USP.

---

Profª. Drª. Sandra Lia do Amaral – UNESP

Coordenador do PPGCF:

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Março de 2011

**“A vontade de Deus nunca irá levá-lo aonde a Graça de Deus não possa protegê-lo”.**

**“Tudo posso naquele que me fortalece”  
Filipenses 4:13**

**Dedico este trabalho ao Eduardo, amor da minha vida, aos meus irmãos Alessandro, Adriana e Christian, e aos meus maiores mestres, meus amados pais, Leme e Lourdes.**

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, por sempre guiar meus passos e estar presente em todos os momentos da minha vida.

Toda a minha trajetória científica não seria possível sem o apoio incondicional da minha família, base de tudo na minha vida: Agradeço aos meus pais, por todo amor e ensinamentos na escola da vida. Vocês são meus maiores mestres. Obrigada por tudo que fizeram por mim e que contribuíram para eu estar aqui hoje. Obrigada pela paciência e compreensão nos meus vários momentos de ausência. Aos meus irmãos, obrigada pelo incentivo e apoio, mesmo à distância.

Ao Eduardo, amor da minha vida, daqui até a eternidade. Obrigada por todo amor, compreensão e, sobretudo paciência nos meus momentos de aflição com os experimentos. Obrigada pela sua presença e apoio em tudo que fiz e faço até hoje. Além de marido, companheiro e amigo, é um colega de profissão que admiro e me espelho muito. Saiba que você é meu grande incentivador. A você, todo o meu amor hoje e sempre.

Minha trajetória no LEMC começou durante a graduação. Eu, aluna do curso de farmácia, cansada de pesar e homogeneizar fármacos em uma farmácia de manipulação, queria mais. Queria fazer pesquisa. E estou hoje aqui devido ao pontapé inicial da professora e amiga, Dr<sup>a</sup>. Vinícia Campana Biancardi, que muito me incentivou e ensinou o “caminho” para chegar até o LEMC.

Foi quando conheci nosso amado Chefe (Dr. Dalton Valentim Vassallo), que como sempre, escancarou as portas do LEMC para mim. Chefinho, muito obrigada por tudo. Obrigada por todas as oportunidades que me deu aqui no LEMC. Você faz parte de uma espécie rara de orientador. Aquele que nos incentiva, que nos dá oportunidade de crescer com nossas próprias pernas. Aquele que, mesmo no dia mais atarefado, sempre tem um tempinho para ouvir nossos choros e angústias. Obrigada por todos os ensinamentos, por toda a sua sabedoria que nos inspira e

nos faz verdadeiros apaixonados pela pesquisa. E é claro, obrigada por todos os bons momentos de convivência no LEMC, com sua alegria e bom humor.

E durante a iniciação científica, “ganhei” uma co-orientadora, que hoje, se tornou minha orientadora oficial. A você, Dr<sup>a</sup> Alessandra Simão Padilha, todo o meu agradecimento hoje e sempre. Pois se estou aqui hoje, muito devo a você, que me acolheu como sua aluna desde a iniciação. Obrigada por todos os ensinamentos, pela orientação, pelo apoio e incentivo que sempre me deu em todos os momentos. Pela paciência, sobretudo nos meus dias de TPM. Pela calma e disponibilidade para ouvir meus choros e reclamações, e pelos bons conselhos científicos e pessoais. Seu jeito doce de falar muito me acalmou naqueles momentos de angústia. Não ganhei apenas uma orientadora neste meu tempo de LEMC, mas também uma grande amiga, que está sempre presente na minha vida. Alê, obrigada mesmo por tudo.

Além do nosso querido “Chefe”, nós também temos uma “Chefa” muito especial, Dr. Ivanita Stefanon. Iva, obrigada por todos os ensinamentos e apoio durante todo este tempo. Pelo incentivo que sempre me deu nos concursos da vida. Por estar sempre disponível para tirar minhas dúvidas e discutir algum resultado. Obrigada por todos os bons momentos vividos, principalmente durante o tempo que passei na “Ala de baixo do LEMC”, ou nas nossas famosas e agora tradicionais festas na sua casa. Além de Chefa, você é uma colega de profissão por quem tenho enorme admiração.

Mas essa Tese não teria sido desenvolvida sem a colaboração de algumas pessoas: Obrigada Aurélia, pela colaboração com o infarto e pelas boas tardes de conversa enquanto infartava os ratinhos. Obrigada Keli, pela amizade e pela ajuda no início dos experimentos da aorta. Obrigada Pri, pela sua amizade e disposição em me ajudar na reta final dos experimentos. Nunca me esquecerei dos dias que cuidava de mim, levando almoço, lanche e tudo mais. Marcelo e Thaís, obrigada pelo carinho e amizade que se fortalece a cada dia. Marcelo, muito obrigada pelas várias vezes que “quebrou o meu galho” no infarto. Pelas discussões e boas idéias. Tatá, foi uma pena saber que nos damos tão bem só agora no final da minha tese. A combinação no jeito de trabalhar foi espetacular. Obrigada pela amizade, pelos bons momentos vividos durante o western blot e pelas longas discussões sobre infarto.

O meu agradecimento especial, para minha amiga e colaboradora deste trabalho, Edna. Obrigada por essa colaboração maravilhosa que tivemos. A sintonia entre nós duas durante os experimentos era de se espantar. Isso sem contar nos dias em que dávamos a louca de fazer faxina no LEMC. Tenho que confessar que já estou com saudades dessa fase. Foram vários dias de experimento, mas também de muita partilha e confidências. *Ed*, obrigada pela amizade, pelos conselhos, e por sempre ter palavras abençoadas que me acalma e me faz seguir em frente. Sua amizade é um presente de Deus na minha vida. Minha amiga, minha irmã, obrigada mesmo por tudo.

Além de todos que me ajudaram diretamente neste trabalho, também quero agradecer aos demais colegas do LEMC. Obrigada pela amizade, mesmo naqueles dias de TPM, pelo aprendizado científico e por todos os momentos partilhados, sejam eles dentro ou fora do laboratório. Tenham certeza de que esses momentos serão sempre lembrados com muito carinho.

Também não posso me esquecer de todos aqueles que já passaram pelo LEMC, e que, apesar de distantes, restam as boas lembranças e amizades que foram construídas. Meu agradecimento especial à Cleci, Creide (Luciana Camilo), Viviane, Juliana e Núbia, pelos bons momentos partilhados.

Às professoras Denise Coutinho Endringer, Ivanita Stefanon, Luciana Venturini Rossoni e Sandra Lia do Amaral, por terem gentilmente aceito o convite para participar da discussão desse trabalho.

Aos professores, colegas e funcionários da Pós-Graduação. Em especial, meu agradecimento ao Marildo. Obrigada por sempre estar disposto a me ajudar quanto à disponibilidade de ratos e pelos momentos de descontração partilhados. À Maria, Net e Luzia, que durante a limpeza e café, sempre têm aquele sorriso amigável que nos conforta até mesmo nas horas mais críticas dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pelo apoio financeiro.

## Resumo

A ouabaína (OUA) é um glicosídeo cardíaco endógeno presente em concentrações nanomolares no plasma de mamíferos. Sua concentração encontra-se elevada no infarto do miocárdio (IM) e na insuficiência cardíaca (IC). Trabalhos têm demonstrado que a OUA tem um papel importante na disfunção e falência cardíaca, podendo atuar como um marcador que prediz a progressão da IC. No entanto, os efeitos vasculares de baixa concentração de OUA no IM e na IC ainda não foram descritos. Diante disso, o presente trabalho investigou os efeitos agudos de 3nM de OUA na reatividade vascular de ratos que desenvolveram ou não sinais de IC após IM, bem como propôs os possíveis mecanismos de ação desse glicosídeo. Para isso, o IM foi induzido, mediante a oclusão da artéria coronária, e os animais foram divididos em três grupos: cirurgia fictícia (SHAM), INF (ratos sem sinais de IC) e IC (ratos com sinais de IC). Quatro semanas após IM, foram avaliados os parâmetros ponderais e hemodinâmicos dos três grupos, e a reatividade vascular à fenilefrina (FE) em anéis de aorta na presença e na ausência de OUA.

Os ratos IC apresentaram redução do peso corporal (PC), aumento da razão pulmão/PC e ventrículo direito/PC, comparado aos demais grupos. Já o grupo INF, apresentou aumento da razão pulmão/PC e ventrículo direito/PC comparado ao SHAM. A área de infarto não diferiu entre os grupos. Quanto aos parâmetros hemodinâmicos, observou-se um aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) no grupo IC quando comparado aos demais. Além disso, houve uma redução das derivadas máxima e mínima de pressão sobre tempo do VE nos grupos INF e IC.

A resposta à FE aumentou no grupo IC e permaneceu inalterada no INF. A modulação do endotélio foi menor no INF quando comparado ao SHAM. Quando a OUA foi incubada, observou-se uma redução da resposta à FE nos três grupos, sendo este efeito mediado pelo endotélio. Após incubação com L-NAME, houve um aumento da resposta à FE nos três grupos, porém, essa resposta foi menor nos grupos INF e IC. A incubação com L-NAME+OUA potencializou a resposta à FE nos três grupos, sugerindo que OUA aumenta a produção de óxido nítrico (NO). A aminoguanidina não alterou a reatividade à FE nos três grupos, entretanto, após



incubação de aminoguanidina+OUA, houve um aumento da resposta à FE nos grupos INF e IC, sugerindo a participação do NO oriundo da iNOS nos efeitos da OUA. O wortmannin não alterou a resposta à FE nos três grupos. Entretanto, a incubação de wortmannin+OUA promoveu aumento da reatividade à FE nos grupos INF e IC, sugerindo uma participação da via PI3K/Akt na produção de NO induzida pela OUA. A incubação com TEA promoveu um aumento da resposta à FE em todos os grupos, entretanto este efeito foi menor no INF. Quando a ouabaína foi incubada juntamente com TEA, a resposta à FE foi maior nos grupos INF e IC, sugerindo que a OUA estimula a liberação de um fator abridor de canais para potássio. A expressão protéica da eNOS, Akt e pAkt não diferiu entre os grupos, porém, na presença de OUA, houve aumento da razão pAkt/Akt nos grupos INF e IC.

Os resultados demonstram que a OUA diminui a reatividade vascular à FE nos ratos SHAM, INF e IC. Essa redução de resposta à FE está associada a um aumento da biodisponibilidade de NO. Portanto, a OUA é capaz de aumentar a produção de NO, porém atua através de mecanismos distintos. Em ratos SHAM, a OUA aumenta a produção de NO por mecanismos independentes da iNOS e da via PI3K/Akt. Já em ratos INF e IC, a OUA aumenta a produção de NO por mecanismos dependentes da iNOS e da via PI3K/Akt. Além disso, nesses últimos grupos, a OUA também aumenta a ativação de canais para potássio. Esses resultados sugerem um efeito benéfico da OUA após o IM e na IC, já que esse digitálico é capaz de reverter, pelo menos parcialmente, a redução de fatores vasodilatadores, como o NO e algum fator que atua através da abertura de canais para potássio, presentes nessas condições.

## Abstract

Ouabain (OUA) is an endogenous compound present in nanomolar concentration in the plasma of mammals. In myocardial infarction (MI) and in heart failure (HF) plasma OUA concentration is increased. Previous reports have demonstrated that OUA may have a primary role in causing cardiac dysfunction and failure, may act as marker that predicts the progression of HF. However, the vascular effects of OUA in the MI and in the HF have not been reported yet. Thus, the present study investigated the acute effects of 3nM of OUA on the vascular reactivity of rats that developed or not HF after MI, and proposed the possible mechanisms of action of digitalis. For this, the MI was induced by coronary ligation and the animals were divided in three groups: fictitious surgery (SHAM), INF (rats without signs of HF) and IC (rats with signs of HF). Four weeks after MI, were evaluated the weight and hemodynamic parameters of the three groups, and vascular reactivity to phenylephrine (PHE) in aortic rings in the presence and absence of the OUA.

The IC group showed decreased body weight (BW), increased lung/BW ratio and right ventricle/BW ratio, compared to other groups. The INF group showed increased lung/BW ratio and right ventricle/BW ratio, compared to SHAM. Infarct size was similar in both groups. Regarding hemodynamic parameters, we observed an increase in left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) in group IC compared to the others. Moreover, we observed a reduction of the positive and negative rates of pressure development in the INF and IC.

The response to PHE increased in IC group and remains unchanged in the INF. The endothelium modulation was smaller in INF compared to SHAM. After incubation with OUA, we observed a reduction in response to PHE in all groups. This effect was mediated by endothelium. The incubation with L-NAME increased the reactivity to PHE in all groups, but, this response was smaller in INF and IC groups. The incubation with L-NAME+OUA potentiated the response to PHE in the three groups, suggesting that OUA increases nitric oxide (NO) production. Aminoguanidine did not alter the reactivity to PHE in the three groups, but, after incubation with aminoguanidine+OUA, the response to PHE in INF and IC increased. This suggests the participation of NO derivate of iNOS in the OUA effects. The wortmannin did not alter the response to PHE in the three groups. However, the incubation with wortmannin+OUA increased the response to PHE in INF and IC

groups. This suggests the participation of PI3K/Akt pathways in the NO production induced by OUA. The TEA increased the reactivity to PHE in all groups, but this effect was smaller in INF group. The coincubation with TEA and OUA increased this response in INF and IC groups, suggesting that OUA stimulates the release of a factor that seems to open potassium channels. The protein expression of eNOS, Akt and pAkt was not different between groups. However, in the presence of OUA, we observed an increased of pAkt/Akt ratio in the INF and IC groups.

Results presented in the current study suggest that OUA decreases vascular reactivity to PHE in SHAM, INF and IC. This reduction in response to PHE is associated with an increased bioavailability of NO. Therefore, the OUA is able to increase NO production, but acts through different mechanisms. In the SHAM rats, OUA increases NO production by independent mechanism of iNOS and PI3K/Akt pathways. In the INF and IC rats, the OUA increases NO production by dependent mechanism of iNOS and PI3K/Akt pathways. Moreover, in these latter groups, the OUA also increases potassium channels activation. These results suggest a beneficial effect of the OUA after MI and HF, since that this digitalis is capable of reversing, at least partially, the reduction of vasodilators factors, such as NO and a factor that seems to open potassium channels, in those conditions.

## Lista de Siglas e Abreviaturas

ACh - Acetilcolina

AI – área de infarto

AMPc – 3'5'-monofosfato cíclico de adenosina

ATP – 5'-trifosfato de adenosina

BH<sub>4</sub> - tetrahidrobiopterina

CaMKII - proteína quinase II dependente de calmodulina

dAAC – diferença da área abaixo da curva

DAF- 4,5-diaminofluoresceína

DAG - diacilglicerol

DMSO - dimetilsulfóxido

dP/dt- - primeira derivada de pressão negativa

dP/dt+ - primeira derivada de pressão positiva

EDHF - Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRF - fator de relaxamento dependente de endotélio

EGFR - receptor do fator de crescimento epitelial

eNOS - Sintase de óxido nítrico endotelial

ERK - Proteína quinase regulada por um sinal extracelular

EROs - Espécies reativas do oxigênio

ETTs - epoxieicosatrienóicos

FAD - flavina adenina dinucleotídeo

FC - frequência cardíaca

FE – fenilefrina

FMN - flavina mononucleotídeo

GMPc – 3'5'- monofosfato cíclico de guanosina

GTP - trifosfato de guanosina

Hsp90 - proteína de choque térmico

IC – ratos infartados com sinais de insuficiência cardíaca

IK<sub>Ca</sub> - canais de potássio ativados por cálcio de intermediária condutância

IM - infarto do miocárdio

INF - ratos infartados sem sinais de insuficiência cardíaca

iNOS - Sintase de óxido nítrico induzível

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

L-NAME – N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil ester  
MLCK - quinase da cadeia leve da miosina  
MLV - Músculo Liso Vascular  
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
nNOS - Sintase de óxido nítrico neuronal  
NO - Óxido nítrico  
NOS - Sintase de óxido nítrico  
OUA – ouabaína  
PAD – pressão arterial diastólica  
PAM – pressão arterial média  
PAS – pressão arterial sistólica  
PDFVE - pressão diastólica final do ventrículo esquerdo  
PGF<sub>2α</sub> - prostaglandinas F<sub>2α</sub>  
PGH<sub>2</sub> - prostaglandinas H<sub>2</sub>  
PGI<sub>2</sub> - prostaciclina  
PI3K - fosfatidilinositol 3 quinase  
PKA – proteína quinase A  
PKC – proteína quinase C  
PKG – proteína quinase dependente de GMPc  
PLC - fosfolipase C  
PSVE - pressão sistólica no ventrículo esquerdo  
ROCs - canais operados por receptores  
RS - retículo sarcoplasmático  
SAC - canais de cálcio ativados por estiramento  
Scr - Proteínas tirosina quinase  
SK<sub>Ca</sub> - canais de potássio ativados por cálcio de baixa condutância  
SOCs - canais operados por estoques  
Src - proteína tirosina quinase Src  
TEA - tetraetilamônio  
TRPC - transient receptor potential channel proteins  
TXA<sub>2</sub> - tromboxano A<sub>2</sub>  
VEGF - fator de crescimento vascular endotelial  
VOCs - canais de cálcio operados por voltagem

## Sumário

<b>I. Introdução.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2. Fator endógeno inibidor da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase .....</b>	<b>18</b>
1.2.1. Mecanismo do <i>plasmersome</i> .....	21
1.2.2. Papel de sinalização da Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase.....	23
<b>1.3. Infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca.....</b>	<b>25</b>
1.3.1. Infarto do miocárdio experimental.....	26
1.3.2. Alterações morfológicas e vasculares após infarto do miocárdio.....	26
<b>1.4. Músculo liso vascular.....</b>	<b>29</b>
1.4.1. Endotélio vascular.....	30
1.4.1.1. Óxido nítrico.....	31
1.4.1.2. Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF).....	35
<b>1.5. Ouabaína e fisiopatologia do infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca.....</b>	<b>36</b>
<b>II. Objetivos.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1. Objetivo geral.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>39</b>
<b>III. Materiais e Métodos.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1. Animais experimentais .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2. Realização do infarto do miocárdio.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3. Medidas hemodinâmicas.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4. Avaliação da área de infarto e hipertrofia cardíaca.....</b>	<b>42</b>
<b>3.5. Identificação dos grupos experimentais.....</b>	<b>42</b>
<b>3.6. Metodologia empregada para estudo da reatividade vascular em anéis de aorta.....</b>	<b>42</b>
3.6.1. Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio.....	44
3.6.2. Avaliação da integridade funcional do endotélio.....	45

3.6.3. Protocolos experimentais.....	46
3.6.3.1. Efeito da ouabaína (3 nM) sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta.....	46
3.6.3.2. Modulação do endotélio nas ações da ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta.....	47
3.6.3.3. Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no efeito da ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta.....	47
3.6.3.3.1. Influência do óxido nítrico no efeito ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta.....	48
3.6.3.3.2. Participação do óxido nítrico derivado da via PI3K/Akt no efeito ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta.....	48
3.6.3.3.3. Influência dos canais para potássio no efeito ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	49
<b>3.7. Medida dos níveis de óxido nítrico nos anéis de aorta após incubação com ouabaína.....</b>	<b>49</b>
<b>3.8. Western blot.....</b>	<b>50</b>
3.8.1. Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS), da Akt e Akt fosforilada.....	50
3.8.1.1. Preparação do tecido e quantificação das proteínas.....	50
3.8.1.2. Eletroforese e Transferência das Amostras.....	51
3.8.1.3. Incubação dos anticorpos.....	51
3.8.1.4. Detecção das proteínas.....	52
<b>3.9. Expressão dos resultados e análises estatísticas.....</b>	<b>53</b>
<b>3.10. Fármacos e reagentes utilizados.....</b>	<b>54</b>
<b>IV. Resultados.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1. Medidas hemodinâmicas.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2. Parâmetros ponderais e extensão do infarto.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3. Estudo da reatividade vascular em anéis de aorta.....</b>	<b>58</b>
4.3.1. Respostas vasculares ao KCl e à fenilefrina.....	58
4.3.2. Efeito da ouabaína (3 nM) sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	60

4.3.3. Modulação do endotélio nas ações da ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	61
4.3.4. Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no efeito da ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta.....	68
4.3.4.1. Influência do óxido nítrico no efeito ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta.....	69
4.3.4.2. Participação do óxido nítrico derivado da via PI3K/Akt no efeito ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta..	79
4.3.4.3. Influência dos canais para potássio no efeito ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	85
<b>4.4. Medida dos níveis de óxido nítrico nos anéis de aorta após incubação com ouabaína.....</b>	<b>90</b>
<b>4.5. Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS), da Akt e Akt fosforilada.....</b>	<b>91</b>
<b>V. Discussão.....</b>	<b>96</b>
<b>5.1. Parâmetros hemodinâmicos, ponderais e extensão do infarto.....</b>	<b>97</b>
<b>5.2. Efeito da ouabaína na reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio.....</b>	<b>100</b>
<b>VI. Conclusão.....</b>	<b>113</b>
<b>VII. Referências.....</b>	<b>115</b>



## I. Introdução

Os glicosídeos cardíacos foram descobertos por William Withering, em 1785, quando investigava as ações das folhas de uma planta chamada foxglove, que posteriormente, foi denominada *Digitalis purpurea*. Eles são divididos em dois grupos: cardenolídeos e bufadienolídeos. A ouabaína, um cardenolídeo, foi descoberta por um antropologista francês, quando analisava o veneno de flexas da tribo Maasai, na África. Esta substância é originada da semente de plantas africanas como a *Strophantus gratus* ou da árvore Ouabaio (*Acocanthera ouabaio*), membros da família *Apocynaceae*, que inclui um variado número de espécies que produzem substâncias cardioativas (Withering, 1785; Blaustein & Hamlyn, 2010).

Desde então, os esteróides cardiotônicos produzidos pelas plantas digitálicas têm sido usados no tratamento da insuficiência cardíaca (Withering, 1785). Porém, apenas na década de 50 que foi descoberto o receptor para os glicosídeos cardíacos. Schatzmann, em 1953, descobriu que a bomba de sódio da membrana plasmática é o receptor para os glicosídeos cardíacos e que estes são inibidores específicos dessa enzima (Hauptman & Kelly, 1999; Schoner, 2002). Assim, os glicosídeos cardíacos, como a ouabaína, exercem sua ação farmacológica através da inibição da bomba de sódio.

Para uma melhor compreensão das ações da ouabaína, é necessário um detalhamento do seu receptor, a  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase.

### 1.1. $\text{Na}^+\text{K}^+$ ATPase

A  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase, também conhecida como bomba de sódio, descrita por Skou em 1957, é uma proteína integral de membrana, presente na maioria das células eucarióticas. Faz parte da família de ATPases tipo P, que são responsáveis pelo transporte ativo de uma variedade de cátions através da membrana, como o sódio, hidrogênio, magnésio, potássio, cálcio, cobre e cádmio (Scheiner-Bobis, 2002).

A bomba de sódio é formada pelas subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Blanco & Mercer, 1998). A subunidade  $\alpha$ , com peso molecular aproximado de 113 kDa, é composta de 10 domínios transmembranais. É responsável pelas propriedades catalíticas e de transporte da enzima, contendo sítios de ligação para sódio e glicosídeos cardíacos no seu segmento extracelular e para potássio e trifosfato de adenosina (ATP), na sua alça intracelular (Rose & Valdes, 1994; Blanco & Mercer, 1998; Bagrov *et al*,

2009). A subunidade  $\beta$ , com aproximadamente 55 kDa, possui apenas um domínio transmembrana e é altamente glicosilada. Esta subunidade é essencial para a maturação e atividade normal da enzima, e parece estar envolvida na modulação da afinidade da enzima ao  $K^+$  e  $Na^+$ , além de facilitar o ancoramento e estabilização da subunidade  $\alpha$  na membrana (Blanco & Mercer, 1998). A subunidade  $\gamma$ , também chamada de FXD2, com peso molecular aproximado de 14 kDa, faz parte do grupo de sete proteínas transmembranas, conhecido como FXD. Essas proteínas não são partes integrais da bomba de sódio, mas estão co-localizadas ao complexo  $\alpha\beta$ , e modulam as propriedades catalíticas dessa enzima (Cornelius & Mahmoud, 2003; Crambert & Geering, 2003; Zouzoulas *et al.*, 2003).

Como as outras proteínas essenciais da célula, a bomba de sódio é expressa como várias isoenzimas. Assim, existem múltiplas isoformas das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , cuja expressão varia de acordo com cada tecido (Blanco & Mercer, 1998). A subunidade  $\alpha$  possui quatro isoformas:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_4$ . A isoforma  $\alpha_1$  está presente em praticamente todos os tecidos, já a isoforma  $\alpha_2$  é expressa nos adipócitos (Lytton *et al.*, 1985), músculo esquelético (Hundal *et al.*, 1992), coração (Zahler *et al.*, 1992; Shamraj *et al.*, 1993), cérebro (Urayama *et al.*, 1989; McGrail *et al.*, 1991), músculo liso vascular (Zhang *et al.*, 2005), cartilagem e ossos (Mobasher *et al.*, 2000). A isoforma  $\alpha_3$  é abundante no sistema nervoso central, estando também presente no coração, células sanguíneas, ovários e músculo liso vascular (Sahin-Erdemli *et al.*, 1995), enquanto a isoforma  $\alpha_4$  foi descrita apenas em testículos de ratos (Shamraj & Lingrel, 1994; Blanco & Mercer, 1998). Essas isoformas também se diferenciam de acordo com a afinidade aos compostos digitálicos. A isoforma que apresenta maior sensibilidade a esses compostos é  $\alpha_3$ , seguida pela  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ , sendo esta última, a menos sensível (Blanco & Mercer, 1998).

Já a subunidade  $\beta$  pode ser encontrada sob três isoformas:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ . A isoforma  $\beta_1$  é largamente distribuída em todos os tecidos enquanto as isoformas  $\beta_2$  e  $\beta_3$  são expressas no cérebro, cartilagem e eritrócitos. A isoforma  $\beta_2$  também é encontrada em tecidos cardíacos e a isoforma  $\beta_3$  nos pulmões (Blanco & Mercer, 1998; Bagrov *et al.*, 2009).

A  $Na^+K^+$  ATPase funciona como um sistema de transporte ativo, responsável pela manutenção dos gradientes de sódio e potássio através da membrana plasmática. Esta enzima, usando a energia da hidrólise de uma molécula de ATP, transporta 3 íons sódio do meio intracelular e 2 íons potássio do meio extracelular. O

gradiente eletroquímico gerado pela bomba de sódio é responsável pela manutenção do balanço osmótico e do potencial de membrana das células e pelas propriedades excitáveis das células musculares e nervosas. Em adição, o gradiente eletroquímico do sódio, fornece energia para os sistemas de transporte secundário, como o transporte de íons e de substratos como a glicose e aminoácidos. Nos rins, a  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase tem um papel importante na reabsorção de sódio e água, fator essencial para a manutenção do volume extracelular e pressão sanguínea (Blanco & Mercer, 1998; Scheiner-Bobis, 2002; Geering, 2006). Além disso, a  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase, através do controle da concentração citoplasmática de sódio, influencia também as concentrações de cálcio, via trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , participando então, da contração do músculo liso e cardíaco (Blaustein, 1993; Marin & Redondo, 1999; Geering, 2006). Portanto, esta enzima é essencial, pois controla diversas funções vitais para a célula.

Diversos fatores podem modular a atividade da bomba de sódio em diferentes tecidos. No músculo liso vascular, a atividade dessa enzima é estimulada por substâncias vasoativas derivadas do endotélio, dentre elas, o óxido nítrico, a angiotensina II, a endotelina-1 e a prostaciclina (Gupta *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1996, Marin & Redondo, 1999). Outros fatores como a concentração intracelular de sódio e potássio (Aydemir-Koksoy & Allen, 2001; Zhou *et al.*, 2003), fosforilação por proteínas quinases (Blanco & Mercer, 1998) e insulina (Feraille *et al.*, 1999; Therien & Blostein, 2000) também modulam a atividade dessa enzima. Em adição aos efeitos regulatórios mediados por íons, hormônios e fatores endoteliais, recentes trabalhos demonstram que o fosfolema, proteína da família FXYD, também é capaz de modular a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase. Quando o fosfolema se encontra na sua forma desfosforilada, promove inibição da atividade da bomba de sódio, porém, na sua forma fosforilada, aumenta a atividade dessa enzima (Bossuyt *et al.*, 2005; Shattock 2009). Dessa maneira, estímulos  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos aumentam a atividade da bomba de sódio, já que ativam quinases, como a proteína quinase C (PKC) e a proteína quinase A (PKA), que fosforilam o fosfolema (Despa *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006).

Por causa da ação altamente seletiva dos digitálicos de se ligar na subunidade  $\alpha$  da bomba de sódio, surgiram especulações sobre a possível existência de um ligante endógeno, uma vez que a seqüência de aminoácidos e a conformação do sítio de ligação dos digitálicos, presente na bomba de sódio, têm

sido altamente conservadas em todas as espécies (Ringer, 1885; Schoner & Scheiner-Bobis, 2007; Lingrel, 2010).

## 1.2. Fator endógeno inibidor da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase

A procura pelo fator endógeno inibidor da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase começou na década de 60 quando de Wardener *et al.* (1961) demonstraram a presença de um hormônio natriurético circulante após expansão aguda de volume, que participava da regulação da excreção de sódio pelos rins. Mais tarde, pesquisas sugeriram que esse fator endógeno seria um inibidor da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase (Kramer *et al.*, 1969; Buckalew *et al.*, 1970). Seis anos depois, Haddy & Overbeck (1976) demonstraram que esse hormônio natriurético inibidor da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase participava da gênese de hipertensões dependentes de volume, já que nessas situações, a atividade da bomba de sódio se encontrava reduzida. Como esse fator endógeno possuía reação cruzada com anticorpos anti-digoxina, ele passou a ser chamado de fator *digitalis-like* (Gruber *et al.*, 1980).

Mais tarde, diversos pesquisadores mostraram estudos que correlacionava o fator endógeno inibidor da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase e a pressão sanguínea. Foi demonstrado que o plasma de alguns pacientes com hipertensão essencial continha um inibidor da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase que se correlacionava com a ingestão de sódio e com os níveis pressóricos desses pacientes (Poston *et al.*, 1981; Hamlyn *et al.*, 1982; Hasegawa *et al.*, 1987). Por muitos anos, vários laboratórios tentaram realizar a caracterização química desse hormônio. Em 1991, Hamlyn *et al.* purificaram o ligante endógeno do plasma humano e constataram que este fator *digitalis-like* é estruturalmente, biologicamente e imunologicamente semelhante à ouabaína. Várias evidências surgiram então comprovando essa semelhança do fator *digitalis-like* com a ouabaína: suas características físico-químicas como a massa do íon protonado e sua composição elementar (C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>O<sub>12</sub>), a alta afinidade pelo sítio de ligação dos glicosídeos cardíacos na bomba de sódio, suas propriedades de inibição da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase, suas ações cardiotônicas e vasopressoras, a alta reatividade cruzada com anticorpos policlonais para ouabaína, além das suas propriedades de eluição em diversos sistemas de cromatografia (Hamlyn *et al.*, 1991; Mathews *et al.*, 1991; Ludens *et al.*, 1991; Bova *et al.*, 1991). Todas essas características são semelhantes ao composto digitálico ouabaína derivado da *Strophantus gratus* e *Acocanthera*

*ouabaio*. A partir de então, esse fator endógeno passou a ser conhecido como fator *ouabain-like* ou ouabaína endógena.

A via de biossíntese desse composto em mamíferos foi demonstrada através da administração de certos precursores e conseqüente aumento da síntese de esteróides cardiotônicos. Assim, a progesterona e a pregnenolona têm sido relatadas como precursoras da ouabaína (Perrin *et al.*, 1997; Hamlyn *et al.*, 1998). Fortes evidências sugerem que as maiores fontes de produção de ouabaína nos mamíferos são a zona glomerulosa do córtex adrenal (Ludens *et al.*, 1992; Laredo *et al.*, 1994; Laredo *et al.*, 1995) e o hipotálamo (de Wardener & Clarson, 1985, Murrel *et al.*, 2005). Além disso, alguns autores demonstraram que a região anteroventral do terceiro ventrículo (Pamnani *et al.*, 1981; Songu-Mize *et al.*, 1982) e miócitos ventriculares também podem liberar ouabaína (D'Urso *et al.*, 2004). A produção de ouabaína pode ser estimulada pelo aumento da concentração plasmática de sódio e pela expansão de volume extracelular (de Wardener *et al.*, 1961; Blaustein, 1993; Yamada *et al.*, 1997). Além disso, outros estímulos da secreção de ouabaína como o hormônio adrenocorticotrópico e angiotensina II (Laredo *et al.*, 1997), agonistas  $\alpha_1$  adrenérgicos (Laredo *et al.*, 2000), estimulação  $\beta$ -adrenérgica durante o exercício físico (Bauer *et al.*, 2005), já foram identificados.

Além da relação da ouabaína com a hipertensão arterial (Hamlyn *et al.*, 1982), concentrações elevadas dessa substância têm sido encontradas em outras condições como insuficiência renal crônica (Hamlyn *et al.*, 1996), hiperaldosteronismo (Rossi *et al.*, 1995), insuficiência cardíaca congestiva (Gottlieb *et al.*, 1992), infarto agudo do miocárdio (Bagrov *et al.*, 1994), pré-eclampsia (Graves *et al.*, 1984, 1987), dentre outros.

O primeiro ou o modelo clássico para explicar a interação dos esteróides cardiotônicos, como a ouabaína, com a bomba de sódio, baseia-se na propriedade desses compostos de inibir a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase da membrana celular. Como a bomba de sódio é responsável pelo efluxo de 3 íons sódio e influxo de 2 íons potássio, quando o glicosídeo se liga e inibe essa enzima, ocorre um aumento de sódio intracelular, e com isso, despolarização celular. Conseqüentemente ocorre abertura dos canais para cálcio dependentes de voltagem e aumento de cálcio intracelular (Vassalle, 1987; Marin *et al.*, 1988). O aumento de sódio intracelular também promove redução ou inibição da atividade do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , aumentando as concentrações de cálcio intracelular. Com isso, o retículo

sarcoplasmático é capaz de estocar uma quantidade maior de cálcio (Blaustein, 1993; Wasserstrom & Aistrup, 2005). Assim, através da amplificação nas concentrações intracelulares de cálcio, a ouabaína pode aumentar a contração do músculo liso vascular, por exemplo. Além disso, como a recaptção de noradrenalina nas terminações perivasculares simpáticas envolve um sistema de co-transporte dependente da concentração intracelular de sódio, a inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase pela ouabaína provoca um aumento da liberação de noradrenalina e uma redução na sua captação, induzindo também, contração do músculo liso vascular (Vanhoutte & Lorenz, 1984; Marin *et al.*, 1988). Todavia, os efeitos da ouabaína no transiente de cálcio podem ser visto também nos neurônios (Blaustein *et al.*, 1991), plaquetas (Roevens *et al.*, 1990) e músculo cardíaco (Lee, 1985). Isso mostra que a ouabaína, através dos seus efeitos no gradiente eletroquímico de sódio e, indiretamente, no trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , modula os estoques intracelulares de cálcio em diversos tipos de células e assim, tem um papel importante na homeostase celular (Blaustein, 1993).

Entretanto, esse modelo clássico ocorre com altas concentrações de ouabaína ( $\geq 0,1\text{mM}$ ), ou seja, com concentrações não-fisiológicas (Blaustein, 1993). Sabendo que os níveis fisiopatológicos de ouabaína circulante compreendem concentrações nanomolares, dois diferentes mecanismos são propostos para explicar as ações desse digitálico (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007).

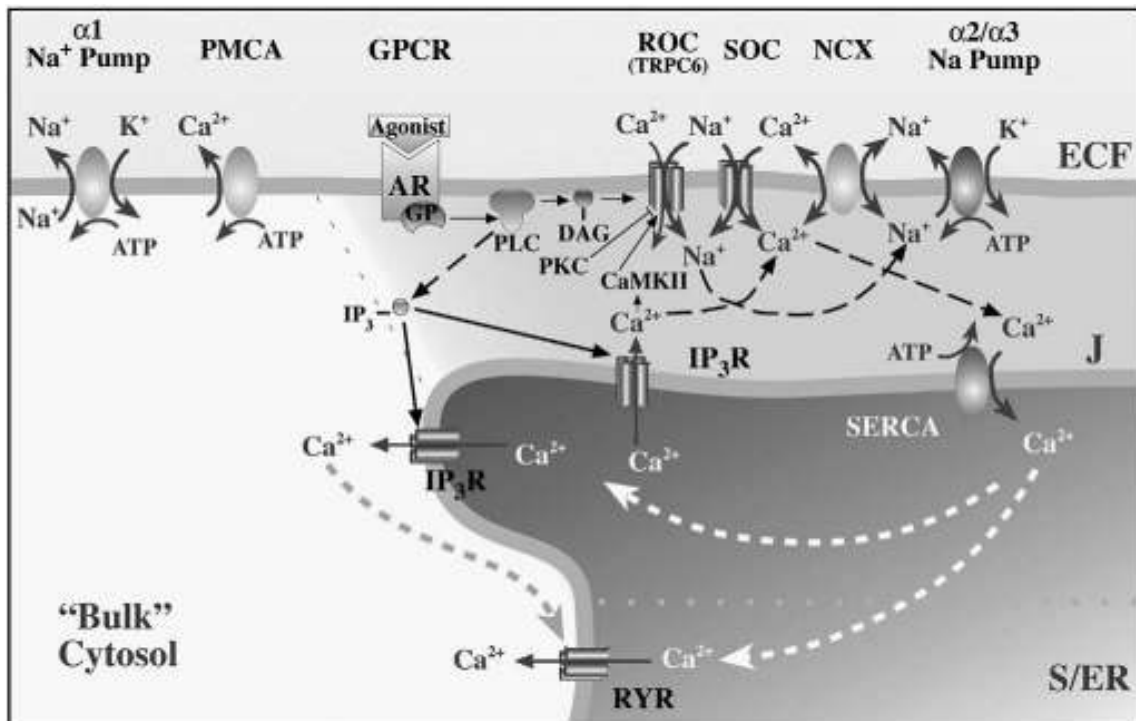
### **1.2.1. Mecanismo do *plasmersome***

Esse mecanismo foi descrito pelo grupo do professor Blaustein com a identificação de uma microrregião da célula denominada *plasmersome*. A descoberta desse microdomínio da membrana plasmática elucidou o papel das diferentes isoformas da subunidade  $\alpha$  da bomba de sódio. Isso porque esse mecanismo se baseia no fato de que, no músculo liso vascular e em outros tipos de células, como os miócitos cardíacos, as isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  estão confinadas a microdomínios da membrana plasmática justapostos ao retículo sarcoplasmático. Além disso, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , e as várias proteínas TRPC (transient receptor potential channel proteins), que são componentes dos ROCs (canais operados por receptores) e SOCs (canais operados por estoques), estão confinadas neste mesmo microdomínio (Juhaszova & Blaustein, 1997a, 1997b; Harteneck *et al.*, 2000;

Golovina, 2005; Pulina *et al.*, 2009). Assim, essas estruturas formam uma unidade funcional, denominada *plasmersome*. Em contraste, a isoforma  $\alpha_1$  da bomba de sódio está distribuída uniformemente na membrana plasmática, mas é aparentemente excluída desta microrregião (Song *et al.*, 2006; Blaustein & Hamlyn, 2010).

A distribuição uniforme da isoforma  $\alpha_1$  da bomba de sódio na membrana plasmática implica no controle, primariamente, da concentração citosólica de sódio. Em contraste, as isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  regulam a concentração local de sódio na região do *plasmersome*, que indiretamente, influencia o transporte e o estoque de cálcio (Blaustein *et al.*, 2009; Blaustein & Hamlyn, 2010) (Figura 1). Sendo assim, essa microrregião da membrana plasmática parece ser importante na regulação do homeostase do cálcio, e assim, importante para as ações dos esteróides cardiotônicos, como a ouabaína. Assim, a inibição das isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase por esse digitálico, aumenta a concentração de sódio nesse microdomínio, resultando na redução da atividade do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e conseqüente aumento local de íons cálcio. Esse cálcio é captado pela  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do retículo sarcoplasmático e estocado no interior dessa organela (Blaustein *et al.*, 1998; Arnon *et al.*, 2000). Dessa forma, a ouabaína endógena, atuando nesse microdomínio, pode influenciar o tônus vascular e a pressão arterial.

