

**Participação da Na⁺K⁺-ATPase e dos canais para K⁺
nas diferenças de reatividade de anéis isolados de
aorta de ratos infartados com e sem sinais de
insuficiência cardíaca**

Fernanda Moura Vargas Dias

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas
(Fisiologia Cardiovascular)

Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, outubro de 2011

Participação da Na⁺K⁺-ATPase e dos canais para K⁺ nas diferenças de reatividade de anéis isolados de aorta de ratos infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca

Fernanda Moura Vargas Dias

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

Aprovada em 18 de outubro de 2011 por:

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon – Orientadora, UFES

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo, UFES

Prof^a. Dr^a. Lusiane Maria Bendhack, FCFRP-USP

Prof. Dr. José Geraldo Mill, UFES

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, NDI - UFES

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon – Coordenadora do PPGCF- UFES

Dias, Fernanda Moura Vargas 1980

Participação da Na⁺K⁺-ATPase e dos canais para K⁺ nas diferenças de reatividade de anéis isolados de aorta de ratos infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca [Vitória] 2011

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

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF

Professor Orientador: Ivanita Stefanon

1. Infarto do Miocárdio 2. Reatividade Vascular 3. Insuficiência cardíaca 4. Na⁺K⁺-ATPase 5. Canais para K⁺ 6. Espécies Reativas de Oxigênio.

Dedico este aos que eu mais amo, aos que me amam incondicionalmente, aos que me apóiam sempre, àqueles a quem eu devo tudo o que sou e tudo o que acredito. Mãe (Edna), Pai (Ricardo), Irmãos (Jú e Cau) e ao meu amor (Fabiano). Dedico este trabalho ao meu bebê, Fabiano Junior, meu precioso, minha vida. Todos eles constituem o meu grande tesouro. *"Porque onde estiver o vosso coração, aí estará também o vosso tesouro" (Mt. 6:21).*

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende." (Leonardo da Vinci)."

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu forças, que me amparou, que me amou incondicionalmente, que me ensinou e me acolheu. Ao meu Deus que me iluminou, me deu sabedoria, me guiou em seus caminhos e me fez chegar até aqui. *“Tudo é do Pai, toda honra e toda a glória, porque é dele a Vitória alcançada em minha vida”*.

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

À minha família por me conduzir até aqui. A minha amada mãe pelo apoio incondicional, por sua dedicação a minha educação e a minha felicidade. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos.

Por me apoiarem em todas as minhas decisões. Pelo imenso amor, carinho e amizade. Pai, Mãe, Jú e Cau.

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

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

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

À Aurélia e Rogério que ficaram ao meu lado sempre e foram além de amigos, companheiros de experimento.

Aos amigos e companheiros de vida Nelson Coimbra, Flávia Paro, Cristina e Fabiana por todo apoio, amizade e doçura. Por ouvirem meus desabafos, me apoiarem e me incentivarem e me fazerem sorrir nos dias tristes.

À Jonaína e Mayla por terem me ensinado, pela ajuda e incentivo ao meu trabalho.

A todos os colegas do laboratório de eletromecânica da UFES e do laboratório de reatividade vascular da USP pela convivência e pela paciência para me ensinarem.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Dados ponderais dos grupos Sham, Inf e IC 30 dias após IM95
- Tabela 2** – Dados hemodinâmicos dos grupos Sham, Inf e IC 30 dias após IM97
- Tabela 3** – Efeitos do L-NAME, TEA, Aminopiridina, Apamina, Iberiotoxina e duplo bloqueio com Apamina +iberiotoxina sobre a R_{max} e pEC_{50} no relaxamento induzido pela acetilcolina em aortas de ratos Sham 30 dias após a cirurgia fictícia para indução ao infarto do miocárdio 121
- Tabela 4** – Efeitos do L-NAME, TEA, Aminopiridina, Apamina, Iberiotoxina e duplo bloqueio com Apamina +iberiotoxina sobre a R_{max} e pEC_{50} no relaxamento induzido pela acetilcolina em aortas de ratos Inf 30 dias após o infarto do miocárdio 125
- Tabela 5** – Efeitos do L-NAME, TEA, Aminopiridina, Apamina, Iberiotoxina e duplo bloqueio com Apamina + Iberiotoxina sobre a R_{max} e pEC_{50} no relaxamento induzido pela acetilcolina em aortas de ratos IC 30 dias após o infarto do miocárdio 129
- Tabela 6** – Sumário dos resultados obtidos pela curva de relaxamento induzido pelo KCl com endotélio intacto (E+), após a remoção do endotélio, após a incubação com L-NAME ou TEA; Expressão protéica das enzimas e-NOS, p-eNOS e α -1 Na^+K^+ -ATPase; Fluorescência produzida por oxidação do dihidroetídio em animais Sham, Inf e IC 144
- Tabela 7** – Sumário dos resultados obtidos pela curva de relaxamento induzido pela ACh em anéis de aorta com endotélio intacto (E+) e após a incubação com L-NAME, TEA, Aminopiridina, Apamina, Iberiotoxina e duplo bloqueio com Apamina +Iberiotoxina de ratos Sham, Inf e IC 145

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Procedimento para indução ao infarto do miocárdio através da oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda. **A)** Toracotomia entre o 3º e 4º espaços intercostais; **B)** Exteriorização do coração e amarradura da artéria coronária descendente anterior esquerda.....72

Figura 2: A) Sistema de avaliação hemodinâmica composto por um cateter (PE-50, Clay-Adams), conectado a um transdutor de pressão (Stathan P23 AA), acoplado a um pré-amplificador (MP100, Funbec, São Paulo, SP) que por sua vez, foi conectado a um conversor analógico digital (MP100, Biopac Systems, Inc; CA). O registro foi adquirido por um computador Pentium 4, 3.06 Ghz; **B)** Ampliação de parte da imagem para visualização da incisão cirúrgica (região esquerda do pescoço), para canulação da artéria carótida; cânula PE-50; e cicatriz da toracotomia para indução ao infarto do miocárdio.74

Figura 3: Avaliação por planimetria das fatias da área infartada (AI) e da área remanescente ao infarto no ventrículo esquerdo (VE). As bordas das fatias são contornadas e medidas por contagem de pontos em papel milimetrado com área calculada em mm². Cada quadrado pequeno apresenta lado igual a 1 mm e delimita uma área de 1 mm². A área total representa a soma das áreas do ventrículo esquerdo remanescente e área de cicatriz. A área de cicatriz foi calculada pela porcentagem da área total. Coração do rato 54, infartado (Inf).....76

Figura 4: Figura demonstrando a medida histológica da área de infarto (coloração com *picrosirius red*). Com uma ferramenta chamada “segmented line”, do programa Image J, era delineada uma linha pontilhada sobre a superfície do coração a ser medida. Após o delineamento, clicava-se em “perimeter” e o perímetro da superfície era fornecido pelo programa. O cálculo da porcentagem de infarto (AI%) foi realizado pela divisão do perímetro da cicatriz na superfície endocárdica (CEN) pelo perímetro endocárdico total (PEN) mais o perímetro da cicatriz epicárdica (CEP) dividido pelo perímetro epicárdico total (PEP), dividido por 2, e multiplicado por 100.78