Essa hipótese do *plasmersome* serve como base estrutural para as ações da ouabaína circulante na elevação da pressão arterial (Blaustein & Hamlyn, 2010). Ainda, fornece embasamento para os diversos trabalhos que estudam a ouabaína como fator de gênese e/ou manutenção da hipertensão arterial (Yuan *et al.*, 1993; Zhang & Leenen, 2001; Rossoni *et al.*, 2002a,b; Padilha *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2009; Siman *et al.*, 2010 ). Em adição, experimentos com camundongos geneticamente modificados corroboram essa hipótese. Se a ouabaína endógena eleva a pressão arterial por inibição das isoformas da bomba de sódio presentes no *plasmersome*, a redução da expressão dessas isoformas poderia ter um efeito similar. Isso foi mostrado por diversos autores, onde camundongos com mutação em um dos alelos da isoforma  $\alpha_2$  da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase ( $\alpha_2^{+/-}$ ), têm aumento da pressão arterial (James *et al.*, 1999; Shelly *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Dostanic-Larson *et al.*, 2005, 2006).



**Figura 1:** Modelo da região do plasmersome mostrando as proteínas envolvidas no controle dos estoques locais de cálcio e da sinalização de cálcio. O plasmersome consiste em um microdomínio da membrana plasmática, adjacente ao retículo sarco-/endoplasmático juncional (S/ER), com suas  $\text{Ca}^{2+}$ ATPases na membrana (SERCA), receptor de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) e receptores de rianodina (RYR). O microdomínio contém receptores de agonistas (ARs) ligados à proteína G (GPCRs), canais operados por receptores (ROCs), canais operados por estoques (SOCs), transient receptor potential channel proteins (TRPCs), subunidade  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase, trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX). A ativação de GPCRs e da proteína G (GPs) estimula a fosfolipase C (PLC) a produzir trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) e diacilglicerol (DAG). DAG pode ativar ROCs diretamente.  $\text{Na}^+$  pode entrar através de ROCs e SOC e promover entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através do NCX. Fonte: Blaustein & Hamlyn (2010).

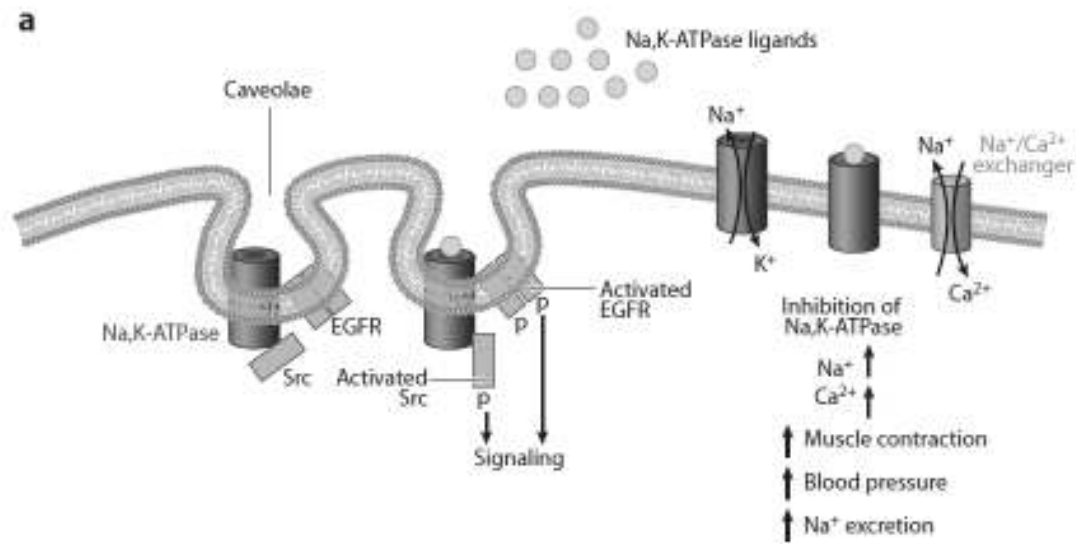
### 1.2.2. Papel de sinalização da $\text{Na}^+\text{K}^+$ ATPase

Outra hipótese para explicar a interação dos glicosídeos endógenos com a bomba de sódio é a alteração de diversas vias de sinalização intracelular que ocorre através dessa interação (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007; Bagrov *et al.*, 2009) (Figura 2). Essa hipótese também justifica porque concentrações picomolares e nanomolares de ouabaína podem produzir diversos efeitos como hipertensão, diferenciação e proliferação celular, sem inibir a bomba de sódio (Xie *et al.*, 2002; 2003). De fato, alguns autores já mostraram que o efeito hipertensor da ouabaína e



seus isômeros é independente da sua potência inibitória sobre a bomba de sódio (Manunta *et al.* 2001).

Além da função de transporte de íons através da membrana plasmática, uma nova função da bomba de sódio tem sido demonstrada pelo grupo do professor Xie: o papel sinalizador da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase. As proteínas com função sinalizadora se localizam nas cavéolas, situadas no músculo liso vascular, e podem transferir sinais para o interior das células, afetando diversas vias de sinalização (Xie *et al.*, 2001; 2002; Pierre & Xie, 2006). Assim, quando a ouabaína se liga na bomba de sódio, a proteína tirosina quinase Src (Src), proteína que interage com a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase na cavéola, é ativada. Essa ativação promove a fosforilação do EGFR (receptor do fator de crescimento epitelial), iniciando uma cascata de eventos intracelulares (Tian *et al.*, 2006, Bagrov *et al.*, 2009). Além da Src, outras proteínas de sinalização podem ser ativadas através da interação da ouabaína com a bomba de sódio, como a fosfolipase C, proteínas TRPC (transient receptor potential channel proteins), PI3K (fosfatidilinositol 3 quinase) e diversas isoformas da PKC (proteína quinase C) (Kometiani *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000, 2003, 2004, 2005; Tian *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Como resultado desses eventos intracelulares pode ocorrer proliferação celular, efeitos antiapoptóticos, aumento de espécies reativas de oxigênio, ativação e fosforilação de canais de cálcio e/ou do trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, dentre outros (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007, Bagrov *et al.*, 2009, Lingrel, 2010).



**Figura 2:** Atividades farmacológicas da ouabaína. Níveis farmacológicos de ouabaína inibem a  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase aumentando  $\text{Na}^+$  intracelular, que por sua vez, aumenta  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular através do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta a contração muscular. Entretanto, ligantes endógenos da bomba de sódio, como a ouabaína, em baixas concentrações, pode se ligar à bomba de sódio localizada nas cavéolas e assim ativar diversas vias de sinalização intracelular. EGFR (receptor do fator de crescimento epitelial). Fonte: Lingrel (2010).

Diversos autores sugerem que essas duas vias de ação da ouabaína, a via do *plasmersome* e a via de sinalização da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase, podem atuar em paralelo e sinergicamente, contribuindo para os efeitos da interação entre ouabaína e  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase (Bagrov *et al.*, 2009). Dessa forma, essas duas hipóteses demonstram que a ouabaína pode exercer suas ações por mecanismos dependentes e independentes da inibição da bomba de sódio, e assim, contribuir na fisiopatologia de diversas condições onde se encontram níveis elevados desse digitálico endógeno.

Como já descrito anteriormente, níveis elevados de ouabaína estão presentes no infarto do miocárdio (Bagrov *et al.*, 1994) e na insuficiência cardíaca congestiva (Gottlieb *et al.*, 1992). O presente trabalho teve como objetivo investigar essa relação, tendo como foco as alterações na reatividade vascular e as possíveis vias de sinalização envolvidas, induzidas por esse digitálico, nessas duas condições. Para melhor compreensão de como foi desenvolvido esse trabalho, faz-se

necessário um detalhamento sobre infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca, bem como do modelo experimental utilizado.

### **1.3. Infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca**

Segundo dados do Ministério da Saúde, as doenças cardiovasculares são responsáveis por grande parte da mortalidade dos brasileiros, correspondendo a 33% do total, atingindo uma taxa de mortalidade de 162,9/100.000 habitantes. No ano de 2008, a proporção de internações hospitalares por doenças do aparelho circulatório foi de 10,21%, ficando como a 3ª maior causa de internação (DATASUS, 2009). Dentre as doenças cardiovasculares, o infarto do miocárdio (IM) é responsável por 60.080 óbitos no Brasil. Estima-se que ocorram de 300 mil a 400 mil casos anuais de infarto, o que confere a esta doença, nos dias atuais, elevada taxa de mortalidade, apesar dos inúmeros avanços terapêuticos obtidos na última década (III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio, 2004). Já em relação à insuficiência cardíaca (IC), sua prevalência é estimada em aproximadamente 2,3% na população mundial, sendo que nos Estados Unidos, a IC resulta em cerca de 300.000 mortes todo ano. No Brasil, a IC é a 3ª causa de todas as hospitalizações. Dessa forma, as doenças cardiovasculares como o IM e a IC, é um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Além dos altos custos hospitalares, essas doenças provocam uma sensível perda da qualidade de vida, resultando, muitas vezes, em aposentadorias precoces e em altos custos socioeconômicos para o país (Revisão das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca, 2002; dos Santos *et al.*, 2009).

O infarto do miocárdio é definido como foco de necrose resultante de baixa perfusão tecidual, com sinais e sintomas conseqüentes da morte celular cardíaca (Zornoff *et al.*, 2009b). É considerado a mais importante forma de cardiopatia isquêmica, onde ocorre um desequilíbrio entre o suprimento e demanda de sangue oxigenado do coração. Tal desequilíbrio promove esgotamento das reservas energéticas e assim, o músculo cardíaco entra em sofrimento. Essa isquemia pode ocorrer tanto pela redução da oferta, como pelo aumento do consumo de oxigênio nos tecidos, e ainda por uma redução da disponibilidade de substratos e remoção inadequada de metabólitos (Anversa & Sonnenblick, 1990).

Para estudar todo o processo de desenvolvimento da doença isquêmica cardíaca, bem como as suas complicações, utiliza-se muito o modelo do infarto experimental em ratos.

### **1.3.1. Infarto do miocárdio experimental**

O modelo de infarto do miocárdio experimental em ratos, extensamente utilizado, se dá pela ligadura permanente da artéria coronária descendente anterior esquerda. Esse modelo foi descrito inicialmente por Heimbürger em 1946, sendo modificado com o passar dos anos (Jonhs & Olson, 1954; Seyle *et al.*, 1960; Pfeffer *et al.*, 1985; Mill *et al.*, 1990). Esse método apresenta diversas vantagens: o custo para seu desenvolvimento é baixo, a cirurgia é rápida e as etapas envolvidas na evolução do infarto como, por exemplo, necrose, cicatrização e remodelamento ocorrem rapidamente, o que diminui o tempo de observação dos estudos. Além disso, as alterações morfológicas e funcionais decorrentes do infarto se assemelham àquelas encontradas em humanos. Dessa forma, observa-se que este modelo é de fundamental importância para o estudo da patogênese do infarto do miocárdio e, conseqüentemente, da insuficiência cardíaca, bem como das intervenções terapêuticas para minimizar essas complicações (Klocke *et al.*, 2007; Zornoff *et al.*, 2009a).

### **1.3.2. Alterações morfológicas e vasculares após infarto do miocárdio**

Após o infarto do miocárdio, ocorre o processo de remodelamento cardíaco, onde o miocárdio remanescente sofre alterações genéticas, estruturais e bioquímicas, resultando na deterioração da capacidade funcional do coração. Isso resulta, normalmente, na instalação de insuficiência cardíaca. O remodelamento ventricular é caracterizado por hipertrofia dos miócitos, dilatação da câmara ventricular e aumento do acúmulo de colágeno em áreas remotas ao local do infarto, resultando no prejuízo da função contrátil do coração (Pfeffer & Braunwald, 1990; Cohn *et al.*, 2000; Zornoff *et al.*, 2009b). Além do remodelamento cardíaco, ocorre também ativação neuroendócrina, primariamente do sistema renina-angiotensina (Sadoshima & Izumo, 1993; Francis, 2001; Westcott *et al.*, 2009). Esses processos são inicialmente adaptativos, na tentativa de restaurar o débito cardíaco, mas em longo prazo se tornam mal-adaptativos, culminando assim na instalação da insuficiência cardíaca. Dessa forma, a insuficiência cardíaca é uma condição onde o

coração se torna incapaz de ejetar ou se encher de sangue em taxas suficientes para manter o débito cardíaco adequado às demandas metabólicas teciduais (Baig *et al.*, 1999; Bauersachs & Widder, 2008).

Os mecanismos propostos para explicar o aparecimento da disfunção ventricular são complexos. Dentre eles, destacam-se: modificações no trânsito de cálcio (Hasenfuus *et al.*, 1997), alterações da via beta-adrenérgica (Barros *et al.*, 1999), alterações das proteínas contráteis (Swynghedauw 1999), aumento da morte celular (Kunapuli *et al.*, 2006), acúmulo de colágeno (Weber *et al.*, 1999, Yang *et al.*, 2002), alterações das metaloproteinases (Spinale 2002; 2006), aumento do estresse oxidativo (Giordano 2005), déficit energético (Ashrafian *et al.*, 2007), alterações das proteínas do citoesqueleto, da membrana e da matriz, e alterações da geometria ventricular (Shellings *et al.*, 2004; Manso *et al.*, 2006).

Além das alterações morfológicas produzidas pelo remodelamento cardíaco, que resultam, por sua vez, no desenvolvimento da insuficiência cardíaca, ocorrem também alterações vasculares. Dessa forma, a insuficiência cardíaca é caracterizada não apenas pelas alterações da função cardíaca, mas também pelo aumento da resistência vascular periférica e prejuízo do fluxo sanguíneo periférico, sendo que esses fatores são dependentes da ativação neurohumoral (Davila *et al.*, 2005).

Inicialmente, na tentativa de garantir a manutenção da função de bomba cardíaca, e com isso, a manutenção do débito cardíaco e da pressão arterial, ocorre uma exacerbação da resposta neurohumoral, com aumento da atividade simpática, ativação do sistema renina-angiotensina e aumento da secreção de arginina-vasopressina. Todavia, em longo prazo, essas respostas agravam os sintomas e o prognóstico da insuficiência cardíaca (Shrier & Abraham 1999; Francis *et al.*, 2001; Ledoux *et al.*, 2003).

Além disso, mecanismos locais de regulação do fluxo sanguíneo também são alterados (Fang & Marwick, 2002). Diversos trabalhos demonstraram que a insuficiência cardíaca cursa com disfunção endotelial, e que esta, contribui significativamente para o aumento da resistência vascular periférica na insuficiência cardíaca, desenvolvendo papel importante no seu desenvolvimento. A baixa perfusão do miocárdio e o prejuízo da função ventricular que ocorre na insuficiência cardíaca são, pelo menos em parte, conseqüência da reduzida capacidade vasodilatadora dependente do endotélio das artérias coronárias. A vasodilatação

periférica diminuída causa aumento da resistência vascular sistêmica com conseqüente aumento da pós-carga, levando a um aumento do trabalho cardíaco e à piora dos sintomas da insuficiência cardíaca. Essa redução da vasodilatação periférica é causada principalmente por uma diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), sendo este o principal contribuinte para a disfunção endotelial na insuficiência cardíaca (Drexler *et al.*, 1992; Katz *et al.*, 1992; Bauersachs & Widder, 2008).

Diversos trabalhos têm demonstrado a presença de altas concentrações de ouabaína circulante em pacientes com infarto do miocárdio e com insuficiência cardíaca (Gotlibb *et al.*, 1992; Bagrov *et al.*, 1994; Leenen *et al.*, 1995). Um estudo envolvendo pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática identificou altas concentrações de ouabaína naqueles indivíduos predispostos a uma rápida progressão da insuficiência cardíaca. Esse estudo sugeriu ainda que a ouabaína endógena poderia atuar como um novo marcador de progressão da insuficiência cardíaca (Pitzalis *et al.*, 2006). Baseado nessas informações, o presente trabalho investigou se esse glicosídeo endógeno altera a resposta vascular em ratos após infarto do miocárdio que desenvolvem ou não insuficiência cardíaca. Para melhor entendimento do desenvolvimento desse trabalho e das vias estudadas nele, é importante uma breve revisão sobre os aspectos gerais do músculo liso vascular e do endotélio.

#### **1.4. Músculo liso vascular**

O tônus vascular é o principal fator determinante da resistência vascular periférica, que por sua vez, é importante na regulação da pressão sanguínea e na distribuição do fluxo sanguíneo entre e dentro dos tecidos e órgãos do corpo. A regulação da atividade contrátil das células do músculo liso vascular (MLV) é dependente de uma complexa interação entre estímulos vasodilatadores e vasoconstritores oriundos de hormônios, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio e pressão sanguínea (Jackson, 2000; Blaustein & Hamlyn, 2010).

Como todas as células musculares, as células do MLV dependem diretamente de um aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico para deflagrar sua contração. A concentração de  $Ca^{2+}$  é regulada por vários sistemas de entrada, saída e estoque de

cálcio. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  se dá através de canais de cálcio operados por receptores (ROCs); canais de cálcio operados por voltagem (VOCs); canais de cálcio operados por estoques (SOC) e canais de cálcio ativados por estiramento (SAC). Além disso, o  $\text{Ca}^{2+}$  pode também entrar ou sair da célula via trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que é regulado pelo gradiente eletroquímico de sódio. Esse gradiente de sódio é, por sua vez, controlado pela bomba de sódio. Em adição aos canais que promovem influxo ou efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , esse íon também é armazenado pelo retículo sarcoplasmático (RS) através do seqüestro de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pela bomba de cálcio do retículo (Kim *et al.*, 2008, Blaustein & Hamlyn, 2010).

Dessa forma, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais da membrana plasmática e a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques intracelulares são a maior fonte de ativação da contração. Essa contração é mediada por dois mecanismos: acoplamento eletromecânico e acoplamento farmacomecânico (Somlyo & Somlyo 1968).

O acoplamento eletromecânico baseia-se na contração dependente das mudanças no potencial de membrana da célula. A despolarização da membrana, induzida, por exemplo, pelo aumento da concentração de  $\text{K}^+$  extracelular, promove influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da abertura de canais VOCs, causando contração (Bulbring & Tomita, 1987; Ganitkevich & Isenberg, 1991). Ainda, trabalhos mostram que o KCl, atua como um estímulo sensibilizador de cálcio na contração do músculo liso (Ratz *et al.*, 2005).

O acoplamento farmacomecânico baseia-se na contração induzida por agonistas contráteis, como norepinefrina, endotelina, angiotensina II, serotonina e fenilefrina. Esses agonistas ligam-se a receptores específicos da membrana da célula muscular lisa que são acoplados à proteína G. A interação agonista-receptor ativa a subunidade  $\alpha$  da proteína G, que por sua vez, ativa a fosfolipase C (PLC) levando à síntese de 1,4,5-trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O  $\text{IP}_3$  interage com seus receptores na membrana do RS e estimula a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ . O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que aumenta a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais da membrana, além de aumentar a sensibilidade das proteínas contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$  e fosforilar a cadeia leve da miosina. Todos esses mecanismos aumentam a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Laporte *et al.*, 2004; Blaustein & Hamlyn, 2010).

Dessa forma, o  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se à calmodulina, formando o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, que, por sua vez, ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK). A MLCK promove fosforilação da cadeia leve da miosina, permitindo a interação entre

os filamentos de actina e miosina, e, conseqüentemente, a contração muscular. Quando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular diminui, ocorre a desativação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ - calmodulina- MLKC, promovendo o relaxamento do músculo liso vascular (Stull, *et al.*, 1991; Horowitz, *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2008).

Dessa forma, hormônios e neurotransmissores regulam a atividade contrátil das células do MLV, e assim, o tônus vascular, fator determinante da resistência vascular periférica. Além disso, fatores derivados do endotélio vascular também atuam na regulação do tônus vascular.

#### **1.4.1. Endotélio vascular**

O endotélio é um órgão que exerce funções fisiológicas indispensáveis para as células, especialmente na manutenção da homeostase e estrutura vascular. Esse órgão é capaz de sintetizar, modificar e liberar inúmeras substâncias metabolicamente ativas que modulam importantes funções como o tônus e a proliferação vascular, respostas inflamatórias, propriedades trombóticas e fibrinolíticas e permeabilidade vascular (Rubanyi, 1993; Flammer & Luscher 2010).

O endotélio é capaz de regular o tônus vascular através da síntese e liberação de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras. Os principais fatores que promovem a contração do músculo liso vascular são a angiotensina II (Kifor & Dzau, 1987), endotelina-1 (Yanagisawa *et al.*, 1988), metabólitos derivados da via do ácido araquidônico, como tromboxano  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ), prostaglandinas  $\text{H}_2$  e  $\text{F}_{2\alpha}$  ( $\text{PGH}_2$  e  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) (Frolich & Forstermann, 1989, Vanhoutte, 1993) e o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (Rubanyi & Vanhoutte, 1986). Já as substâncias capazes de promover o relaxamento do músculo liso vascular são a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) (Moncada *et al.*, 1977), o óxido nítrico (NO) (Furchgott & Zawadski, 1980, Palmer *et al.*, 1987) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Felotou & Vanhoutte, 1988).

Dessa forma, o endotélio é fundamental para o controle do tônus vascular e, conseqüentemente, para a regulação da pressão sanguínea. Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre a liberação desses fatores vasoativos derivados do endotélio. Entretanto, em diversas condições patológicas, como na hipertensão arterial e na insuficiência cardíaca, ocorre um desequilíbrio na produção desses fatores, caracterizando a disfunção endotelial. Dessa forma, durante a disfunção endotelial pode ocorrer uma diminuição do relaxamento dependente do endotélio, decorrente de uma menor liberação ou biodisponibilidade de substâncias



vasodilatadoras, e um aumento da produção de substâncias vasoconstritoras (Vanhoutte, 2009; Flammer & Luscher 2010).

Dentre os diversos fatores derivados do endotélio, serão detalhados a seguir o NO e o EDHF, uma vez que estas foram as vias estudadas no presente trabalho.

#### **1.4.1.1. Óxido nítrico**

Em 1980, Furchgott & Zawadski, demonstraram que o relaxamento vascular induzido por acetilcolina era dependente da presença de endotélio, e mediado por um fator de relaxamento dependente de endotélio (EDRF). Em 1987, esse EDRF foi identificado como um radical livre, chamado de óxido nítrico (Palmer *et al.*, 1987; Ignaro *et al.*, 1987; Furchgott, *et al.*, 1987; Vanhoutte, 2009).

O NO tem sido demonstrado como um importante modulador em diversos processos biológicos essenciais como, defesa imunitária, regulação do tônus vascular, prevenção da agregação plaquetária, inflamação, neurotransmissão, inibição da proliferação do músculo liso vascular e inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular (Moncada *et al.*, 1991; Scott-Burden & Vanhoutte, 1993; Kubes, 1991). Dessa forma, fica claro a relação entre a redução de NO e a progressão de diversos processos patológicos como hipertensão arterial, diabetes, insuficiência cardíaca, dentre outros.

O efeito vasodilatador do NO se dá após sua difusão para o músculo liso vascular, onde ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, que hidrolisa o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMP<sub>c</sub>). Este, por sua vez, ativa a proteína quinase G (PKG) que, através da fosforilação de diversas proteínas, promove o relaxamento do músculo liso vascular por redução das concentrações intracelulares de cálcio (Rapoport & Murad, 1983; Ignarro & Kadowitz, 1985; Lincoln *et al.*, 2001). Dessa maneira, a ativação da via NO/GMP<sub>c</sub>/PKG induz relaxamento do MLV por diversos mecanismos, tais como: fosforilação do fosfolambam, que ativa a Ca<sup>2+</sup> ATPase do retículo sarcoplasmático; ativação do trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>; inibição dos canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L; fosforilação dos canais de K<sup>+</sup>, que induz hiperpolarização; estimulação de Ca<sup>2+</sup> ATPases de membrana e redução na sensibilidade dos filamentos contráteis ao Ca<sup>2+</sup> (Tare *et al.*, 1990; Mery *et al.*, 1991; Cornwell *et al.*, 1991; Furukawa *et al.*, 1991; Lincoln *et al.*, 2001). Além disso, trabalhos mostram que o NO também pode ativar a bomba de Na<sup>+</sup> (Gupta *et al.*, 1996).

A síntese de NO resulta da oxidação da L-arginina, que é convertida em L-citrulina, por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Para isso, a NOS utiliza como co-fatores a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida – NADPH), a tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e a flavina mononucleotídeo (FMN) (Palmer *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1991).

Existem três isoformas da NOS que podem ser divididas em duas categorias: uma categoria é a NOS constitutiva, que é dependente da formação do complexo cálcio- calmodulina, e inclui a isoforma endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS). A outra categoria é a NOS induzível (iNOS), que tem sua atividade independente da concentração de Ca<sup>2+</sup>. A iNOS é expressa principalmente em resposta a citocinas e a outros mediadores inflamatórios, sendo que essa expressão, é fortemente dependente da ativação do fator de transcrição NF-kappaB (Moncada 1991; Forstermann *et al.*, 1994; Andrew & Mayer, 1999; Hecker *et al.*, 1999; Channon *et al.*, 2000). As isoformas constitutivas produzem NO em episódios curtos e em pequenas quantidades, da ordem de nano ou picomols. Já a NOS induzível produz NO em altas concentrações, na ordem de micromols, e a produção deste continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra morte celular (Moncada, 1991; Marletta, 1994; Dusting & MacDonald 1995).

A nNOS é expressa principalmente no cérebro, na medula espinhal e no sistema nervoso periférico, mas também no epitélio brônquico, traqueal, gastrintestinal e músculo esquelético (Moncada *et al.*, 1997; Walford & Loscalzo, 2003). No sistema nervoso central, o NO derivado da nNOS está envolvido nos processos de memória e nos mecanismos centrais de controle da pressão arterial. Já no sistema nervoso periférico, o NO liberado pelos neurônios periféricos, não-adrenérgicos e não-colinérgicos, regula algumas funções gastrintestinais, respiratórias e genitourinárias importantes, além de produzir relaxamento vascular (Toda *et al.*, 1991; Rand, 1992; Forstermann *et al.*, 1994). Já a iNOS, expressa principalmente nos macrófagos e nas células musculares lisas, produz grandes quantidades de NO, que tem efeitos citostáticos e citotóxicos em microorganismos e em células tumorais (Forstermann *et al.*, 1994).

A eNOS é expressa principalmente nas células endoteliais e plaquetas, mas também ocorre em algumas populações de neurônios, no epitélio respiratório (Moncada *et al.*, 1997), no endotélio endocárdico e nos cardiomiócitos (Mungrue *et*

*al.*, 2002), dentre outros locais. O NO derivado da eNOS é vital para a homeostase cardiovascular. Nas células endoteliais, a eNOS funcional tem sido encontrada no complexo de Golgi (O'Brien *et al.*, 1995), membrana plasmática (Hecker *et al.*, 1994) e nas cavéolas da membrana plasmática (Liu *et al.*, 1996; Shaul, 2002). Apesar da eNOS ser uma enzima constitutiva, existem diversos fatores que podem afetar a sua expressão e atividade. Dentre esses fatores destacam-se: estresse de cisalhamento (shear stress), estrogênio, hipóxia, forças mecânicas, estímulos químicos como acetilcolina, bradicinina, trombina, ionóforo de cálcio (A23187); adenosina difosfato (ADP), substância P e agregação plaquetária (Fleming & Busse, 2003; Vanhoutte 2003).

A produção de NO pela eNOS é controlada por fosforilação, interações proteínas-proteínas e localização intracelular. Classicamente, a ativação da eNOS se dá através do aumento da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  e conseqüente formação do complexo cálcio-calmodulina, após exposição à acetilcolina ou bradicinina, por exemplo. Todavia, a eNOS pode ser ativada também por certos estímulos, como o shear stress e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), sem a ocorrência de um aumento sustentado de cálcio intracelular. Neste caso, a eNOS é ativada por fosforilação (Fleming & Busse, 2003).

Dessa forma, a fosforilação da eNOS é importante na regulação da sua atividade. Existem vários sítios de fosforilação da eNOS, porém, até o presente momento, estudos mostram 2 sítios principais, que são: um resíduo de serina (na sequência eNOS humana: Ser<sup>1177</sup> e na eNOS bovina: Ser<sup>1179</sup>) e um resíduo treonina (na sequência da eNOS humana: Thr<sup>495</sup> e na eNOS bovina: Thr<sup>497</sup>). Quando há fosforilação no resíduo de serina, a produção de NO aumenta de duas a três vezes acima do nível basal (McCabe *et al.*, 2000). Após estímulos como o shear stress, ocorre ativação da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), que por sua vez, ativa a Akt e a proteína quinase A (PKA), que fosforilam a eNOS na Ser<sup>1177</sup>, aumentando sua atividade (Dimmeler *et al.*, 1999; Fisslthaler *et al.*, 2000). Além do shear stress, há outros estímulos como: o VEGF e o estrogênio, que fosforilam a eNOS principalmente via Akt, a insulina que age tanto via Akt como via proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e a bradicinina, que age via proteína quinase II dependente de calmodulina (CaMKII) (Fleming & Busse, 2003).

Já quando há fosforilação no resíduo treonina, ocorre diminuição da atividade da eNOS, uma vez que a eNOS fosforilada neste resíduo inibe a ligação da

calmodulina ao seu domínio de ligação (Fleming *et al.*, 2001). Alterações na fosforilação da Thr<sup>495</sup> são geralmente associadas com estímulos que elevam cálcio intracelular e aumentam a atividade da eNOS, como a bradicinina, ionóforos de cálcio e histamina. Dessa maneira, a atividade da eNOS não é simplesmente determinada pela formação do complexo cálcio-calmodulina mas também por alterações na fosforilação na Thr<sup>495</sup> e na Ser<sup>1177</sup> (Fleming *et al.*, 2001; Fleming & Busse, 2003).

Além da fosforilação, a interação de algumas proteínas à eNOS podem modular sua atividade ou sua localização intracelular, e assim afetar a produção de NO. A eNOS funcional é prioritariamente localizada nas cavéolas. Isso facilita a ativação da eNOS, já que as cavéolas funcionam com um centro de integração de sinais de transdução (Michel & Feron; 1997). A adesão da eNOS à cavéola ocorre por interação com as caveolinas (proteínas integrantes das cavéolas). Essa interação leva à inibição da atividade da eNOS, pois a caveolina antagoniza a ligação da calmodulina (Fulton *et al.*, 2001). Além da caveolina, outras proteínas podem modular a atividade da eNOS, como a proteína de choque térmico (Hsp90), a dinamina, os receptores acoplados a proteína G, diversas quinases e fosfatases e a proteína de interação com a eNOS (NOSIP). Todas essas proteínas estão envolvidas na via de sinalização da eNOS e podem modular sua atividade (Fleming & Busse, 2003; Chatterjee & Catravas, 2008).

#### **1.4.1.2. Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)**

O EDHF surgiu como o terceiro fator vasodilatador derivado do endotélio, no início da década de 80, quando pesquisadores mostraram um relaxamento dependente do endotélio, acompanhando de hiperpolarização do MLV, que não era mediado por NO e prostaciclina (De Mey *et al.*, 1982; Taylor & Weston, 1988). A identidade molecular do EDHF bem como suas vias de sinalização está ainda em discussão, já que numerosos fatores derivados do endotélio, incluindo o NO e a prostaciclina podem também promover hiperpolarização do MLV (Félétou & Vanhoutte, 2006). Todavia, diversos trabalhos apontam como possíveis candidatos a EDHF, os ácidos epoxieicosatrienóicos (ETTs), metabólitos do ácido araquidônico derivados da via do citocromo P450 (Fisslthaler *et al.*, 1999; Campbell & Falck, 2007); a anandamida, um derivado do ácido araquidônico (Randall & Kendall 1997 ); os íons potássio; o acoplamento elétrico entre as células endoteliais e musculares

lisas através da *gap junctions* (Félétou & Vanhoutte, 2006); produtos da lipoxigenase (Faraci *et al.*, 2001); o próprio NO (Bolotina *et al.*, 1994); peróxido de hidrogênio (Ellis & Triggle 2003; Shimokawa & Morikawa 2005); o AMPc (Popp *et al.*, 2002) e possivelmente o peptídeo natriurético atrial tipo C (Wei *et al.*, 1994).

A contribuição desses candidatos a EDHFs na resposta vasodilatadora derivada do endotélio parece variar de acordo com o leito vascular e espécie animal, sendo que esses EDHFs podem atuar de maneira separada ou agir de forma sinérgica (Grgic *et al.*, 2009). Os mecanismos propostos para explicar o efeito vasodilatador do EDHF, envolvem a ativação de canais para potássio ativados por cálcio, especialmente o SK<sub>Ca</sub> e/ou o IK<sub>Ca</sub> (canais de potássio ativados por cálcio de baixa e intermediária condutância, respectivamente), e a ativação da Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> -ATPase (Félétou & Vanhoutte, 2006; Grgic *et al.*, 2009).

### **1.5. Ouabaína e fisiopatologia do infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca**

Alguns trabalhos têm demonstrado uma relação entre ouabaína e a fisiopatologia do infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca, entretanto, pouco ainda se sabe dessa relação. Gottlieb e colaboradores (1992) demonstraram que as concentrações de ouabaína endógena estão elevadas em pacientes com insuficiência cardíaca. E ainda, que a concentração desse digitálico endógeno tem uma relação significativa com o índice cardíaco e pressão arterial média, sugerindo que a ouabaína é um importante fator regulador da homeostasia em humanos. Já em 1994, os resultados de Bagrov e colaboradores mostraram, em humanos, que já no primeiro dia após infarto do miocárdio há um aumento das concentrações plasmáticas do fator digoxina-like, atualmente chamado de ouabaína, estando associado com o desenvolvimento de arritmias ventriculares. Dessa maneira, evidencia-se um aumento das concentrações plasmáticas de ouabaína no infarto do miocárdio e na insuficiência cardíaca.

Diversos estudos sugerem que a ouabaína tem um papel importante na disfunção e falência cardíaca. Ferrandi e colaboradores (2004) demonstraram que a infusão de baixas doses de ouabaína, suficiente para dobrar a concentração plasmática de ouabaína endógena, induz hipertrofia ventricular esquerda em ratos normotensos. Já Balzan e colaboradores (2001), detectaram concentrações elevadas de ouabaína em pacientes com disfunção ventricular esquerda por miocardiopatia dilatada, antes mesmo do desenvolvimento de insuficiência cardíaca,

sugerindo que a ouabaína pode ser um marcador precoce dessa doença. Em adição, estudos mostram que níveis elevados de ouabaína circulante predizem a progressão da insuficiência cardíaca em pacientes com miocardiopatia dilatada (Pitzalis *et al.*, 2006). Dessa forma, fica evidente que a ouabaína contribui para a progressão da falência cardíaca (Gottlieb *et al.*, 1992; Leenen *et al.*, 1995; Ferrandi *et al.*, 2004; Stella *et al.*, 2007).

Uma das possíveis explicações para este aumento das concentrações plasmáticas de ouabaína é que a insuficiência cardíaca congestiva está associada com retenção de líquido e expansão de volume plasmático, condições conhecidas por estimular a liberação de ouabaína endógena (Bagrov & Shapiro, 2008). Em adição, sabe-se que o sistema renina-angiotensina-aldosterona é marcadamente ativado após infarto do miocárdio e tem papel central na progressão da insuficiência cardíaca (Wollert & Drexler, 1999; Faccarollo *et al.*, 2008). Dessa forma, através da ativação dos receptores mineralocorticóides, a aldosterona parece aumentar a liberação de ouabaína central (Westcott *et al.*, 2009). Além disso, já foi demonstrado que a angiotensina II, atuando em receptores do tipo AT<sub>2</sub>, estimula a secreção de ouabaína em células adrenocorticais (Laredo *et al.*, 1997).

Além desses estudos que relacionam ouabaína com a falência cardíaca que ocorre após infarto do miocárdio, o grupo do Professor Leenen, vem tentando mostrar os efeitos da ouabaína central após infarto do miocárdio. Em 1995, esse grupo demonstrou que o desenvolvimento da insuficiência cardíaca em modelos animais está associado a um aumento marcante de ouabaína central e periférica (Leenen *et al.* 1995). Essa ouabaína central parece mediar o aumento da atividade simpática associada com a insuficiência cardíaca congestiva, uma vez que, o bloqueio da ouabaína central com anticorpo específico normalizou a hiperatividade simpática dos ratos nessas condições. Mais tarde, esses mesmos autores mostraram que o bloqueio crônico da ouabaína central ou do sistema renina-angiotensina central inibe o desenvolvimento da disfunção ventricular esquerda em ratos após infarto do miocárdio, sugerindo que, ambos, ouabaína e sistema renina-angiotensina central contribuem para a disfunção cardíaca após infarto do miocárdio (Leenen *et al.*, 1999). Além disso, foi demonstrado também que o bloqueio crônico da ouabaína central previne o prejuízo da resposta barorreflexa em ratos após infarto agudo do miocárdio (Huang *et al.*, 1997) e em ratos com insuficiência cardíaca congestiva (Huang *et al.*, 2000).

Uma possível explicação para todos esses efeitos da ouabaína é que, como após infarto do miocárdio ocorre ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona; a aldosterona, através da ativação dos receptores mineralocorticóides, parece aumentar a liberação de ouabaína central, que por sua vez, é capaz de ativar o sistema renina-angiotensina central (Westcott *et al.*, 2009). Assim, a ouabaína central e o sistema renina-angiotensina central contribuem para a disfunção ventricular após infarto do miocárdio fazendo parte das vias que causam a hiperreatividade simpática nessa condição (Leenen *et al.*, 1999).

Dessa forma, fica evidente a relação entre ouabaína e infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca. No entanto, a maioria dos trabalhos desenvolvidos até o momento relaciona apenas os efeitos centrais da ouabaína bem como seus efeitos sobre a falência cardíaca nessas condições. Porém, os efeitos vasculares desse glicosídeo no infarto do miocárdio e na insuficiência cardíaca, e sua contribuição na fisiopatologia dessas doenças, ainda não foram descritos.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar os efeitos da incubação aguda de baixa concentração de ouabaína (3 nM) em anéis de aorta de ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca, 4 semanas após infarto do miocárdio.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar se a ouabaína altera a reatividade vascular induzida por estimulação alfa-adrenérgica em anéis de aorta de ratos sham e de ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio;

- Averiguar uma possível modulação, por parte do endotélio, sobre os efeitos da ouabaína em anéis de aorta, bem como estudar os possíveis fatores endoteliais envolvidos;

- Avaliar se a ouabaína aumenta a produção local de óxido nítrico em anéis de aorta de ratos sham e de ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio;

- Avaliar se a incubação aguda de baixa concentração de ouabaína altera a expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico, da Akt e da sua forma fosforilada em anéis de aorta de ratos sham e de ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio.



### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais experimentais**

Para a realização deste trabalho experimental foram utilizados ratos Wistar machos, com idades aproximadas de três meses, pesando entre 220 e 240 gramas. Esses animais foram cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas, sob controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso de água e ração.

Todos os procedimentos experimentais desse estudo foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA- EMESCAM – Processos 03/2007; 04/2007; 05/2007).

#### **3.2. Realização do infarto do miocárdio**

O procedimento para a indução do infarto foi realizado de acordo com a técnica descrita por Selye *et al.* (1960) e modificada por Mill *et al.* (1990). Os animais foram anestesiados com uma mistura contendo Ketamina (50mg/Kg) e Xylazina (10mg/Kg), administrados por via intramuscular. Em seguida, foi realizada uma toracotomia do lado esquerdo entre o 3º e 4º espaço intercostal. O músculo peitoral foi separado e as costelas expostas. O coração foi exteriorizado e a artéria coronariana descendente anterior esquerda ligada aproximadamente a 3 mm distal à sua origem através do uso de fio mononylon 6.0. Em seguida, o coração foi novamente interiorizado ao seu local de origem e o animal foi cuidadosamente suturado retomando sua respiração normal. O procedimento cirúrgico do infarto, após abertura do tórax durava no máximo 30 segundos. Esta técnica permite a obtenção de infartos transmuralis, nos quais a necrose miocárdica envolve por completo ou quase na sua totalidade a espessura da parede ventricular (Pfeffer *et al.*, 1979).

Para a realização do grupo controle (SHAM), um grupo de animais foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, exceto pela ligação da artéria coronariana.

Após a recuperação, esses animais foram acomodados novamente em gaiolas identificadas e mantidos no biotério por 4 semanas sob as condições acima especificadas.

### **3.3. Medidas hemodinâmicas**

Quatro semanas após o infarto do miocárdio ou cirurgia fictícia (Sham) os animais foram anestesiados com injeção intra-peritoneal de uretana (1,2 g/kg i.p.). O plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso, com testes como pinçar a cauda do animal, e o anestésico foi suplementado quando necessário. A artéria carótida direita foi canulada com cateter de polietileno (PE-50, Clay-Adams) preenchido com salina heparinizada (100 UI/ml). Após a cateterização, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (TSD 104A - Biopac) acoplado a um pré-amplificador. Os registros foram adquiridos por um sistema de aquisição e registro de dados (MP100 Byopac Systems, Inc; CA- PC Pentium 4), utilizando uma taxa de amostragem de 2000 amostras/segundo. O cateter introduzido na artéria alcançou o ventrículo esquerdo para a aquisição de dados de pressões intraventriculares.

Os valores de pressão foram coletados após estabilização do registro, e representam a média de 10 ciclos cardíacos consecutivos. Foram registradas a pressão arterial diastólica (PAD), a pressão arterial sistólica (PAS), a pressão arterial média (PAM), a pressão sistólica no ventrículo esquerdo (PSVE), a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), a frequência cardíaca (FC) e a primeira derivada de pressão positiva e negativa do ventrículo esquerdo ( $dP/dt+$  e  $dP/dt-$ ). A PAM e FC foram calculadas a partir do registro de pressão sanguínea pulsátil e as derivadas de pressão positiva e negativa foram obtidas dos registros de ondas de pressão intraventricular em função do tempo.

### **3.4. Avaliação da área de infarto e hipertrofia cardíaca**

Após a realização das medidas hemodinâmicas, os animais foram eutanaziados. O coração e os pulmões foram removidos e imersos em solução salina (NaCl, 0,9%) e a aorta torácica foi retirada para realização dos protocolos de reatividade vascular. As câmaras cardíacas foram separadas e pesadas. O septo interventricular foi considerado como parte do ventrículo esquerdo (VE). O peso

úmido foi corrigido pelo peso corporal para estimar a hipertrofia cardíaca. Os pulmões também foram dissecados, pesados e corrigidos pelo peso corporal.

O tecido infartado foi visualizado por transluminação, uma vez que se diferencia do tecido remanescente por se apresentar fino e fibroso. Para medida da área de infarto, o VE remanescente e o tecido infartado foram separados e expostos sob papel milimetrado. As áreas foram medidas por contagem de pontos, para obtenção da área correspondente em mm<sup>2</sup> (Mill e cols., 1990). A área de infarto foi estimada como área percentual infartada do VE em relação à área total do VE. Corações com áreas de infarto menores que 25% e maiores que 45% foram descartados deste estudo.

### **3.5. Identificação dos grupos experimentais**

Após a realização das avaliações acima citadas, os animais infartados foram separados em dois subgrupos: aqueles que apresentavam sinais de insuficiência cardíaca (IC) e aqueles que não apresentavam sinais de insuficiência cardíaca (INF). O critério utilizado para essa separação foi a média mais 2 desvios padrão da PDFVE dos animais SHAM (Anversa *et al.*, 1985). Os animais que ultrapassavam o ponto de corte foram considerados como IC e aqueles que tinham PDFVE abaixo desse limite foram considerados como INF.

### **3.6. Metodologia empregada para estudo da reatividade vascular em anéis de aorta**

Após as medidas dos parâmetros hemodinâmicos, os animais foram eutanaziados e exanguinados. A aorta torácica foi cuidadosamente removida e imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs fria (4°C) (composição em mM: NaCl 127; KCl 4,7; NaHCO<sub>3</sub> 18; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,17; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2; glicose 11 e EDTA 0,01). Em seguida a aorta foi delicadamente dissecada para retirada do tecido conectivo e adiposo, e então dividida em aproximadamente 6 anéis (seguimentos cilíndricos) com 3 - 4 mm de comprimento. Dois desses anéis foram separados para a realização da medida dos níveis de óxido nítrico.

Cada anel da artéria foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs, aquecida a 36 ± 0,5 °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica

(95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>), mantendo o pH estável em 7,4 de acordo com método descrito por Marín *et al* (1988).

Para a montagem da preparação experimental, dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos vasculares, de forma que permanecessem paralelos. Um fio foi fixado à parede da cuba e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor de força (GRASS<sup>®</sup> Force- displacement transducer FT03, Mass) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; CA) e este a um computador (PC Pentium) (Figura 3).

Após a montagem os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 1g, reajustada, quando necessário, durante aproximadamente 45 minutos de estabilização.

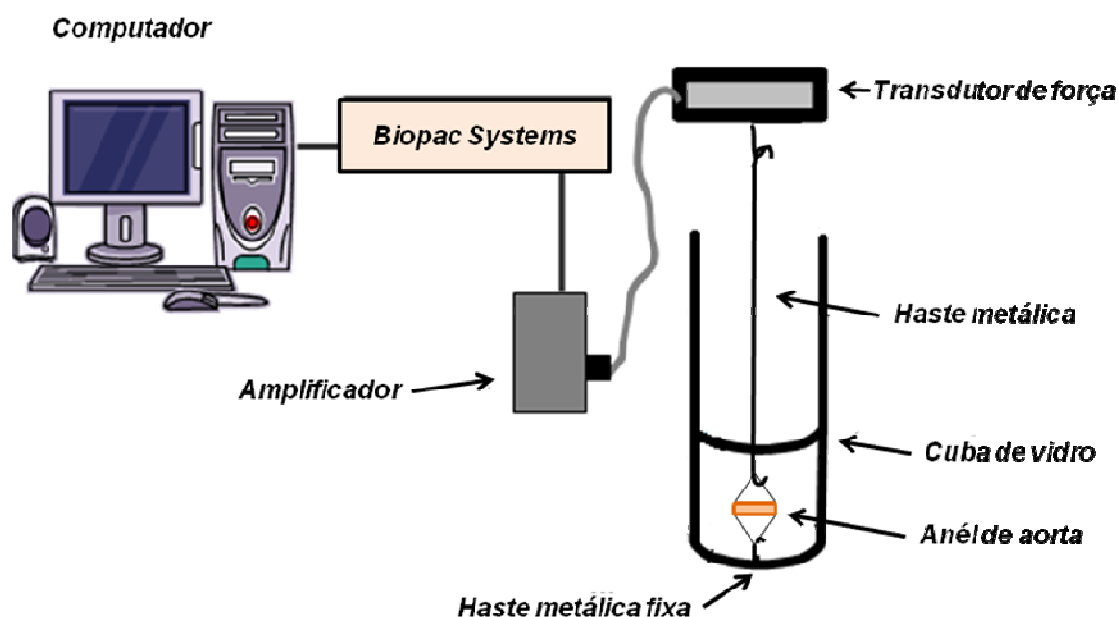


Figura 3: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular "in vitro". Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems* (modificado de Dias, 2007).

### 3.6.1. Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio

Após o período de estabilização (Figura 4A), foi adicionado cloreto de potássio (KCl) 75 mM ao banho, para verificar a atividade contrátil induzida por despolarização e, assim, avaliar a viabilidade do músculo liso vascular (Figura 4B).

Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados aproximadamente três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso (Figura 4 B, C). Dessa forma, os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados.

Após 30 minutos de estabilização (Figura 4 D), uma nova dose de KCl (75 mM) foi adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida após 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 4 E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para que retornassem à tensão de repouso e, depois de 30 minutos (Figura 4 G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

### **3.6.2. Avaliação da integridade funcional do endotélio**

A viabilidade endotelial foi avaliada por meio de uma pré-contração com fenilefrina  $10^{-6}$  M (concentração que induziu aproximadamente 75 % da contração máxima ao KCl 75 mM), seguida de relaxamento produzido através da adição de acetilcolina ( $10^{-5}$  M) (Figura 4 I, J, L). Os anéis que relaxaram menos que 80% do platô foram descartados.

A figura abaixo ilustra o registro típico dos protocolos experimentais acima descritos (Figura 4).

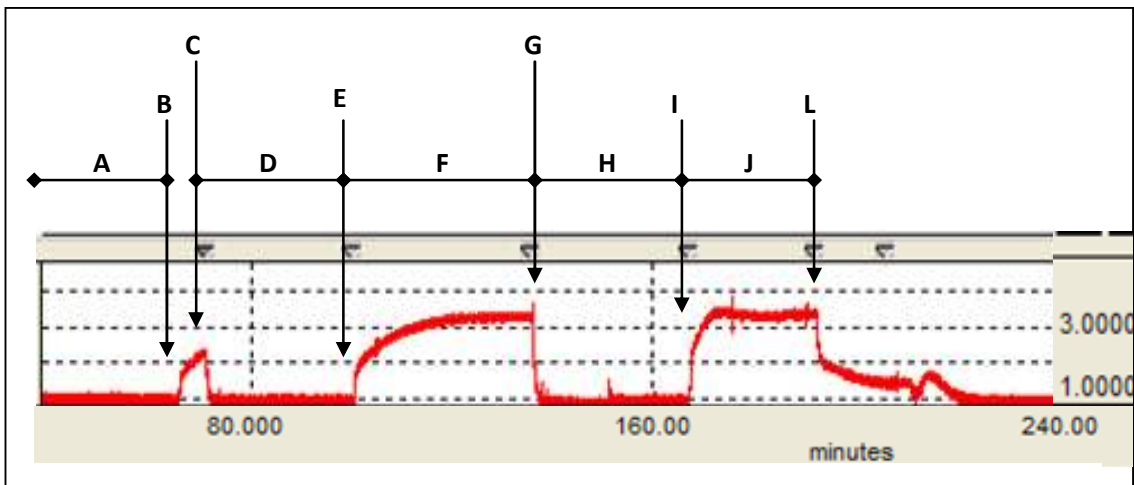


Figura 4: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. **Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl:** **A)** Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0,9 a 1,3 gramas); **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)** 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-contracção com fenilefrina; **J)** Platô da contracção induzida pela Fe; **L)** Adição de acetilcolina. Eixo horizontal (tempo; intervalo de 80 min); eixo vertical (força em gramas). (Modificado de Dias, 2007).

### 3.6.3. Protocolos experimentais

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, os anéis foram lavados três vezes para que retornassem à tensão basal. Posteriormente, esses anéis foram submetidos a vários protocolos experimentais, com objetivo de estudar os efeitos da incubação de ouabaína na reatividade vascular à fenilefrina de ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca, bem como suas possíveis vias de atuação.

Para avaliar o efeito da ouabaína, além dos 3 grupos experimentais existentes (SHAM, INF e IC), cada grupo foi dividido em dois subgrupos: aquele que foi submetido à incubação com ouabaína, e aquele, cujos anéis não foram incubados com ouabaína. O tempo de incubação com ouabaína foi de 45 minutos. É importante ressaltar que, os anéis que não receberam ouabaína, foram submetidos às mesmas

condições temporais. Além das comparações realizadas na presença e ausência de ouabaína, os 3 grupos experimentais foram comparados entre si em todos os protocolos realizados.

#### **3.6.3.1. Efeito da ouabaína (3 nM) sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta**

Trabalho de Gottlieb *et al.* (1992) demonstrou que pacientes portadores de insuficiência cardíaca apresentam elevação da ouabaína plasmática ( $1,52 \pm 2,58$  nM). Dessa forma, para testar se concentrações próximas a essa poderiam modificar a reatividade vascular, e assim, alterar a progressão do infarto e insuficiência cardíaca, optamos por utilizar uma concentração de 3 nM de ouabaína.

Sendo assim, para avaliar o efeito da ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE,  $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) na presença e na ausência de ouabaína (3 nM). O efeito da ouabaína na resposta contrátil à fenilefrina, foi calculado como percentual de resposta ao KCl (75 mM).

Ao final de cada experimento, esses anéis foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise de Western blot.

#### **3.6.3.2. Modulação do endotélio nas ações da ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta**

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular o efeito da ouabaína sobre a resposta constritora à fenilefrina, em alguns experimentos, o endotélio foi removido. Assim, no momento da montagem dos anéis, 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. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina  $10^{-5}$  M de induzir relaxamento, após pré-contração com fenilefrina.

Sendo assim, curvas concentração-resposta à fenilefrina foram realizadas em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-), na presença e na ausência de ouabaína.

### **3.6.3.3. Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no efeito da ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta**

Para avaliar as possíveis vias de atuação da ouabaína para modificar a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca, foram utilizadas algumas intervenções farmacológicas.

Sendo assim, os protocolos de reatividade vascular foram conduzidos da seguinte forma: curvas concentração-resposta à FE ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) foram realizadas após incubação do fármaco a ser estudado e após incubação conjunta do fármaco e ouabaína. Além disso, o efeito desses fármacos foi avaliado simultaneamente na ausência de ouabaína.

É importante ressaltar que em cada segmento vascular foi realizado apenas uma curva concentração-resposta à fenilefrina para evitar o tempo prolongado de experimento, já que isso resultaria em prejuízo na preparação utilizada nesse estudo.

#### **3.6.3.3.1. Influência do óxido nítrico no efeito ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta**

A produção basal de óxido nítrico (NO) foi avaliada indiretamente pelo aumento, dependente do endotélio, na contração à fenilefrina induzido pelo inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, o L-N<sup>G</sup>-Nitroarginina Metil Éster (L-NAME).

Sendo assim, com a finalidade de avaliar a participação do óxido nítrico no efeito da ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-resposta à FE, após incubação com 100  $\mu$ M de L-NAME e após incubação conjunta de L-NAME (100  $\mu$ M) e ouabaína (3nM).

Além disso, buscando avaliar a participação do óxido nítrico derivado da isoforma induzível da óxido nítrico sintase, foi utilizado aminoguanidina (50  $\mu$ M), um inibidor seletivo dessa enzima. Para isso, foram realizadas curvas concentração-resposta à FE, após incubação com 50  $\mu$ M de aminoguanidina e após incubação conjunta de aminoguanidina (50  $\mu$ M) e ouabaína (3nM).



### **3.6.3.3.2. Participação do óxido nítrico derivado da via PI3K/Akt no efeito ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta**

Diversos trabalhos já demonstraram que a ouabaína aumenta a liberação basal de óxido nítrico (Xie *et al.*, 1993; Eva *et al.*, 2006). Além disso, o óxido nítrico participa da modulação de respostas vasoconstritoras em anéis de aorta, artéria mesentérica superior e em artérias de resistência de ratos hipertensos induzidos pela ouabaína (Rossoni *et al.*, 2002a; Xavier *et al.*, 2004b). Entretanto, a via pela qual a ouabaína aumenta a produção de óxido nítrico ainda é pouco esclarecida.

Diante disso, buscando avaliar se a ouabaína é capaz de estimular a via de produção de óxido nítrico a partir da PI3K/Akt, utilizou-se wortmannin (0,1  $\mu$ M), um inibidor da PI3K. Sendo assim, foram realizadas curvas concentração-resposta à FE, após incubação com 0,1  $\mu$ M de wortmannin e após incubação conjunta de wortmannin (0,1  $\mu$ M) e ouabaína (3nM). Além disso, como o wortmannin foi diluído em DMSO, foram realizadas curvas concentração-resposta à FE após incubação com DMSO, para eliminar qualquer dúvida de que esse veículo pudesse alterar a reatividade vascular à fenilefrina nos três grupos experimentais estudados.

### **3.6.3.3.3. Influência dos canais para potássio no efeito ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina**

Com o objetivo de averiguar se o efeito da ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à FE envolvia a participação dos canais para potássio, foi utilizado tetraetilamônio (TEA), um bloqueador de canais para potássio ativados por cálcio.

Para isso, foram realizadas curvas concentração-resposta à FE, após incubação com 2 mM de TEA e após incubação conjunta de TEA (2 mM) e ouabaína (3nM).

## **3.7. Medida dos níveis de óxido nítrico nos anéis de aorta após incubação com ouabaína**

A liberação local de NO foi avaliada conforme o método descrito por Martín *et al.*, (2005). Para aplicação desse método, no momento do experimento de reatividade vascular em anéis de aorta, eram separados dois anéis de cada animal. Esses anéis eram armazenados em tampão HEPES, a 4°C, até o momento de realização do protocolo de medida de NO.

Para a realização desse protocolo, os anéis obtidos foram estabilizados durante 30 minutos em tampão HEPES (em mmol/L: NaCl 119; HEPES 20; CaCl<sub>2</sub> 1.2; KCl 4.6; MgSO<sub>4</sub> 1; KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 0.4; NaHCO<sub>3</sub> 5; glicose 5.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15; pH 7.4) a 37° C. Depois do período de estabilização, os anéis foram incubados com o produto fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF- 2 µmol/L, diluído em tampão HEPES) durante 30 minutos, a 37° C, e a solução foi coletada para medida da liberação basal de NO. Em seguida, foi realizada a medida da liberação de NO após incubação com ouabaína (3nM). Para isso, um anel foi incubado com ouabaína durante 45 minutos, a 37° C. O outro anel foi utilizado como controle, permanecendo também, durante 45 minutos, a 37° C. Após os 45 minutos, uma curva concentração-resposta à FE (10<sup>-10</sup> a 3x10<sup>-4</sup> M) foi realizada em ambos os anéis, com o objetivo de mimetizar as mesmas condições dos experimentos conduzidos no estudo de reatividade vascular. Em seguida, a solução foi novamente coletada para a medida da liberação de NO.

A produção de NO foi estimada a partir da intensidade de fluorescência do DAF. A fluorescência da solução foi medida em temperatura ambiente usando um espectrofluorímetro (Biotek Sinergy<sup>TM</sup> 2 Instruments, Biotek's Gen 5<sup>TM</sup> Software), com filtros de excitação a 492 nm e de emissão a 515 nm. Para determinar a emissão basal de fluorescência do DAF, foi realizada a medida da fluorescência da solução sem a presença do anel de aorta. A quantidade de óxido nítrico liberada foi expressa como unidades arbitrárias/mg de tecido (Martín *et al.*, 2005).

### **3.8. Western blot**

#### **3.8.1. Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS), da Akt e Akt fosforilada**

Os anéis de aorta, submetidos ou não à incubação com ouabaína (3nM), nos experimentos de reatividade vascular, foram as amostras utilizadas para o Western blot. Sendo assim, ao final de cada experimento, os anéis eram coletados, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até o momento da extração protéica.

### **3.8.1.1. Preparação do tecido e quantificação das proteínas**

A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização dos anéis de aorta em solução tampão composta de: Tris- HCl (10mM, pH 7,4); NaVO<sub>3</sub> (1 mM); SDS, 1%; DTT (0,5 mM); EDTA (5 mM , pH 8); PMSF (1 mM); NaF (10 mM); Inibidor de protease.

A homogeneização foi realizada em temperatura fria, onde, durante todo o procedimento, o homogeneizador de vidro era mantido em um recipiente com gelo. Após a homogeneização do tecido, essa mistura foi acondicionada em eppendorf e centrifugada (Eppendorf-Neitheir-Hinz, Gmb 22331, Alemanha) a 6000 rpm durante 12 minutos, a 4°C, para recolher a fase protéica (sobrenadante). Em seguida, foi realizada a quantificação protéica pelo método de Bradford (1976) através do espectrofotômetro (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil).

Pequenas alíquotas contendo 80 µg de proteína foram preparadas a partir de diferentes volumes do homogenato. Para obter igualdade de volume nas alíquotas, o volume final foi completado com a solução tampão de homogeneização.

### **3.8.1.2. Eletroforese e Transferência das Amostras**

Alíquotas do homogenato foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT 39 µM; Tris-HCl 0,01 M pH 8,0 e Azul de bromofenol 0,5 %). Depois de realizar uma centrifugação (6000 rpm, por 2 minutos), as alíquotas foram mantidas à temperatura de 95°C durante 4 minutos em banho-seco (Dryblock B530).

As amostras foram aplicadas em gel SDS-poliacrilamida 7,5% (acrilamida 40%, glicerol 100%, Tris HCl 1,5M pH 8,8, SDS 10%, persulfato amônico APS 10% e Temed), previamente imersos em cuba contendo tampão para eletroforese, e submetidas à eletroforese durante aproximadamente 3 horas, aplicando uma corrente constante de 80 V (PowerPac<sup>TM</sup> HC, BioRad, Singapura), em banho de gelo.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare, UK), através da montagem do sistema de sanduíche (papel de Whatman, membrana, gel e novamente papel de Whatman), banhado por solução tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, Glicina 190 mM, Metanol 20% e SDS 0,1 %). O sistema foi submetido a uma corrente de 25 V

durante 1 hora, à temperatura ambiente, no aparelho de Semi-dry (Trans-Blot SD Cell, Bio-Rad, U.S.A.).

### **3.8.1.3. Incubação dos anticorpos**

Após a transferência das proteínas, as membranas foram bloqueadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio (leite desnatado 5%, Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 à 0,1 %, pH 7,5) sob constante agitação mecânica, para evitar a união inespecífica com reativos não imunológicos.

Em seguida, sob agitação constante, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários para a eNOS (1:250, BD Biosciences), Akt (anticorpo policlonal, 1:500, Santa Cruz Biotechnology Califórnia, Inc.), Akt fosforilada na Ser 473 (anticorpo policlonal, 1:500, Santa Cruz Biotechnology Califórnia, Inc.), e  $\alpha$ -actina (anticorpo monoclonal, 1:5000, Sigma Chemical, CO, St. Louis, USA) diluídos em solução à 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1 %, pH 7,5). Essa incubação com os anticorpos primários ocorreu durante toda a noite, a 4°C, por agitação mecânica.

Posteriormente, as membranas foram lavadas com solução de TBS-T, por 30 minutos (6 lavadas com duração de 5 minutos cada), sob agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário durante 1 hora, sob agitação constante. Foi utilizado imunoglobulina IgG anti-camundongo para a eNOS e  $\alpha$ -actina (1:5000, Stressgen Bioreagents) e imunoglobulina IgG anti-coelho para Akt e Akt fosforilada (1:7500, Stressgen Bioreagents).

Após incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos, com troca da solução de TBS-T, a cada 5 minutos. Em seguida, realizou-se mais uma etapa de lavagem por mais 30 minutos, utilizando a solução TBS-T sem a presença do tween-20, com troca da solução a cada 10 minutos.

### **3.8.1.4. Detecção das proteínas**

As proteínas correspondentes à eNOS, Akt, Akt fosforilada e  $\alpha$ -actina foram detectadas por uma reação de quimioluminescência, por meio da exposição das membranas, durante 5 minutos, a um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham<sup>TM</sup>, GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas foram colocadas em contato com

um filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham<sup>TM</sup>, UK), e as bandas impregnadas foram posteriormente reveladas. As bandas das proteínas foram quantificadas mediante análise densitométrica. Para tal, foi utilizado o programa ImageJ, após digitalização dos filmes com auxílio de um scanner.

O Western blot para essas quatro proteínas foi realizado na mesma membrana. Sendo assim, para a obtenção da Akt fosforilada e da  $\alpha$ -actina, foi necessário realizar o stripping da membrana, logo após a revelação das bandas para a eNOS e Akt. Para isso, as membranas foram submetidas a duas incubações com solução tampão de “stripping” (Glicina 200 mM, SDS 0,1% e Tween 1%, pH 2,2), cada uma com duração de 10 minutos. Em seguida, outras duas incubações foram realizadas na presença de PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  80 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, NaCl 100mM, pH 7,4), cada uma com duração de 10 minutos, sendo este processo finalizado com mais duas lavagens na presença da solução de TBS-T, cada uma com duração de 5 minutos. Após efetuar o stripping, as membranas foram bloqueadas e as etapas seguintes são similares ao que foi descrito anteriormente.

### **3.9. Expressão dos resultados e análises estatísticas**

Os resultados foram expressos como média +/- erro padrão da média (EPM). Os valores de n significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental. Os resultados de reatividade vascular das curvas concentração-resposta à fenilefrina foram normalizados em função da resposta máxima de contração ao KCl (75 mM) e estão expressos em %.

Para cada curva concentração-resposta à fenilefrina foram calculados os valores de resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e  $\text{pD}_2$  ( $-\log \text{EC}_{50}$ ). Para isso, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta a esse agonista.

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina, alguns resultados foram expressos como diferença da área abaixo da curva (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina. A AUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (dAUC%) da curva controle correspondente.

Os resultados da expressão protéica da eNOS e Akt estão expressos como a relação entre a densidade ótica para eNOS ou Akt em relação à  $\alpha$ -actina. Já os

resultados da Akt fosforilada, estão expressos como a relação entre a densidade ótica para Akt fosforilada em relação à Akt.

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t* de Student, não-pareado, e análise de variância (ANOVA) uma via para medidas repetidas ou completamente randomizadas, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de  $p < 0,05$ .

O programa estatístico GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA) foi utilizado para análise e apresentação gráfica dos dados obtidos.

### **3.10. Fármacos e reagentes utilizados**

- 4,5-diaminofluoresceína (DAF) (Sigma)
- 3', 3'', 5', 5''-tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódico (Azul de bromofenol) (Sigma)
- Acetilcolina, Cloridrato (Sigma)
- Ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Sigma)
- Acido hidroxietilpiperazina etanosulfônico (HEPES) (Sigma)
- Albumina bovina (Sigma)
- Aminoguanidina (Sigma)
- Anticorpo de camundongo anti-eNOS (Anti-eNOS, BD Biosciences)
- Anticorpo de coelho Akt 1/2/3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- Anticorpo de coelho p-Akt 1/2/3 (Ser 473) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- Anticorpo de camundongo  $\alpha$ -actina (Sigma Chemical, CO, St. Louis, USA)
- Anti-imunoglobulina G de camundongo (Stressgen Bioreagents )
- Anti-imunoglobulina G de coelho (Stressgen Bioreagents)
- Bicarbonato de Sódio (Merck)
- Cloreto de Cálcio Dihidratado (Merck)
- Cloreto de Potássio (Merck)
- Cloreto de Sódio (Merck)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (VETEC)
- DL-ditiotreitól (DTT) (Sigma)

- Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF, Inibidor de Protease) (Sigma)
- Fluoreto de sódio (Sigma)
- Fosfato de Potássio Monobásico (Merck)
- Fosfato diácido de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (VETEC)
- Glicerol (Sigma)
- Glicina (Sigma)
- Glicose (VETEC)
- Hidrogenofosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Sigma)
- Inibidor de protease (Cocktail for General Use) (Sigma)
- Lauril sulfato de sódio (SDS) (Sigma)
- Leite desnatado (Nestlé)
- L-Fenilefrina, Hidrocloridrato (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- Metavanadato de sódio ( $\text{NaVO}_3$ ) (Sigma)
- N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- N,N'-Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)
- N,N,N',N'-tetrametil-etinodiamina (Temed) (Sigma)
- Ouabaína, octahidrato (Sigma)
- Persulfato amônico (APS) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Twenn 20) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western blot (ECL Plus, Amersham<sup>TM</sup>, GE Healthcare, UK).
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado (Merck)
- Tetraetilamônio, cloridrato (TEA) (Sigma)
- Tris (hidroximetil)-aminomenato (Tris) (Sigma)
- Uréia (Sigma)
- Uretana (Sigma)
- Wortmannin (Sigma)

Todas as soluções, usadas nos protocolos de reatividade vascular, com exceção do wortmannin, foram preparadas com água deionizada e mantidas no congelador a -20° C. O wortmannin foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO).



## IV. RESULTADOS

### 4.1. Medidas hemodinâmicas

Quatro semanas após o infarto do miocárdio ou cirurgia fictícia (SHAM) foram obtidas as medidas dos parâmetros hemodinâmicos. De acordo com a PDFVE, como descrito anteriormente na metodologia desse trabalho, os animais foram divididos em 3 grupos: grupo SHAM (animais que sofreram apenas uma cirurgia fictícia), grupo INF (animais infartados, mas sem sinais de insuficiência cardíaca) e IC (animais infartados e com sinais de insuficiência).

Como demonstrado na Tabela 1, pode-se observar que os 3 grupos não apresentaram diferenças em relação aos parâmetros de PAS, PAD, PAM, PSVE e FC. Entretanto, a PDFVE do grupo IC apresentou-se aumentada, quando comparada aos grupos SHAM e INF. Já em relação às derivadas  $dP/dt +$  e  $dP/dt -$ , observou-se uma redução desses parâmetros nos grupos INF e IC, quando comparados ao grupo SHAM.

**Tabela 1:** Parâmetros hemodinâmicos dos grupos experimentais:

	SHAM (N=21)	INF (N=37)	IC (N=23)
<b>PAS (mmHg)</b>	107 ± 3,2	99 ± 2,1	104 ± 2,9
<b>PAD (mmHg)</b>	70 ± 3	70 ± 2,7	79 ± 2,8
<b>PAM (mmHg)</b>	87 ± 3,6	84 ± 2,6	92 ± 3,3
<b>PSVE (mmHg)</b>	111 ± 3,6	101 ± 2,3	110 ± 3,6
<b>PDFVE (mmHg)</b>	3,6 ± 0,5	4,6 ± 0,3	16,4 ± 1,3* #
<b>dP/dT + (mmHg/s)</b>	5554 ± 481	4097 ± 227*	3977 ± 269*
<b>dP/dT - (mmHg/s)</b>	-6038 ± 334	-4565 ± 171*	-4918 ± 196*
<b>FC (bpm)</b>	346 ± 13	350 ± 12	368 ± 10

Pressão artéria sistólica (PAS); Pressão arterial diastólica (PAD); pressão arterial média (PAM); pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE); pressão diastólica final ventricular esquerda (PDFVE); primeira derivada temporal positiva ( $dP/dt+$ ) e negativa ( $dP/dt-$ ) da pressão intraventricular esquerda; frequência cardíaca (FC). Os resultados estão expressos como Média ± EPM. ANOVA 1 via, post hoc Tukey. \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. INF.

### 4.2. Parâmetros ponderais e extensão do infarto.

Após as mensurações hemodinâmicas, as câmaras ventriculares foram separadas e pesadas, bem como o pulmão, e assim submetidas à avaliação

ponderal e medida da área de infarto. A Tabela 2 sumariza esses parâmetros dos diferentes grupos. É importante ressaltar que todos os animais utilizados, tanto nos protocolos de reatividade vascular, como nos protocolos de biologia molecular, estão incluídos na tabela abaixo, justificando assim, a diferença entre a quantidade de animais de cada grupo experimental.

O grupo IC apresentou redução do peso corporal e aumento das razões PP/PC, VD/PC e VE/PC, quando comparado aos grupos SHAM e INF. Entretanto, quando comparado apenas os valores absolutos de PP, VD e VE, observou-se aumento apenas do PP e VD no grupo IC quando comparado aos demais grupos. Quanto ao grupo INF, observou-se um aumento dos pesos absolutos e das razões PP/PC, VD/PC, quando comparado ao grupo SHAM. Em relação à área de infarto, não houve diferença significativa entre os grupos INF e IC.

**Tabela 2:** Parâmetros ponderais e extensão do infarto dos grupos experimentais:

	SHAM (N=50)	INF (N=40)	IC (N=18)
PC (g)	351 ± 4,6	340 ± 5,6	314 ± 9,3* #
PP (mg)	1832 ± 50,8	2283 ± 103*	3198 ± 106* #
PP/PC (mg/g)	5,25 ± 0,13	6,83 ± 0,4*	10,1 ± 0,4 * #
VE (mg)	785 ± 11,1	785 ± 25,2	822 ± 37,1
VE/PC (mg/g)	2,24 ± 0,02	2,37 ± 0,04	2,62 ± 0,1 * #
VD (mg)	213 ± 5,05	288 ± 13,6*	410 ± 24,7* #
VD/PC (mg/g)	0,6 ± 0,01	0,86 ± 0,05*	1,3 ± 0,07 * #
AI (%)		33,6 ± 0,1	36 ± 1,5

Peso corporal (PC); peso úmido do pulmão (PP); razão peso do pulmão e peso corporal (PP/PC); peso úmido do ventrículo esquerdo (VE); razão peso do ventrículo esquerdo e peso corporal (VE/PC); peso úmido do ventrículo direito (VD); razão peso do ventrículo direito e peso corporal (VD/PC); área de infarto (AI%). Os resultados estão expressos como Média ± EPM. ANOVA 1 via, post hoc Tukey. Para avaliar a AI, foi utilizado teste *t* de Student não pareado. \**p*<0,05 vs. SHAM; # *p*<0,05 vs. INF.

### 4.3. Estudo da reatividade vascular em anéis de aorta

#### 4.3.1. Respostas vasculares ao KCl e à fenilefrina

Na Tabela 3 estão representados os valores de contração induzido por 75 mM de KCl. Como se pode observar, as contrações induzidas pelo KCl foram similares entre os grupos SHAM, INF e IC. A retirada mecânica do endotélio não modificou significativamente a resposta contrátil induzida pelo KCl. Da mesma forma,

semelhante aos anéis com endotélio intacto, a resposta ao KCl nos anéis sem endotélio foi semelhante entre os diferentes grupos experimentais.

**Tabela 3:** Valores de contração (g) induzida por 75mM de KCl em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio de ratos SHAM, INF e IC.

	SHAM	INF	IC
<b>E+</b>	2,38 ± 0,06	2,21 ± 0,08	2,18 ± 0,08
<b>E-</b>	2,61 ± 0,25	2,53 ± 0,12	2,1 ± 0,3

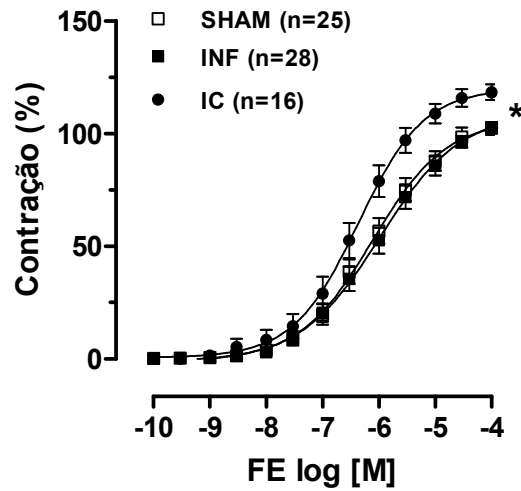
Os resultados estão expressos em Média ± EPM. ANOVA 1 via, post hoc Tukey, p>0,05.

Como demonstrado na Figura 5, a fenilefrina aumentou, de maneira concentração-dependente, o tônus basal dos anéis de aorta de ratos SHAM, INF e IC. Entretanto, a resposta máxima à fenilefrina foi maior no grupo IC, quando comparado aos grupos SHAM e INF (Figura 5, Tabela 4).

**Tabela 4:** Parâmetros referentes à sensibilidade ( $pD_2$ ) e à resposta máxima ( $R_{máx}$ , % de contração ao KCl) obtidos por meio das curvas concentração-resposta à fenilefrina, em segmentos de artéria torácica de ratos SHAM, INF e IC.

	SHAM	INF	IC
<b><math>pD_2</math></b>	-5,98 ± 0,17	-6,03 ± 0,13	-6,45 ± 0,19
<b><math>R_{máx}</math></b>	104,4 ± 3,04	106,5 ± 2,3	119 ± 3,7*

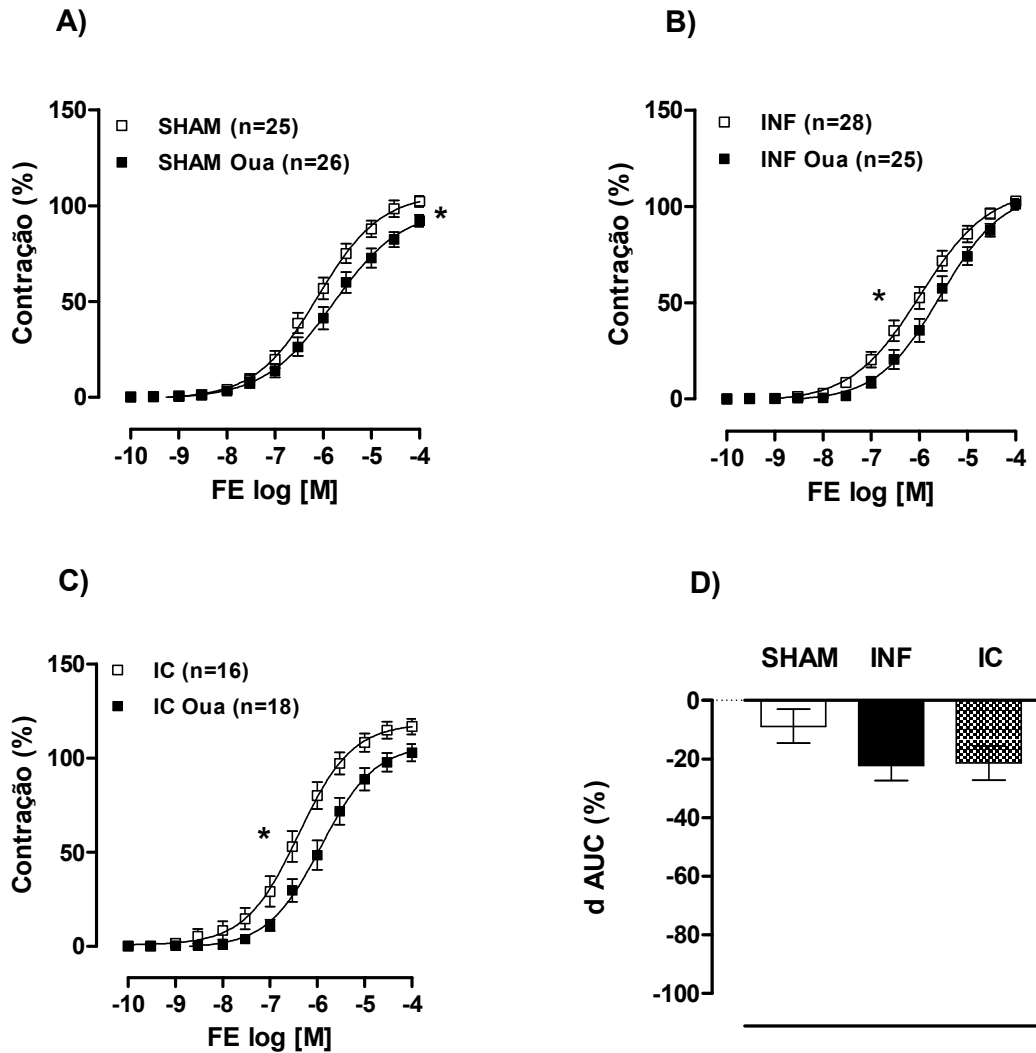
Valores expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via, post hoc Tukey. \*P < 0,05 vs. SHAM e INF.



**Figura 5:** Curva concentração-resposta à fenilefrina (FE) em segmentos de aorta torácica de ratos SHAM, INF e IC. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. ANOVA 1 via, post hoc Tukey. \*P < 0,05 IC vs. SHAM e INF.

#### 4.3.2. Efeito da ouabaína (3 nM) sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

A ouabaína promoveu diminuição da resposta vasoconstritora à fenilefrina nos três grupos experimentais, quando comparado às curvas controles. Como demonstrado na Figura 6 e Tabela 5, houve diminuição da resposta máxima no grupo SHAM e da sensibilidade nos grupos INF e IC, após incubação com ouabaína. Através da dAUC (Figura 6D), observou-se que o efeito da ouabaína em diminuir a resposta vasoconstritora à fenilefrina foi de magnitude similar nos três grupos experimentais estudados.