Figura 5: Organograma da divisão dos grupos experimentais, trinta dias após o infarto do miocárdio (IM), a partir dos critérios estabelecidos como sinalizadores de insuficiência cardíaca citados na literatura científica. Cirurgia fictícia de infarto do miocárdio (Sham); ratos infartados sem sinais de insuficiência (Inf); ratos infartados com sinais de insuficiência (IC). Pressão diastólica final no ventrículo esquerdo (PDfVE); Razão entre a massa do ventrículo direito e a massa corporal (VD/MC); Razão entre a massa dos pulmões e a massa corporal (PP/MC).79

Figura 6: Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, após a remoção do tecido conjuntivo e adiposo adjacente à artéria e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (Modificado de Angeli, 2009).80

Figura 7: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “in vitro”. Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems* (modificado de Dias, 2007).81

Figura 8: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: **A)** Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 1g); **B)** Adição de KCl (75 mM) ao banho; **C)**

Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; **D)** Período de estabilização (30 min); **E)** Adição de KCl (75 mM) ao banho; **F)** Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); **G)** Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; **H)** Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: **I)** Pré-contracção com fenilefrina (Fe) 10^{-4} M; **J)** Platô da contração induzida pela Fe; **L)** Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-3} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical.82

Figura 9: Registro com curvas representando avaliação da atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à OUA em aortas de ratas com e sem sinais de insuficiência cardíaca após o infarto do miocárdio. **A)** Perfusão por 30 minutos com solução Krebs sem potássio; **B)** Pré-contracção com fenilefrina (Fe) 10^{-4} M; **C)** Platô da contração induzida pela Fe; **D)** Primeira curva de KCl (adição de 1, 2, 5 e 10 mM ao banho em intervalos de 2' 30"); **E)** Lavagem com solução Krebs sem potássio; **F)** Adição de OUA 10^{-4} M e estabilização por 30 minutos; **G)** Pré-contracção com Fe 10^{-4} M; **H)** Platô da contração induzida pela Fe; **I)** Segunda curva de KCl (adição de 1, 2, 5 e 10 mM ao banho em intervalos de 2' 30"). O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. Caso um fármaco fosse utilizado durante este protocolo, o mesmo era administrado nos períodos **A)** e **F)**, e incubado por no mínimo 30 minutos.83

Figura 10: Esquema demonstrativo do protocolo experimental da avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio. Foi realizada a incubação por 30 minutos com o fármaco a ser estudado. Após, o término do período de incubação, adicionou-se fenilefrina (Fe 10^{-4} M) ao banho. Quando o platô da contração à Fe foi atingido realizou-se a curva concentração-resposta à acetilcolina, adicionando-se concentrações crescentes de acetilcolina ao banho (10^{-11} a 3×10^{-5}).....86

Figura 11: Dados ponderais dos animais Sham, Infarto (Inf) e Infarto com sinais de insuficiência cardíaca (IC), 30 dias após o infarto: **A)** Massa corporal (MC); **B)** Razão entre a massa do ventrículo esquerdo e a massa corporal (VE/MC); **C)** Razão entre a massa do ventrículo direito e a massa corporal (VD/MC); **D)** Razão entre a massa dos pulmões e a massa corporal (PP/MC). Os resultados foram expressos como média \pm EPM, considerando significantes as diferenças para $P < 0,05$. ANOVA uma via com *post hoc* de Tukey: * $P < 0,05$ vs. Sham; $^{\dagger}P < 0,05$ vs. Inf.....98

Figura 12: Área de cicatriz, medida por planimetria, dos animais Infarto (Inf) e Infarto com sinais de insuficiência cardíaca (IC) trinta 30 dias após o infarto. **A)** Porcentagem da área de cicatriz; **B)** Razão entre o perímetro da área de cicatriz do ventrículo esquerdo em mm^2 e a massa corporal em gramas (VE/MC). Os resultados foram expressos como média \pm EPM, considerando significantes as diferenças para $P < 0,05$. Para análise estatística foi utilizado teste *t* de Student não pareado99

Figura 13: **A)** Correlação entre a razão da massa dos pulmões pela massa corporal (PP/MC) e a AI% de todos os animais. **B)** Correlação entre a AI% e a razão VE/MC de todos os animais; **C)** Correlação entre a AI% e a VD/MC de todos os animais. Os resultados foram expressos como correlação linear, com coeficiente de correlação de Pearson A) $r = 0,39$ e $P = 0,13$ (não houve correlação); B) $r = -0,28$ e $P = 0,28$ (não houve correlação); C) $r = -0,23$ e $P = 0,24$ (não houve correlação). 101

Figura 14: Avaliação histológica da área de cicatriz após o infarto. **A)** Fotografia das lâminas de corações de animais trinta dias após infarto do miocárdio, coradas com *picrosirius red* (corte de 5 μm). À esquerda, área de cicatriz do animal infartado sem insuficiência (Inf) e à direita do animal infartado com insuficiência (IC); **B)** Resultado

do cálculo da porcentagem da área de infarto (AI%) foi realizado pela divisão do perímetro da cicatriz na superfície endocárdica (CEN) pelo perímetro endocárdico total (PEN) mais o perímetro da cicatriz epicárdica (CEP) dividido pelo perímetro epicárdico total (PEP), dividido por 2, e multiplicado por 100. Os resultados foram apresentados como média \pm EPM, considerando significantes as diferenças para $P < 0,05$. Para análise estatística foi utilizado teste *t* de Student não pareado 102

Figura 15: Curvas de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratos Sham, 30 dias após a cirurgia fictícia para indução ao infarto. Anéis isolados de aorta com endotélio íntegro (E+), após a remoção mecânica do endotélio (E-), após a incubação com L-NAME e tetraetilâmonio (TEA). **A)** Grupo Sham E+ vs. Sham E-. **B)** Grupo Sham E+ vs. Sham L-NAME. **C)** Grupo Sham E+ vs. Sham TEA. Todas as comparações foram realizadas antes e após a incubação por 30 minutos com OUA (100 μ M). A resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi realizada ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. Valores foram considerados significantes com $P < 0,05$ 104

Figura 16: Curvas de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratos sem sinais de insuficiência cardíaca (Inf), 30 dias após o infarto. Anéis isolados de aorta com endotélio íntegro (E+), após a remoção mecânica do endotélio (E-), após a incubação com L-NAME e tetraetilâmonio (TEA). **A)** Grupo Inf E+ vs. Inf E-. **B)** Grupo Inf E+ vs. Inf L-NAME. **C)** Grupo Inf E+ vs. Inf TEA. Todas as comparações foram realizadas antes e após a incubação por 30 minutos com OUA (100 μ M). A resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi realizada ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. Valores foram considerados significantes com $P < 0,05$ 106

Figura 17: Curvas de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratos com sinais de insuficiência cardíaca (IC), 30 dias após o infarto. Anéis isolados de aorta com endotélio íntegro (E+), após a remoção mecânica do endotélio (E-), após a incubação com L-NAME e tetraetilâmonio (TEA). **A)** Grupo IC E+ vs. IC E-. **B)** Grupo IC E+ vs. IC L-NAME. **C)** Grupo IC E+ vs. IC TEA. Todas as comparações foram realizadas antes e após a incubação por 30 minutos com OUA (100 μ M). A resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi realizada ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. Valores foram considerados significantes com $P < 0,05$ 108

Figura 18: Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratos com endotélio íntegro (E+), 30 dias após o infarto. **A)** Grupo Inf E+ vs. Sham E+. **B)** Grupo IC E+ vs. Sham E+. **C)** Grupo IC E+ vs. Inf E+. Todas as comparações foram realizadas antes e após a incubação por 30 minutos com OUA (10^{-4} M). A resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi realizada ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. Valores foram considerados significantes com $P < 0,05$ 110