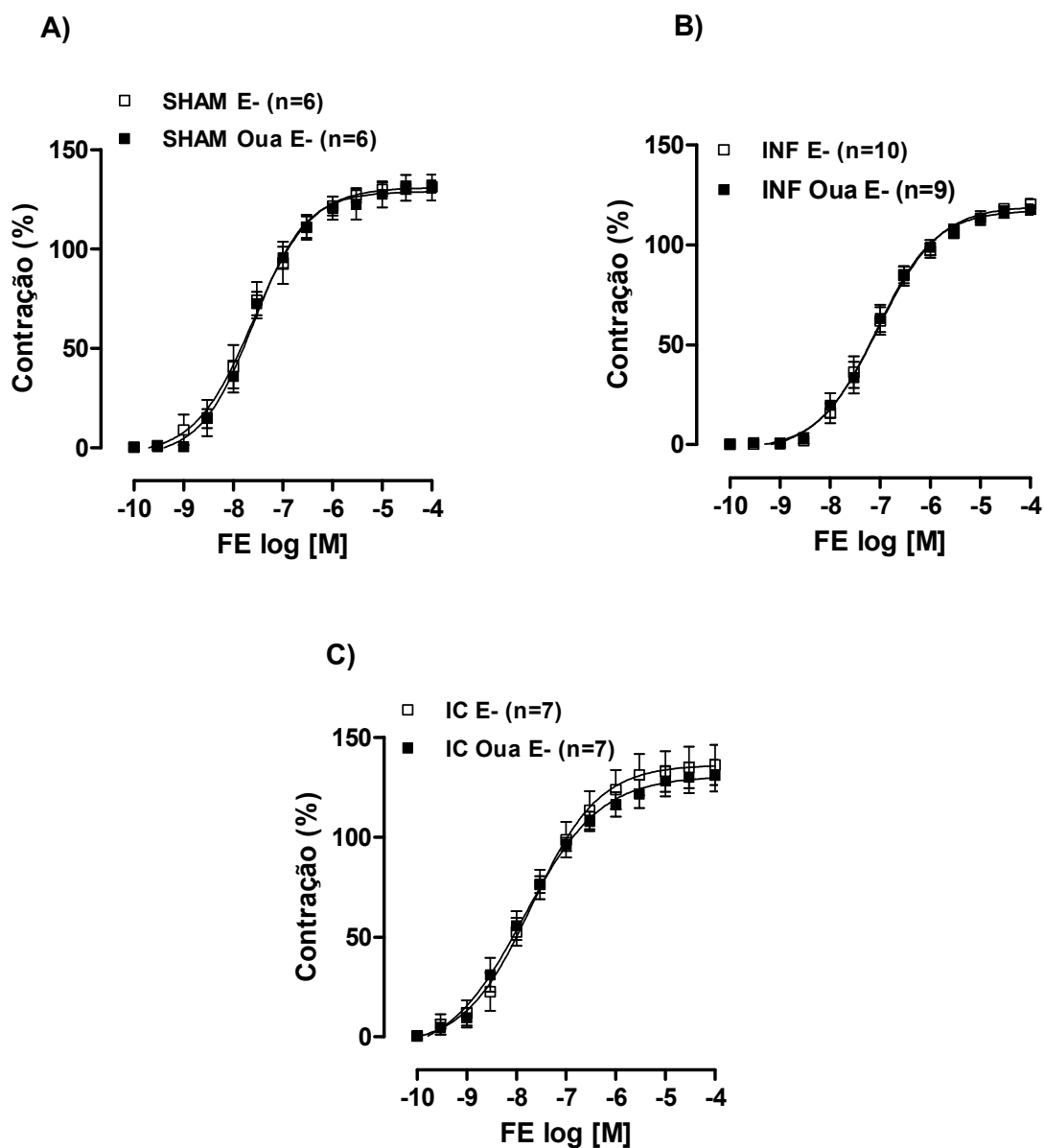


**Figura 6:** Curva concentração-resposta à fenilefrina (FE) na presença (SHAM OUA, INF OUA, IC OUA) e na ausência de ouabaína (SHAM, INF, IC) em segmentos de aorta torácica de ratos SHAM (A), INF (B) e IC (C). Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta dos três grupos experimentais (D). Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de  $R_{max}$  e  $pD_2$ : \*  $P < 0,05$  entre as duas situações experimentais (presença vs. ausência de ouabaína). ANOVA 1 via, post hoc Tukey, para análise de dAUC:  $p > 0,05$ .

#### **4.3.3. Modulação do endotélio nas ações da ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina**

A fim de avaliar a modulação endotelial nas ações da ouabaína, o endotélio vascular foi mecanicamente removido e, a ausência desta estrutura foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina ( $10^{-5}$ M) induzir relaxamento menor que 10%.

Na ausência do endotélio, a ouabaína não alterou a reatividade vascular à fenilefrina, sugerindo que seus efeitos são dependentes do endotélio vascular (Figura 7).

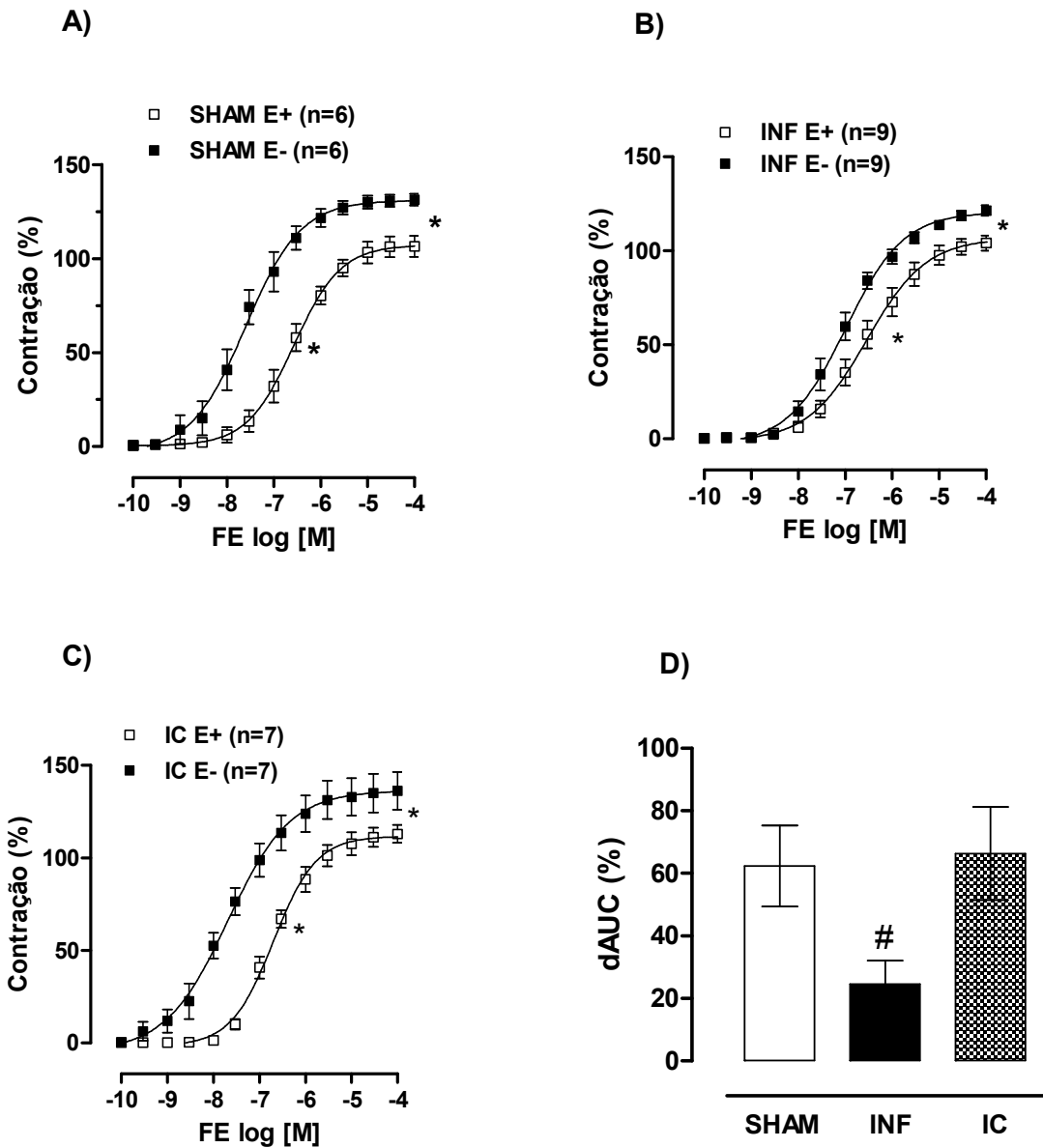


**Figura 7:** Efeito da remoção do endotélio (E-) na curva concentração-resposta à fenilefrina (FE) em segmentos de aorta torácica de ratos SHAM (A), INF (A) e IC (C) na presença (Oua E-) e na ausência (E-) de ouabaína. Os resultados (média ± EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado.  $p > 0,05$ .

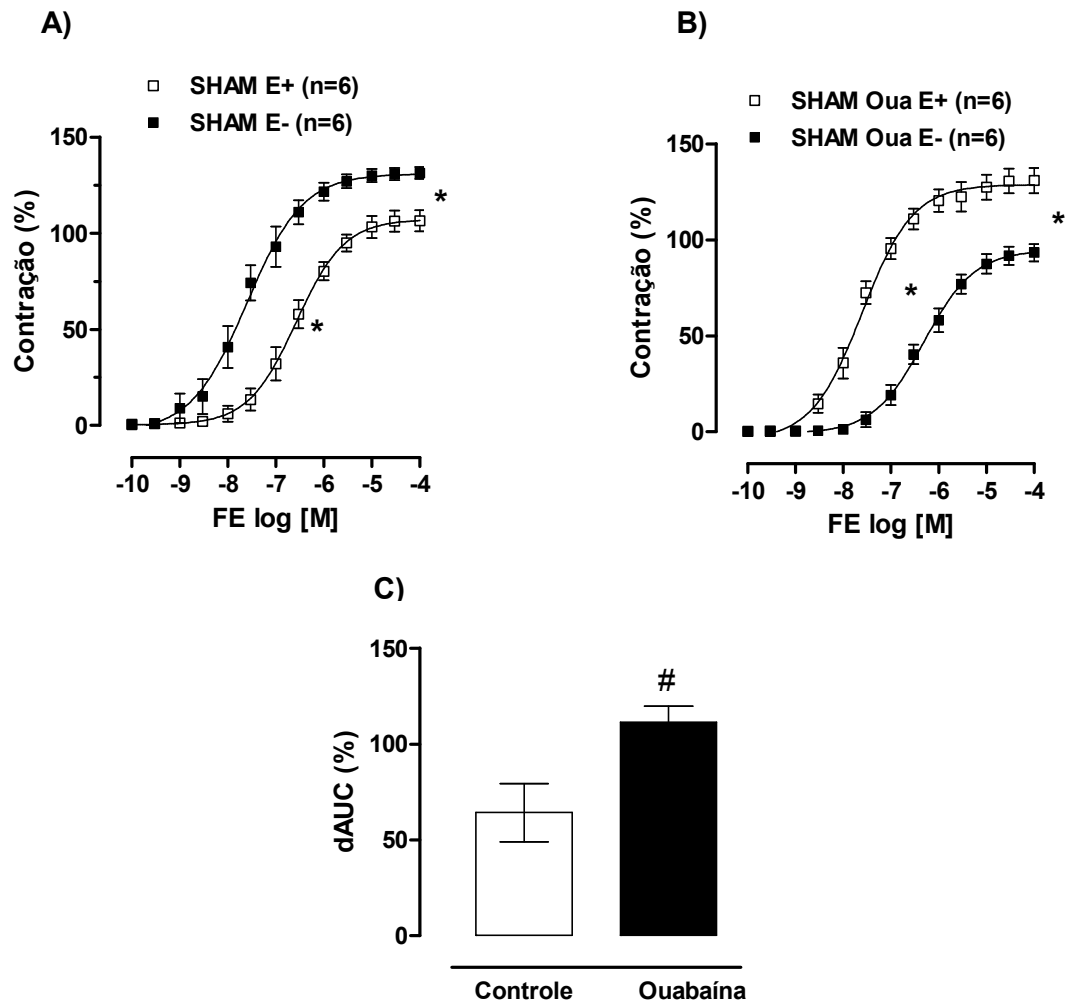
Além disso, para verificar a modulação endotelial sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina dos três grupos estudados, tanto na presença quanto na ausência de ouabaína, comparou-se a área abaixo das curvas concentração resposta à fenilefrina, na presença e na ausência do endotélio. Na ausência de ouabaína, a remoção mecânica do endotélio induziu um significativo aumento da

sensibilidade e da resposta máxima à fenilefrina, em segmentos da aorta torácica dos 3 grupos estudados (Figura 8 A, B, C, Tabela 5). Entretanto, como evidenciado através dos valores de dAUC, esse aumento foi de menor magnitude nos animais do grupo INF, quando comparado aos grupos SHAM e IC (Figura 8 D). Já na presença de ouabaína, evidenciou-se um aumento da modulação endotelial no grupo SHAM (Figura 9). Entretanto, a ouabaína não alterou a modulação endotelial nos grupos INF e IC (Figura 10, Figura 11).

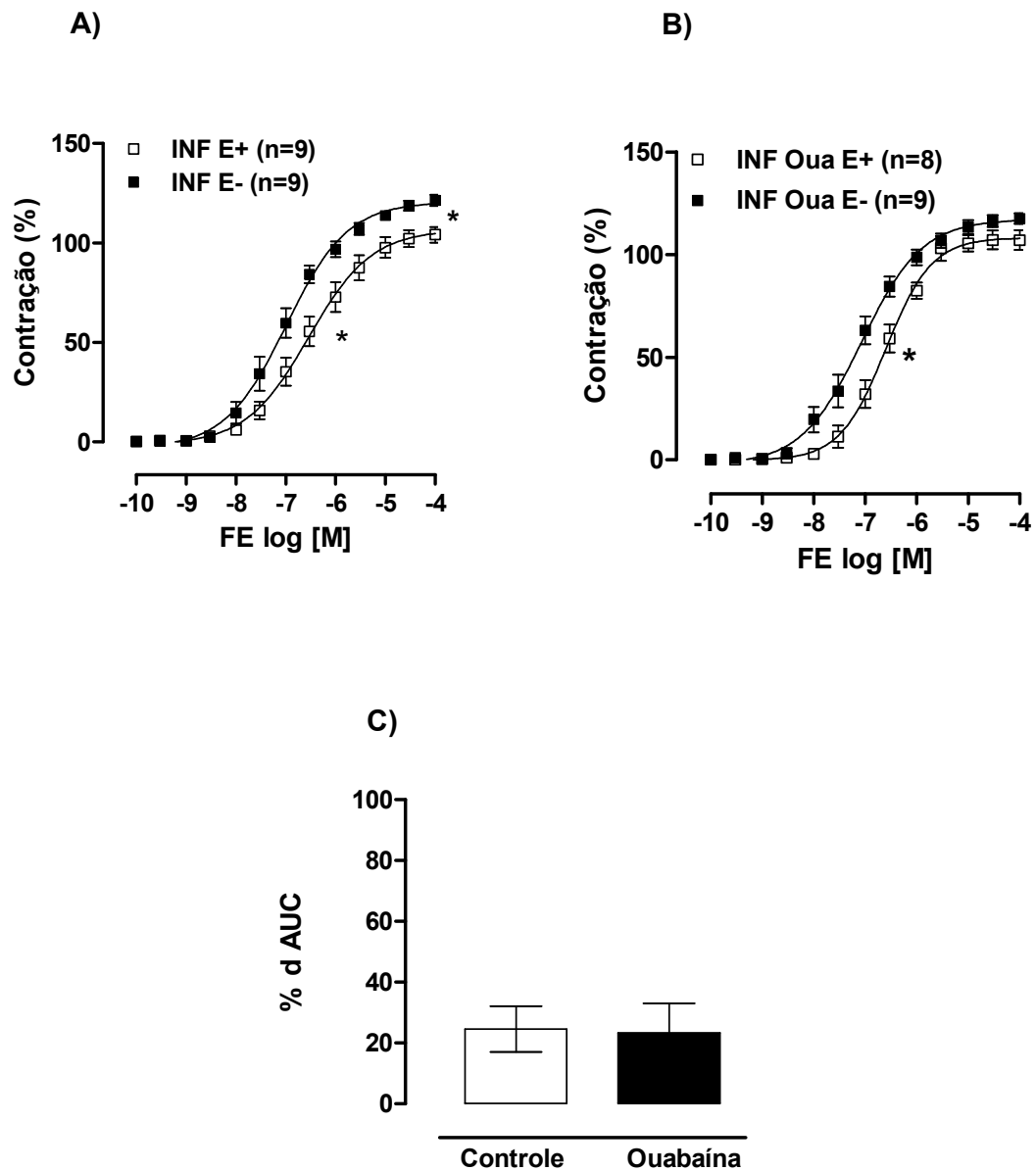




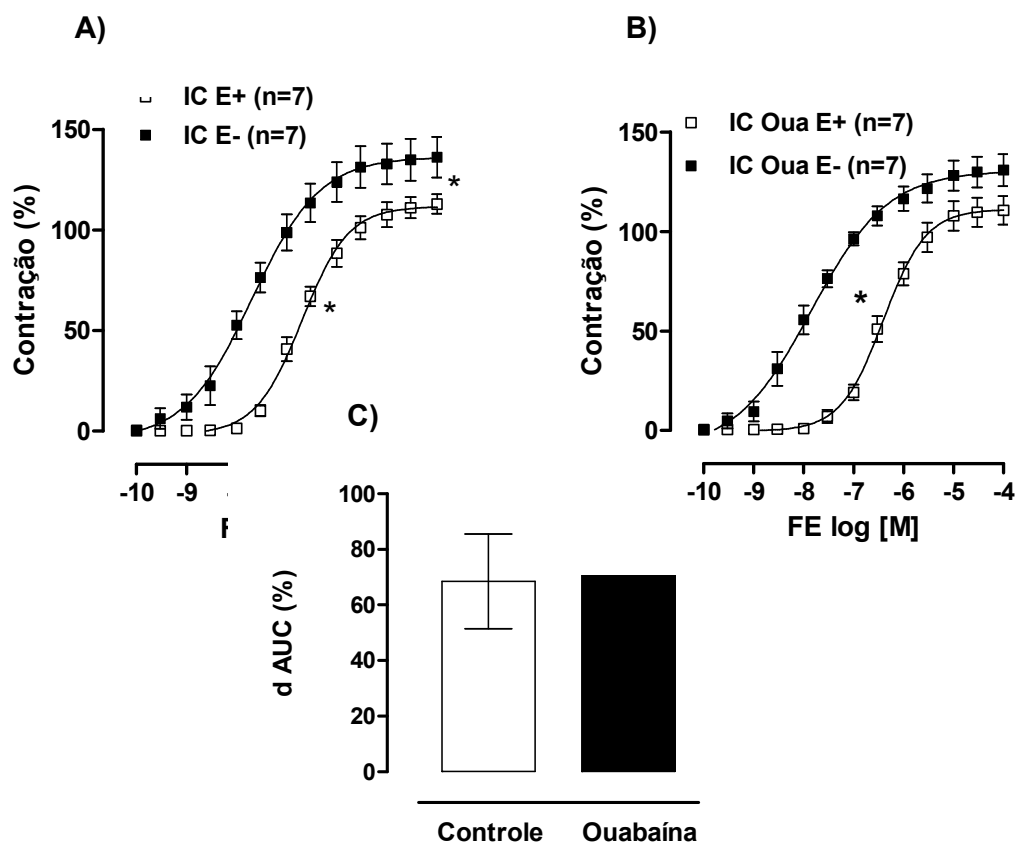
**Figura 8:** Efeito da retirada mecânica do endotélio (E-) sobre as curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE) em segmentos de aorta torácica de ratos SHAM (A), INF (B) e IC (C). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta dos três grupos experimentais (D). Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de  $R_{max}$  e  $pD_2$ : \*  $P < 0,05$  E<sup>+</sup> vs E<sup>-</sup>. ANOVA 1 via, post hoc Tukey, para análise de dAUC: #  $P < 0,05$  vs. SHAM e IC.



**Figura 9:** Efeito da retirada mecânica do endotélio (E-) sobre as curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE) em segmentos de aorta torácica de ratos SHAM: (A) presença (SHAM E+) e ausência do endotélio (SHAM E-); (B) efeito da ouabaína na presença (Oua E+) e na ausência do endotélio (Oua E-); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo, na ausência (controle) e na presença (ouabaína) de ouabaína. Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste  $t$  não pareado, para análise de  $R_{max}$ ,  $pD_2$  e dAUC: \*  $p < 0,05$  E<sup>+</sup> vs E<sup>-</sup>, # $p < 0,05$  vs. Controle.



**Figura 10:** Efeito da retirada mecânica do endotélio (E-) sobre as curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE) em segmentos de aorta torácica de ratos INF: (A) presença (INF E+) e ausência do endotélio (INF E-); (B) efeito da ouabaína na presença (Oua E+) e na ausência do endotélio (Oua E-). (C) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo, na ausência (controle) e na presença (ouabaína) de ouabaína. Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de R<sub>max</sub>, pD<sub>2</sub> e dAUC: \* *p* < 0,05 E<sup>+</sup> vs E<sup>-</sup>.



**Figura 11:** Efeito da retirada mecânica do endotélio (E-) sobre as curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE) em segmentos de artéria aorta torácica de ratos IC: (A) presença (IC E+) e ausência do endotélio (IC E-); (B) efeito da ouabaína na presença (Oua E+) e na ausência do endotélio (Oua E-); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo, na ausência (controle) e na presença (ouabaína) de ouabaína. Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de  $R_{max}$ ,  $pD_2$  e dAUC: \*  $p < 0,05$  E<sup>+</sup> vs E<sup>-</sup>.

**Tabela 5:** Parâmetros referentes à sensibilidade ( $pD_2$ ) e à resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ , % de contração ao KCl) obtidos por meio das curvas concentração-resposta à fenilefrina, em endotélio intacto ( $E^+$ ) e desnudo ( $E^-$ ), na presença (Oua) e na ausência de ouabaína, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos SHAM, INF e IC.

	$pD_2$			$R_{m\acute{a}x}$		
	SHAM	INF	IC	SHAM	INF	IC
<b>E+</b>	-6,58 ± 0,11	-6,37 ± 0,21	-6,62 ± 0,08	106,6 ± 5,7	108,5 ± 5,6	114,3 ± 5
<b>E-</b>	-7,73 ± 0,28*	-6,97 ± 0,18*	-7,9 ± 0,3*	131,5 ± 3,0*	124,5 ± 4,5*	135,7 ± 7,7*
<b>Oua E+</b>	-6,3 ± 0,11	-6,35 ± 0,09	-6,41 ± 0,05	94,2 ± 4,5	105,7 ± 6,9	113,6 ± 6,3
<b>Oua E-</b>	-7,61 ± 0,1 <sup>#</sup>	-6,89 ± 0,15 <sup>#</sup>	-7,69 ± 0,15 <sup>#</sup>	131,3 ± 6,8 <sup>#</sup>	121,7 ± 2,9	123,9 ± 5,6

Valores expressos como média ± EPM. Teste t: \* $p < 0,05$  vs  $E^+$  ;  $\#p < 0,05$  vs. Oua E+.

#### 4.3.4. Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no efeito da ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta

Diante dos resultados apresentados, observou-se que a ouabaína, em baixa concentração, diminui a resposta contrátil à fenilefrina em ratos SHAM, INF e IC, sendo que, esses efeitos são dependentes do endotélio vascular. Diante disso, o próximo passo desse estudo foi avaliar a participação dos fatores endoteliais envolvidos nesse efeito da ouabaína. Sendo assim, iniciamos o estudo da via do óxido nítrico, já que este é um importante vasodilatador derivado do endotélio.

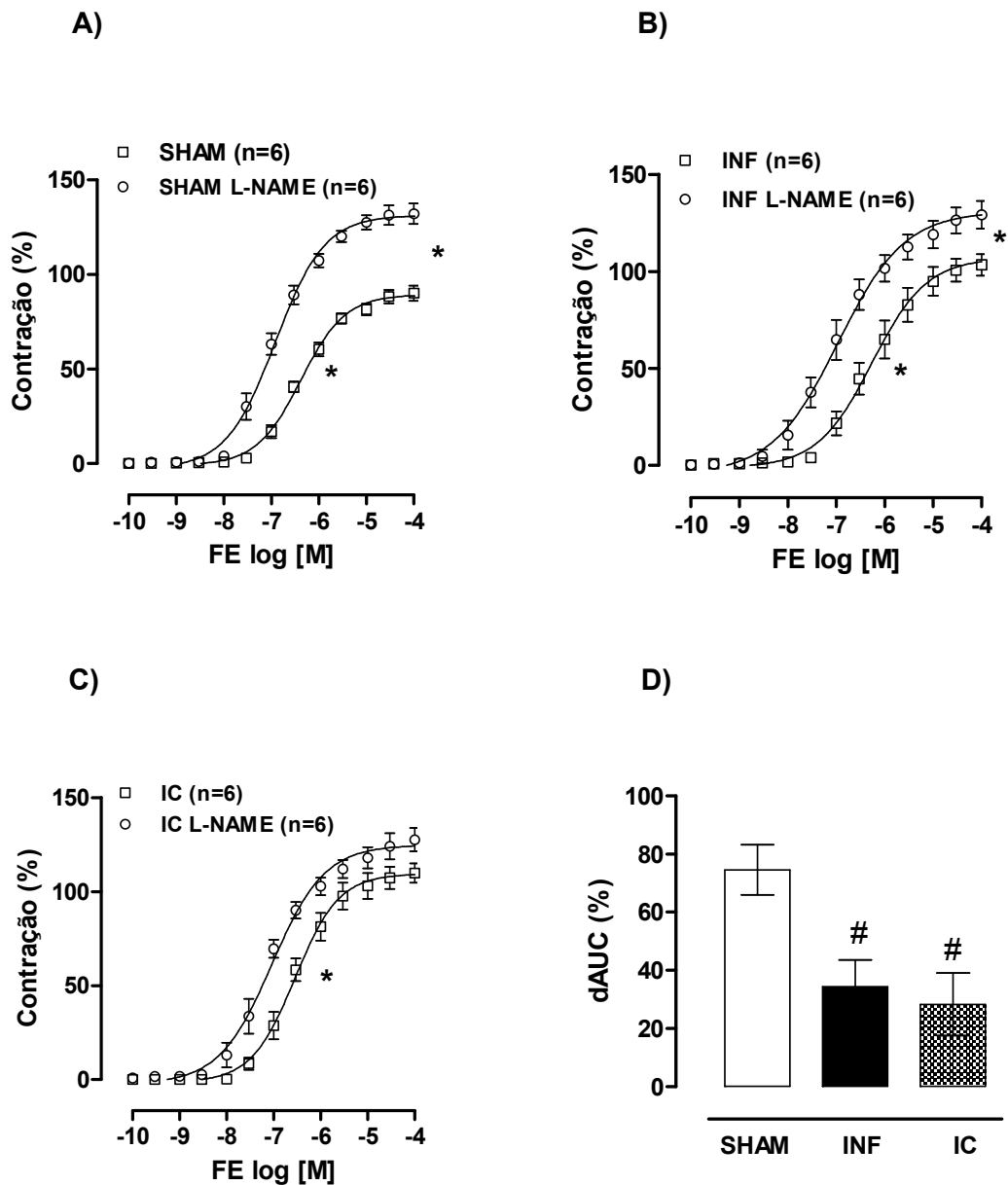
##### 4.3.4.1. Influência do óxido nítrico no efeito ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta

Para analisar a participação do óxido nítrico no efeito da ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, anéis de aorta de ratos SHAM, INF e IC, foram incubados com L-NAME (100  $\mu$ M), inibidor não-específico da NOS, na presença e na ausência de ouabaína.

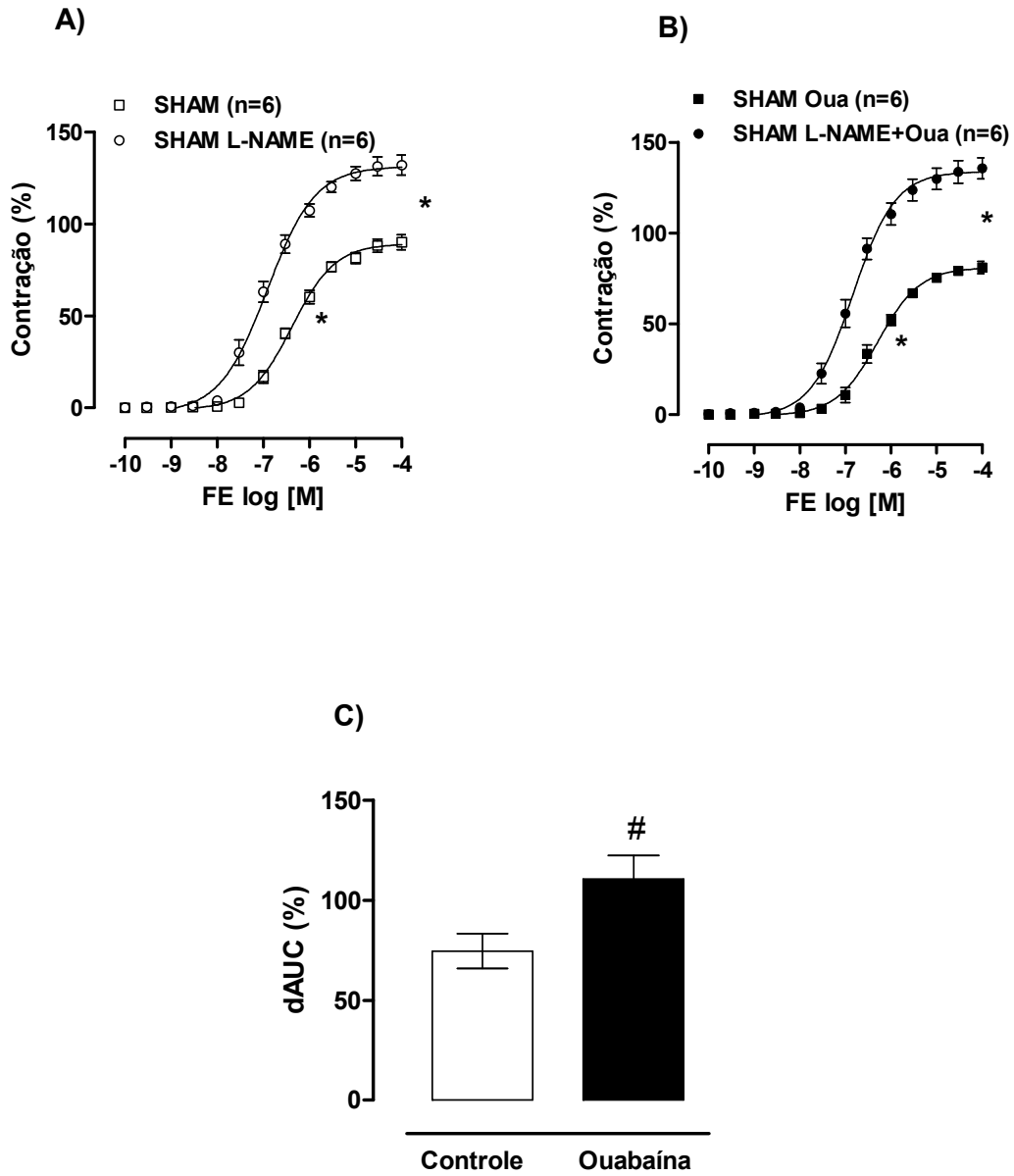
Como demonstrado na Figura 12 e Tabela 6, o L-NAME induziu um aumento da sensibilidade e da resposta máxima à fenilefrina em anéis de aorta dos grupos SHAM e INF, e um aumento somente da sensibilidade nos anéis de aorta do grupo IC. Como evidenciado pelos valores de dAUC, o efeito da inibição da síntese de

óxido nítrico com L-NAME foi menor nos grupos INF e IC, quando comparado ao grupo SHAM (Figura 12D).

Quando os anéis de aorta foram expostos ao L-NAME associado à ouabaína, o efeito do L-NAME sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina, na presença de ouabaína, foi maior quando comparado ao efeito apenas do L-NAME, nos três grupos estudados (Figuras 13, 14 e 15, Tabela 6).

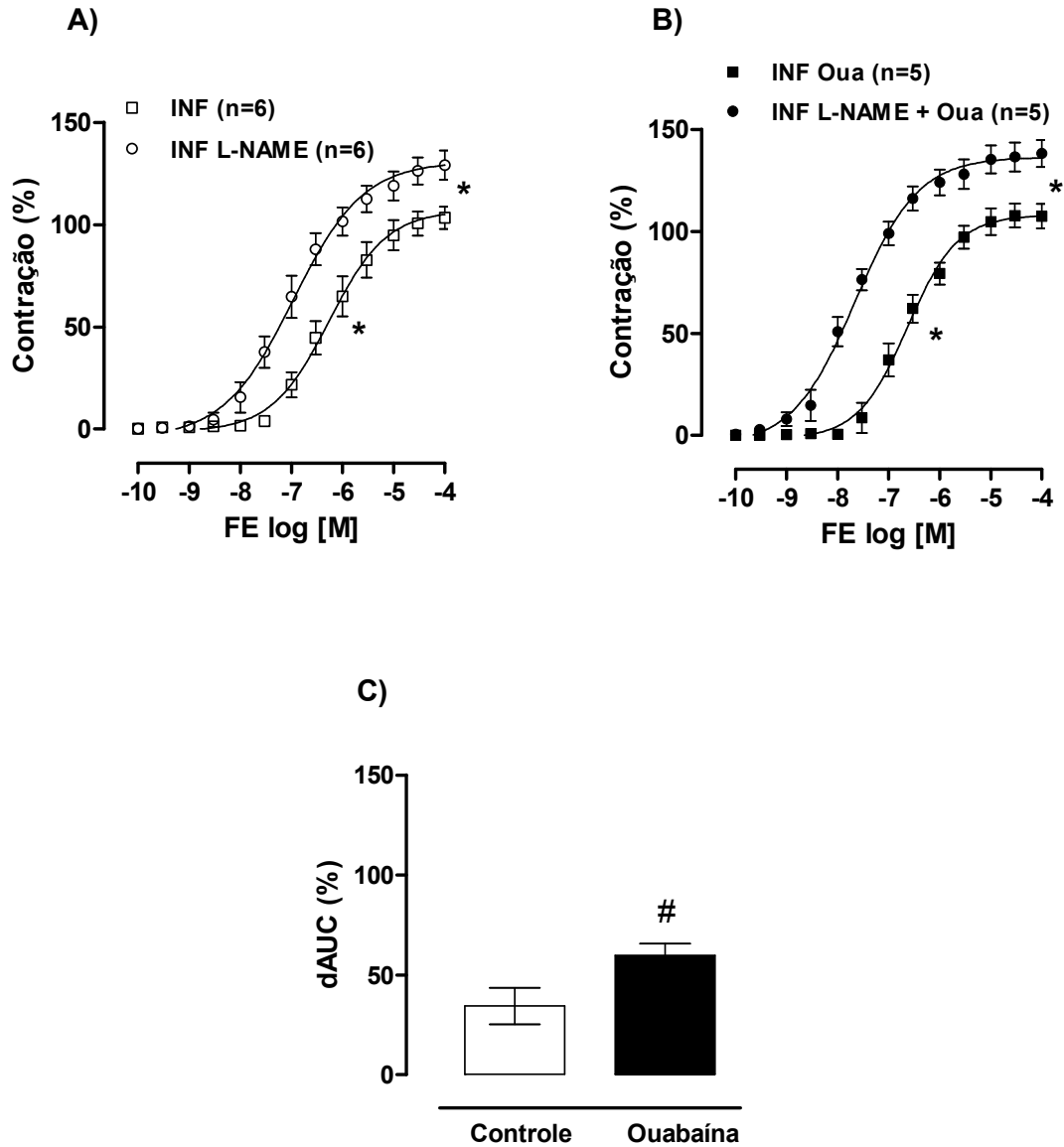


**Figura 12:** Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com L-NAME (100  $\mu$ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos SHAM (A), INF (B) e IC (C). Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de todo os grupos experimentais (D). Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de  $R_{max}$  e  $pD_2$ : \*  $p < 0,05$  Antes vs após incubação com L-NAME. ANOVA 1 via, post hoc Tukey, para análise de dAUC: #  $p < 0,05$  vs. SHAM.

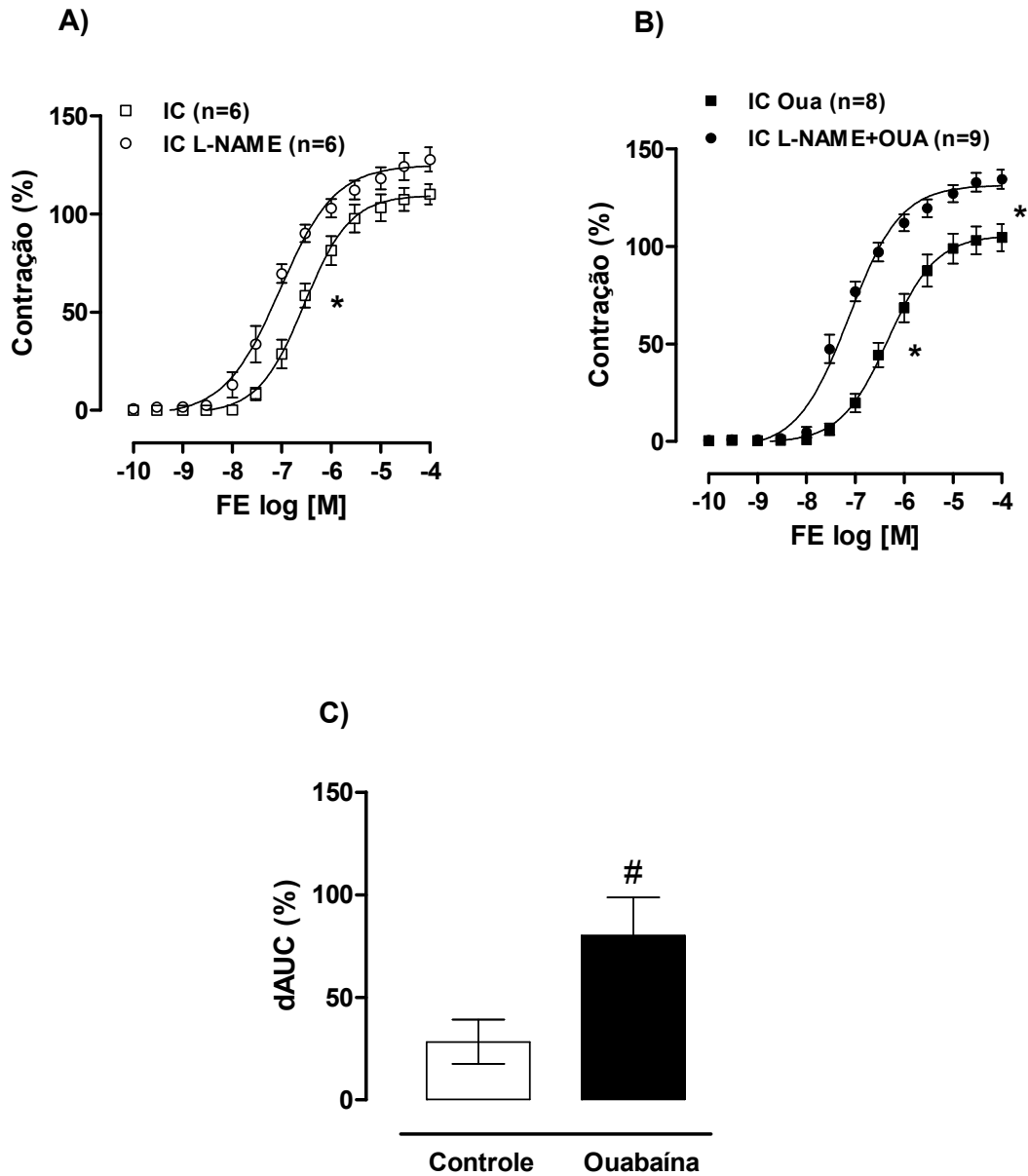


**Figura 13:** Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com L-NAME (100  $\mu$ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos SHAM na presença (B) e na ausência (A) de ouabaína. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta após incubação com L-NAME na ausência (Controle) e na presença de ouabaína (Ouabaína). Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de  $R_{max}$ ,  $pD_2$  e dAUC: \*  $p < 0,05$  Antes vs. após incubação com L-NAME; #  $p < 0,05$  vs. Controle.





**Figura 14:** Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com L-NAME (100  $\mu$ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos INF na presença (B) e na ausência (A) de ouabaína. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta após incubação com L-NAME na ausência (Controle) e na presença de ouabaína (Ouabaína). Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de  $R_{max}$ ,  $pD_2$  e dAUC: \*  $p < 0,05$  Antes vs. após incubação com L-NAME; #  $p < 0,05$  vs. Controle.



**Figura 15:** Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com L-NAME (100  $\mu$ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos IC na presença (B) e na ausência (A) de ouabaína. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta após incubação com L-NAME na ausência (Controle) e na presença de ouabaína (Ouabaína). Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de Rmax, pD<sub>2</sub> e dAUC: \* *p* < 0,05 Antes vs. após incubação com L-NAME; # *p* < 0,05 vs. Controle.

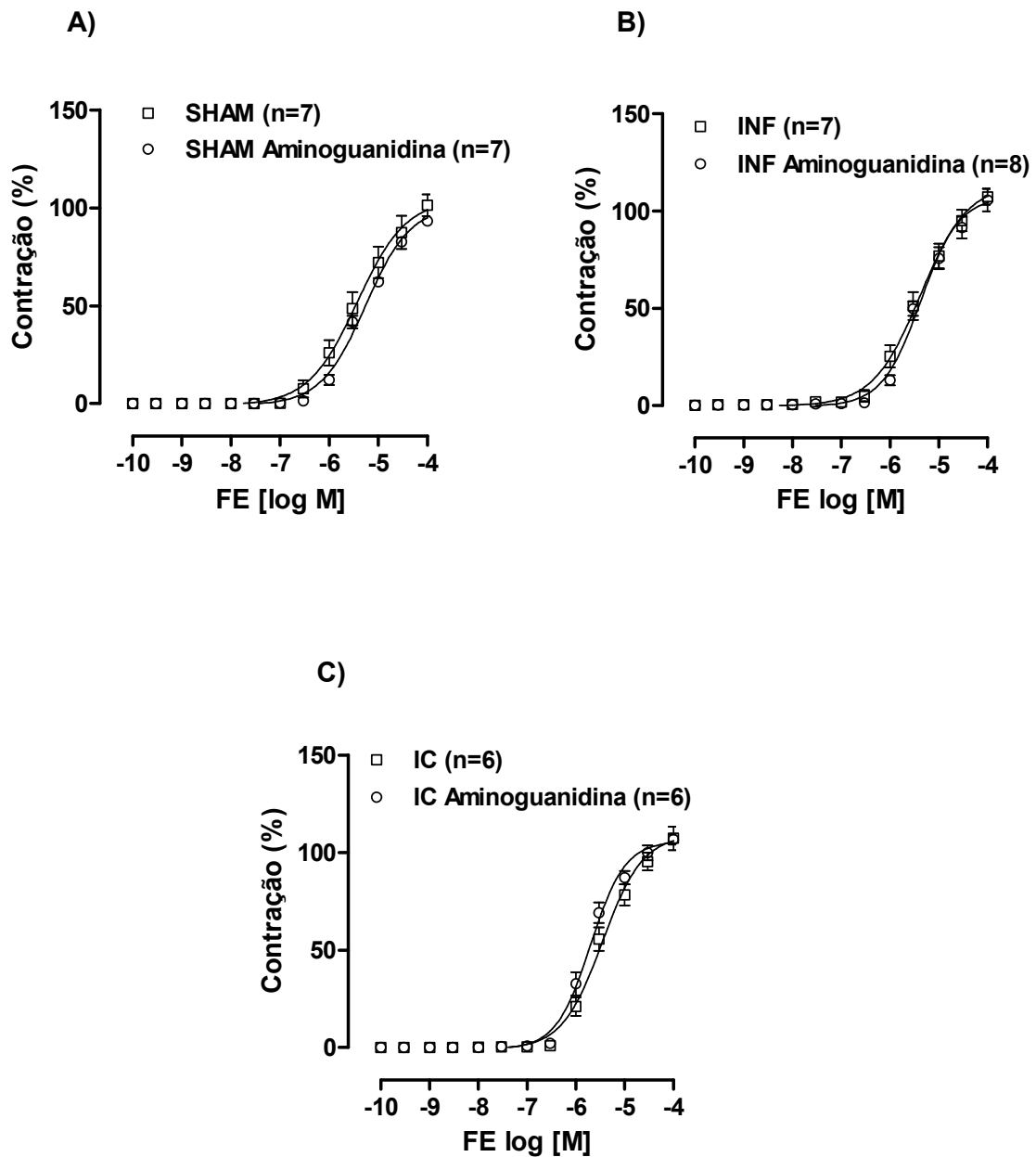
**Tabela 6:** Parâmetros referentes à sensibilidade ( $pD_2$ ) e à resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ , % de contração ao KCl) obtidos por meio das curvas concentração-resposta à fenilefrina, antes e após incubação com L-NAME, na presença e na ausência de ouabaína, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos SHAM, INF e IC.

	$pD_2$			$R_{m\acute{a}x}$		
	SHAM	INF	IC	SHAM	INF	IC
<b>Antes L-NAME</b>	-6,37 ± 0,08	-6,21 ± 0,2	-6,54 ± 0,08	90 ± 3,94	110 ± 6,4	112 ± 5,43
<b>Após L-NAME</b>	-6,91 ± 0,1*	-6,99 ± 0,22*	-7,1 ± 0,11*	133 ± 6,28*	137 ± 3,6*	129 ± 6,33
<b>Após Oua</b>	-6,3 ± 0,11	-6,66 ± 0,13	-6,31 ± 0,09	86 ± 5,77	111 ± 3,94	106 ± 7,13
<b>Após L-NAME+Oua</b>	-6,83 ± 0,06*	-8,05 ± 0,48*	-7,13 ± 0,06*	136 ± 5,8*	139 ± 6,4*	136 ± 4,62*

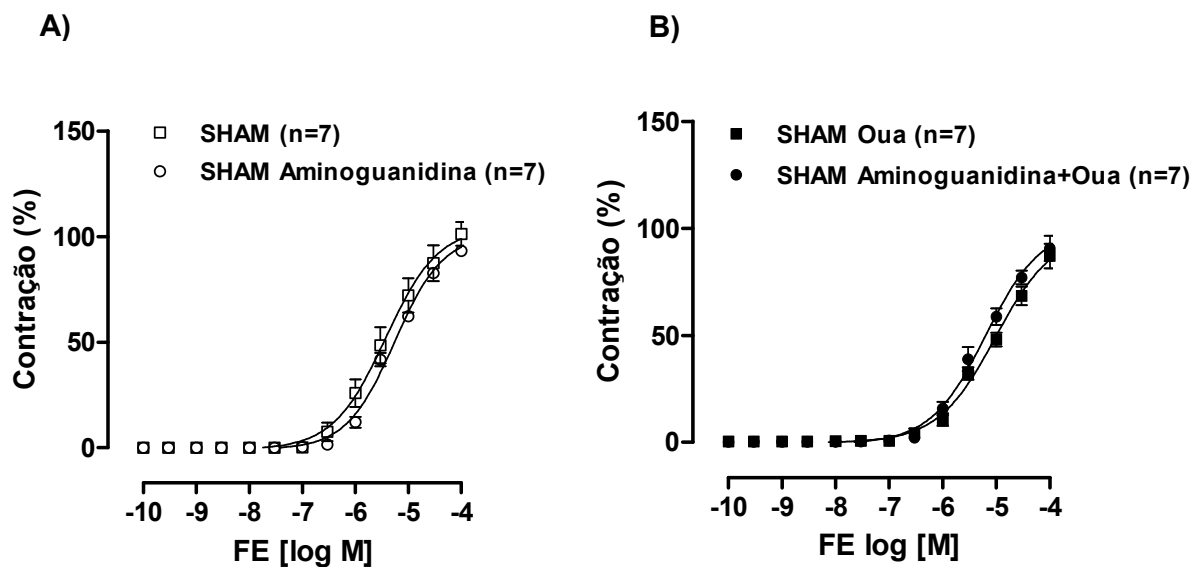
Valores expressos como média ± EPM. Teste *t* não pareado: \**p* < 0,05 Antes vs. após incubação com L-NAME

A participação do óxido nítrico derivado da isoforma induzível da óxido nítrico sintase no efeito da ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina também foi avaliada. Para isso, anéis de aorta de ratos SHAM, INF e IC, foram incubados com aminoguanidina (50  $\mu$ M), na presença e na ausência de ouabaína.

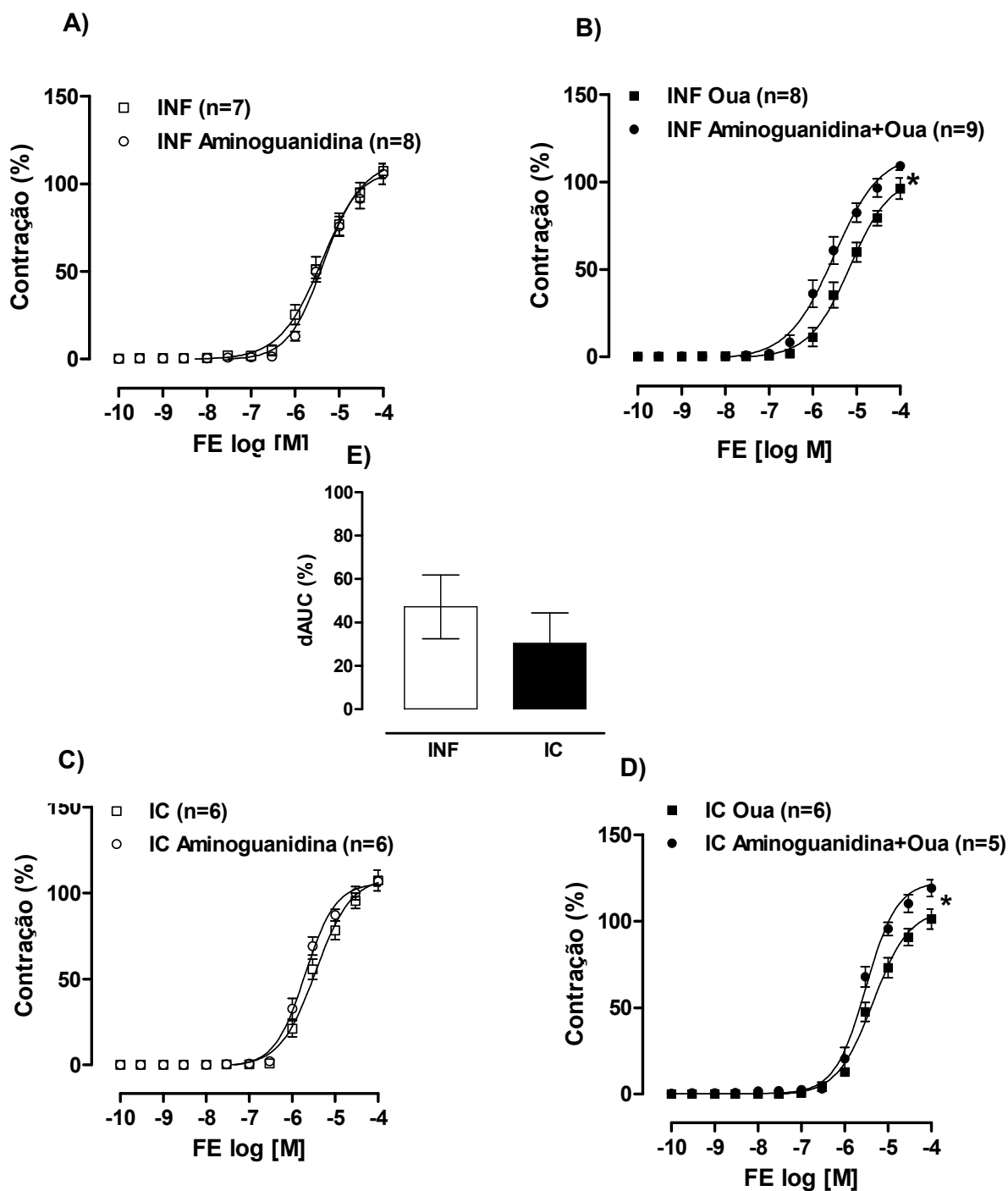
A incubação com aminoguanidina não alterou a sensibilidade e a resposta máxima à fenilefrina nos anéis de aorta dos três grupos estudados (Figura 16, Tabela 7). Entretanto, quando os anéis de aorta foram expostos à aminoguanidina associado à ouabaína, observou-se um aumento da resposta máxima à fenilefrina nos grupos INF e IC (Figura 18, Tabela 7). Como se pode observar na análise da dAUC, esse efeito foi de igual magnitude nos dois grupos (Figura 18E). Já em relação ao grupo SHAM, a incubação com aminoguanidina mais ouabaína não alterou a resposta contrátil à fenilefrina (Figura 17, Tabela 7).



**Figura 16:** Efeito do bloqueio da síntese óxido nítrico derivado da isoforma induzível da óxido nítrico sintase, com Aminoguanidina (50  $\mu$ M), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos SHAM (A), INF (B) e IC (C). Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de Rmax e  $pD_2$ :  $p > 0,05$ .



**Figura 17:** Efeito do bloqueio da síntese óxido nítrico derivado da isoforma induzível da óxido nítrico sintase, com Aminoguanidina (50  $\mu$ M), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos SHAM na presença (B) e na ausência (A) de ouabaína. Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de  $R_{max}$ ,  $pD_2$ :  $p > 0,05$



**Figura 18:** Efeito do bloqueio da síntese óxido nítrico derivado da isoforma induzível da óxido nítrico sintase, com Aminoguanidina (50  $\mu$ M), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos INF (A,B) e IC (C,D) na presença (B,D) e na ausência (A,C) de ouabaína. (E) Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) após incubação com Aminoguanidina na presença de ouabaína. Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de  $R_{max}$ ,  $pD_2$  e dAUC: \*  $p < 0,05$  Antes vs. após incubação com Aminoguanidina.

**Tabela 7:** Parâmetros referentes à sensibilidade ( $pD_2$ ) e à resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ , % de contração ao KCl) obtidos por meio das curvas concentração-resposta à fenilefrina, antes e após incubação com Aminoguanidina (Amino), na presença e na ausência de ouabaína (Oua), em segmentos de artéria aorta torácica de ratos SHAM, INF e IC.

	$pD_2$			$R_{m\acute{a}x}$		
	SHAM	INF	IC	SHAM	INF	IC
<b>Antes Amino</b>	-5,42 ± 0,15	-5,52 ± 0,05	-5,46 ± 0,07	102 ± 5,88	114 ± 2,38	110 ± 5,27
<b>Após Amino</b>	-5,27 ± 0,07	-5,36 ± 0,08	-5,7 ± 0,07	102 ± 3,87	112 ± 5,81	109 ± 2,98
<b>Após Oua</b>	-5 ± 0,09	-5,16 ± 0,11	-5,35 ± 0,06	91 ± 4,67	99 ± 4,83	109 ± 6,31
<b>Após Amino+Oua</b>	-5,11 ± 0,09	-5,53 ± 0,14	-5,52 ± 0,1	99 ± 5,52	119 ± 2,74*	130 ± 5,83*

Valores expressos como média ± EPM. Teste *t* não pareado: \**p* < 0,05 Antes vs. após incubação com Aminoguanidina.

#### 4.3.4.2. Participação do óxido nítrico derivado da via PI3K/Akt no efeito ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta

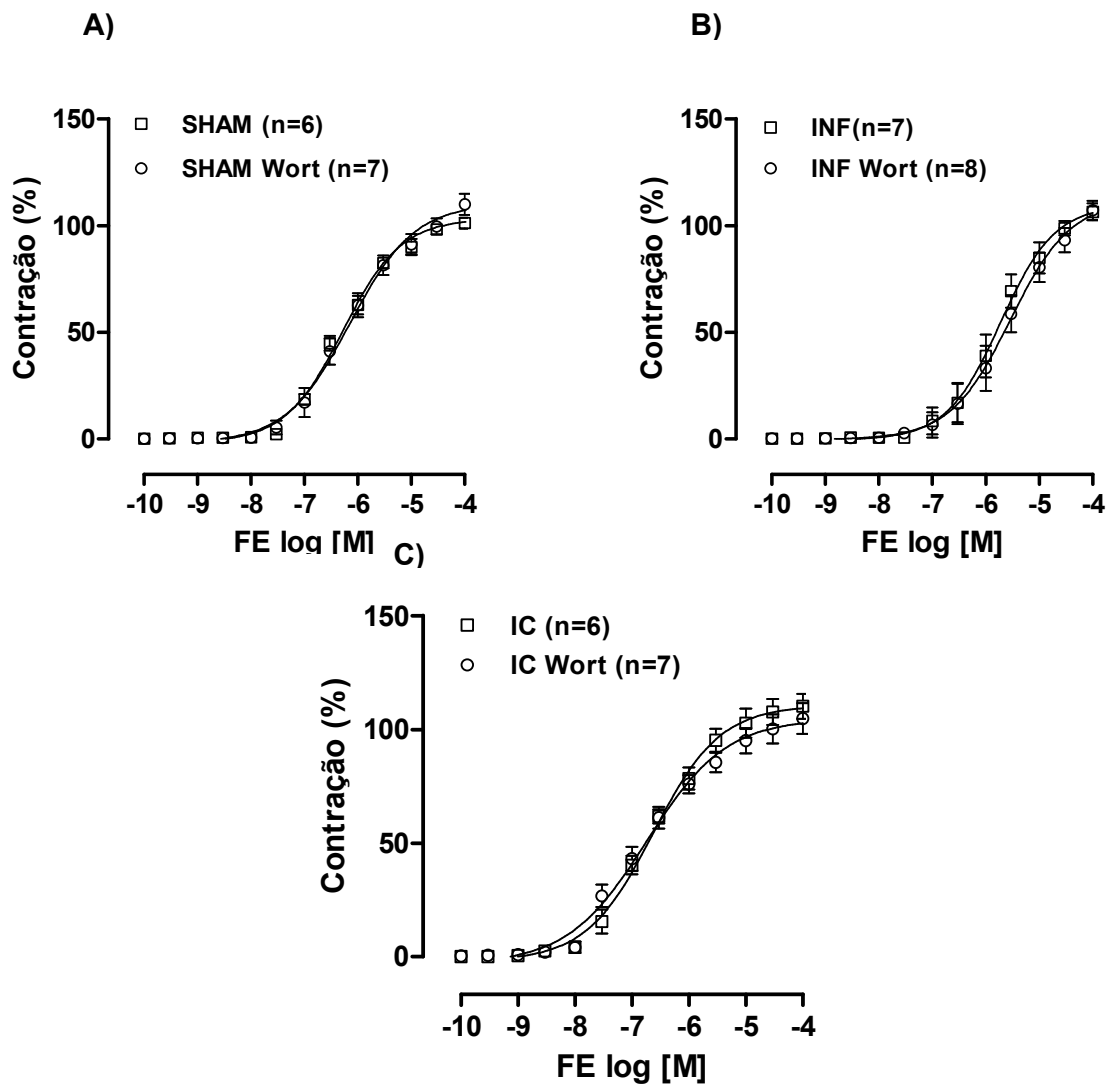
Para estudar uma provável participação do óxido nítrico derivado da via PI3K/Akt no efeito da ouabaína, anéis de aorta de ratos SHAM, INF e IC foram incubados com um inibidor seletivo da PI3K, o wortmannin (0,1 μM), na presença e na ausência de ouabaína (3nM).

Como é possível observar na Figura 19, em nenhum dos grupos, o wortmannin modificou a resposta contrátil induzida pela fenilefrina. Quando os anéis de aorta foram expostos ao wortmannin associado à ouabaína, também não houve alteração da resposta vasoconstritora à fenilefrina no grupo SHAM (Figura 20). Entretanto, a incubação de wortmannin mais ouabaína provocou um aumento da resposta máxima e da sensibilidade à fenilefrina no grupo INF, e um aumento apenas da sensibilidade à fenilefrina no grupo IC (Figura 21, Tabela 8). Esse efeito

tem magnitude similar em ambos os grupos, como observado na análise da dAUC na Figura 21E.

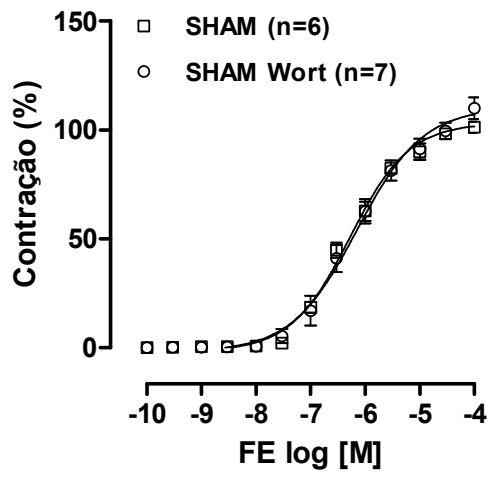
Como demonstrado na Figura 22, o DMSO, veículo utilizado na diluição do wortmannin, não modificou a resposta contrátil à fenilefrina nos três grupos experimentais estudados, comprovando que a resposta encontrada nesse protocolo experimental é provocada pelo fármaco wortmannin.



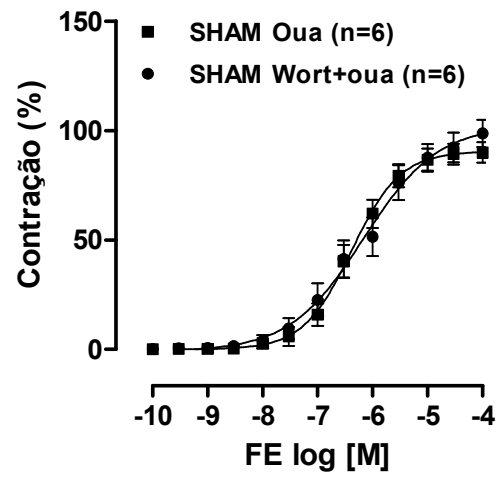


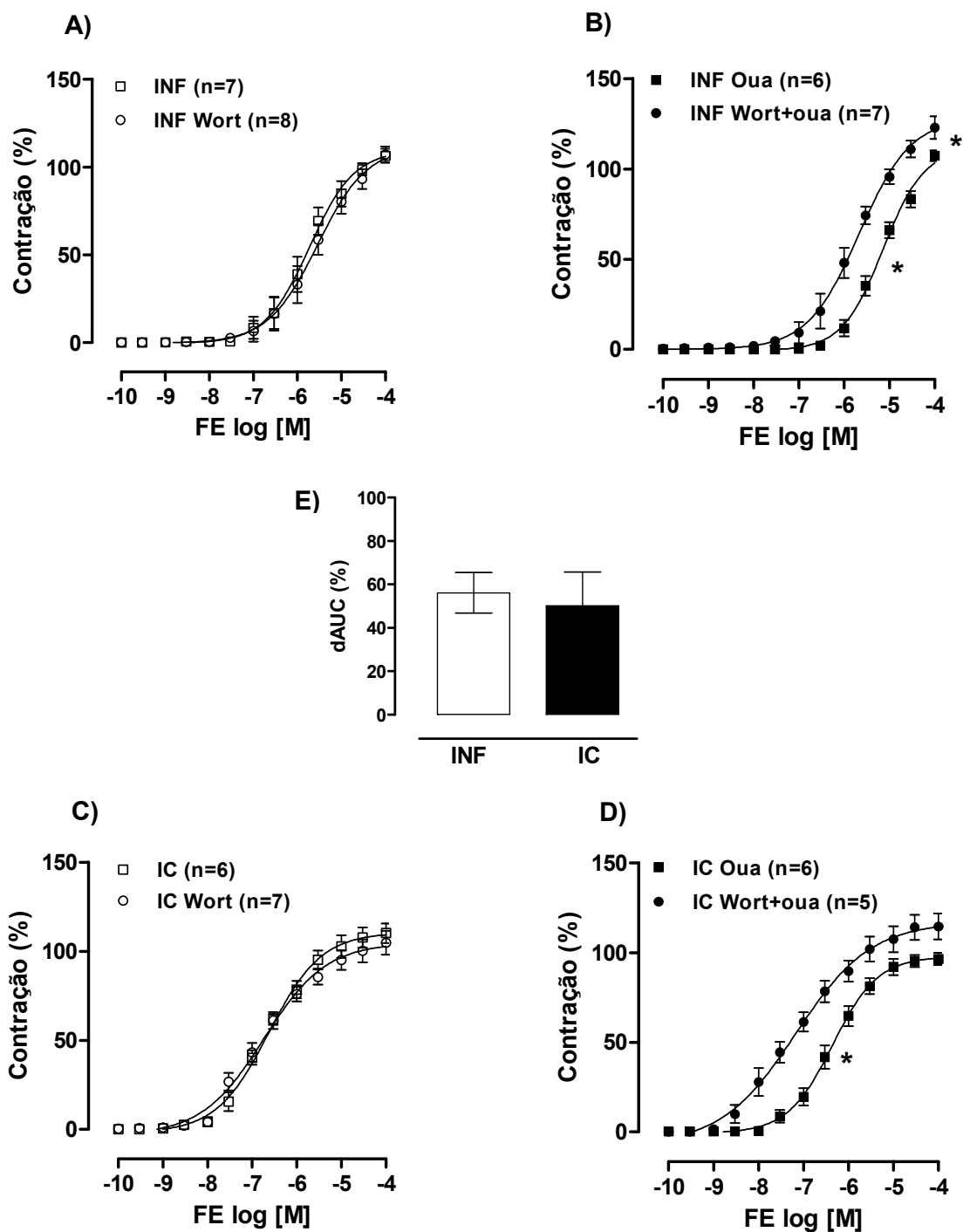
**Figura 19:** Efeito do bloqueio da síntese óxido nítrico derivado da via PI3K/Akt, com Wotmannin (0,1  $\mu$ M), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos SHAM (A), INF (B) e IC (C). Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de Rmax e pD<sub>2</sub>: p>0,05.

A)

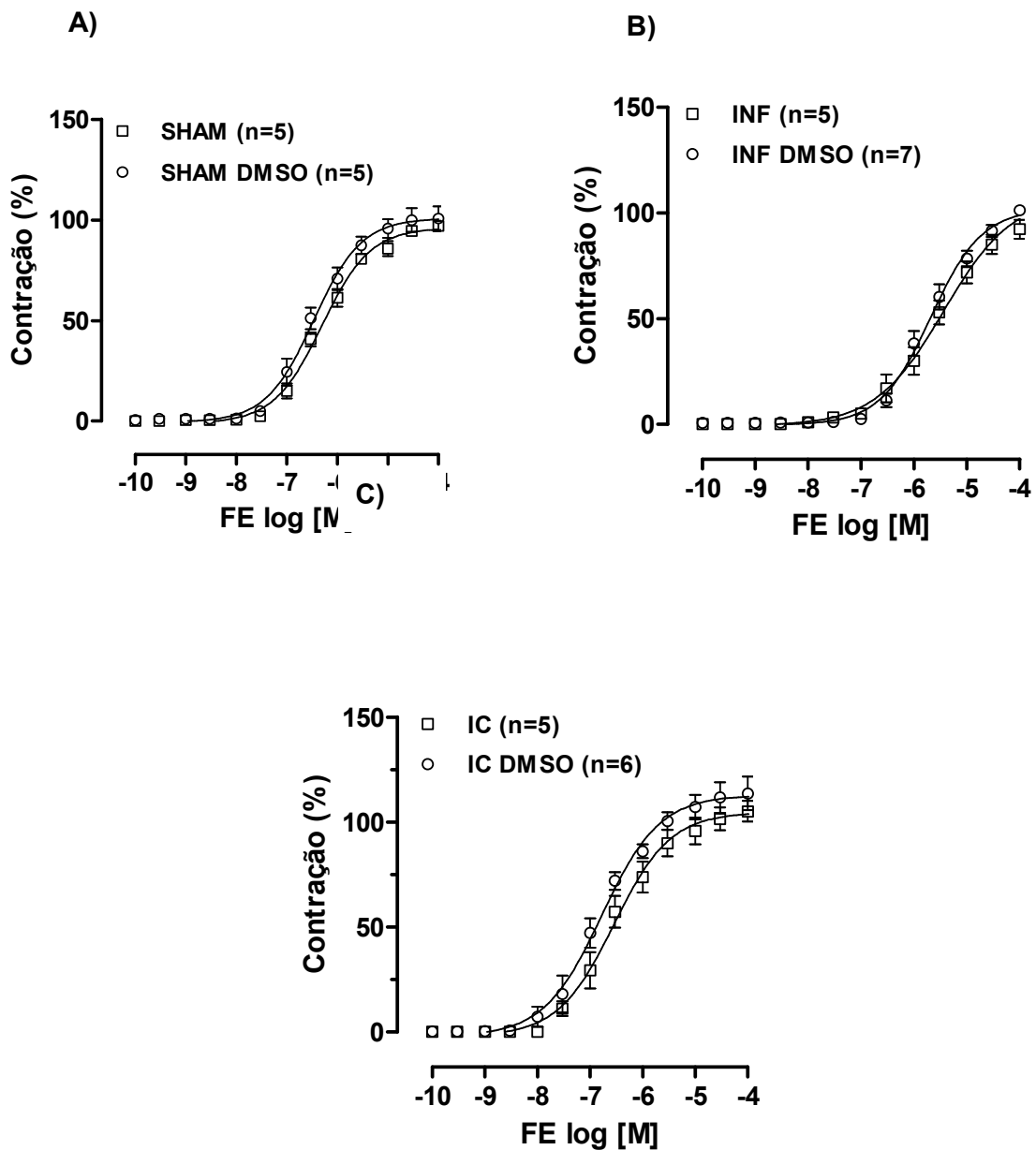


B)





**Figura 21:** Efeito do bloqueio da síntese óxido nítrico derivado da via PI3K/Akt, com Wortmannin (0,1  $\mu$ M), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos INF (A,B) e IC (C,D) na presença (B,D) e na ausência (A,C) de ouabaína. (E) Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) após incubação com Aminoguanidina na presença de ouabaína dos grupos INF e IC. Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de  $R_{max}$ ,  $pD_2$  e dAUC: \*  $p < 0,05$  Antes vs. após incubação com Wortmannin.



**Figura 22:** Efeito da incubação com DMSO, sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos SHAM (A), INF (B) e IC (C). Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de  $R_{max}$  e  $pD_2$ :  $p > 0,05$ .

**Tabela 8:** Parâmetros referentes à sensibilidade ( $pD_2$ ) e à resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ , % de contração ao KCl) obtidos por meio das curvas concentração-resposta à fenilefrina, antes e após incubação com Wortmannin (Wort), na presença e na ausência de ouabaína (Oua), em segmentos de artéria aorta torácica de ratos SHAM, INF e IC.

	$pD_2$			$R_{m\acute{a}x}$		
	SHAM	INF	IC	SHAM	INF	IC
<b>Antes Wort</b>	-6,25 ± 0,08	-5,75 ± 0,17	-6,62 ± 0,05	107 ± 3,79	110 ± 4,76	111 ± 5,55
<b>Após Wort</b>	-6,19 ± 0,16	-5,63 ± 0,19	-6,76 ± 0,11	111 ± 4,72	108 ± 4,61	105 ± 6,81
<b>Após Oua</b>	-6,36 ± 0,13	-5,15 ± 0,07	-6,35 ± 0,12	90 ± 4,72	107 ± 2,87	102 ± 5,22
<b>Após Wort +Oua</b>	-6,19 ± 0,17	-5,78 ± 0,18*	-7,18 ± 0,14*	101 ± 5,56	126 ± 5,32*	115 ± 6,72

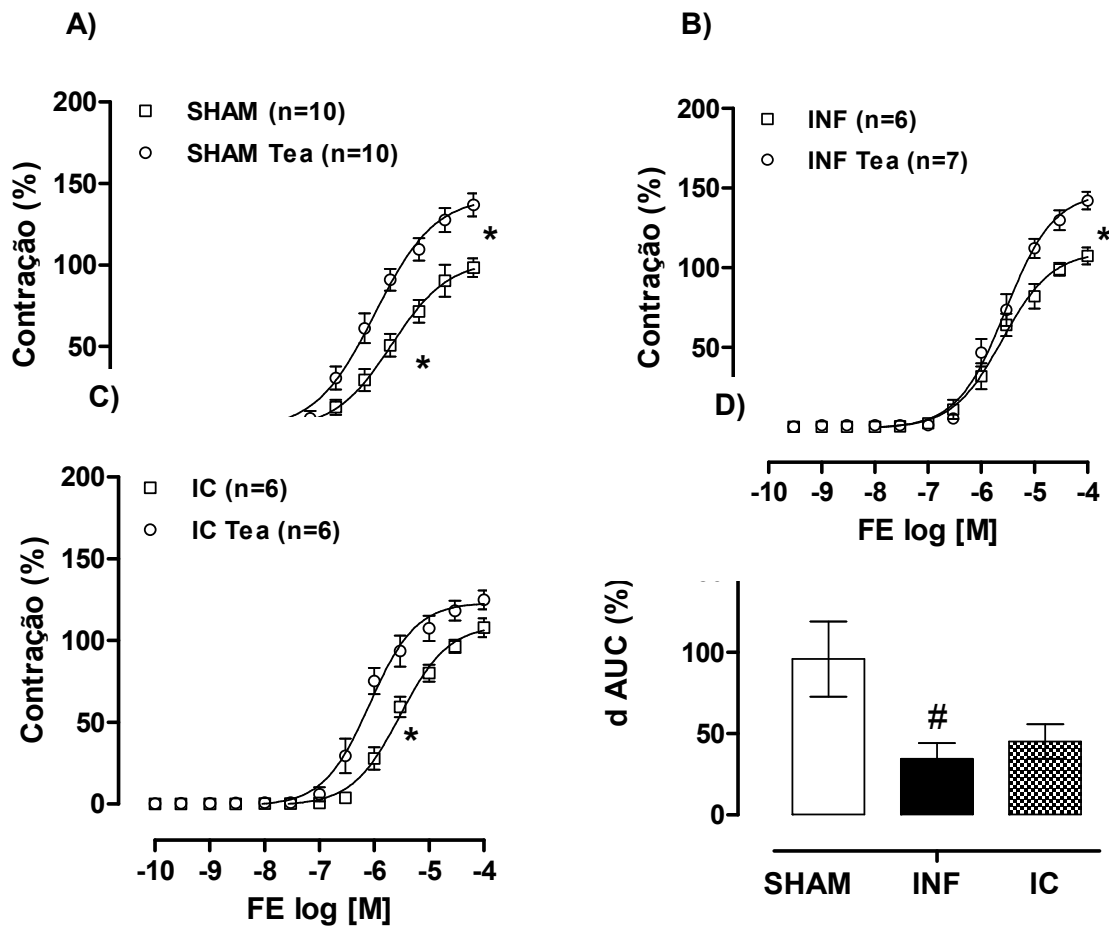
Valores expressos como média ± EPM. Teste *t* não pareado: \**p* < 0,05 Antes vs. após incubação com Wortmannin.

#### 4.3.4.3. Influência dos canais para potássio no efeito ouabaína sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

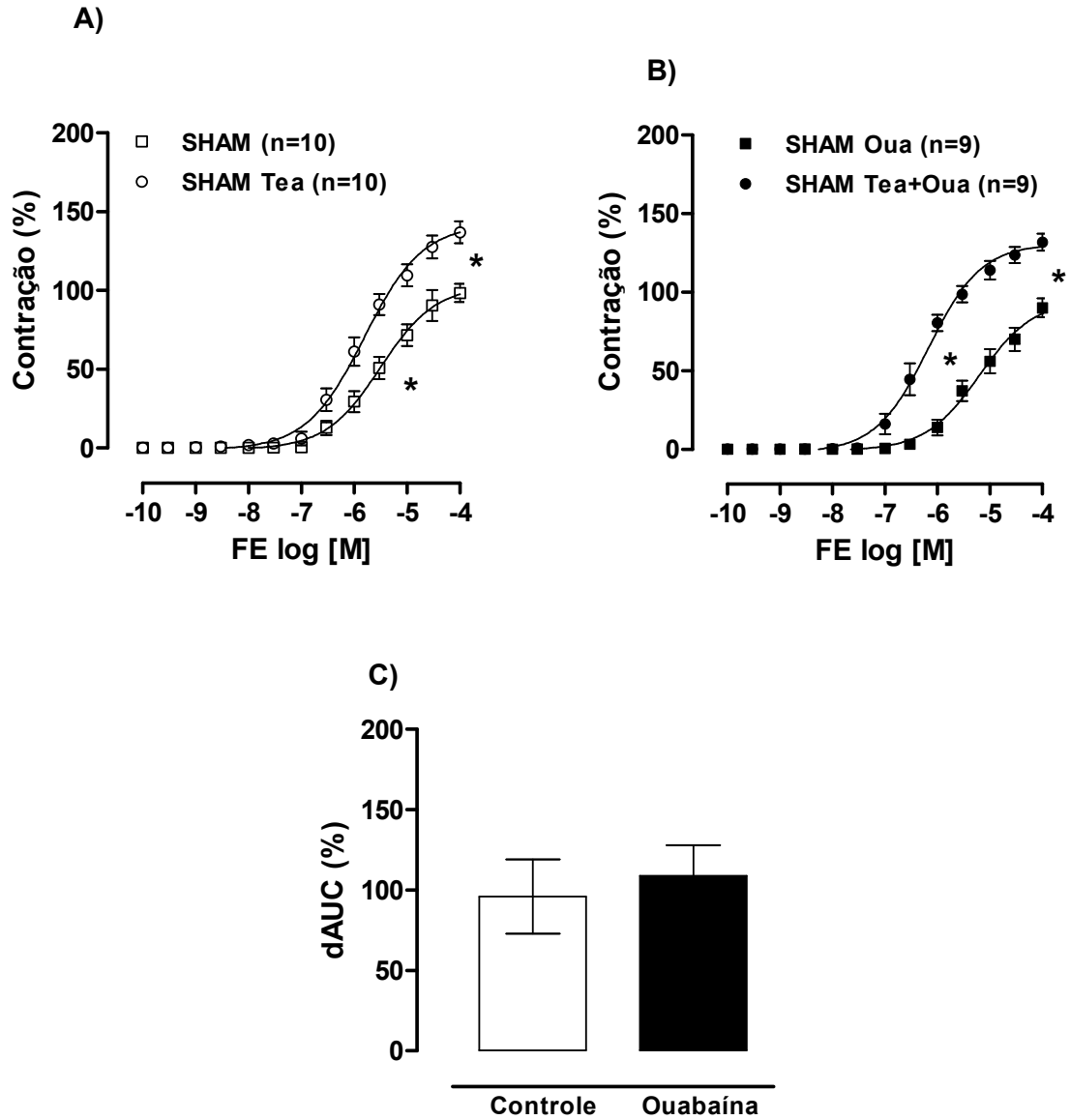
Com o objetivo de avaliar o papel modulatório dos canais para potássio dependentes de cálcio no efeito da ouabaína sobre a resposta contrátil à fenilefrina, foi utilizado TEA, um bloqueador de canais para potássio ativados por cálcio. Para isso, anéis de aorta de ratos SHAM, INF e IC foram incubados com TEA (2 mM), na presença e na ausência de ouabaína.

A incubação com TEA promoveu alterações distintas sobre a resposta contrátil à fenilefrina, entre os grupos estudados (Figura 23). No grupo SHAM, a incubação com TEA promoveu aumento da resposta máxima e da sensibilidade à fenilefrina, enquanto no grupo INF, ocorreu um aumento apenas da resposta máxima à fenilefrina. No grupo IC, o TEA aumentou somente a sensibilidade à fenilefrina. Através da análise da dAUC, nota-se que essa resposta foi de menor magnitude no grupo INF quando comparado ao grupo SHAM (Figura 23D).

Quando os anéis de aorta foram expostos ao TEA associado à ouabaína, no grupo SHAM, nenhum efeito adicional sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina foi observado (Figura 24, Tabela 9). Entretanto, nos grupos INF e IC, o efeito do TEA foi potencializado na presença de ouabaína (Figuras 25 e 26), como é possível observar na análise da dAUC (Figuras 25C e 26C, Tabela 9). Esse efeito foi de igual magnitude entre os grupos INF e IC (Figura 26 D).