Figura 19: Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratos com endotélio removido mecanicamente (E-), 30 dias após o infarto. **A)** Grupo Inf E- vs. Sham E-; **B)** Grupo IC E- vs. Sham E-; **C)** Grupo IC E- vs. Inf E-. Todas as comparações foram realizadas antes e após a incubação por 30 minutos com OUA (10^{-4} M). A resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi

realizada ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. Valores foram considerados significantes com $P < 0,05$ 112

Figura 20: Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em anéis de aorta de ratos incubados por 30 minutos com L-NAME (100 mM), 30 dias após o infarto. **A)** Grupo Inf L-NAME vs. Sham L-NAME; **B)** Grupo IC L-NAME vs. Sham L-NAME; **C)** Grupo IC L-NAME vs. Inf L-NAME. Todas as comparações foram realizadas antes e após a incubação por 30 minutos com OUA (10^{-4} M). A resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi realizada ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. Valores foram considerados significantes para $P < 0,05$ 114

Figura 21: Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em anéis de aorta de ratos incubados por 30 minutos com TEA (100 mM), 30 dias após o infarto. **A)** Grupo Inf TEA vs. Sham TEA; **B)** Grupo IC TEA vs. Sham TEA; **C)** Grupo IC TEA vs. Inf TEA. Todas as comparações foram realizadas antes e após a incubação por 30 minutos com OUA (10^{-4} M). A resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi realizada ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. Os valores foram considerados significantes para $P < 0,05$ 116

Figura 22: Curva de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh), em aorta torácica de ratos Sham, 30 dias após a cirurgia fictícia para indução ao infarto. **A)** Comparação entre os grupos Sham com endotélio intacto (E+) e Sham incubado com $N^{(W)}$ -nitro-L-arginina metil éster (100 μ M) (L-NAME); **B)** Comparação entre os grupos Sham E+ e Sham incubado com tetraetilamônio (2 mM) (TEA); **C)** Comparação entre os grupos Sham E+ e Sham incubado com 4-Aminopiridina (5 mM) (4-AP). O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$ comparados com Sham E+ 119

Figura 23: Curva de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh), em aorta torácica de ratos Sham, 30 dias após a cirurgia fictícia para indução ao infarto. **A)** Comparação entre os grupos Sham com endotélio intacto (E+) e Sham incubado com Apamina (0,5 μ M) (Apam); **B)** Comparação entre os grupos Sham E+ e Sham incubado com Iberiotoxina (30 nM) (Iberio); **C)** Comparação entre os grupos Sham E+ e Sham incubado com Apamina mais Iberiotoxina (0,5 μ M, 30 nM respectivamente) (Apam+Iberio); O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$ comparados com Sham E+ 120

Figura 24: Curva de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh), em aorta torácica de ratos Inf, 30 dias após o infarto. **A)** Comparação entre os grupos Inf com endotélio intacto (E+) e Inf incubado com $N^{(W)}$ -nitro-L-arginina metil éster (100 μ M) (L-NAME); **B)** Comparação entre os grupos Inf E+ e Inf incubado com tetraetilamônio (2 mM) (TEA); **C)** Comparação entre os grupos Inf E+ e Inf incubado com 4-aminopiridina (5 mM) (4-AP). O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da

contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$ 123

Figura 25: Curva de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh), em aorta torácica de ratos Inf, 30 dias após o infarto do miocárdio. **A)** Comparação entre os grupos Inf com endotélio intacto (E+) e Inf incubado com apamina (0,5 μ M) (Apam); **B)** Comparação entre os grupos Inf E+ e Inf incubado com iberiotoxina (30 nM) (Iberio); **C)** Comparação entre os grupos Inf E+ e Inf incubado com apamina mais iberiotoxina (0,5 μ M, 30 nM respectivamente) (Apam+Iberio); O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$ 124

Figura 26: Curva de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh), em aorta torácica de ratos IC, 30 dias após o infarto. **A)** Comparação entre os grupos IC com endotélio intacto (E+) e IC incubado com N^(W)-nitro-L-arginina metil éster (100 μ M) (L-NAME); **B)** Comparação entre os grupos IC E+ e IC incubado com tetraetilamônio (2 mM) (TEA); **C)** Comparação entre os grupos IC E+ e IC incubado com 4-aminopiridina (5 mM) (4-AP). O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $*P < 0,05$ 127

Figura 27: Curva de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh), em aorta torácica de ratos IC, 30 dias após o infarto do miocárdio. **A)** Comparação entre os grupos IC com endotélio intacto (E+) e IC incubado com apamina (0,5 μ M) (Apam); **B)** Comparação entre os grupos IC E+ e IC incubado com iberiotoxina (30 nM) (Iberio); **C)** Comparação entre os grupos IC E+ e IC incubado com apamina mais iberiotoxina (0,5 μ M, 30 nM respectivamente) (Apam+Iberio); O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $*P < 0,05$ 128

Figura 28: Comparação das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em aorta torácica de ratos Sham (preto) e Inf (azul) 30 dias após o infarto do miocárdio. **A)** Anéis com endotélio intacto (E+) e após a incubação com L-NAME (100 μ M); **B)** Após a incubação com TEA (2 mM); **C)** Após a incubação com 4-AP (5 mM); **D)** Diferença da área sobre a curva (dAUC) antes e após a incubação com TEA; **E)** dAUC antes e após a incubação com 4-AP. O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$ 131

Figura 29: Comparação das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em aorta torácica de ratos Sham (preto) e Inf (azul) 30 dias após o infarto do miocárdio. **A)** Após a incubação com Apamina (Apam, 0.5 μ M); **B)** Após a incubação com Iberiotoxina (Iberio, 30 nM); **C)** Após a incubação com Apamina mais

Iberiotoxina; **D**) Diferença da área sobre a curva (dAUC) antes e após a incubação com Apam; **E**) dAUC antes e após a incubação com Iberio; **F**) dAUC antes e após a incubação com Apam+Iberio. O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$ 132

Figura 30: Comparação das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em aorta torácica de ratos Sham (preto) e IC (vermelho) 30 dias após o infarto do miocárdio. **A**) Anéis com endotélio intacto (E+) e após a incubação com L-NAME (100 μ M); **B**) Após a incubação com TEA (2 mM); **C**) Após a incubação com 4-AP (5 mM); **D**) Diferença da área sobre a curva (dAUC) antes e após a incubação com TEA; **E**) dAUC antes e após a incubação com 4-AP. O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$ 134

Figura 31: Comparação das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em aorta torácica de ratos Sham (preto) e IC (vermelho) 30 dias após o infarto do miocárdio. **A**) Após a incubação com Apamina (Apam, 0.5 μ M); **B**) Após a incubação com Iberiotoxina (Iberio, 30 nM); **C**) Após a incubação com Apamina mais Iberiotoxina; **D**) Diferença da área sobre a curva (dAUC) antes e após a incubação com Apam; **E**) dAUC antes e após a incubação com Iberio; **F**) dAUC antes e após a incubação com Apam+Iberio. O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$ 135

Figura 32: Comparação das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em aorta torácica de ratos Inf (azul) e IC (vermelho) 30 dias após o infarto do miocárdio. **A**) Anéis com endotélio intacto (E+) e após a incubação com L-NAME (100 μ M); **B**) Após a incubação com TEA (2 mM); **C**) Após a incubação com 4-AP (5 mM); **D**) Diferença da área sobre a curva (dAUC) antes e após a incubação com TEA; **E**) dAUC antes e após a incubação com 4-AP. O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$ 137

Figura 33: Comparação das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em aorta torácica de ratos Inf (azul) e IC (vermelho) 30 dias após o infarto do miocárdio. **A**) Após a incubação com Apamina (Apam, 0,5 μ M); **B**) Após a incubação com Iberiotoxina (Iberio, 30 nM); **C**) Após a incubação com Apamina mais Iberiotoxina; **D**) Diferença da área sobre a curva (dAUC) antes e após a incubação com Apam; **E**) dAUC antes e após a incubação com Iberio; **F**) dAUC antes e após a incubação com Apam+Iberio. O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM.