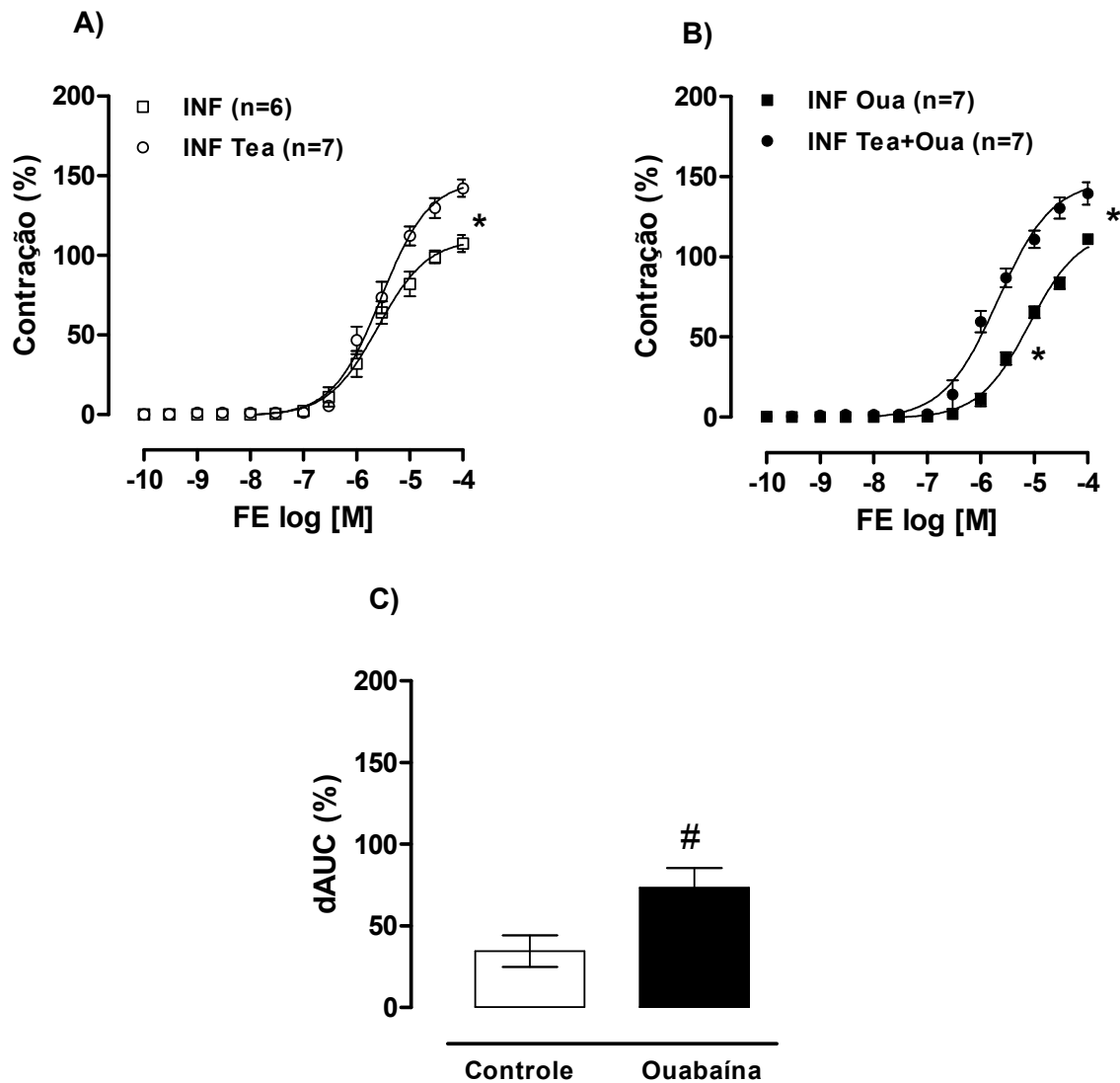


**Figura 23:** Efeito do bloqueio dos canais para potássio ativados por cálcio com TEA (2mM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos SHAM (A), INF (B) e IC (C). Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de todo os grupos experimentais (D). Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de  $R_{max}$  e  $pD_2$ : \*  $p < 0,05$  Antes vs. após incubação com TEA. ANOVA 1 via, post hoc Tukey, para análise de dAUC: #  $p < 0,05$  vs. SHAM.

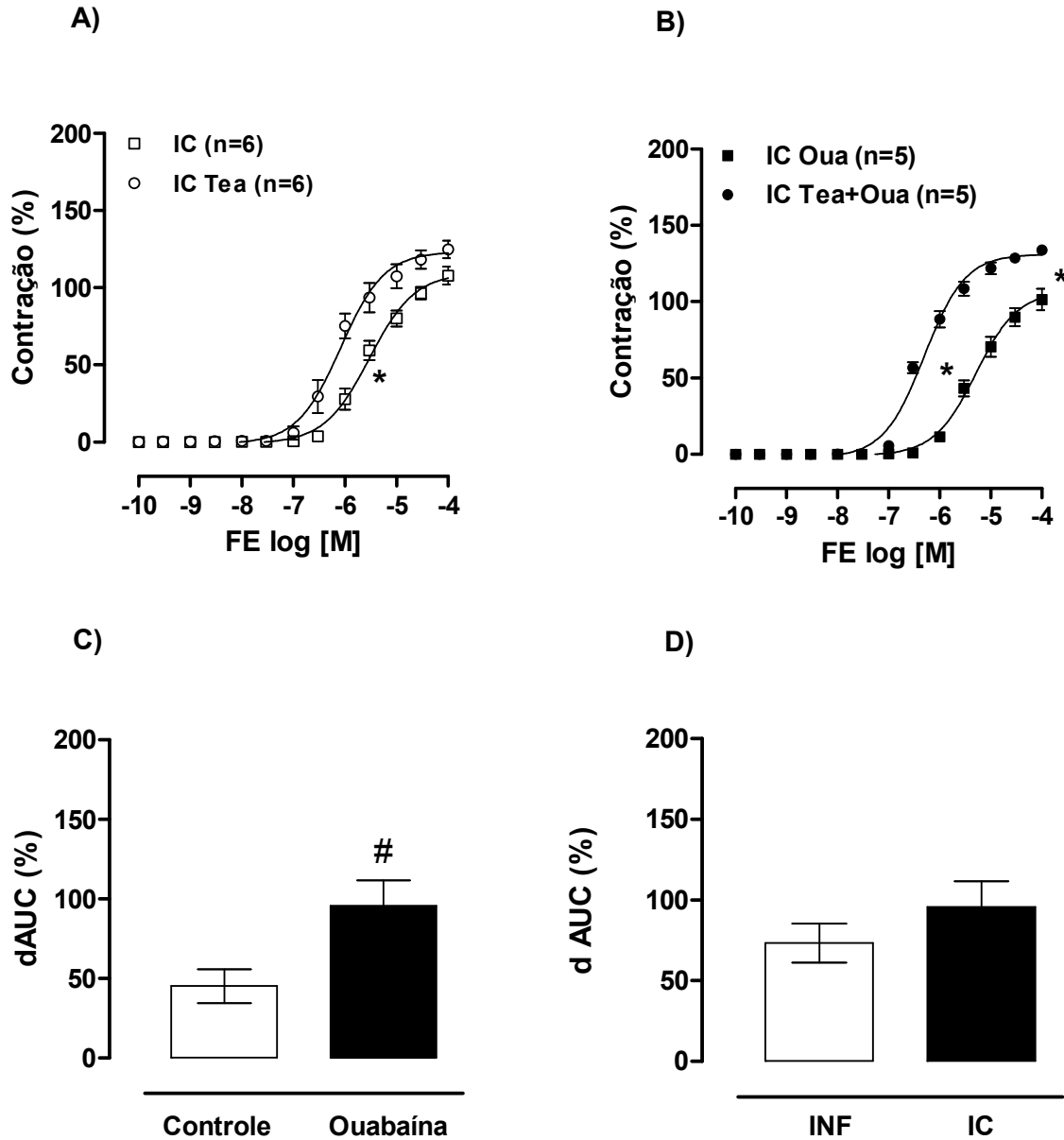


**Figura 24:** Efeito do bloqueio dos canais para potássio ativados por cálcio com TEA (2mM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos SHAM na presença (B) e na ausência (A) de ouabaína. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta após incubação com TEA na presença (Controle) e na ausência de ouabaína (Ouabaína). Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de Rmax, pD<sub>2</sub> e dAUC: \* *p* < 0,05 Antes vs. após incubação com TEA.





**Figura 25:** Efeito do bloqueio dos canais para potássio ativados por cálcio com TEA (2mM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos INF na presença (B) e na ausência (A) de ouabaína. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta após incubação com TEA na presença (Controle) e na ausência de ouabaína (Ouabaína). Os resultados (média  $\pm$  EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de Rmax, pD<sub>2</sub> e dAUC: \* *p* < 0,05 Antes vs. após incubação com TEA; # *P* < 0,05 vs. Controle.



**Figura 26:** Efeito do bloqueio dos canais para potássio ativados por cálcio com TEA (2mM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos IC na presença (B) e na ausência (A) de ouabaína. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta após incubação com TEA na presença (Controle) e na ausência de ouabaína (Ouabaína). (D) Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta após incubação com TEA na presença de ouabaína dos grupos INF e IC. Os resultados (média ± EPM), estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Teste *t* não pareado, para análise de  $R_{max}$ ,  $pD_2$  e dAUC: \*  $p < 0,05$  Antes vs. após incubação com TEA; #  $p < 0,05$  vs. Controle.

**Tabela 9:** Parâmetros referentes à sensibilidade ( $pD_2$ ) e à resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ , % de contração ao KCl) obtidos por meio das curvas concentração-resposta à fenilefrina, antes e após incubação com TEA, na presença e na ausência de ouabaína, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos SHAM, INF e IC.

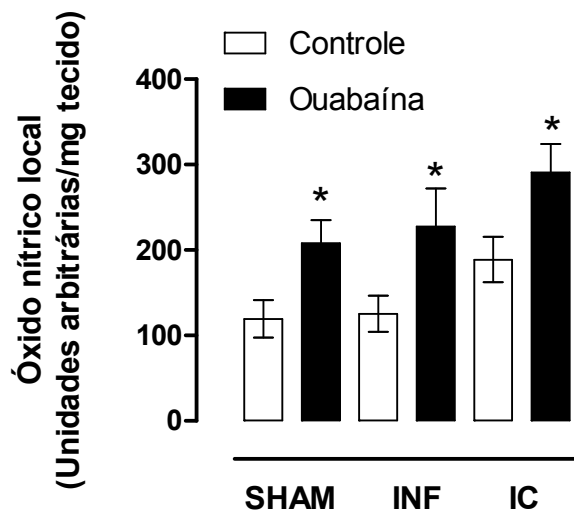
	$pD_2$			$R_{m\acute{a}x}$		
	SHAM	INF	IC	SHAM	INF	IC
<b>Antes</b>	-5,5 ± 0,12	-5,63 ± 0,07	-5,55 ± 0,13	100 ± 6,12	109 ± 6,39	110 ± 6,45
<b>TEA</b>						
<b>Após TEA</b>	-5,84 ± 0,08*	-5,60 ± 0,07	-6,05 ± 0,13*	143 ± 8,35*	148 ± 6,55*	126 ± 7,17
<b>Após Oua</b>	-5,18 ± 0,11	-5,10 ± 0,07	-5,22 ± 0,10	90 ± 6,27	111 ± 2,55	107 ± 8,84
<b>Após TEA +Oua</b>	-6,23 ± 0,10*	-5,69 ± 0,11*	-6,28 ± 0,06*	134 ± 5,35*	153 ± 9,9*	136 ± 2,78*

Valores expressos como média ± EPM. Teste *t* não pareado: \**p* < 0,05 Antes vs. após incubação com TEA.

#### 4.4. Medida dos níveis de óxido nítrico nos anéis de aorta após incubação com ouabaína

Com a finalidade de confirmar os resultados funcionais de reatividade vascular em anéis de aorta, os níveis de óxido nítrico nesses anéis foram medidos após incubação com ouabaína. Para isso, o 4,5-diaminofluoresceína (DAF) foi utilizado.

Como demonstrado na Figura 27, a ouabaína promoveu um aumento dos níveis de óxido nítrico em artérias de ratos SHAM, INF e IC.



**Figura 27:** Liberação local de óxido nítrico com o uso de 4,5-diaminofluoresceína (DAF), em anéis de aorta de ratos SHAM, INF e IC, na presença (Ouabaína) e na ausência (Controle) de ouabaína. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos em unidades arbitrárias/mg de tecido, calculados a partir da intensidade de fluorescência emitida pelo DAF. Teste t não pareado. \*  $p < 0,05$  vs. Controle.

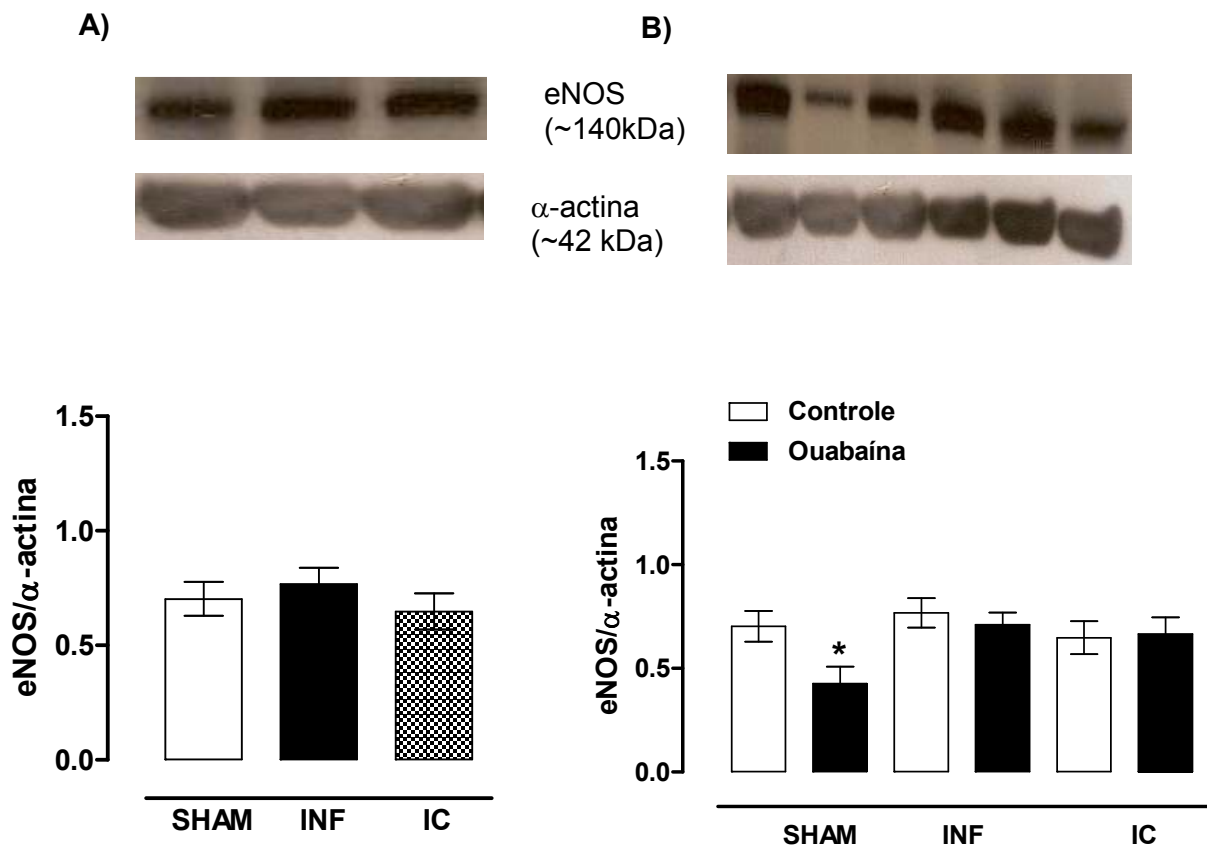
#### 4.5. Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS), da Akt e Akt fosforilada

A expressão da eNOS foi avaliada com o objetivo de verificar se o aumento de óxido nítrico induzido pela ouabaína estava acompanhado de alteração da expressão dessa enzima.

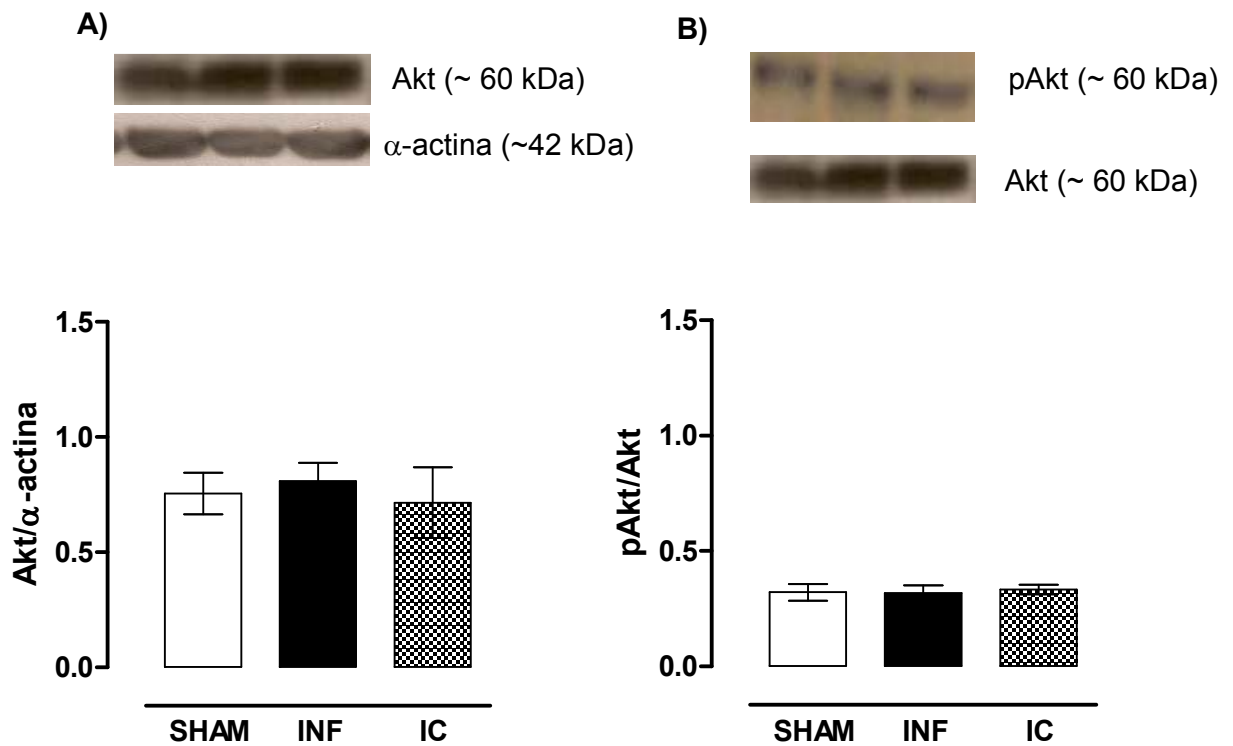
A Figura 28A, demonstra a expressão da eNOS nos três grupos experimentais estudados. Em anéis de aorta de ratos SHAM, INF e IC, em condições estimuladas, ou seja, após realização de curvas concentração-resposta à fenilefrina, a expressão protéica da eNOS foi similar entre os três grupos. Após exposição dos anéis de aorta à ouabaína, ocorreu uma diminuição da expressão dessa enzima no grupo SHAM. Em relação aos grupos INF e IC, não foram observadas diferenças significativas na expressão da eNOS (Figura 28B).

Ainda, com o objetivo de avaliar se a ouabaína poderia alterar a expressão de outras enzimas envolvidas na produção de óxido nítrico, foi realizada a análise expressão protéica da Akt e de sua forma fosforilada (pAkt).

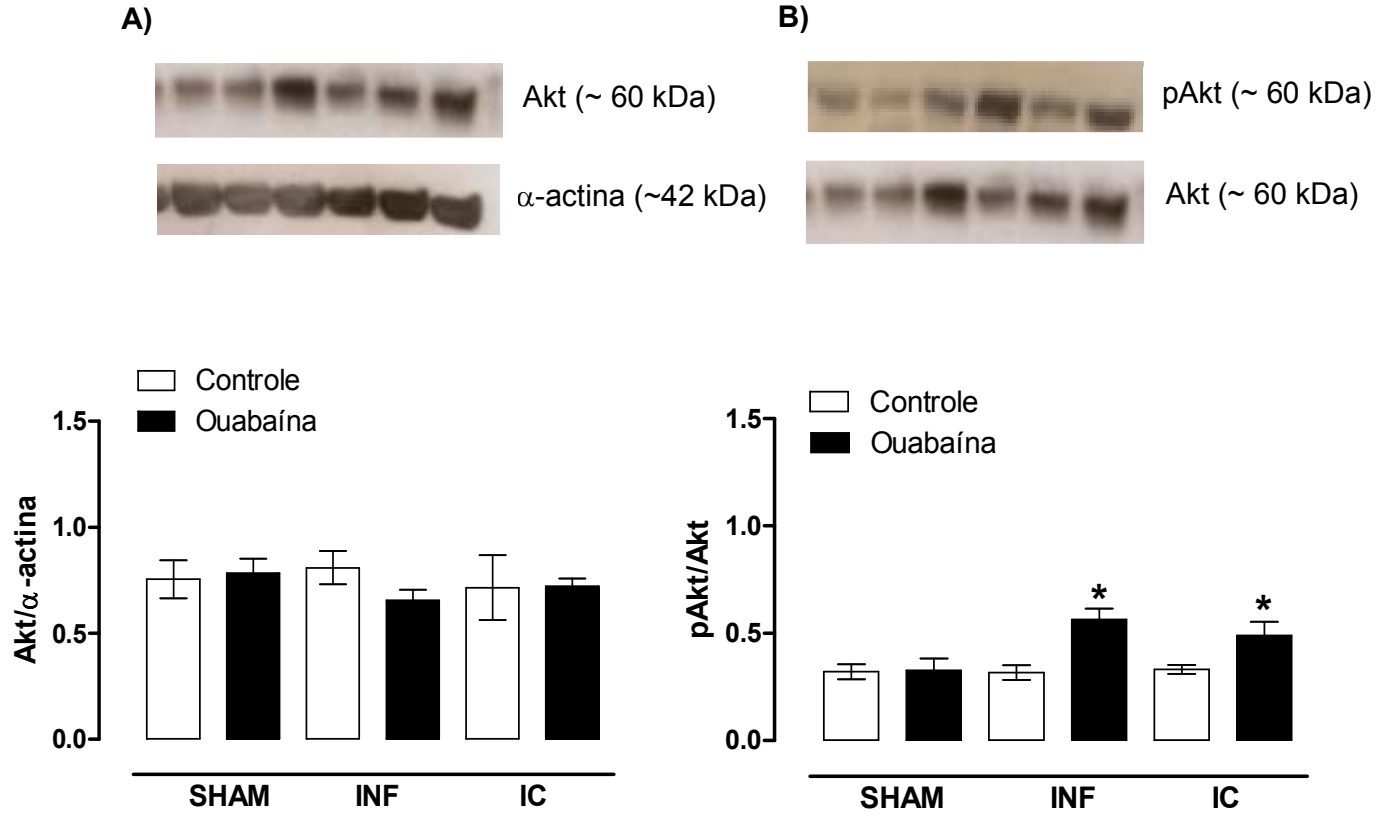
Como demonstrado na Figura 29A e B, não há alteração da expressão protéica da Akt e da razão da expressão protéica da forma fosforilada desta enzima (pAkt) com relação à forma não fosforilada (Akt), entre os três grupos experimentais estudados. Após exposição dos anéis de aorta à ouabaína, também não houve alteração da expressão protéica da Akt em todos os grupos (Figura 30A). Entretanto, após análise da razão da expressão protéica da forma fosforilada desta enzima (pAkt) com relação à forma não fosforilada (Akt), observou-se que a ouabaína promoveu um aumento dessa razão nos grupos INF e IC, e não alterou esta razão no grupo SHAM (Figura 30B).



**Figura 28:** (A) Análise densitométrica de Western Blot para expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS), em aorta torácica de ratos SHAM, INF e IC. (B) Análise densitométrica de Western Blot para a expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS), em aorta torácica de ratos SHAM, INF e IC, na presença (Ouabaína) e na ausência (Controle) de ouabaína. Painel superior mostra bandas representativas da expressão da eNOS e  $\alpha$ -actina. Os resultados (média  $\pm$  EPM; N=6-9), estão expressos como expressão da eNOS em relação a  $\alpha$ -actina. ANOVA 1 via para comparação dos três grupos:  $p > 0,05$ . Teste *t* para comparação entre controle e ouabaína. \* $p < 0,05$  vs. Controle.



**Figura 29:** (A) Análise densitométrica de Western Blot para expressão protéica da Akt, em aorta torácica de ratos SHAM, INF e IC. (B) Análise densitométrica de Western Blot para expressão relativa da Akt fosforilada (pAkt) por Akt, em aorta torácica de ratos SHAM, INF e IC. Painel superior mostra bandas representativas da expressão da Akt e  $\alpha$ -actina, e da pAkt e Akt. Os resultados (média  $\pm$  EPM; N=6-8), estão expressos como expressão da Akt em relação a  $\alpha$ -actina (A), e pAkt em relação a Akt (B). ANOVA 1 via para comparação dos três grupos:  $p > 0,05$ .



**Figura 30:** (A) Análise densitométrica de Western Blot para expressão protéica da Akt, em aorta torácica de ratos SHAM, INF e IC, na presença (Ouabaína) e na ausência (Controle) de ouabaína. (B) Análise densitométrica de Western Blot para expressão relativa da Akt fosforilada (pAkt) por Akt, em aorta torácica de ratos SHAM, INF e IC, na presença (Ouabaína) e na ausência (Controle) de ouabaína. Painel superior mostra bandas representativas da expressão da Akt e  $\alpha$ -actina, e da pAkt e Akt. Os resultados (média  $\pm$  EPM; N=6-8), estão expressos como expressão da Akt em relação a  $\alpha$ -actina (A), e pAkt em relação a Akt (B). Teste *t* para comparação entre controle e ouabaína. \**p*<0,05 vs. Controle.



## V. DISCUSSÃO

A ouabaína é um esteróide cardiotônico endógeno presente em concentrações nanomolares no plasma de diversos mamíferos, incluindo o homem (Hamlyn *et al.*, 1996). Diversos trabalhos têm demonstrado uma relação entre o aumento dos níveis plasmáticos de ouabaína com algumas doenças como hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, insuficiência renal crônica, pré-eclampsia, dentre outros (Hamlyn *et al.*, 1982; Graves *et al.*, 1984, 1987; Gottlieb *et al.*, 1992; Bagrov *et al.*, 1994; Hamlyn *et al.*, 1996).

Os estudos envolvendo ouabaína endógena e infarto do miocárdio surgiram no final da década de 80. Em 1989, Bagrov e colaboradores hipotetizaram que as altas concentrações de esteróides cardiotônicos endógenos poderiam contribuir para as arritmias ventriculares induzidas por isquemia do miocárdio. Em 1990, Delva e colaboradores mostraram um rápido aumento da atividade inibitória da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase plasmática em pacientes com doença coronariana durante angioplastia. Em adição, foi demonstrado que o pré-tratamento com anticorpos anti-digoxina evita a inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase cardíaca induzida por isquemia e diminui a incidência de arritmias ventriculares em ratos que sofreram ligadura da coronária (Bagrov *et al.*, 1993; Ke *et al.*, 2004).

Além do infarto do miocárdio, a ouabaína endógena também se encontra elevada na insuficiência cardíaca (Gottlieb *et al.*, 1992). Como já se sabe, uma das conseqüências do infarto do miocárdio é o desenvolvimento da insuficiência cardíaca. Como a insuficiência cardíaca está associada à retenção de líquido e à expansão do volume plasmático, especula-se que a produção de esteróides cardiotônicos endógenos, como a ouabaína, seja estimulada nessas circunstâncias (Schrier & Abraham, 1999; Bagrov *et al.*, 2009). Dessa forma, uma série de estudos surgiu associando a ouabaína endógena e o desenvolvimento da insuficiência cardíaca. O estudo de Schreiber e colaboradores (1981) hipotetizou que os esteróides cardiotônicos podem estar envolvidos na regulação do crescimento tecidual e hipertrofia do miocárdio. Mais tarde, foi demonstrado que o desenvolvimento da insuficiência cardíaca em ratos está associado com o aumento da atividade inibitória da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase plasmática (Morise *et al.*, 1988).

A relação entre esteróides cardiotônicos, geometria cardíaca e parâmetros hemodinâmicos também tem sido investigada em vários estudos. Gottlieb e colaboradores (1992) encontraram níveis elevados de ouabaína endógena em

pacientes com desempenho ventricular esquerdo prejudicado. Em um estudo envolvendo pacientes hipertensos, uma correlação negativa entre volume diastólico final do ventrículo esquerdo, índice cardíaco e ouabaína plasmática foi encontrada (Pierdomenico *et al.*, 2001). Ainda, Pitzalis e colaboradores (2006) demonstraram, em um estudo envolvendo pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática, que altas concentrações de ouabaína foram encontradas naqueles pacientes predispostos a uma progressão mais rápida de insuficiência cardíaca. Dessa forma, a ouabaína endógena funcionaria como um marcador que prediz a progressão da insuficiência cardíaca.

Assim sendo, observa-se uma estreita relação entre ouabaína endógena e a fisiopatogenia do infarto do miocárdio e da insuficiência cardíaca. Entretanto, a maioria dos estudos envolvendo essas duas condições e a ouabaína, gira em torno dos efeitos centrais desse digitalico bem como dos seus efeitos na função cardíaca. Diante disso, o presente trabalho buscou investigar os efeitos da ouabaína na reatividade vascular de ratos que desenvolveram ou não insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio, bem como propor os possíveis mecanismos de ação desse digitalico. Antes da discussão dos resultados dos efeitos vasculares da ouabaína nesses dois modelos, será feita uma breve discussão sobre os parâmetros hemodinâmicos, ponderais e de extensão do infarto dos modelos experimentais utilizados.

### **5.1. Parâmetros hemodinâmicos, ponderais e extensão do infarto.**

Para avaliar os efeitos vasculares da ouabaína no infarto do miocárdio e na insuficiência cardíaca, o presente estudo utilizou três grupos experimentais: grupo SHAM, grupo INF (ratos infartados sem sinais de insuficiência cardíaca) e grupo IC (ratos infartados com sinais de insuficiência cardíaca). Essa subdivisão dos animais infartados se deu a partir da avaliação da PDFVE, já que estudos consideram esta variável como referência para a determinação da IC (Pfeffer *et al.*, 1979; Anversa *et al.*, 1985; Pfeffer *et al.*, 1985).

Já é bem descrito na literatura que o remodelamento ventricular que ocorre após o infarto do miocárdio ocasiona prejuízo da função contrátil do coração, fato que contribui para a instalação da insuficiência cardíaca (Pfeffer & Braunwald, 1990;

Sutton & Sharpe, 2000). Como consequência da insuficiência cardíaca, ocorre uma redução do débito cardíaco e assim, um aumento da PDFVE. Esse aumento da PDFVE indica uma exaustão dos mecanismos compensatórios que ocorrem após o infarto na tentativa de manter o débito cardíaco (Francis *et al.*, 2001). Dessa forma, analisando os resultados hemodinâmicos do presente estudo, observa-se um aumento significativo da PDFVE no grupo IC, quando comparado ao grupo INF e SHAM, comprovando assim, a instalação da insuficiência cardíaca nesse grupo de animais. Além disso, foi observada uma redução das derivadas  $dP/dt +$  e  $dP/dt -$  nos grupos INF e IC, quando comparados ao grupo SHAM. Esse resultado também auxilia na confirmação da presença de insuficiência cardíaca nos ratos do grupo IC. A alteração desses parâmetros indicativos de redução de contratilidade miocárdica já está estabelecida na literatura como consequência da perda de massa contrátil e disfunção do miocárdio remanescente após infarto do miocárdio (Pfeffer *et al.*, 1985; Anversa *et al.*, 1985; Mill *et al.*, 2003; Jasmin *et al.*, 2004). Resultados semelhantes foram encontrados 7 dias após o infarto do miocárdio, demonstrando que essas alterações já são detectadas na fase aguda do IM (Teerlink *et al.*, 1994; Faria, 2009; Sartório *et al.*, 2007). Em relação aos outros parâmetros hemodinâmicos, como a PAS, PAD, PAM, PSVE e FC, não houve diferenças significantes entre os três grupos, corroborando resultados anteriores do nosso laboratório (Sartório *et al.*, 2005; Fernandes, 2006; Moura, 2007).

As alterações hemodinâmicas encontradas no presente estudo foram associadas com aumento das massas ventricular direita e pulmonar, conforme descrito por estudos prévios (Pfeffer *et al.*, 1979). Dessa forma, analisando os parâmetros ponderais, observou-se um aumento das razões PP/PC e VD/PC nos grupos INF e IC, sendo que o aumento desses parâmetros no grupo IC foi ainda maior, acarretando diferença significativa com o grupo INF. Essas alterações ponderais são resultados de mecanismos hipertróficos compensatórios que são ativados após o infarto do miocárdio (Anversa *et al.*, 1985), ou seja, são consequências do remodelamento ventricular (Pfeffer & Braunwald, 1990). O prejuízo contrátil instalado após o infarto promove acúmulo de sangue na câmara cardíaca, que de forma retrógrada, atinge o pulmão, resultando em um processo de remodelamento pulmonar, com consequente aumento do peso dos pulmões. Conseqüentemente a essa congestão pulmonar, ocorre hipertrofia do VD, na tentativa de aumentar a força contrátil para manter o débito sanguíneo pulmonar

adequado (Jasmin *et al.*, 2003; 2004). Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados no trabalho de Faria (2009), que estudou as alterações ponderais, hemodinâmicas e de reatividade vascular em ratas após sete dias de infarto do miocárdio.

Apesar de ter ocorrido aumento da razão VE/PC no grupo IC, quando observamos os pesos absolutos, essa diferença desaparece, indicando que este aumento da razão foi devido à diminuição do peso corporal observada nesses animais. A semelhança do peso do VE entre os grupos experimentais pode ser devido a um balanço entre a perda de tecido miocárdio que ocorre após o infarto e a hipertrofia do miocárdio remanescente (Mill *et al.*, 1990). Quando avaliamos o peso corporal, foi observada uma redução desse parâmetro no grupo IC quando comparado aos grupos SHAM e INF, corroborando os resultados de Faria (2009). Nesse trabalho, Faria e colaboradores identificaram que a variação do PC apresenta alta sensibilidade e especificidade para a detecção da IC, propondo uma variável de fácil aquisição para os estudos experimentais que objetivam separar animais infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca.

Já é bem descrito na literatura a correlação entre a extensão do infarto e o desenvolvimento da IC (Norman & Coers, 1960; Anversa *et al.*, 1984; Novaes *et al.*, 1996). Entretanto, trabalhos do nosso laboratório demonstraram que animais com mesma área de infarto, podem ou não desenvolver IC após infarto do miocárdio. Pereira e colaboradores (2005) foram os primeiros a demonstrar essa idéia, pois observaram que 30 dias após IM, alguns animais apresentavam ou não sinais de IC, mesmo com área de infarto semelhante. Além disso, em cada subgrupo estudado, foram observadas alterações de reatividade vascular no leito caudal, além de alterações ponderais e hemodinâmicas. A partir deste estudo, diversos trabalhos investigaram as diferenças de respostas vasculares e de contratilidade cardíaca em animais com mesma área de infarto que desenvolvem ou não IC, em tempos de infarto diferentes (Fernandes, 2006; Moura, 2007; Dias, 2007; Faria, 2009; Fernandes, 2010). Todos esses trabalhos reforçam a idéia de que a IC pode ser determinada por fatores independentes de alterações na área de infarto. Nossos resultados corroboram essa idéia, já que animais com área de infarto semelhante, desenvolveram ou não sinais de IC 4 semanas após IM.

Uma vez determinados os grupos experimentais, o próximo passo desse estudo foi avaliar os possíveis efeitos da ouabaína na reatividade vascular em anéis de aorta dos animais que desenvolveram ou não IC.

## **5.2. Efeito da ouabaína na reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio.**

Comparando a função vascular dos três grupos estudados no presente estudo, observou-se que a reatividade vascular à fenilefrina foi diferente entre os animais que desenvolveram ou não insuficiência cardíaca. O grupo IC apresentou aumento da responsividade à fenilefrina em comparação com os grupos INF e SHAM. Já o grupo INF, mostrou reatividade à fenilefrina semelhante ao SHAM. Essas mudanças na responsividade à fenilefrina não foram acompanhadas de alterações da resposta contrátil ao cloreto de potássio, sugerindo que nesses modelos estudados, não há alteração do aparato contrátil do músculo liso vascular. Como o endotélio é um importante regulador do tônus vascular, um desequilíbrio na liberação e/ou síntese dos fatores derivados do endotélio pode ser o responsável pelas alterações da reatividade vascular encontrada no presente estudo.

Diversos trabalhos têm demonstrado que a disfunção endotelial e a responsividade anormal a vasoconstritores têm papel importante na manutenção e desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Elsner *et al.*, 1991; Katz *et al.*, 1992; Teerlink *et al.*, 1993; Bauersachs & Widder, 2008). O aumento da reatividade vascular a agentes vasoconstritores em aorta de ratos IC já pode ser visto após 7 dias de IM (Teerlink *et al.*, 1994). Essa resposta é dependente do endotélio e foi atribuída a uma redução da liberação basal de NO. Um estudo envolvendo hamsters com cardiomiopatia também demonstrou aumento da resposta vasoconstritora em anéis de aorta (Crespo 1999). Esses resultados também corroboram os de Miller e colaboradores (2000), que demonstraram um aumento da reatividade vascular à fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos IC 6 semanas após o IM. Em adição, um estudo que analisou a evolução temporal da disfunção endotelial na IC, avaliando diferentes tempos de infarto (1, 4 e 16 semanas), mostrou que ocorre disfunção endotelial após 4 semanas, sendo que esta progride até a 16ª semana (Teerlink *et al.*, 1993).

Trabalhos que estudaram a função vascular em ratos que desenvolvem ou não insuficiência cardíaca, também notaram diferenças marcantes. Pereira *et al.*, (2005), estudando esses mesmos modelos após 30 dias de IM, mostraram que ratos INF apresentam um aumento da reatividade vascular à fenilefrina, enquanto ratos IC têm uma diminuição da reatividade à fenilefrina. Esse aumento da reatividade nos ratos INF foi acompanhado por uma diminuição do relaxamento dependente do endotélio. Já a redução da reatividade no grupo IC foi causada por um aumento da biodisponibilidade de NO. Da mesma forma, Faria (2009) mostrou que ratas IC também apresentam uma redução na reatividade vascular à fenilefrina 7 dias após IM, sendo esse efeito associado ao aumento da liberação basal de NO. Esses resultados são contrários aos do presente estudo. Entretanto, isso pode ser devido ao leito vascular estudado, já que esses trabalhos utilizaram o leito arterial caudal ao passo que o presente estudo avaliou a reatividade à fenilefrina em anéis de aorta torácica.

O endotélio vascular foi removido a fim de investigar a modulação endotelial na resposta pressora à fenilefrina dos grupos estudados. A ausência de endotélio funcional promoveu aumento da resposta pressora à fenilefrina em todos os grupos. Porém, essa resposta foi menor nos ratos INF, sugerindo um prejuízo da modulação endotelial nesse grupo. O presente resultado corrobora, em parte, os dados de Faria (2009), que demonstrou uma modulação endotelial reduzida em ratas INF e IC, 7 dias após IM. Já Pereira *et al.* (2005), mostrou uma modulação endotelial semelhante entre ratos SHAM, INF e IC. Mais uma vez, essas contradições encontradas entre os trabalhos podem ser devido ao leito vascular estudado. Trabalhos que avaliaram a importância do endotélio através da resposta vasodilatadora dependente do endotélio, induzida por acetilcolina, também relatam um prejuízo da função endotelial após o infarto do miocárdio. Foi demonstrada uma redução da resposta vasodilatadora à acetilcolina no terceiro e no trigésimo dia após IM em artéria caudal de ratos (Sartório *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2005).

Como foi possível observar no presente trabalho e em estudos anteriores, o infarto do miocárdio e a insuficiência cardíaca cursam com alterações na função vascular. Por outro lado, sabe-se que a ouabaína plasmática encontra-se elevada nessas circunstâncias (Gottlieb *et al.*, 1992; Bagrov *et al.*, 1994). Portanto, quais seriam os efeitos vasculares de baixa concentração de ouabaína na reatividade vascular desses animais?