O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$ 138

Figura 34: Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS), por meio da técnica de *Western Blot*, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n= 6), Inf (n= 6) e IC (n=6). Na parte superior da figura estão as bandas de *Western Blot* representativas da expressão da eNOS e da α -actina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Razão entre a densidade das bandas da eNOS e da α -actina. Os resultados não foram significantes para $P < 0.05$ 139

Figura 35: Expressão protéica da forma fosforilada da sintase endotelial do óxido nítrico, no resíduo Ser¹¹⁷⁷ (p-eNOS), por meio da técnica de *Western Blot*, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n= 12), Inf (n= 16) e IC (n=16). Na parte superior da figura estão as bandas de *Western Blot* representativas da expressão da p-eNOS e da α -actina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Razão entre a densidade das bandas da p-eNOS e da α -actina. **B)** Normalização da densidade das bandas da p-eNOS considerando Sham como 100%. * $P < 0,05$ IC vs. Sham; [†] $P < 0,05$ IC vs. Inf..... 140

Figura 36: Razão da expressão protéica da sintase endotelial do óxido nítrico e da forma fosforilada da sintase endotelial do óxido nítrico, no resíduo Ser¹¹⁷⁷ (p-eNOS). Técnica de *Western Blot*, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n= 6), Inf (n= 8) e IC (n=8). Na parte superior da figura estão as bandas de *Western Blot* representativas da expressão da p-eNOS, eNOS e da α -actina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Razão entre a densidade das bandas da eNOS/p-eNOS. Os resultados não foram significantes, pois o $P > 0,05$ 141

Figura 37: Razão da expressão protéica da isoforma α -1 Na⁺K⁺-ATPase. Técnica de *Western Blot*, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n= 5), Inf (n= 7) e IC (n=7). Na parte superior da figura estão as bandas de *Western Blot* representativas da expressão da isoforma α -1 Na⁺K⁺-ATPase e da α -actina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Razão entre a densidade das bandas da α -1 Na⁺K⁺ATPase/ α -actina. Os resultados não foram significantes, pois o $P > 0,05$ 142

Figura 38: Produção in situ de O₂⁻ em aortas de ratos após 30 dias do infarto do miocárdio. **A)** Cirurgia fictícia (Sham); **B)** Infartados sem sinais de insuficiência cardíaca, Inf; **C)** Infartado com sinais de Insuficiência cardíaca, IC..... 143

Figura 39: Esquema resumindo os principais resultados encontrados no presente trabalho. 170

LISTA DE ABREVIÇÕES

- 1, 4, 5 - inositol trifosfato (IP₃)
- 3 - isobutil-l-metilxantina (IBMX –inibidor da fosfodiesterase)
- 3, 5 - monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)
- 5 - trifosfato de guanosina (GTP)
- 3,5 - monofosfato cíclico, 8 - bromoadenosina (8-brcAMP – análogo do AMPc)
- Acetilcolina (ACh)
- Aminopridina (4-AP, inibidor dos canais para K⁺ voltagem dependentes)
- Apamina (Apam, inibidor dos canais para K⁺ ativados por Ca⁺² de baixa condutância)
- Área de cicatriz de infarto do miocárdio (AI)
- Arginina vasopressina (AVP)
- Canais para K⁺ voltagem dependentes (K_v)
- Canais para K⁺ ativados por Ca⁺² de larga condutância (BK_{Ca})
- Canais para K⁺ ativados por Ca⁺² de baixa condutância (SK_{Ca})
- Concentração intracelular de Ca⁺² ([Ca⁺²]_{cit})
- Concentração intracelular de Na⁺ ([Na⁺]_{cit})
- de Adenosina difosfato (ADP)
- de Adenosina trifosfato (ATP)
- Diacilglicerol (DAG)
- Endotélio íntegro (E⁺)
- Endotélio removido mecanicamente (E⁻)
- Enzima conversora de angiotensina (ACE)
- Espécies reativas do oxigênio (EROS)
- Erro padrão da média (EPM)
- Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α)
- Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)
- Fator natriurético atrial (FAN)
- Fator natriurético cerebral (FNC)
- Flavina adenina de nucleotídeo (FAD)
- Flavina mononucleotídeo (FMN)
- Frequência cardíaca (FC)
- Grupo cirurgia fictícia (Sham)

Grupo infartadas (Inf)

Grupo infartadas que desenvolveram sinais de insuficiência cardíaca (IC)

Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

Iberiotoxina (Iberio, inibidor dos canais para K^+ ativados por Ca^{+2} de larga condutância)

Infarto do miocárdio (IM)

Inibidor “não-seletivo” da sintase do óxido nítrico (NOS) $N^{(W)}$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)

Insuficiência cardíaca (IC)

Massa corporal (MC)

Massa dos pulmões (PP)

Monofosfato cíclico de adenosina (AMPc)

monóxido de carbono (CO)

Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)

Ouabaína (OUA)

Óxido nítrico (NO)

Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDfVE)

Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE)

Primeira derivada temporal de pressão positiva (dP/dt+)

Primeira derivada temporal de pressão negativa (dP/dt-)

Prostaciclina (PGI_2)

Prostaglandina A₁ (PGA_1)

Prostaglandina E₂ (PGE_2)

Prostaglandina F_{2 α} ($PGF_{2\alpha}$)

Prostaglandina H₂ (PGH_2)

Proteína cinase A (PKA)

Proteína cinase C (PKC)

Proteína cinase G (PKG)

Razão entre a massa da área de infarto e a massa corporal (AI/MC)

Razão entre a massa dos pulmões e a massa corporal (PP/MC)

Razão entre a massa do ventrículo direito e a massa corporal (VD/MC)

Razão entre a massa do ventrículo esquerdo e a massa corporal (VE/MC)

Resistência vascular periférica (RVP)

Resposta máxima (R_{max})

Retículo sarcoplasmático (RS)

Sensibilidade (pEC_{50})

Serotonina (5-HT)

Sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS)

Sintase de óxido nítrico (NOS)

Sistema nervoso central (SNC)

Sistema nervoso simpático (SNS)

Sistema renina-angiotensina (SRA)

Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

Sulfeto de hidrogênio (H_2S)

Tetraetilamônio (TEA, inibidor não seletivo dos canais para K^+)

Tetrahidrobiopterina (BH_4)

Tromboxano A_2 (TXA_2)

Ventrículo Direito (VD)

Ventrículo esquerdo (VE)

RESUMO

Introdução: A Na^+K^+ -ATPase e os canais para K^+ são essenciais para a regulação do potencial de membrana das células do músculo liso vascular (MLV). A ativação ou a inibição destes canais por fatores vasoativos neurais, humorais e locais possibilitam a modulação fisiológica do tônus vascular. Evidências demonstram que a gênese das alterações da reatividade vascular encontradas em doenças como a hipertensão arterial e o diabetes podem estar relacionadas ao aumento do estresse oxidativo e a alteração da biodisponibilidade de NO que influenciariam o funcionamento da Na^+K^+ -ATPase e dos canais para K^+ do MLV. Embora vários trabalhos demonstrem alteração da reatividade vascular após o infarto do miocárdio (IM), nenhum estudo até o presente momento avaliou a participação dos canais para K^+ e da Na^+K^+ -ATPase nas alterações da reatividade vascular que ocorrem em uma fase crônica após o IM, em ratos com área de cicatriz (AI) semelhante, com e sem sinais de insuficiência cardíaca (IC). **Objetivo:** Avaliar a atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à ouabaína (OUA) e dos canais para K^+ em anéis de aorta de ratos após o IM, com mesma AI, com e sem sinais de IC. **Materiais e Métodos:** 89 ratos Wistar machos (220-360 g) foram distribuídos em: cirurgia fictícia (Sham, n= 37), animais após o IM sem sinais de IC (Inf, n= 27) e com sinais IC (IC, n= 25). O IM foi induzido cirurgicamente através da oclusão da artéria coronária anterior esquerda. 30 dias após o IM, os animais foram pesados, anestesiados (Uretana, 1,2 g/ kg, i.p.), cateterizados e as medidas hemodinâmicas foram realizadas. Em seguida, os animais foram sacrificados, os dados ponderais foram avaliados pela razão entre a massa úmida do ventrículo direito (VD/MC), ventrículo esquerdo (VE/MC) e pulmões (PP/MC) pela massa corporal (MC) de cada animal. Os anéis de aorta foram removidos, perfundidos com solução de Krebs e gaseificados com mistura carbogênica. A atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à OUA foi verificada pela técnica de relaxamento induzido pelo potássio (0-10 mM), antes e após a incubação com OUA, em anéis com endotélio intacto (E+), sem endotélio (E-) e após a incubação com L-NAME. A participação dos canais para K^+ na reatividade vascular foi realizada pela técnica de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh), na presença do L-NAME e dos bloqueadores dos canais para K^+ : tetraetilamônio (TEA, não seletivo), Aminopridina (4-AP, inibidor dos canais para K^+ voltagem dependentes - K_v), Iberitoxina (inibidor dos canais para K^+ ativados por Ca^{+2} de larga condutância - BK_{Ca}), Apamina (inibidor dos canais para K^+ ativados por Ca^{+2} de baixa condutância - SK_{Ca}) e duplo bloqueio com Apamina e Iberitoxina. Foi realizada a avaliação da expressão protéica das isoformas $\alpha 1$ da Na^+K^+ -ATPase e da eNOS através do *Western blot*. Foi realizada a quantificação da produção do ânion superóxido (O_2^-) “*in situ*” por fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE). A AI foi avaliada por contagem de pontos em papel milimetrado (planimetria) e por histologia com a coloração com *picrosirius red*. Realizou-se avaliação da sensibilidade (pEC_{50}) e da resposta máxima (R_{max}). Para comparar os resultados entre os grupos foi realizada ANOVA 1 e 2 vias, *post hoc* Bonferroni e *post hoc* Tukey, além do Teste *t* Student quando necessário. Além disso, Os valores foram considerados significantes para $*P < 0,05$. Os protocolos experimentais foram aprovados (005/2007) pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-EMESCAM). **Resultados:** Não houve diferença entre a AI (Inf: $33,67 \pm 1,62$; IC: $38,7 \pm 2,45$ %), a massa corporal (Sham: 322 ± 7 ; Inf: 341 ± 5 ; IC: 337 ± 7 g) e a razão VE/MC (Sham: $2,12 \pm 0,03$; Inf: $2,19 \pm 0,05$; IC: $2,27 \pm 0,07$ mg/g) entre os grupos estudados. Verificou-se, porém, aumento das razões VD/MC (Sham: $0,64 \pm 0,09$; Inf: $0,74 \pm$

0,04; IC: $1,25 \pm 0,08^{**}$ mg/g; $^{**}P < 0,01$), PP/MC (Sham: $4,41 \pm 0,35$; Inf: $3,91 \pm 0,48$; IC: $8,34 \pm 0,69^{**}$ mg/g; $^{**}P < 0,01$) e da PDfVE (Sham: $5,26 \pm 0,52$; Inf: $7,20 \pm 0,64$; IC: $19,65 \pm 2,13^{**}$; $^{**}P < 0,05$) nos animais IC quando comparados com Inf e Sham. O relaxamento induzido pelo KCl foi maior em animais Inf quando comparados com os animais Sham e IC. Entretanto a remoção do endotélio, bem como incubação com L-NAME ou TEA foram capazes de abolir as diferenças entre os grupos. No grupo IC houve aumento do relaxamento induzido pelo KCl na presença de OUA quando comparados com os Sham. A remoção do endotélio e a incubação com TEA foram capazes de abolir as diferenças entre os grupos Sham e IC, mas a incubação com L-NAME não. No grupo IC comparado com Sham e Inf, a incubação com L-NAME diminuiu o relaxamento induzido pelo KCl. Após a incubação com TEA houve diminuição da R_{max} e sensibilidade dos anéis de aorta dos animais Inf e IC à ACh comparados com os Sham. A dAUC realizada com as curvas de ACh antes e após a incubação com 4-AP foi maior nos animais Inf comparados com Sham e IC. Embora o bloqueio isolado com Apamina ou Iberiotoxina não tenha ocasionado diferenças nas dAUCs entre os grupos, o duplo bloqueio resultou em uma dAUC maior no grupo IC quando comparado com Sham e Inf. Não houve diferença na expressão protéica da $\alpha 1$ da Na^+K^+ ATPase entre os grupos. Entretanto, a expressão protéica da eNOS e p-eNOS estava diminuída nos animais IC. Além disso, houve maior produção de O_2^- nos grupos Inf e IC comparados com Sham. **Conclusões:** Em uma fase crônica após o IM experimental, em ratos com AI semelhante com e sem sinais de IC, existem diferenças nos mecanismos de relaxamento vascular que induzem a caracterização de dois grupos com respostas funcionais distintas. Dentre os mecanismos envolvidos estão o aumento da participação dos canais para K^+ e do estresse oxidativo após o IM, bem como a expressão diminuída da eNOS e p-eNOS no grupo de animais IC. Além disso, sugere-se que nos animais Inf os canais K_v estejam contribuindo mais para o relaxamento vascular, enquanto os animais IC, parecem depender mais dos canais K_{Ca} . As diferenças no relaxamento vascular, de acordo com os protocolos utilizados no presente trabalho, não estariam relacionadas à alteração da função e expressão da Na^+K^+ -ATPase entre os grupos.