Diversos trabalhos têm demonstrado que a ouabaína contribui para a progressão da falência cardíaca, em situações, como por exemplo, na insuficiência cardíaca (Gottlieb *et al.*, 1992; Leenen *et al.*, 1995; Balzan *et al.*, 2001). Como a ouabaína plasmática se encontra em altas concentrações nessas condições, o presente estudo buscou investigar, pela primeira vez na literatura, os efeitos vasculares da ouabaína em ratos INF e IC. Dessa maneira, os resultados obtidos após incubação de 3 nM de ouabaína, concentração próxima à encontrada em pacientes com insuficiência cardíaca (Gottlieb *et al.*, 1992), demonstram que esse digitálico endógeno é capaz de diminuir a resposta vasoconstritora à fenilefrina de ratos SHAM, INF e IC. No entanto, a magnitude desse efeito é semelhante entre os três grupos.

Vários trabalhos já demonstraram que a ouabaína é capaz de promover alterações na reatividade vascular e, com isso, contribuir para a gênese e/ou manutenção de doenças, como por exemplo, a hipertensão arterial (Vassallo *et al.*, 1997; Padilha *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2009). Entretanto, os efeitos desse digitálico na reatividade vascular de ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca após IM até então não tinham sido investigados. Indo de encontro aos nossos achados, Rossoni e colaboradores (2003) demonstraram que a ouabaína, de forma aguda, em uma concentração nanomolar, diminui a resposta contrátil à fenilefrina no leito arterial caudal de animais com hipertensão induzida por L-NAME. Em contrapartida, há trabalhos que mostram que a ouabaína, agudamente, potencializa a resposta vasopressora induzida pela fenilefrina no leito arterial caudal de ratos normotensos e hipertensos (Vassallo *et al.*, 1997; Rossoni *et al.*, 2001; Padilha *et al.*, 2004). Dessa forma, observa-se que a ouabaína, de forma aguda, pode promover alterações de reatividade vascular distintas, dependendo do modelo animal e leito vascular estudado.

A remoção do endotélio comprovou que os efeitos da ouabaína sobre a reatividade vascular à fenilefrina são dependentes do mesmo, já que, na sua ausência, a ouabaína não modificou a reatividade vascular. Diversos trabalhos já demonstraram que o endotélio é capaz de modular as ações da ouabaína. Rossoni e colaboradores (1999) mostraram que os efeitos agudos da ouabaína são modulados parcialmente pelo endotélio, já que esse digitálico, em baixa concentração, é capaz de estimular a liberação de um fator endotelial, capaz de promover a abertura de canais para potássio. Já Padilha e colaboradores (2004), demonstraram que o

endotélio modula positivamente as ações agudas da ouabaína no leito vascular caudal de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), através da liberação de angiotensina II. No entanto, em animais com hipertensão induzida por L-NAME, o endotélio é capaz de liberar um fator capaz de abrir canais para potássio, reduzindo assim, a resposta contrátil à fenilefrina induzida por concentração nanomolar de ouabaína (Rossoni *et al.*, 2003). Estudos crônicos com ouabaína também mostram essa modulação por parte do endotélio. Rossoni e colaboradores (2002 a, b) demonstraram que a hipertensão produzida pelo tratamento crônico com ouabaína, era acompanhada de redução da reatividade vascular à fenilefrina em aorta, mas não no leito arterial caudal, além de um aumento na modulação endotelial negativa em ambas as artérias. Essa modulação endotelial negativa seria causada por um aumento de NO e EDHF, respectivamente, nessas artérias.

Quando avaliamos o efeito modulatório total do endotélio, na presença e na ausência de ouabaína, foi observado um aumento dessa modulação, na presença de ouabaína, nos ratos SHAM. Isso sugere um aumento da modulação endotelial negativa nesses animais após incubação com ouabaína. Entretanto, nos animais INF e IC, a ouabaína não alterou esse efeito modulatório do endotélio, possivelmente porque esses animais já têm um prejuízo dessa modulação endotelial, como já foi demonstrado por alguns trabalhos (Teerlink *et al.*, 1993; Faria, 2009).

Como a ouabaína promoveu diminuição da resposta contrátil à fenilefrina nos três modelos estudados, e este efeito foi dependente do endotélio, o próximo passo desse estudo foi investigar quais os fatores endoteliais envolvidos nos efeitos desse digitálico. Sendo assim, sabendo que o óxido nítrico é um importante vasodilatador derivado do endotélio, e ainda, que trabalhos já observaram que a ouabaína aumenta a liberação basal de NO em diferentes segmentos arteriais (Rossoni *et al.*, 2002a; Padilha *et al.*, 2008; Briones *et al.*, 2009), iniciou-se o estudo dessa via.

Na ausência de ouabaína, a incubação com L-NAME promoveu um aumento da reatividade vascular à fenilefrina nos três grupos estudados, entretanto, esse efeito foi de menor magnitude nos grupos INF e IC. Isso indica uma menor modulação negativa do óxido nítrico sobre a resposta alfa-adrenérgica em anéis de aorta de ratos INF e IC. No grupo IC, essa menor modulação negativa do óxido nítrico poderia justificar o aumento da resposta contrátil à fenilefrina encontrado nesse grupo. Já no grupo INF, apesar da menor modulação por parte do óxido



nítrico, a resposta contrátil à fenilefrina permanece semelhante ao grupo SHAM. Provavelmente, outros fatores vasodilatadores podem estar contribuindo para a manutenção dessa resposta.

Alterações na via do NO têm sido amplamente descritas em estudos clínicos e experimentais após o IM e na IC. Em aorta de ratos após 7 dias de IM, foi demonstrado um prejuízo na liberação basal de NO em paralelo a um aumento da responsividade à norepinefrina (Teerlink *et al.*, 1994). Ainda, camundongos knockout para as três isoformas da NOS, além de desenvolver infarto do miocárdio espontâneo, apresentaram aumento da resposta contrátil à fenilefrina paralelo a uma completa ausência de relaxamento à acetilcolina (Nakata *et al.*, 2008). Trabalhos já mostraram também que na circulação coronariana de ratos e na circulação sistêmica de cães com IC, foi encontrado um prejuízo da liberação basal de NO (Elsner *et al.*, 1991; Drexler *et al.*, 1992). Em pacientes com IC, o prejuízo do relaxamento dependente de endotélio, mediado por NO, contribui para a elevada resistência vascular desses pacientes, sendo considerado um importante fator preditivo de eventos cardíacos subseqüentes (Kubo *et al.*, 1991; Katz *et al.*, 2005; Fisher *et al.*, 2005). Todavia, há trabalhos que relatam uma produção de NO inalterada (Drexler & Lu, 1992) ou aumentada (Habib *et al.*, 1994) em modelos experimentais de IC após IM. Estudos prévios do nosso laboratório demonstraram um aumento da biodisponibilidade de NO em artéria caudal de ratos IC, 7 e 30 dias após IM (Faria, 2009; Pereira *et al.*, 2005). É importante ressaltar que o presente estudo avaliou a reatividade vascular de anéis de aorta de ratos INF e IC 4 semanas após IM. Dessa maneira, as divergências de respostas encontradas podem ser devido ao leito vascular e ao tempo de infarto estudado.

Uma das possíveis causas da menor biodisponibilidade de NO após o IM seria uma redução na expressão vascular da principal enzima responsável pela sua liberação, a eNOS. O regulador fisiológico mais importante da expressão da eNOS *in vivo* é o shear stress (Li *et al.*, 2002; Harrison *et al.*, 2006). Na insuficiência cardíaca, o prejuízo da função ventricular esquerda reduz o fluxo sanguíneo nas artérias de condutância e resistência, resultando assim na diminuição do shear stress. Diversos estudos já corroboraram essa hipótese, mostrando uma redução da expressão da eNOS em modelos experimentais de insuficiência cardíaca (Comini *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1996; Schafer *et al.*, 2003). Todavia, no presente estudo não foi observado alteração da expressão protéica da eNOS em aorta de ratos INF e IC,

quatro semanas após o IM. Indo de encontro aos nossos achados, Sartório e colaboradores (2007) não encontraram alteração da expressão da eNOS 7 dias após IM. Entretanto, ao avaliarem a isoforma fosforilada dessa enzima (peNOS), encontraram uma redução significativa da razão peNOS/eNOS nos animais infartados, quando comparados ao grupo SHAM. Dessa forma, apesar da expressão da eNOS não ter sido alterada nos presentes resultados, poderia haver uma redução na expressão da peNOS nesses animais. Em contrapartida, há trabalhos que relatam um aumento da expressão vascular da eNOS em ratos com IM crônico, porém este achado é acompanhado de um aumento do estresse oxidativo (Bauersachs *et al.*, 1999).

A redução da biodisponibilidade de NO pode resultar também do aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs). A liberação aumentada de EROs, foi detectada em vários estudos experimentais de IC (Bauersachs *et al.*, 1999; 2001; Arimura *et al.*, 2001, Schafer *et al.*, 2003; Sartório *et al.*, 2007; Dworakowski *et al.*, 2008). Ainda, pacientes com IC apresentam elevadas concentrações de peróxido de lipídeos no plasma, uma evidência de estresse oxidativo nessas condições (Belch *et al.*, 1991; Keith *et al.*, 1998). Dessa maneira, as EROs, especialmente o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), reagem rapidamente com o NO, levando à formação de peroxinitrito, outro importante radical livre, diminuindo assim, a biodisponibilidade de NO.

Quando a ouabaína foi incubada juntamente com L-NAME, o efeito desse fármaco foi potencializado nos três grupos estudados. Isso indica que a ouabaína promoveu uma maior modulação negativa do óxido nítrico sobre a resposta alfa-adrenérgica em aorta de ratos SHAM, INF e IC. Esse fenômeno poderia explicar a redução da reatividade vascular à fenilefrina encontrada na presença desse digitálico. Esses resultados sugerem que a ouabaína é capaz de aumentar a biodisponibilidade de NO tanto em ratos SHAM, como em ratos INF e IC. Em adição, a medida direta de NO basal através do DAF, em anéis de aorta após incubação com ouabaína, confirma esse aumento de NO. Como observado nos resultados anteriores, os ratos INF e IC apresentam um prejuízo na via do NO, com uma menor biodisponibilidade desse vasodilatador. Dessa forma, a ouabaína, poderia reverter, pelo menos em parte, a produção de NO nessas condições.

Diversos trabalhos, tanto agudos como crônicos, já demonstraram que a ouabaína é capaz de aumentar a liberação de vasodilatadores derivados do

endotélio como o EDHF, a prostaciclina e o NO (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1993; Ponte *et al.*, 1996; Marín & Redondo, 1999; Rossoni *et al.*, 1999). Estudos crônicos com ouabaína, em ratos com hipertensão induzida por esse digitálico, demonstraram um aumento da modulação endotelial negativa pelo NO (Padilha *et al.*, 2008; Hernanz *et al.*, 2008; Xavier *et al.*, 2004b; Rossoni *et al.*, 2002 a,b). Essa modulação negativa do NO ocorre em paralelo a uma redução da reatividade vascular à fenilefrina induzida pela ouabaína, em artérias mesentéricas e em anéis de aorta (Xavier *et al.*, 2004b; Rossoni *et al.*, 2002 a,b). Agudamente, foi demonstrado também que concentrações nanomolares de ouabaína aumenta a produção de NO em cultura de células endoteliais humanas (Eva *et al.*, 2006) e em cultura de células endoteliais da aorta (Dong *et al.*, 2004). Xie e colaboradores (1993) também demonstraram que 10  $\mu$ M de ouabaína aumenta a liberação de NO em artérias coronárias de porcos. Esses autores ainda especularam que a liberação de NO do endotélio vascular, induzida pela ouabaína, poderia contribuir para um efeito benéfico da ouabaína na insuficiência cardíaca congestiva. De fato, os presentes resultados também sugerem que a ouabaína aumenta a liberação de NO em anéis de aorta de ratos INF e IC, tendo assim um efeito benéfico nesses animais, já que esses modelos têm uma menor biodisponibilidade de NO, como demonstrado anteriormente.

Uma possível causa para o aumento da produção de NO induzido pela ouabaína seria através do aumento da expressão da eNOS. Alguns estudos já demonstraram que o aumento da liberação de NO ocorrido após tratamento com ouabaína foi acompanhado de aumento da expressão da eNOS (Rossoni *et al.*, 2002 b). Todavia, há estudos que não encontraram alteração da expressão dessa enzima (Padilha *et al.*, 2008; Hernanz *et al.*, 2008; Xavier *et al.*, 2004b). No presente trabalho, foi observado que nos ratos SHAM, a ouabaína diminuiu a expressão da eNOS, enquanto nos ratos INF e IC, a expressão dessa enzima não foi alterada após incubação com esse digitálico. Isso indica que o aumento da produção de NO pela ouabaína, observado no presente estudo, não pode ser explicado por aumento da expressão da eNOS. Todavia, vale ressaltar que o aumento da produção de NO poderia ser resultado de um aumento da atividade da eNOS. De fato, Eva e colaboradores (2006), em experimentos agudos, usando concentrações de ouabaína bem próximas à utilizada no presente estudo, demonstraram que o aumento da

produção endotelial de NO provocado pela ouabaína, foi acompanhado de aumento da atividade da eNOS.

A ouabaína tem sido descrita por aumentar a produção de NO e a expressão da iNOS em células do músculo liso vascular estimuladas por interleucina-1 $\beta$  (Ikeda *et al.*, 1995; Pacheco *et al.*, 2000). Diante disso, para analisar se o NO derivado da iNOS, participa da redução da resposta contrátil à fenilefrina observada após incubação com ouabaína, o efeito do inibidor da iNOS, aminoguanidina, foi determinado.

Na ausência de ouabaína, a incubação com aminoguanidina não alterou a resposta contrátil à fenilefrina nos três grupos estudados. Esse resultado sugere que não há modulação do óxido nítrico derivado da iNOS sobre a reatividade vascular de ratos SHAM e de ratos INF e IC, 4 semanas após IM. É importante lembrar que o presente trabalho avaliou o IM na sua fase crônica, o que justificaria o não envolvimento da modulação endotelial por parte da iNOS, já que a resposta inflamatória após IM ocorre na sua fase inicial (Neumann *et al.*, 1995; Deten *et al.*, 2002). Corroborando nossos achados, Bauersachs e colaboradores (1999) não encontraram alterações na expressão da iNOS em aorta torácica de ratos 8 semanas após IM. Entretanto, trabalhos demonstraram um aumento da atividade e expressão da iNOS no tecido cardíaco após IM (Wildhirt *et al.*, 1997; Vejstrup *et al.*, 1998). Outros estudos também já mostraram aumento da expressão da iNOS em artérias de resistência e condutância em modelos experimentais de insuficiência cardíaca 6 e 8 semanas após IM (Miller *et al.*, 2000; Stathopoulos *et al.*, 2001). Esse aumento da expressão da iNOS parece estar relacionado com o aumento de ânion superóxido, ao invés de aumento da produção de NO. Isso promove uma redução da biodisponibilidade de NO e, conseqüentemente um aumento da reatividade vascular após IM (Miller *et al.*, 2000; Sartório *et al.*, 2005).

Quando a ouabaína foi incubada juntamente com aminoguanidina, houve um aumento da resposta contrátil à fenilefrina nos grupos INF e IC, ao passo que no grupo SHAM, a reatividade à fenilefrina não foi modificada. Esses resultados sugerem um envolvimento do NO derivado da iNOS na redução da resposta à fenilefrina observada em anéis de aorta de ratos INF e IC após incubação com ouabaína. Em contrapartida, o achado do grupo SHAM sugere que o NO oriundo da iNOS não participa do efeito da ouabaína na redução da resposta contrátil à fenilefrina. O envolvimento do NO derivado da iNOS na redução da reatividade

vascular à fenilefrina também já foi demonstrado em anéis de aorta de ratos tratados com ouabaína (Rossoni *et al.*, 2002a). Ainda, foi descrito que a ouabaína é capaz de promover a ativação do fator de transcrição NFκB, e com isso estimular a expressão da iNOS em cultura de células endoteliais (Bereta *et al.*, 1995).

Além de alterações na expressão das isoformas da NOS, diversas outras vias podem estar envolvidas na estimulação da produção de NO pela ouabaína. Já é bem estabelecido que a eNOS é diretamente regulada pela Akt que, uma vez ativada pela PI3K, fosforila a eNOS na Ser 1177 (Michell *et al.*, 1999). Eva e colaboradores (2006) observaram em células endoteliais do cordão umbilical humano, que a ligação da ouabaína na bomba de sódio induz uma cascata de reação que promove ativação da PI3K e, conseqüentemente, da Akt. Esta, por sua vez, fosforila a eNOS, aumentando a produção de NO. Buscando averiguar uma possível participação da via PI3K/Akt na produção de NO pela ouabaína, o presente trabalho utilizou o fármaco wortmannin, um inibidor seletivo da PI3K.

Na ausência de ouabaína, a incubação de wortmannin não alterou a resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta de ratos SHAM, INF e IC. Esses resultados sugerem que a via PI3K/Akt não está envolvida na produção de NO nos modelos experimentais estudados. Confirmando os dados funcionais, quando foi realizada a avaliação da expressão protéica da Akt e de sua forma fosforilada, não foi detectada alterações nessa expressão entre os três grupos. Indo de encontro a esses resultados, Sartório e colaboradores (2007) também não encontraram alterações na expressão da Akt e de sua forma fosforilada em anéis de aorta de ratos 7 dias após IM.

Todavia, quando a ouabaína foi incubada juntamente com wortmannin, foi observado um aumento da resposta contrátil à fenilefrina nos anéis de aorta de ratos INF e IC, ao passo que no grupo SHAM, não houve alteração da reatividade vascular à fenilefrina. Esses resultados indicam que a ouabaína é capaz de estimular a produção de NO por mecanismos distintos em ratos SHAM, INF e IC. Nos ratos INF e IC, esse digitálico pode estimular a via PI3K/Akt, que por sua vez, fosforila a eNOS, aumentando assim, a produção de NO. Já nos animais SHAM, a ouabaína pode estimular a produção de NO por mecanismos independentes da via PI3K/Akt. Esses resultados sugerem que nos animais INF e IC, a ouabaína atua por uma via alternativa de produção de NO, na tentativa de reverter, pelo menos parcialmente, a redução da liberação de NO presente nesses modelos.

Corroborando nossos resultados, Eva e colaboradores (2006), utilizando concentrações nanomolares de ouabaína, bem próximas àquela utilizada no presente estudo, propõem que a ouabaína, através da sua interação com a bomba de sódio, induz ativação da via PI3K/Akt, levando à fosforilação da eNOS e, conseqüentemente, um aumento na produção de NO. Esses autores sugerem que esse mecanismo se dê a partir de uma interação direta da PI3K com a subunidade  $\alpha$  da bomba de sódio, fato que já foi descrito por Yudowski e colaboradores (2000). Essa interação entre ouabaína e Akt já foi demonstrada em outros trabalhos. Em células do túbulo renal, 10 nM de ouabaína induz fosforilação da Akt, no seu resíduo Ser 473, por uma via dependente da quinase reguladora extracelular (ERK), promovendo assim, proliferação celular (Khundmiri *et al.*, 2006; 2007). Em miócitos cardíacos, a ouabaína induz hipertrofia através da ativação da via PI3K/Akt (Liu *et al.*, 2007).

Para confirmar os resultados funcionais com wortmannin, foi avaliada a expressão protéica da Akt e de sua forma fosforilada (pAkt Ser 473), na presença de ouabaína. Foi observado que a expressão da Akt não foi modificada após incubação com ouabaína. Entretanto, avaliando a isoforma fosforilada dessa enzima (pAkt), observou-se um aumento da razão pAkt/Akt nos grupos INF e IC após incubação com ouabaína. Esse achado sugere que a ouabaína promove um aumento da atividade da Akt. Esses dados corroboram os achados funcionais, contribuindo com nossa hipótese de que, nos animais INF e IC, a ouabaína estimula a produção de NO através da via PI3K/Akt. Ainda, corroboram os achados de Eva e colaboradores (2006), que observaram que a ouabaína, na faixa de concentração de 0,1 a 10 nM, aumenta a expressão protéica da pAkt em células endoteliais humanas. Essa fosforilação da Akt induzida pela ouabaína, também pode justificar os resultados encontrados após incubação com aminoguanidina mais ouabaína nos grupos INF e IC. Trabalhos demonstram que a fosforilação da Akt induz a ativação do fator de transcrição NFkB, conhecido como regulador da iNOS (Hattori *et al.*, 2003). Dessa forma, a ouabaína pode estimular a fosforilação da Akt, que através da ativação do NFkB, pode ativar a iNOS.

Esses resultados em conjunto sugerem que a ouabaína aumenta a produção de NO nos animais INF e IC, por ativação da via PI3K/Akt, diminuindo assim, a resposta contrátil à fenilefrina. Já nos animais SHAM, a ouabaína estimula a produção de NO, por mecanismos independentes da via PI3K/Akt.

Como já se sabe, uma das vias de vasodilatação do NO envolve a ativação de canais para potássio (Bolotina *et al.*, 1994; Félétou & Vanhoutte, 2006; Félétou & Vanhoutte, 2009; Félétou, 2009). Além disso, trabalho prévio do nosso grupo (Briones *et al.*, 2009) verificou que o tratamento crônico com ouabaína, promove aumento da liberação basal de NO, e que o próprio NO gerado é capaz de estimular canais para potássio em coronária de ratos. Diante disso, também avaliamos a participação de canais para potássio na redução da resposta vasoconstritora induzida pela ouabaína nos 3 grupos experimentais. Para isso, foi utilizado TEA, um inibidor de canais para potássio.

Na ausência de ouabaína, a incubação com TEA aumentou a resposta contrátil à fenilefrina nos ratos SHAM, INF e IC, confirmando a modulação negativa dos canais para potássio sobre a resposta à fenilefrina nesses animais. Entretanto, essa modulação negativa foi menor nos animais INF quando comparado ao grupo SHAM. Como foi utilizado TEA, um bloqueador inespecífico dos canais para potássio, não poderíamos afirmar que os efeitos observados são atribuídos à liberação de um EDHF. Entretanto, visto que já foi descrito que o NO é considerado um EDHF (Bolotina *et al.*, 1994), por ativar esses canais em aorta de ratos, poderíamos especular essa possível via em nossos resultados.

Os trabalhos que envolvem a participação do EDHF na modulação endotelial após IM são contraditórios. Em artérias de resistência de ratos IC após 4 a 8 semanas de IM, foi observado uma redução da modulação endotelial negativa do NO paralelo a um aumento da modulação negativa pelo EDHF (Malmsjö *et al.*, 1999). Essa resposta também foi observada em anéis de aorta de ratos 7 dias após IM (Csanyi *et al.*, 2006). Em contrapartida, foi demonstrado em anéis de aorta de ratos IC 12 semanas após IM, um prejuízo na resposta vasodilatadora mediada pelo EDHF (Gschwend *et al.*, 2003). Esses resultados divergentes podem ser próprios das diferenças entre os leitos vasculares e o tempo de infarto estudado.

Sendo assim, os resultados entre os três modelos estudados mostram que o aumento da reatividade vascular à fenilefrina, observado nos ratos IC, pode ser causado por uma diminuição da modulação endotelial negativa do NO. Apesar da diminuição da modulação endotelial negativa do NO e dos canais para potássio, observado no grupo INF, a resposta contrátil à fenilefrina não foi alterada. Provavelmente, deve existir a modulação de outro fator vasodilatador nesse grupo, que esteja mantendo essa resposta à fenilefrina semelhante à do grupo SHAM. De

fato, Dias e colaboradores (2007) observaram um aumento da atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  sensível a ouabaína em anéis de aorta de animais INF após 30 dias de IM. Além disso, é bem estabelecido que o infarto do miocárdio cursa com aumento do estresse oxidativo (Bauersachs *et al.*, 1999), tendo como consequência aumento de EROs bem como de seus intermediários, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Em certos leitos vasculares, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  atua como fator relaxante dependente de endotélio, promovendo hiperpolarização e vasodilatação periférica, coronariana e em artérias cerebrais (Rabelo *et al.*, 2003; Thengchaisri *et al.*, 2007). Embora não tenhamos avaliado essa via de sinalização, poderíamos especular que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado promoveria vasodilatação, podendo contribuir para a manutenção dessa resposta à fenilefrina encontrada no grupo INF do presente trabalho. Ou ainda, que esses animais podem apresentar aumento da atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ , auxiliando assim, na manutenção da semelhança de resposta à fenilefrina do grupo INF com o SHAM.

Quando a ouabaína foi incubada juntamente com o TEA, houve um aumento da resposta contrátil à fenilefrina nos grupos INF e IC, porém, no grupo SHAM, essa resposta não foi modificada. Esses resultados sugerem que a ouabaína poderia promover aumento da liberação de um fator endotelial, difusível, capaz de abrir canais para potássio, contribuindo para a diminuição da resposta à fenilefrina observada nos grupos INF e IC após incubação desse digitalico. Corroborando nossos resultados, Rossoni e colaboradores (1999, 2002a) demonstraram que a ouabaína, de forma aguda e crônica, aumenta a liberação de um fator hiperpolarizante endotelial que parece abrir canais de  $\text{K}^+$  no leito arterial caudal de ratos wistar. Além disso, trabalho prévio do nosso grupo (Briones *et al.*, 2009), demonstrou que o tratamento crônico com ouabaína promove relaxamento à acetilcolina em artérias coronárias, através da ativação de canais de potássio ativados por cálcio de alta condutância (BKCa), pelo óxido nítrico. Nesse sentido, poderíamos especular em nosso estudo, que o próprio NO estimulado pela ouabaína poderia ativar canais para potássio, contribuindo para a redução da reatividade vascular a fenilefrina. Em contrapartida, outros trabalhos demonstraram uma redução do EDHF após tratamento crônico com ouabaína em artérias de resistência de ratos wistar, e no leito arterial caudal de ratos SHR (Padilha *et al.*, 2008; Xavier *et al.*, 2004b, 2009).



Portanto, os presentes resultados sugerem que a ouabaína, além de aumentar a produção de NO via PI3K/Akt, promove também aumento da liberação de um fator endotelial, difusível, capaz de abrir canais para potássio, em anéis de aorta de ratos INF e IC. Esses efeitos em conjunto, promovem uma redução da resposta contrátil à fenilefrina. Já nos animais SHAM, a redução de reatividade vascular observada após incubação com ouabaína, deve-se a uma maior liberação de NO, por um mecanismo independente da via PI3K/Akt.

## VI. CONCLUSÃO

Os resultados experimentais obtidos no presente estudo estão sintetizados abaixo:

- os ratos IC apresentam aumento da reatividade vascular à fenilefrina, sendo essa resposta acompanhada de uma menor modulação negativa do NO. Apesar da resposta à fenilefrina não estar alterada nos ratos INF, esse grupo apresenta uma menor modulação negativa do NO e dos canais para potássio.

- em anéis de aorta de ratos SHAM, INF e IC, a ouabaína foi capaz de reduzir a reatividade vascular induzida por estimulação alfa-adrenérgica; sendo este efeito dependente do endotélio vascular.

- essa redução da reatividade vascular à fenilefrina promovida pela ouabaína nos ratos SHAM está associada a um aumento da modulação endotelial do óxido nítrico, sendo que este NO não é derivado da iNOS e tampouco da via PI3K/Akt.

- em ratos INF e IC, a redução da resposta à fenilefrina promovida pela ouabaína está associada a um aumento da produção de NO e ao aumento da liberação de um fator endotelial, difusível, capaz de abrir canais para potássio. Esse aumento de NO promovido pela ouabaína é oriundo da eNOS e iNOS e envolve a participação da via PI3K/Akt.

- 3 nM de ouabaína foi capaz de aumentar a produção local de óxido nítrico em anéis de aorta de ratos SHAM, INF e IC.

- a expressão protéica da eNOS não foi alterada pela ouabaína nos três grupos estudados, porém, a incubação com ouabaína aumentou a razão pAkt/Akt nos anéis de aorta de ratos INF e IC.

Em conclusão, o presente trabalho demonstra, pela primeira vez, que a ouabaína é capaz de aumentar a produção de NO através de mecanismos distintos em aorta de animais SHAM, INF e IC. Em ratos SHAM, a ouabaína aumenta a produção de NO por mecanismos independentes da iNOS e da via PI3K/Akt. Já em ratos INF e IC, a ouabaína aumenta a produção de NO por mecanismos

dependentes da eNOS e iNOS e, da via PI3K/Akt. Além disso, nesses últimos grupos, esse digitalico também promove aumento da liberação de um fator endotelial, difusível, capaz de abrir canais para potássio. Esses resultados indicam que a ouabaína pode estimular vias alternativas de produção de NO, como a via PI3K/Akt, tentando reverter a redução da biodisponibilidade de NO presente nos ratos INF e IC. Ainda, esses resultados sugerem um efeito benéfico da ouabaína após o IM e na IC, já que esse digitalico é capaz de reverter, pelo menos parcialmente, a redução de fatores vasodilatadores, como o NO, e aumentar a participação de canais para potássio, presentes nessas condições.

## REFERÊNCIAS

Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.*, 1999; 15;43(3):521-31.

Arimura K, Egashira K, Nakamura R, Ide T, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A. Increased inactivation of nitric oxide is involved in coronary endothelial dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280, H68–75.

Arnon A, Hamlyn JM, Blaustein MP. Ouabain augments Ca(2+) transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na(+). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2000; 279(2):H679-91.

Anversa P, Beghi C, Mc Donald SL, Levicky V, Kikkawa Y, Olivetti G. Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by myocardial infarction in the rat. *Am J Pathol.*, 1984; 116:504–513.

Anversa P, Loud AV, Levicky V, Guideri G. Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I. Myocyte hypertrophy. *American Journal of Physiology and Heart Circulatory Physiology*, 1985; 248: H876-H882.

Anversa P, Sonnenblick EH. Ischemic cardiomyopathy: pathophysiologic mechanisms. *Prog Cardiovasc Dis.*, 1990; 33(1):49-70.

Ashrafian H, Frenneaux MP, Opie LH. Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation*, 2007; 116: 434-48.

Aydemir-Koksoy, A; Allen, JC. Regulation of Na<sup>+</sup> pump expression by vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2001; 280: H1869–H1874.

Bagrov AY, Fedorova OV, Maslova MN, Roukoyatkina NI, Stolba P, Zhabko EP. Antiarrhythmic effect of antibodies to digoxin in acute myocardial ischemia in rats. *Eur J Pharmacol*, 1989; 162:195–196.

Bagrov AY, Fedorova OV, Roukoyatkina NI, Zhabko EP. Effect of antidigoxin antibody on myocardial Na,K-pump activity and of endogenous digoxin-like factor in acute myocardial ischemia in rats. *Cardiovasc Res*, 1993; 27:1045–1050.

Bagrov, AY; Kuznetsova, EA; Federova, OV. Endogenous digoxin-like factor in acute myocardial infarction. *Journal of Internal Medicine*, 1994; 235: 63-67.

Bagrov AY, Shapiro JI. Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications. *Nat Clin Pract Nephrol.*, 2008; 4(7): 378–392.

Bagrov, AY; Shapiro, JI; Fedorova, OV. Endogenous Cardiotonic Steroids: Physiology, Pharmacology, and Novel Therapeutic Targets. *Pharmacol Rev.*, 2009; 61:9–38.

Baig KM, Mahon N, McKenna WJ, Caforio ALP, Bonow RO, Francis GS, Gheorghiade M. The pathophysiology of advanced heart failure. *Heart & Lung*, 1999; 28 (2).

Balzan S, Neglia D, Ghione S, D'Urso G, Baldacchino MC, Montali U, L'Abbate A. Increased circulating levels of ouabain-like factor in patients with asymptomatic left ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail.*, 2001;3:165–171.

Barros RA, Okoshi MP, Cicogna AC. Via beta-adrenérgica em corações normais e hipertrofiados. *Arq Bras Cardiol.*, 1999; 72: 641-8.

Bauer N; Muller-Ehmsen J; Krämer U; Hambarchian N; Zobel C; Schwinger RHG; Neu H; Kirch U; Grunbaum EG; Schoner W. Ouabain-Like Compound Changes Rapidly on Physical Exercise in Humans and Dogs Effects of  $\beta$ -Blockade and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. *Hypertension*; 2005; 45:1024-1028.

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: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation*, 1999; 20;100(3):292-8.

Bauersachs J, Fleming I, Fraccarollo D, Busse R, Ertl G. Prevention of endothelial dysfunction in heart failure by vitamin E: attenuation of vascular superoxide anion formation and increase in soluble guanylyl cyclase expression. *Cardiovasc Res*, 2001, 51, 344–350.

Bauersachs J, Widder JD. Endothelial dysfunction in heart failure. *Pharmac Rep* 2008; 60: 119–126.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 1976; 7;72:248-54.

Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J*, 1991, 65, 245–248.

Bereta J, Cohen MC, Bereta M. Stimulatory effect of ouabain on VCAM-1 and iNOS expression in murine endothelial cells: involvement of NF- $\kappa$ B. *FEBS Letters*, 1995; 377: 21~5.

Blanco G; Mercer RW. Isoenzymes of the Na, K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal of Physiology*, 1998; 275: F633-F650.

Blaustein MP; Goldman WF; Fontana G; Krueger B; Santiago EM; Steele TD; Weiss DN; Yarowsky PJ. Physiological roles of the sodium-calcium exchanger in nerve and muscle. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1991; 639: 254-274.

Blaustein, MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intra-cellular  $Ca^{2+}$  stores and cell responsiveness. *American Journal of Physiology*, 1993; 264: C1367-C1387.

Blaustein, MP; Juhaszova, M; Golovina, VA. The cellular mechanisms of action of cardiotonic steroids: a new hypothesis. *Clinical and Experimental Hypertension*, 1998; 20 (5 & 6): 691-703.

Blaustein MP, Zhang J, Chen L, Song H, Raina H, Kinsey SP, Izuka M, Iwamoto T, Kotlikoff MI, Lingrel JB, Philipson KD, Wier WG, Hamlyn JM. The Pump, the Exchanger, and Endogenous Ouabain Signaling Mechanisms That Link Salt Retention to Hypertension. *Hypertension*, 2009; 53[part 2]:291-298.)

Blaustein MP; Hamlyn JM. Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: Endogenous ouabain, the  $Na^+$  pump, the  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger and TRPC proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010; 1802(12):1219-1229.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 1994; 368: 850–853.

Bova S; Blaustein MP; Ludens JH; Harris DW; DuCharme DW; Hamlyn JM. Effects of an endogenous ouabainlike compound on heart and aortic. *Hypertension*, 1991; 17: 944-950.

Bossuyt J; Ai X; Moorman JR; Pogwizd SM; Bers DM. Expression and phosphorylation of the Na-pum regulatory subunit phospholemman in heart failure. *Circulation Research*, 2005; 97: 558-565.

Briones AM, Padilha AS, Cogolludo AL, Alonso MJ, Vassallo DV, Perez-Vizcaino F, Salaices M. Activation of BKCa channels by nitric oxide prevents coronary artery endothelial dysfunction in ouabain-induced hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 2009, 27:83–91

Buckalew VM Jr; Marinez FJ; Green WE. The effect of dialysates and ultra filtrates of plasma of saline loaded dogs on toad bladder sodium transport. *Journal of Clinical Investigation*, 1970; 49: 926-935.

Bulbring E, Tomita T. Catecholamine action on smooth muscle. *Pharmacol Rev* 39: 49–96, 1987.

Campbell WB, Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension*, 2007; **49**: 590–596.

Channon KM, Qian H, George SE. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury: insights from experimental gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2000;20(8):1873-81.

Chatterjee A, Catravas JD. Endothelial Nitric Oxide (No) And Its Pathophysiologic Regulation. *Vascul Pharmacol.*, 2008; 49(4-6): 134–140.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.*, 2000; 35: 569-82.

Comini L, Bachetti T, Gaia G, Pasini E, Agnoletti L, Pepi P, Ceconi C et al.: Aorta and skeletal muscle NO synthase expression in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28, 2241–2248.

Cornelius F; Mahmmoud YA. Direct activation of gastric H,K-ATPase by N-terminal protein kinase C phosphorylation: comparison of the acute regulation mechanisms of H,K-ATPase and Na,K-ATPase. *Biophys J.*, 2003; *84*:1690–1700.

Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.*, 1991;40(6):923-31.



Crambert G; Geering K. FXYP proteins: new tissue-specific regulators of the ubiquitous Na,K-ATPase. *Sci STKE*, 2003; 21:166-RE1.

Crespo MJ. Vascular alterations during the development and progression of experimental heart failure. *J Card Fail.*, 1999;5(1):55-63.

Csanyi G, Bauer M, Dietl W, Lomnicka M, Stepuro T, Podesser BK, Chlopicki S. Functional alterations in NO, PGI<sub>2</sub> and EDHF pathways in the aortic endothelium after myocardial infarction in rats. *Eur J Heart Fail.*, 2006; 8: 769-776.

Dávila DF, Núñez TJ, Odreman R, de Dávila CA. Mechanisms of neurohormonal activation in chronic congestive heart failure: pathophysiology and therapeutic implications. *Int J Cardiol.*, 2005; 8;101(3):343-6.

DATASUS (2009). Indicadores e Dados Básicos - Brasil – 2009 IDB-2009. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2009/c08.def>, acessado em dezembro de 2010.

Delva P, Barbieri E, Devynck M-A, Meyer P, Destro G, Capra C, Pernollet MG, Zardini P, and Lechi A. Increase in plasma digitalis like activity during percutaneous transluminal angioplasty in patients with coronary stenosis. *Life Sci*, 1990; 47:385–389.

De Mey JG, Claeys M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *J Pharmacol Exp Ther.*, 1982; 222: 166–173.

Despa S, Bossuyt J, Han F, Ginsburg KS, Jia L, Kutchai H, Tucker AL, Bers DM. Phospholemman-Phosphorylation Mediates the beta-Adrenergic Effects on Na/K Pump Function in Cardiac Myocytes. *Circ Res.*, 2005; 97:252-259

Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res*, 2002; 55: 329–340.

de Wardener HE; Mills IH; Clapham WF; Hayter CJ. Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows administration of intravenous saline in dog. *Clinical Science*, 1961; 21: 249-258.

de Wardener HE; Clarkson EM. Concept of natriuretic hormone. *Physiological Reviews*, 1985; 65 (3): 658-759.

Dias FMV. Atividade funcional da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase sensível a ouabaina em aorta de ratas com e sem sinais de insuficiência cardíaca após infarto agudo do miocárdio. Dissertação de Mestrado, 2007. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 1999; 399: 601–605.

Dostanic-Larson I, Lorenz JN, Van Huysse JW, Neumann JC, Moseley AE, Lingrel JB. Physiological role of the  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-isoforms of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006; 290:R524–R528.

Dostanic-Larson I, Van Huysse JW, Lorenz JN, Lingrel JB. The highly conserved cardiac glycoside binding site of Na,K-ATPase plays a role in blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005; 102:15845–15850.

Dusting GJ, MacDonald PS. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. *Ann. Med.*, 1995; 27: 395-406.

D'Urso G; Frascarelli BS; Balzan S; Zucchi R; Montali U. Production of Ouabain-Like Factor in Normal and Ischemic Rat Heart. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 2004; 43:657–662.

Dong XH, Komiyama Y, Nishimura N, Masuda M, Takahashi H. Nanomolar level of ouabain increases intracellular calcium to produce nitric oxide in rat aortic endothelial cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2004; 31, 276–283

Dos Santos JJA; Plewka JEA; Brofman PRS. Qualidade de vida e indicadores clínicos na insuficiência cardíaca: análise multivariada. *Arq. Bras. Cardio.*, 2009; 93(2): 159-166.

Drexler H, Hayoz D, Munzel T, Horning B, Just H, Brunner HR, Zelis R. Endothelial function in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1992; 69: 1596–1601.

Drexler H, Lu W. Endothelial dysfunction of hindquarter resistance vessels in experimental heart failure. *Am J Physiol.*, 1992;262(6 Pt 2):H1640-5.

Dworakowski R, Simon W, Momin A, Desai J, El-Gamel A, Wendler O, Kearney MT, Shah AM. Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase-Derived Superoxide and Vascular Endothelial Dysfunction in Human Heart Failure. *J Am Coll Cardiol.*, 2008; 51:1349–56.