ABSTRACT

Introduction: Na⁺K⁺-ATPase and K⁺ channels are essential for the regulation of membrane potential in the vascular smooth muscle cells (VSMC). The activation or inhibition of these channels by neural, humoral and local vasoactive factors enable the physiological modulation of vascular tone. Studies show that the genesis of changes in vascular reactivity found in diseases such as hypertension and diabetes may be related to increased oxidative stress and alteration of NO bioavailability that influence the Na⁺K⁺-ATPase and K⁺ channels of the VSM. Although several studies demonstrate changes in vascular reactivity after myocardial infarction (MI), no study to date evaluated the involvement of Na⁺K⁺-ATPase and K⁺ channels in the alterations of vascular reactivity that occur in a chronic phase after MI, in rats with similar scar area (SA), with and without signs of heart failure (HF). **Objective:** To evaluate the functional activity of the Na⁺K⁺-ATPase ouabain (OUA)-sensitive and K⁺ channels in aortic rings of rats, after MI, with similar SA, with and without signs of HF. **Materials and Methods:** 89 male Wistar rats (220-360 g) were divided into: Sham operation (Sham, n = 37), animals after MI without signs of HF (Inf, n = 27) with signs of HF (HF, n = 25). The MI was surgically induced by occlusion of the left anterior coronary artery. 30 days after MI, animals were weighed, anesthetized (urethane, 1.2 g / kg, ip), catheterized and hemodynamic measurements were performed. The animals were sacrificed and the mass data were evaluated by the ratio of wet mass of the right ventricle (RV/BW), left ventricle (LV/BW) and lung (Lung/BW) by body mass (BW) of each animal. The aortic rings were removed, superfused with Krebs solution and aerated with carbogen mixture. The functional activity of the Na⁺K⁺-ATPase OUA-sensitive was investigated by the relaxation induced by potassium (0-10 mM) before and after OUA incubation, in rings with intact (E+) and removed endothelium (E-), and after L-NAME incubation. The participation of K⁺ channels in vascular reactivity was performed using the acetylcholine (ACh) induced relaxation after L-NAME and K⁺ channels blockers incubation: tetra-ethylammonium (TEA, non-selective blockers of K⁺ channels), Aminopiridin (4-AP, voltage-dependent K⁺ channels inhibitor - K_v), Iberiotoxin (blocker of Ca²⁺ channels sensitive of large-conductance - BK_{Ca}), Apamina (blocker of Ca²⁺ channels sensitive of small-conductance - SK_{Ca}) and the association of iberiotoxin and apamin. We performed the evaluation of α1 Na⁺K⁺-ATPase and eNOS protein expression by Western blot. The production of superoxide anion (O₂⁻) "in situ" was performed by the fluorescence produced by oxidation of dihydroethidium (DHE). The SA was assessed by counting of the points on graph paper (planimetry) and histology with picosirius red staining. We carried out evaluation of sensitivity (*pEC*₅₀) and maximal response (*R*_{max}) to ACh induced relaxation. To compare results between groups was performed ANOVA 1 and 2 ways, *post hoc* tests Tukey, Bonferroni and Student *t*. Values were considered significant for **P* < 0.05. The experimental protocols were approved (005/2007) by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA-EMESCAM). **Results:** There were no differences between the SA (Inf: 33.67 ± 1.62, HF: 38.7 ± 2.45%), body mass (Sham: 322 ± 7; Inf: 341 ± 5, HF: 337 ± 7 g) and the ratio LV/BW (Sham: 2.12 ± 0.03; Inf: 2.19 ± 0.05, IC: 2.27 ± 0.07 mg/ g) between groups. However, there were increased in the RV/BW (Sham: 0.64 ± 0.09; Inf: 0.74 ± 0.04, HF: 1.25 ± 0.08⁺ mg/g; ⁺*P* < 0.01), Lung/BW (Sham: 4.41 ± 0.35, Inf: 3.91 ± 0.48, HF: 8.34 ± 0.69⁺ mg/ g ⁺*P* < 0.01) and LVEDP (Sham: 5.26 ± 0.52, Inf: 7.20 ± 0.64, IC: 19.65 ± 2.13⁺; ⁺*P* < 0.05) in the IC group when compared with Sham and Inf. The K⁺-induced relaxation was higher in Inf compared to Sham and HF animals. However, the endothelium removal,

as well as the L-NAME or TEA incubation were able to abolish the differences between groups. In IC group K^+ -induced relaxation was increased in the presence of OUA compared with Sham. Removal of the endothelium and incubation with TEA were able to abolish the differences between the Sham and HF groups, but the L-NAME incubation did not. In the HF group compared with Sham and Inf, L-NAME incubation decreased the K^+ -induced relaxation. After incubation with TEA, R_{max} and the sensitivity of aortic rings to ACh Inf and HF decreased compared with Sham. The dAUC performed with the curves of ACh before and after incubation with 4-AP was higher in Inf animals compared with Sham and HF. Although the blocking with Apamin or Iberiotoxin has not caused the differences between the dAUC of groups, the double block resulted in the dAUC higher in HF group compared with Sham and Inf. There was no difference in protein expression of $\alpha 1$ Na^+K^+ -ATPase between groups. However, the $\alpha 1$ Na^+K^+ -ATPase, p-eNOS and eNOS protein expression was diminished in the HF animals. In addition, a higher production of $O_2^{\cdot -}$ in the Inf group compared with Sham and HF. **Conclusions:** In a chronic phase after experimental MI in rats with similar AI, with and without signs of HF, differences exist in mechanisms that induce vascular relaxation characterization of two distinct groups with functional responses. Among the mechanisms involved are increasing the participation of K^+ channels and oxidative stress after MI, as well as decreased expression of eNOS and p-eNOS in the HF group of animals. Moreover, it is suggested that the Inf animals K_v channels are contributing more to the vascular relaxation, while the HF animals, seem to depend on the channels of K_{Ca} . Differences in vascular relaxation, according to the protocols used in this study, no relation to the change in function and expression of Na^+K^+ -ATPase between the groups.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 INFARTO DO MIOCÁRDIO	26
1.2 INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CONGESTIVA PÓS-INFARTO DO MIOCÁRDIO	28
1.2.1 Remodelamento cardíaco	29
1.2.2 Ativação neurohumoral	31
1.2.3 Reatividade vascular e disfunção endotelial	34
1.3 Na ⁺ K ⁺ -ATPase	38
1.3.1 As subunidades da Na ⁺ K ⁺ -ATPase	39
1.3.1.1 Subunidade catalítica α	39
1.3.1.2 A subunidade glicosilada β	41
1.3.1.3 A subunidade regulatória γ	41
1.3.2 Mecanismos de regulação da Na ⁺ K ⁺ -ATPase	43
1.3.2.1 Eventos que envolvem a sinalização das ações hormonais	43
1.3.2.2 Regulação da Na ⁺ K ⁺ -ATPase por íons e ATP	45
1.3.2.3 Hormônios na regulação da Na ⁺ K ⁺ -ATPase	46
1.3.2.4 Fatores vasoativos derivados do endotélio na regulação da Na ⁺ K ⁺ - ATPase.....	47
1.3.2.5 Regulação da Na ⁺ K ⁺ -ATPase através dos seus inibidores endógenos	50
1.4 FISILOGIA DOS CANAIS PARA POTÁSSIO DO MÚSCULO LISO VASCULAR	54
1.4.1.1 Canais de K ⁺ voltagem dependentes (K _v).....	56
1.4.1.2 Canais de K ⁺ ativados por cálcio (K _{Ca})	57
1.4.1.2.1 Canais de K ⁺ ativados por cálcio de larga condutância (BK _{Ca}).....	58
1.4.1.2.2 Canais de K ⁺ ativados por cálcio de baixa (SK _{Ca}) e intermediária condutância (ISK _{Ca})	60
1.4.1.3 Canais para potássio sensíveis ao ATP (K _{ATP}).....	61
1.4.1.4 Canais para potássio retificadores de influxo (K _{IR})	63
1.4.1.5 Canais para K ⁺ com dois poros por domínio (K _{2P}).....	64
2. OBJETIVOS	70
2.1 OBJETIVO GERAL.....	70