Ellis A, Triggle CR. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol.*, 2003; 81: 1013–1028.

Elsner D, Muntze A, Kromer EP, Riegger GAJ. Systemic vasoconstriction induced by inhibition of nitric oxide synthesis is attenuated in conscious dogs with heart failure. *Cardiovasc Res.*, 1991; 25:438-440.

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

Fang ZY, Marwick TH. Vascular dysfunction and heart failure: epiphenomenon or etiologic agent? *Am. Heart J.*, 2002;143, 383 – 390.

Faraci FM, Sobey CG, Chrissobolis S, Lund DD, Heistad DD, Weintraub NL. Arachidonate dilates basilar artery by lipoxygenase-dependent mechanism and activation of K(+) channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2001; 281: R246–R253.

Faria TO. Alterações ponderais, hemodinâmicas e da função vascular do leito arterial caudal em ratas sete dias após o infarto do miocárdio. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2009.

Fraccarollo D, Galuppo P, Schraut S, Kneitz S, van Rooijen N, Ertl G, Bauersachs J. Immediate mineralocorticoid receptor blockade improves myocardial infarct healing by modulation of the inflammatory response. *Hypertension*, 2008;51(4):905-14.

Féléto M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 1988; 93: 515-524.

Féléto M, Vanhoutte PM. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Where Are We Now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2006; 26:1215-1225.

Féléto M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clinical Science*, 2009; 117, 139–155.

Féléto M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *British Journal of Pharmacology*, 2009; 156, 545–562

Feraille E, Carranza ML, Gonin S, Béguin P, Pedemonte C, Rousselot M, Caverzasio J, Geering K, Martin PY, Favre H. Insulin-induced stimulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the  $\alpha$ -subunit at Tyr-10. *Mol Biol Cell.*, 1999; 10: 2847–2859.

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

Fernandes AA. Avaliação da contratilidade ventricular direita 7 e 60 dias após infarto do miocárdio em ratos com e sem insuficiência cardíaca e mesma área de cicatriz. Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2010.

Ferrandi M, Molinari I, Barassi P, Minotti E, Bianchi G, Ferrari P. Organ hypertrophic signaling within caveolae membrane subdomains triggered by ouabain and antagonized by PST 2238. *J Biol Chem.*, 2004; 279:33306–33314.

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. *Eur Heart J.* 2005; 26: 65–69.

Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I *et al.* Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*, 1999, 401: 493–497.

Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand*, 2000; 168: 81–88.

Flammer AJ, Lüscher TF. Three decades of endothelium research: From the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. *Swiss Med Wkly.*, 2010; 140:w13122

Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr495 regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res*, 2001, 88: e68–e75.

Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2003; 284: R1–R12.

Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric Oxide Synthase Isozymes Characterization, Purification, Molecular Cloning, and Functions. *Hypertension*, 1994; 3 [part 2] :1121-1131.

Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med.*, 2001; 110: 37S-46S.

Francis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Felder RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *American Journal Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2001, 281: R1734-R1745.

Frolich JC; Forstermann V. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. *Advanced Prostaglandin Tromboxane and Leukotriene Research*, 1989; 19: 211-215.

Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/ calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther.*, 2001; 299: 818–824.

Furchgott RF; Zawadzski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 288: 373-376.

Furchgott RF; Carvalho MHC; Khan MT. Evidence for endothelium-dependent vasodilatation of resistance vessels by acetylcholine. *Blood Vessels*, 1987; 24: 145-149.

Furukawa K, Ohshima N, Tawada-Iwata Y, Shigekawa M. Cyclic GMP stimulates Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J Biol Chem.*, 1991; 5;266(19):12337-41.

Ganitkevich VY, Isenberg G. Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. *J Physiol.*, 1991; 435: 187–205.

Geering, K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 2006; 290: F241–F250.

Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* 2005; 115: 500-8.

Golovina VA. Visualization of localized store-operated calcium entry in mouse astrocytes. Close proximity to the endoplasmic reticulum. *J. Physiol.* 2005; 564, 737–749.

Gottlieb SS; Rogowski AC; Weinberg M; Krichten CM; Hamilton BP; Hamylin JM. Elevated concentrations of ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation*, 1992; 86 (2): 20-425.

Graves SW, Valdes R Jr, Brown BA, Knight AB, Craig HR. Endogenous digoxin-immunoreactive substance in human pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.*; 1984; 58:748–751.

Graves SW. The possible role of digitalislike factors in pregnancy-induced hypertension. *Hypertension*, 1987; 10:184–186.

Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J, Köhler R. Endothelial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in normal and impaired EDHF-dilator responses – relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 2009, 157, 509–526.

Gruber KA; Whitaker JM; Buckalew VM. Endogenous digital-like substance in plasma volume expanded dogs. *Nature*, 1980; 287: 743-745.

Gschwend S, Buikema H, Henning RH, Pinto YM, de ZD, van Gilst WH. Endothelial dysfunction and infarct-size relate to impaired EDHF response in rat experimental chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*, 2003; 5:147–54.

Gupta S; Mc Arthur C; Grady C; Ruderman NB. Stimulation of vascular Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *American Journal of Physiology*, 1994; 266 (35): H2146-2151.

Gupta S; Phipps K; Ruderman NB. Differential stimulation of Na<sup>+</sup> pump activity by insulin and nitric oxide in rabbit aorta. *American Journal of Physiology*, 1996; 270: H1287-H1293.

Habib H, Dutka D, Crossman D, Oakley CM, Cleland JGF. Enhanced basal nitric oxide production in heart failure: another failed regulatory mechanism? *Lancet*, 1994; 344:371–373.

Haddy FJ; Overbeck HW. The role of humoral agents in volume expanded hypertension. *Life Sciences*, 1976; 19: 935-947.

Hamlyn JM; Ringel R; Schaeffer J; Levinson PD; Hamilton BP; Kowarski AA; Blaustein MP. A circulating inhibitor of (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATPase associated with essential hypertension. *Nature*, 1982; 300: 650-652.

Hamlyn JM; Blaustein MP; Bova S; DuCharme DW; Mandel F; Mathews WR; Ludens JH. Identification and characterization of an ouabain-like compound from human



plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1991; 88: 6259-6263.

Hamlyn JM; Hamilton BP; Manunta P. Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and a hypothesis. *Journal of Hypertension*, 1996; 14 (2) 151-197.

Hamlyn JM; Lu Z; Manunta P; Ludens JH; Kimura K; Shah JR; Laredo J; Hamilton JP; Hamilton MJ; Hamilton BP. Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. *Clin. Exp.Hypertens.*, 1998; 20: 523–533.

Han F, Bossuyt J, Despa S, Tucker AL, Bers DM. Phospholemman Phosphorylation Mediates the Protein Kinase C–Dependent Effects on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>Pump Function in Cardiac Myocytes. *Circ Res.*, 2006; 99:1376-1383.

Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C: Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med*, 2006, 259, 351–363.

Harteneck C, Plant TD, Schultz G. From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.*, 2000; 23 159–166.

Hasegawa T; Masugi F; Ogihara T; Kumuhara Y. Increase in plasma ouabainlike inhibitor of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase with high sodium intake in patients with essential hypertension. *Journal Clinical Hypertension*, 1987; 3: 419-429.

Hasenfuus G, Meyer M, Schillinger W, Preus M, Pieske B, Just H. Calcium handling proteins in the failing human heart. *Basic Res Cardiol*. 1997; 92: 87-93.

Hattori Y, Hattori S, Kasai K. Lipopolysaccharide activates Akt in vascular smooth muscle cells resulting in induction of inducible nitric oxide synthase through nuclear factor-kappa B activation. *Eur J Pharmacol.*, 2003; 481:153–158.

Hauptman PJ; Kelly RA. Digitalis. *Circulation*; 1999; 99:1265-1270.

Hecker M, Mülsch A, Bassenge E, Förstermann U, Busse R. Subcellular localization and characterization of nitric oxide synthase(s) in endothelial cells: physiological implications. *Biochem J.*, 1994; 1; 299 (Pt 1):247-52.

Hecker M, Cattaruzza M, Wagner AH. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol.*, 1999;32(1):9-16.

Heimburger RF. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg.*, 1946; 52: 677-89.

Hernanz R, Briones AM, Martín A, Beltran AE, Tejerina T, Salaiques M, Alonso MJ. Ouabain treatment increases nitric oxide bioavailability and decreases superoxide anion production in cerebral vessels. *Journal of Hypertension*, 2008, 26:1944–1954

Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.*, 1996; 76(4):967-1003.

Huang BS, Yuan B, Leenen FH. Blockade of brain 'ouabain' prevents the impairment of baroreflexes in rats after myocardial infarction. *Circulation*, 1997; 96(5):1654-9.

Huang BS, Yuan B, Leenen FH. Chronic blockade of brain "ouabain" prevents sympathetic hyper-reactivity and impairment of acute baroreflex resetting in rats with congestive heart failure. *Can J Physiol Pharmacol.*, 2000; 78(1):45-53.

Hundal HS; Marette A; Mitsumoto Y; Ramlal T; Blostein R; Klip A. Insulin induces translocation of the  $\alpha 2$  and  $\alpha 1$  subunits of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem*; 1992; 267:5040–5043.

Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 1985; 25: 171-191.

Ignarro LJ; Buga GM; Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1987; 84: 9265-9269.

Ikedo U, Furuhashi K, Kanbe T, and Shimada K. Ouabain enhances nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells induced by interleukin-1beta. *Eur J Pharmacol.*, 1995; 288: 379–383.

Jackson WF. Ion channels and vascular tone. *Hypertension*, 2000;35(1 Pt 2):173-8.

James PF, Grupp IL, Grupp G, Woo AL, Askew GR, Croyle ML, Walsh RA, Lingrel JB. Identification of a specific role for the Na, K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol. Cell*; 1999; 3; 555–563.

Jasmin JF, Calderone A, Leung TK, Villeneuve L, Dupuis J. Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan. *Cardiovasc Res.*, 2003; 58: 621–631.

Jasmin JF, Mercier I, Hnasko R, Cheung MWC, Tanowitz HB, Dupuis J, Lisanti MP. Lung remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: pathogenic role of reduced caveolin expression. *Cardiovasc Res.*, 2004; 63: 747–755.

Johns TNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction: I. Method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg.*, 1954; 140: 675-82.

Juhaszova M; Blaustein MP. Na<sup>+</sup> pump low and high ouabain affinity alpha subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997a; 94:1800–1805.

Juhaszova M; Blaustein MP. Distinct distribution of different Na<sup>+</sup> pump alpha subunit isoforms in plasmalemma. *Physiological implications. Ann N Y Acad Sci.*, 1997b; 3; 834:524-36.

Katz SD, Biasucci L, Sabba C, Strom JA, Jondeau G, Galvao M, Solomon S, Nikolic SD, Forman R, Lejemtel TH. Impaired endothelium-mediated vasodilation in the peripheral vasculature of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 918–925.

Katz SD, Hryniewicz K, Hriljac I, Balidemaj K, Dimayuga C, Hudaihed A, Yasskiy A. Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 2005;111:310 –314.

Ke YS, Wang DG, Wang HG, Yang SY. Endoxin antagonist lessens myocardial ischemia reperfusion injury. *Cardiovasc Drugs Ther.*, 2004; 18:289–293.

Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, Jeejeebhoy KN. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 1998, 31, 1352–1356.

Khundmiri SJ, Metzler MA, Ameen M, Amin V, Rane MJ, Delamere NA. Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2006; 291: C1247–C1257.

Khundmiri SJ, Amin V, Henson J, Lewis J,1 Ameen M, Rane MJ, Delamere NA. Ouabain stimulates protein kinase B (Akt) phosphorylation in opossum kidney proximal tubule cells through an ERK-dependent pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2007; 293: C1171–C1180.

Kifor I, Dzau VJ. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circulation Research*, 1987; 60 (3): 422-428.

Kim HR, Appel S, Vetterkind S, Gangopadhyay SS, Morgan KG. Smooth muscle signaling pathways in health and disease. *J Cell Mol Med.*, 2008; 12(6A): 2165–2180

Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res.*, 2007; 74: 29-38.

Kometiani P, Li J, Gnudi L, Kahn BB, Askari A, Xie Z. Multiple signal transduction pathways link Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes: the roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.*, 1998; 273:15249–15256.

Kramer H; Gonick H; Paul W. Third factor: Inhibition of the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase? *Proceedings of the Fourth International Congress on Nephrology*. New York: Karger, 1969; 373.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991; 88: 4651-5.

Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Williams RE, Heifetz SM. Endothelium dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation*, 1991;84:1589 – 1596.

Kunapuli S, Rosanio S, Schwarz ER. How do cardiomyocytes die? Apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. *J Card Fail.*, 2006; 12: 381-8.

Laporte R, Hui A, Laher I. Pharmacological Modulation of Sarcoplasmic Reticulum Function in Smooth Muscle. *Pharmacol Rev.*, 2004; 56:439–513.

Laredo J; Ramilton BP; Hamlyn JM. Ouabain is secreted by bovine adrenal cortical cells. *Endocrinology*, 1994; 135 (2): 794-797.

Laredo J; Ramilton BP; Hamlyn JM. Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells: role of the zone glomerulosa and zona fasciculata. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 1995; 212 (2): 487-493.

Laredo J; Shah Jr; Lu ZR; Hamilton BP; Hamlyn JM. Angiotensin II estimates secretions of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptors. *Hypertension*, 1997; 29 (1 pt 2): 401-407.

Laredo J; Shah JR; Hamilton BP; Hamlyn JM. Alpha-1 adrenergic receptors stimulate secretion of endogenous ouabain from human and bovine adrenocortical cells. In *Na/K-ATPase and Related ATPases* (Taniguchi, K. & Kayas, S., eds), *Elsevier Science*, Amsterdam; 2000; pp.6 71–679.

Ledoux J, Gee DM, Leblanc N. Increased peripheral resistance in heart failure: new evidence suggests an alteration in vascular smooth muscle function. *British Journal of Pharmacology*, 2003; 139, 1245–1248.

Lee, CO. 200 Years of digitalis: the emerging central role of the sodium ion in the control of cardiac force. *Am. J. Physiol.*, 1985; 249 (5Pt 1), C367-C378.

*Leenen FH, Huang BS, Yu H, Yuan B. Brain 'ouabain' mediates sympathetic hyperactivity in congestive heart failure. Circ Res., 1995; 77(5):993-1000.*

Leenen FHH; Yuan B; Huang BS. Brain “ouabain” and angiotensin II contribute to cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 1999; 277:1786-1792.

Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*, 2002; 7:132–147.

Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Signal Transduction in Smooth Muscle. Invited Review. CGMP- dependent protein kinase signalling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol.*, 2001; 91: 1421-30.

Lingrel, JB. The Physiological Significance of the Cardiotonic Steroid/Ouabain-Binding Site of the Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.*, 2010, 72:395–412.

Liu J, García-Cardeña G, Sessa WC. Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry*, 1996; 15;35(41):13277-81.

Liu J, Tian J, Haas M, Shapiro JI, Askari A, Xie Z. Ouabain interaction with cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> concentrations. *J Biol Chem.*, 2000; 275:27838–27844.

Liu J, Kesiry R, Periyasamy SM, Malhotra D, Xie Z, Shapiro JI. Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells by a clathrin-dependent mechanism. *Kidney Int.*, 2004; 66:227–241.

Liu J, Liang M, Liu L, Malhotra D, Xie Z, Shapiro JI. Ouabain-induced endocytosis of the plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells requires caveolin-1. *Kidney Int.*, 2005; 67:1844–1854.

Liu L, Mohammadi K, Aynafshar B, Wang H, Li D, Liu J, Ivanov AV, Xie Z, Askari A. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2003; 284:C1550–C1560.

Liu L, Zhao X, Pierre SV, Askari A. Association of PI3K-Akt signaling pathway with digitalis-induced hypertrophy of cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2007; 293: C1489–C1497.

Ludens JH; Clark MA; DuCharme DW; Harris DW; Lutzke BS; Mandel F; Mathews WR; Sutter DM; Hamlyn JM. Purification of an endogenous digitalislike factor from human plasma for structural analysis. *Hypertension*, 1991; 17: 923-929.

Ludens JH; Clark MA; Robinson FG; DuCharme DA. Rat adrenal cortex is a source of a circulation ouabainlike compound. *Hypertension*, 1992; 19 (6 Pt 2): 721-724.

Lytton J, Lin JC, Guidotti G. Identification of two molecular forms of (Na,K)-ATPase in rat adipocytes. Relation to insulin stimulation of the enzyme. *J Biol Chem.*, 1985; 260:1177–1184.

Malmsjo M, Bergdahl A, Zhao XH, Sun XY, Hedner T, Edvinsson L, Erlinge D. Enhanced acetylcholine and P2Y-receptor stimulated vascular EDHF-dilatation in congestive heart failure. *Cardiovasc Res.*, 1999; 43:200–9.

Manso AM, Elsherif L, Kang SM, Ross RS. Integrins, membrane-type matrix metalloproteinases and ADAMs: potential implications for cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.*, 2006; 69: 574-84.

Manunta P; Messaggio E; Ballabeni C; Sciarrone MT; Lanzani C; Ferrandi M; Hamlyn JM; Cusi D; Galletti F; Bianchi G. Salt sensitivity study group of the Italian Society of Hypertension. Plasma ouabain-like factor during acute and chronic changes in sodium balance in essential hypertension. *Hypertension*, 2001; 38: 198–203.

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

Marín J; Redondo J. Vascular sodium pump: endothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging. *Pharmacology & Therapeutics*, 1999; 84: 249-271.

Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 1994; 78: 927-30.

Martín MDC, Balfagon G, Minoves N, Blanco-Rivero J, Ferrer M. Androgen deprivation increases neuronal nitric oxide metabolism and its vasodilator effect in rat mesenteric arteries. *Nitric Oxide*, 2005; 12:163–176.



Mathews WR; DuCharme DW; Hamlyn JM; Harris DW; Mandel F; Clark MA; Ludens JH. Mass spectral characterization of an endogenous digitalislike factor from human plasma. *Hypertension*, 1991; 17: 930-935.

Mccabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem.*, 2000; 275: 6123–6128.

McGrail KM, Phillips JM, Sweadner KJ. Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. *J Neurosci.*, 1991; 11:381–391.

Méry PF, Lohmann SM, Walter U, Fischmeister R. Ca<sup>2+</sup> current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1991; 15; 88(4): 1197-201.

Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, de Montellano PR, Kemp BE, Pearson RB. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr. Biol.*, 1999; 9: 845–848.

Michel T, Feron O. Perspective Series: Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthases  
Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How, and Why? *J. Clin. Invest.*, 1997; 100 (9): 2146–2152.

Mill JG, Stefanon I, Leite CM; Vassalo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res.*, 1990; 24: 748–753.

Mill JG, Milanez MC, Resende MM, Gomes MGS, Leite CM. Spironolactone prevents cardiac collagen proliferation after myocardial infarction in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 2003; 30: 739-744.

Miller AA, Megson IL, Gray GA. Inducible nitric oxide synthase-derived superoxide contributes to hypereactivity in small mesenteric arteries from a rat model of chronic heart failure. *British Journal of Pharmacology*, 2000; 131, 29 ± 36.

Mobasher A, Avila J, Cozar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJ, Lamb JF, Martín-Vasallo P. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Rep.*; 2000; 20:51–91.

Moncada S; Herman AG; Higgs EA; Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Trombosis Research*, 1977; 11: 323-344.

Moncada, S; Palmer, RMJ; Higgs, EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 1991; 43: 109-142.

Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev.*, 49, 137-42. 1997.

Morise T, Okamoto S, Takasaki H, Ikeda M, Takeda R, Kiuti F, Tuda Y. Biological activity of partially purified digitalis-like substance and Na-K-ATPase inhibitor in rats. *Jpn Circ J.*, 1988; 52:1309–1316.

Moura VGC. Função direita de corações isolados de ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca oito semanas após infarto agudo do miocárdio. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2007.

Mungrue IN, Husain M, Stewart, DJ. The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart Fail Rev.*, 7, 407-22; 2002.

Murrell JR; Randall JD; Rosoff J; Zhao JL; Jensen RV; Gullans SR; Hauptert Jr GT. Endogenous ouabain: upregulation of steroidogenic genes in hypertensive hypothalamus but not adrenal. *Circulation*, 2005; 112: 1301–1308.

Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Suda O, Morishita T, Shibata K, Yatera Y, Sabanai K, Tanimoto A, Nagasaki M, Tasaki H, Sasaguri Y, Nakashima Y, Otsuji Y, Yanagihara N. Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Circulation* 2008; 117:2211–2223.

Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M, Schömig A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation*, 1995; 15;92(4):748-55.

Norman TD and Coers CR. Cardiac hypertrophy after coronary ligation in rats. *Arch Pathol.*, 1960; 69:181–184.

Novaes MA, Stefanon I, Mill JG, and Vassallo DV. Contractility changes of the right and ventricular muscle after chronic myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res.*, 1996; 29:1683–1690.

O'Brien AJ, Young HM, Povey JM, Furness JB. Nitric oxide synthase is localized predominantly in the Golgi apparatus and cytoplasmic vesicles of vascular endothelial cells. *Histochem Cell Biol.*, 1995; 103(3):221-5.

Pacheco ME, Marin J, Manso AM, Rodriguez-Martinez MA, Briones A, Salaices M, Redondo J. Nitric oxide synthase induction by ouabain in vascular smooth muscle cells from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens.*, 2000; 18: 877– 884.

Padilha, AS; Rossoni, LV; Xavier, FE; Vassallo, DV. Ouabain at nanomolar concentration promotes synthesis and release of angiotensin II from the endothelium of the tail vascular bed of spontaneously hypertensive rats. *Journal Cardiovasc Pharmacol*, 2004; 44: 372-380.

Padilha AS, Peçanha FM, Vassallo DV, Alonso MJ, Salaiques M. Ouabain treatment changes the role of endothelial factors in rat resistance arteries. *European Journal of Pharmacology*, 2008; 600:110–116.

Palmer RM; Ferrige AG; Moncada S. Nitric oxide release account for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987; 327: 524-526.

Pamnani M; Huot S; Buggy J; Clough DL; Haddy FJ. Demonstration of a humoral inhibitor of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump in some models of experimental hypertension. *Hypertension*, 1981; 2 (Suppl II): II 96-II101.

Pereira RB, Sartório CL, Vassallo DV, Stefanon S. Differences in tail vascular bed reactivity in rats with and without heart failure following myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2005; 312: 1321–1325.

Perrin A, Brasmes B, Chambaz EM; Defaye G. Bovine adrenocortical cells in culture synthesize an ouabain-like compound. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1997; 126: 7–15.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circulation Research*, 1979; 44: 503-512.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985; 72 (2): 406–412.

Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.*, 1990; 81(4):1161-72.

Pierdomenico SD, Bucci A, Manunta P, Rivera R, Ferrandi M, Hamlyn JM, Lapenna D, Cuccurullo F, and Mezzetti A. Endogenous ouabain and hemodynamic and left ventricular geometric patterns in essential hypertension. *Am J Hypertens.*, 2001; 14:44–50.

Pierre SV, Zijian Xie. The Na,K-ATPase receptor complex. *Cell Biochem. Biophys.*, 2006; 46:303–15.

Pitzalis MV, Hamlyn JM, Messaggio E, Iacoviello M, Forleo C, Romito R, de Tommasi E, Rizzon P, Bianchi G, Manunta P. Independent and incremental prognostic value of endogenous ouabain in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2006; 8:179–186.

Ponte A, Marín J, Arribas S, Gonzalez R, Barrus MT, Salaices M, Sanchez-Ferrer CF. Endothelial modulation of ouabain-induced contraction and sodium pump activity in aortas of normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res.*, 1996; 33: 164–174.

Popp R, Brandes RP, Ott G, Busse R, Fleming I. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circ Res.*, 2002; 90: 800–806.

Poston L; Sewell RB; Wilkson SP; Richardson PJ; Williams R; Clarkson EM; MacGregor GA; de Wardener HE. Evidence for a circulating sodium transport inhibitor in essential hypertension. *British Medical Journal*, 1981; 282: 847-849.

Pulina MV, Zulian A, Berra-Romani R, Beskina O, Mazzocco-Spezia A, Baryshnikov SG, Papparella I, Hamlyn JM, Blaustein MP, Golovina VA. Upregulation of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> transporters in arterial smooth muscle from ouabain hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2009; 298: H263–H274.

Rabêlo LA, Cortes SF, Alvarez-Leite J, Lemos VS. Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Br J Pharmacol.*, 2003; 138: 1215-20.

Rand MJ. Nitroergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, noncholinergic neuro-effector transmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 1992; 19, 147-69.

Randall MD; Kendall DA. Involvement of a cannabinoid in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated coronary vasorelaxation. *European Journal of Pharmacology*, 1997; 335 (2-3): 205-209.

Rapoport RM, Murod F. Agonist – induced endothelium-dependent relaxation in the aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res.*, 1983; 52: 353-357.

Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calciumsensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2005; 288: C769–C783.

Revisão das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2002; 79, Supl IV.

Ringer S. Regarding the influence of the organic constituents of the blood on the contractility of the ventricle. *J Physiol.*, 1885; 6: 361–381.

Roevens P; de Chaffoy de Courcelles D. Ouabain increases the calcium concentration in intracellular stores involved in stimulus-response coupling in human platelets. *Circ. Res.*, 1990; 67: 1494-1502.

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

Rossi G; Manunta P; Hamlyn JM; Pavan E; Di Toni R; Semplicini A; Pessina AC. Immunoreactive endogenous ouabain in primary aldosteronism and essential hypertension: relationship with plasm renin, aldosterone and blood pressure levels. *Journal of Hypertension*, 1995; 13 (10): 1181-1191.

Rossoni LV; Cunha V; França A; Vassallo DV. The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses in modulated by the endothelium. *Journal Cardiovascular Pharmacology*, 1999; 34 (6): 887-892.

Rossoni LV; Pinto VD; Vassallo DV. Effects of small doses of ouabain on the arterial blood pressure of anesthetized hypertensive and normotensive rats. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, 2001; 34:1065-1077.

Rossoni LV; Salaices M; Miguel M; Briones AM; Barker, LA; Vassallo, DV; Alonso, MJ. Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. *American Journal of Heart and Circulation Physiology*, 2002a; 283 (5): H2110-2118.

Rossoni LV; Salaices M; Marín J; Vassallo DV; Alonso MJ. 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*, 2002b; 135 (3): 771-7781.

Rossoni LV; dos Santos L; Barker LA; Vassallo DV. Ouabain changes arterial blood pressure and vascular reactivity to phenylephrine in L-NAME-induced hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2003; 41: 105-116.

Rubanyi GM; Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology*, 1986; 250 (19): H815-H821.

Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 1993; 22 (suppl 4): 1-14.

Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of AT1 receptor subtype. *Cir Res.*, 1993; 73: 413-23.

Sahin-Erdemli I; Medford RM; Songu-Mize E. Regulation of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase  $\alpha$  subunit isoforms in rat tissues during hypertension. *European Journal of Pharmacology*, 1995; 292: 163-171.

Sanchez-Ferrer CF, Fernandez-Alfonso MS, Ponte A, Casado MA, Gonzalez R, Rodriguez-Manas L, Pareja A, Marín J. Endothelial modulation of the ouabain-induced contraction in human placental vessels. *Circ Res.*, 1992; 71: 943–950.

Sartório CL, Pinto VD, Cutini GJS, Vassallo DV, Stefanon I. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition on the rat tail vascular bed reactivity three days after myocardium infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 2005; 45: 321–326.

Sartório CL, Fraccarollo D, Galuppo P, Leutke M, Ertl G, Stefanon I, Bauersachs J. Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction. *Hypertension*, 2007; 50: 919–925.

Scheiner-Bobis G. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem.*, 2002; 269:2424–2433.

Schoner W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *Eur. J. Biochem.*, 2002; 269:2440–2448.

Schoner W; Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2007, 293: C509–C536.

Schrier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med.*, 1999, 341:577–585.

Schreiber V, Kolbel F, Stepan J, Gregorova I, Pribyl T. Digoxin-like immunoreactivity in the serum of rats with cardiac overload. *J Mol Cell Cardiol.*, 1981; 13:107–110.

Scott-Burden T, Vanhoutte, P.M. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation*, 1993; 87 (5): 51-5.



Selye H, Bajusz E, Grassos S, Mendell P. Simple techniques for the surgery occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*, 1960; 11: 398-407.

Schafer A, Fraccarollo D, Hildemann SK, Tasc P, Ertla G, Bauersachs J. Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction. *Cardiovascular Research*, 2003; 58: 655–662.

Shamraj OI, Grupp IL, Grupp G, Melvin D, Gradoux N, Kremers W, Lingrel JB, De Pover A. Characterisation of Na/K-ATPase, its isoforms, and the inotropic response to ouabain in isolated failing human hearts. *Cardiovasc Res*, 1993; 27:2229–2237.

Shamraj OI; Lingrel JB. A putative fourth Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase  $\alpha$  subunit gene is expressed in testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1994; 91: 12952-12956.

Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: Location, Location, Location. *Annu. Rev. Physiol.*; 2002. 64:749–74.

Shattock MJ. Phospholemman: its role in normal cardiac physiology and potential as a druggable target in disease. *Curr Opin Pharmacol.*, 2009; 9(2):160-166.

Schellings MW, Pinto YM, Heymans S. Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc Res.*, 2004; 64: 24-31.

Shelly DA, He S, Moseley A, Weber C, Stegemeyer M, Lynch RM, Lingrel J, Paul RJ. Na<sup>+</sup> pump alpha 2-isoform specifically couples to contractility in vascular smooth muscle: evidence from gene-targeted neonatal mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2004; 286: C813–C820.

Shimokawa H, Morikawa K. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Mol Cell Cardiol.*, 2005; 39: 725–732.

Schrier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. *N. Engl. J. Med.*, 1999; 341, 577 – 585.

Siman FD, Stefanon I, Vassallo DV, Padilha AS. A low concentration of ouabain (0.18 microg/kg) enhances hypertension in spontaneously hypertensive rats by inhibiting the Na<sup>+</sup> pump and activating the renin-angiotensin system. *Braz J Med Biol Res.*, 2010; 43(8):767-776.

Smith CJ, Sun D, Hoegler C, Roth BS, Zhang X, Zhao G, Xu XB, Kobari Y, Pritchard K Jr, Sessa WC, Hintze TH. Reduced gene expression of vascular endothelial NO synthase and cyclooxygenase-1 in heart failure. *Circ Res*, 1996, 78, 58–64.

Somlyo AV, Somlyo AP. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.*, 1968;159(1):129-45.

Song H, Lee MY, Kinsey SP, Weber DJ, Blaustein MP. An N-terminal sequence targets and tethers Na<sup>+</sup> pump alpha2 subunits to specialized plasma membrane microdomains. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281 12929–12940.

Songu-Mize E; Bealer SL; Caldwell RW. Effect of AV3V lesions on development of Doca-salt hypertension and vascular Na<sup>+</sup>-pump activity. *Hypertension*, 1982; 4: 575-580.

Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.*, 2002; 90: 520-30.

Spinale FG, Escobar GP, Hendrick JW, Clark LL, Camens SS, Mingoia JP, Squires CG, Stroud RE, Ikonomidis JS. Chronic matrix metalloproteinase inhibition following myocardial infarction in mice: differential effects on short and long-term survival. *J Pharmacol Experim Ther.*, 2006; 318: 966–973.

Stathopoulos PB, Lu X, Shen J, Scott JA, Hammond JR, McCormack DG, Arnold JM, Feng Q. Increased L-arginine uptake and inducible nitric oxide synthase activity in aortas of rats with heart failure. *Am J Physiol.*, 2001; 280:H859–H867.

Stella P, Manunta P, Mallamaci F, Melandri M, Spotti D, Tripepi G, Hamlyn JM, Malatino LS, Bianchi G, Zoccali C. Endogenous ouabain and cardiomyopathy in dialysis patients. *J Intern Med.*, 2007; 263:274–280.

Stull JT, Gallagher PJ, Herring BP, Kamm KE. Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation. *Hypertension*, 1991;17(6 Pt 1):723-32.

Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, 2000; 27; 101(25):2981-8.

Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.*, 1999; 79: 215-62.

Taylor SG, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci.*, 1988; 9: 272–274.

Tare M, Parkington HC, Coleman HA, Neild TO, Dusting GJ. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature*, 1990; 5; 346 (6279):69-71.

Teerlink JR, Clozel M, Fischli W, Clozel J-P. Temporal evolution of endothelial dysfunction in a rat model of chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.*, 1993; 22:615-620.

Teerlink JR, Gray GA, Clozel M, Clozel JP. Increased vascular responsiveness to norepinephrine in rats with heart failure is endothelium dependent. Dissociation of basal and stimulated nitric oxide release. *Circulation*, 1994; 89:393-401.

Therien AG; Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2000; 279: C541–C566.

Thengchaisri N, Shipley R, Ren Y, Parker J, Kuo L. Exercise training restores coronary arteriolar dilation to NOS activation distal to coronary artery occlusion: role of hydrogen peroxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2007; 27: 791-8.

Tian J, Liu J, Garlid KD, Shapiro JI, Xie Z. Involvement of mitogenactivated protein kinases and reactive oxygen species in the inotropic action of ouabain on cardiac myocytes: a potential role for mitochondrial KATP channels. *Mol Cell Biochem.*, 2003; 242:181–187.

Tian J, Cai T, Yuan Z, Wang H, Liu L, Haas M, Maksimova E, Huang XY, Xie ZJ. Binding of Src to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol. Biol. Cell.*, 2006; 17:317–26.

Toda N, Okamura T. Reciprocal regulation by putatively nitroxiergic and adrenergic nerves of monkey and dog temporal arterial tone. *Am J Physiol.*, 1991; 261:H1740-H1745.

Urayama O, Shutt H, Sweadner KJ. Identification of three isozyme proteins of the catalytic subunit of the Na,K-ATPase in rat brain. *J Biol Chem.*; 1989; 264:8271–8280.

Vanhoutte PM; Lorenz RR. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibitors and the adrenergic neuroeffector interaction in blood vessel wall. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 1984; 6 (1): 588-594.

Vanhoutte PM. Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation*, 1993; 87 (V): V9-V17.

Vanhoutte PM. Endothelial Control of Vasomotor Function From Health to Coronary Disease. *Circulation Journal*, 2003; 67(7):572-5.

Vanhoutte PM. Endothelial Dysfunction The First Step Toward Coronary Arteriosclerosis. *Circ J.*, 2009; 73: 595 – 601.

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

Vassallo DV; Songu-Mize E; Rossoni LV; Amaral SMC. Effects of ouabain on vascular reactivity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1997; 30: 545-552.

Vejlstrup NG, Bouloumie A, Boesgaard S, Andersen CB, Nielsen-Kudsk JE, Mortensen SA, Kent JD, Harrison DG, Busse R, Aldershvile J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human heart: expression and localization in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.*, 1998; 30:1215–1223.

Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost.*, 2003; 1, 2112-8.

Wang H, Haas M, Liang M, Cai T, Tian J, Li S, Xie Z. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem.*, 2004; 279:17250–17259.

Wasserstrom JA; Aistrup GL. Digitalis: new actions for an old drug. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005; 289: H1781- H1793.

Weber KT, Sun Y, Guntaka RV. Rebuilding and remodeling following myocardial infarction: the good, the bad, and the ugly of tissue repair. *Dialogues in Cardiovascular Medicine*, 1999; 4: 3-19.

Wei CM, Hu S, Miller VM, Burnett JC Jr. Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1994; 205: 765–771.

Westcott KV, Huang BS, Leenen FH. Brain renin-angiotensin-aldosterone system and ventricular remodeling after myocardial infarct: a review. *Can J Physiol Pharmacol.*, 2009; 87(12):979-88.

Wildhirt SM, Suzuki H, Horstman D, Weismüller S, Dudek RR, Akiyama K, Reichart B. Selective modulation of inducible nitric oxide synthase isoenzyme in myocardial infarction. *Circulation.* 1997; 96:1616–1623.

Withering W. An account of the foxglove and some of its medical uses: with practical remarks on dropsy and other diseases. London, 1785. [Reprinted in Birmingham, AL: *Classics of Medicine Library*; 1979, p.184-186].

Wollert KC, Drexler H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovasc Res.*, 1999; 43:838–849.

Xavier FE; Salaices M; Márquez-Rodas I; Alonso MJ; Rossoni LV; Vassallo DV; Balfagón G. Neurogenic nitric oxide release increases in mesenteric arteries from ouabain hypertension rats. *Journal of Hypertension*, 2004a, 22: 949-957.

Xavier FE, Rossoni LV, Alonso MJ, Balfagón G, Vassallo DV, Salaices M. Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in alpha adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. *Br. J. Pharmacol.*, 2004b 143, 215–225.

Xavier FE, Davel APC, Fukuda LE, Rossoni LV. Chronic ouabain treatment exacerbates blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats: the role of vascular mechanisms. *Journal of Hypertension*, 2009; 27(6):1233-42.

Xie J, Wang Y, Summer WR, Greenberg SS. Ouabain enhances basal release of nitric oxide from carotid artery. *Am J Med Sci.*, 1993; 305: 157–162.

Xie Z. Ouabain interaction with cardiac Na,K-ATPase reveals that the enzyme can act as a pump and as a signal transducer. *Cell Mol. Biol.*, 2001; 47:383–90.

Xie Z, Askari A. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a signal inducer. *Eur J Biochem.*, 2002; 269: 2434–2439.

Xie Z, Cai T. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interventions.*, 2003; 3: 157–168.

Yamada K; Goto A; Nagoshi H; Terano Y; Omata M. Elevation of ouabainlike compound levels with hypertonic sodium chloride load in rat plasma and tissues. *Hypertension*, 1997; 30 (Pt 1): 94-98.

Yanagesawa M; Kurihara S; Kimura S; Tomobe Y; Kobayashi M; Mitsui Y; Yazaki Y; Goto K; Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular cells. *Nature*, 1988; 322: 411-415.

Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero AO. Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol.*, 2002; 87.5: 547–555.

Yuan CM; Manunta P; Hamlym JM; Chen S; Bohlen E; Ylum J; Haddy FJ; Pamnani MB. Long-term ouabain administration produces hypertension in rats. *Hypertension*, 1993; 22: 178-187.

Yudowski GA, Efendiev R, Pedemonte CH, Katz AI, Berggren PO, Bertorello AM, Phosphoinositide-3 kinase binds to a proline-rich motif in the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase alpha subunit and regulates its trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000; 97:6556–6561.

Zahler R, Brines M, Kashgarian M, Benz EJ Jr, Gilmore-Hebert M. The cardiac conduction system in the rat expresses the  $\alpha 2$  and  $\alpha 3$  isoforms of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1992; 89:99–103.

Zhang J; Leenen FH. AT(1) receptor blockers prevent sympathetic hyperactivity and hypertension by chronic ouabain and hypertonic saline. *American Journal Physiology and Heart Circulation Physiology*, 2001; 280 (3): H1318-1323.

Zhang J, Lee MY, Cavalli M, Chen L, Berra-Romani R, Balke CW, Bianchi G, Ferrari P, Hamlyn JM, Iwamoto T, Lingrel JB, Matterson DR, Wier WG, Blaustein MP. Sodium pump alpha2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice. *J Physiol*; 2005; 569:243–256.

Zhou X; Wu Yin; Doi SQ, Robinson SW, Takeyasu K; Fan X. Stimulation of Na,K-ATPase by low potassium requires reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2003; 285: C319–C326.

Zornoff LAM; Paiva SAR; Minicucci MF; Spadaro J. Infarto do Miocárdio Experimental em Ratos: Análise do Modelo. *Arq Bras Cardiol*; 2009a; 92(2):157-164

Zornoff LAM, Paiva SAR, Duarte DR, Spadaro J. Remodelação Ventricular Pós-Infarto do Miocárdio: Conceitos e Implicações Clínicas. *Arq Bras Cardiol.*, 2009b; 92(2):157-164.

Zouzoulas A; Therien AG; Scanzano R; Deber CM; Blostein R. Modulation of Na,K-ATPase by the  $\gamma$  subunit: studies with transfected cells and transmembrane mimetic peptides. *J Biol Chem.*; 2003; 278:40437–40441.

III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio. Arquivos Brasileiros de Cardiologia; 2004, - 83, Supl. IV.