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	70
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
3.1 COMITÊ DE ETICA	71
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	71
3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	71
3.3.1 Infarto agudo do miocárdio.....	71
3.3.2 Medidas hemodinâmicas e avaliação da função ventricular esquerda.....	73
3.3.3 Avaliação dos dados ponderais	75
3.3.4 Avaliação da área de infarto do miocárdio	75
3.3.5 Separação dos Grupos Experimentais.....	79
3.3.6 Preparação dos anéis isolados de aorta	80
3.3.7 Estudo da atividade funcional da Na ⁺ K ⁺ -ATPase sensível à ouabaína.....	83
3.3.7.1 Modulação do endotélio sobre a resposta de relaxamento ao KCl e sobre a capacidade da ouabaína de inibir a atividade funcional da Na ⁺ K ⁺ -ATPase.....	84
3.3.7.2 Efeito do bloqueio com L-NAME sobre resposta de relaxamento ao KCl e sobre a capacidade da ouabaína de inibir a atividade funcional da Na ⁺ K ⁺ -ATPase.....	84
3.3.7.3 Efeito do bloqueio com tetraetilamônio (TEA) sobre resposta de relaxamento ao KCl e sobre a capacidade da ouabaína de inibir a atividade funcional da Na ⁺ K ⁺ -ATPase.....	85
3.3.8 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio	85
3.3.8.1 Efeito do bloqueio com L-NAME sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio	86
3.3.8.2 Efeito dos bloqueadores dos canais para potássio sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio	87
3.3.9 Quantificação da produção do ânion superóxido (O ₂ ⁻) “in situ”	87
3.3.9.1 Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE).	87
3.3.10 Quantificação da expressão protéica através do <i>Western blot</i>	87
3.4 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	90
3.5 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS	92
4. RESULTADOS	94
4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS.....	94
4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PONDERAIS.....	96

4.3 AVALIAÇÃO DA ÁREA DE CICATRIZ APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO	99
4.4 ATIVIDADE FUNCIONAL DA Na ⁺ K ⁺ -ATPase SENSÍVEL À OUABAÍNA 30 DIAS APÓS O INFARTO – COMPARAÇÃO INTRAGRUPO	103
4.4.1 Grupo Sham	103
4.4.2 Grupo Inf	105
4.4.3 Grupo IC	107
4.5 ATIVIDADE FUNCIONAL DA Na ⁺ K ⁺ -ATPase SENSÍVEL À OUABAÍNA 30 DIAS APÓS O INFARTO – COMPARAÇÃO INTERGRUPOS	109
4.5.1 Comparação da atividade funcional da Na ⁺ K ⁺ -ATPase sensível à OUA em aortas de ratos com endotélio intacto dos grupos Sham, Inf e IC	109
4.5.2 Comparação da modulação do endotélio sobre a atividade funcional da Na ⁺ K ⁺ -ATPase sensível à OUA nos anéis de aorta de ratos Sham, Inf e IC	111
4.5.3 Diferença da participação do NO sobre a atividade funcional da Na ⁺ K ⁺ -ATPase sensível à OUA em anéis de aorta dos grupos Sham, Inf e IC	113
4.5.4 Diferença da participação dos canais para K ⁺ sobre a atividade funcional da Na ⁺ K ⁺ -ATPase sensível à OUA em anéis de aorta dos grupos Sham, Inf e IC	115
4.6 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS PARA K ⁺ NA RESPOSTA VASODILATADORA DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO	118
4.6.1 Avaliação da participação dos canais para K ⁺ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio nos animais Sham	118
4.6.2 Avaliação da participação dos canais para K ⁺ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio nos animais infartados sem sinais de IC	122
4.6.3 Avaliação da participação dos canais para K ⁺ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio nos animais infartados com sinais de IC	126
4.6.4 Comparação da participação dos canais para K ⁺ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio em animais Inf e Sham	130
4.6.5 Comparação da participação dos canais para K ⁺ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio em animais IC e Sham	133
4.6.6 Comparação da participação dos canais para K ⁺ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio em animais Inf e IC	136
4.7 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA	139
4.7.1 <i>Western Blot</i> para detecção das isoformas eNOS e p-eNOS da sintase do óxido nítrico	139

4.7.2 <i>Western Blot</i> para detecção da isoforma α -1 da Na^+K^+ -ATPase.....	142
4.8 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO ($\text{O}_2^{\cdot-}$) “ <i>in situ</i> ” ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA PRODUZIDA PELA OXIDAÇÃO DO DIHIDROETÍDIO (DHE).....	143
5 DISCUSSÃO	146
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO PONDERAL, ÁREA DE INFARTO E HEMODINÂMICA.....	148
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DA Na^+K^+ -ATPase SENSÍVEL À OUABAÍNA EM ANIMAIS SHAM, Inf E IC	153
5.3 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS PARA K^+ NA RESPOSTA VASODILATADORA DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANIMAIS SHAM, Inf E IC.....	157
5.4 AVALIAÇÃO DAS ISOFORMAS α -1 Na^+K^+ ATPase, eNOS, p-eNOS DA SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO DO MLV	166
5.5 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO ($\text{O}_2^{\cdot-}$) “ <i>in situ</i> ” ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA PRODUZIDA PELA OXIDAÇÃO DO DHE	168
6 CONCLUSÃO.....	170
7 REFERÊNCIAS.....	171

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFARTO DO MIOCÁRDIO

O infarto do miocárdio (IM) é considerado a morte tecidual decorrente de uma obstrução arterial. A baixa perfusão tecidual evolui com sinais e sintomas que são conseqüência da hipóxia e da morte das células cardíacas (Sharpe, 1993; Zornoff et al; 2009).

No Brasil, dentre diversas causas avaliadas pelo Ministério da Saúde em 2008, as doenças do aparelho circulatório representaram 40,8% das mortes em pessoas com mais de 60 anos. Quando foram avaliadas as causas por doenças específicas, o infarto agudo do miocárdio representou 39,3 mortes, a cada 100.000 habitantes, em relação a causas específicas de morte, em todas as idades. O Espírito Santo superou o coeficiente de mortalidade brasileiro por causas específicas, pois em 2009 apresentou o alarmante número de 49,7 mortes a cada 100.000 habitantes sendo ocasionada por infarto agudo do miocárdio (DATASUS, 2011a).

As conseqüências econômicas e sociais das mortes por IM agravam-se quando se constata que os índices de mortalidade aumentam significativamente dentre as pessoas na fase economicamente ativa. Assim, muitos indivíduos de uma faixa etária onde é grande o retorno social pelo trabalho, vão a óbito, ou sobrevivem com graus variados de incapacidade física (DATASUS, 2011b). Dessa forma, é importante compreender as alterações que ocorrem no sistema cardiovascular após o IM a fim de reduzir a morbimortalidade.

A isquemia miocárdica pode resultar da formação de placa de aterosclerose, do desenvolvimento de trombose e da vasoconstrição excessiva (Libby e Theroux, 2005). Os locais mais comuns de oclusão das coronárias por placas de aterosclerose são: 1) no ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda; 2) na artéria coronária direita; e 3) no ramo circunflexo da artéria coronária esquerda (Lee et al., 1996; Libby e Theroux, 2005).

Dentre as possibilidades relacionadas com o tempo de evolução da isquemia, o miocárdio sofre progressiva agressão representada pelas áreas de hipóxia, lesão e

necrose, sucessivamente (Pesaro, 2004). Após a agressão ao miocárdio, ocorre o reparo cardíaco que é um complexo processo envolvendo respostas neuroendócrinas, diversos componentes pró-inflamatórios e o remodelamento da matriz extracelular.

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

A ativação do SNS ocasiona um aumento de descarga nervosa nos troncos simpáticos periféricos dirigidos para os rins, coração, vasos e, particularmente, para a supra-renal. Há, portanto, um aumento da concentração circulante de adrenalina, proveniente da supra-renal, como também, há uma elevação da noradrenalina, proveniente do aumento da atividade dos nervos simpáticos. O FAN é um hormônio peptídico que é liberado, dentre outros locais, pelos miócitos atriais quando submetidos ao estiramento. Francis et al. (2001) relacionam a elevação persistente do FAN aos casos que evoluem para insuficiência cardíaca (IC). A ativação do SRAA resulta, em grande parte, no aumento da produção e liberação de renina pelos rins. Como consequência da produção e liberação de renina pelo aparelho justaglomerular, aumenta a concentração plasmática de angiotensina II e de aldosterona. Os principais efeitos fisiológicos desta elevação no plasma estariam relacionados a uma tentativa de aumento da volemia, a fim de manter uma perfusão do tecido miocárdico adequada em situações de baixo débito (Skeggs et al., 1976).

Após o IM e a perda de tecido contrátil na área da cicatriz, o coração passa a usar, primeiramente, sua reserva sistólica (representada pelo aumento da atividade contrátil do miocárdio) a fim de manter a perfusão sistêmica. Isso ocorre basicamente pelo aumento da atividade simpática (Pfeffer et al; 1992). Secundariamente, a manutenção do débito cardíaco depende da reserva diastólica, ou seja, do aumento da eficiência sistólica através da ativação do mecanismo de Frank-Starling (Klein et al; 1967). O próximo passo para manutenção da função cardíaca após a perda do miocárdio da área da cicatriz é o remodelamento ventricular.

O remodelamento é um termo utilizado para descrever os processos de reparo das câmaras cardíacas que resultam na alteração da geometria ventricular e diminuição da função cardíaca (Dorn, 2002). Segundo Sutton e Sharpe (2000), o IM

pode ser dividido em duas fases: 1) fase precoce (dentro de 72 horas após o IM); 2) fase tardia (após 72 horas de IM). A fase tardia pode se estender enquanto persistam os estímulos bioquímicos que dependem do tamanho, local e transmuralidade do IM. Nesta fase a concentração de uma série de moduladores pode estar aumentada, tais como: angiotensina II; endotelina 1, catecolaminas, fator de necrose tumoral, interleucina 1 e 6, bem como fatores de crescimento. Estas substâncias funcionariam como moduladores regulando os eventos iniciais do infarto, como a reação inflamatória, além de promoverem efeitos hemodinâmicos e inotrópicos que contribuem para a estabilização dos pacientes. A concentração plasmática destas substâncias pode voltar ao normal dentro de uma semana, ou, em alguns casos, pode ser mantida elevada. Modelos experimentais têm demonstrado que o aumento da concentração dos moduladores podem tanto desencadear quanto regular o remodelamento cardíaco (Rouleau et al; 1991; Nian et al; 2004). Após o IM, o remodelamento ventricular é o principal fator causador da IC (Gaballa e Goldman, 2002; Pfeffer, 2002).

1.2 INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CONGESTIVA PÓS-INFARTO DO MIOCÁRDIO

A insuficiência cardíaca congestiva é uma síndrome clínica complexa de caráter sistêmico, definida como disfunção cardíaca que cursa com inadequado suprimento sanguíneo para atender necessidades metabólicas tissulares, na presença de retorno venoso normal, ou é capaz de fazê-lo somente com elevadas pressões de enchimento (Hirsch et al., 1991; Davidoff et al., 2004; Bocchi et al; 2009). Ela é a via final comum da maioria das doenças que acometem o coração, sendo um dos mais importantes desafios clínicos atuais na área da saúde. Trata-se de um problema epidêmico em progressão. Mais de 2/3 (69,8%) das hospitalizações por IC que foram realizadas no ano de 2007 ocorreram em pessoas com mais de 60 anos (DATASUS, 2011a).

No Brasil, a principal etiologia da IC é a cardiopatia isquêmica crônica associada à hipertensão arterial. Em determinadas regiões do país e em áreas com precária condição sócio-econômica, ainda existem formas de IC associadas à

doença de Chagas e a cardiopatia valvar reumática crônica, que são situações especiais de IC em nosso meio (Bocchi et al; 2009). O mecanismo responsável pelos sinais e sintomas clínicos apresentados pelo paciente com IC pode ser decorrente da disfunção sistólica, diastólica ou de ambas, acometendo um ou ambos os ventrículos. Nos adultos, em aproximadamente 60% dos casos está associada à disfunção ventricular esquerda sistólica e no restante 40% à disfunção diastólica, devendo ser realçado que esta última vem sendo mais observada com o aumento da expectativa de vida da população (Zdanowicz, 2002; Bocchi et al; 2009)

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

1.2.1 Remodelamento cardíaco

À medida que o infarto se consolida, uma dilatação ventricular seria indispensável para manter o débito cardíaco em valores compatíveis com a vida. Desta forma, o sangue bombeado pelo coração deve ser capaz de perfundir os tecidos de acordo com a demanda metabólica do organismo. A necrose dos miócitos e o aumento da sobrecarga ventricular disparam uma cascata de sinalização bioquímica intracelular capaz de promover hipertrofia, dilatação e formação de cicatriz de colágeno. Inicialmente, a hipertrofia ventricular é uma resposta adaptativa benéfica à sobrecarga hemodinâmica por estabilizar a função contrátil, mas sua evolução colabora para a disfunção ventricular progressiva (Spann et al., 1967; Rossini et al; 2010; Mill et al; 2011). O enrijecimento da parede ventricular, secundário à instalação da hipertrofia causa elevação do estresse sistólico e diastólico de parede (Pfeffer e Braunwald, 1990; Matos-Souza et al; 2008). Essa

hipertrofia pode ter um efeito benéfico do ponto de vista energético, já que, segundo a relação de Laplace o estresse gerado na parede ventricular depende da pressão multiplicada pelo raio dividido pelo dobro da espessura da parede da cavidade. Assim, um dado aumento da pressão ventricular pode ser compensado pelo aumento da hipertrofia concêntrica, normalizando o estresse de parede.

Por outro lado, o estresse diastólico final na sobrecarga de volume dispara a replicação dos sarcômeros em série, que resulta em alongamento individual dos miócitos. Este aumento do comprimento celular causa um aumento no volume ventricular total resultando em hipertrofia excêntrica (Pfeffer e Braunwald, 1990; Carabello, 2002; Zornoff et al; 2009). A deterioração progressiva dos ventrículos, a disfunção sistólica e diastólica instaladas pelo contínuo processo de remodelamento levam a diminuição da fração de ejeção, prejuízo no mecanismo de Frank-Starling e descompensação do estresse sistólico, anteriormente evitado de acordo com a Lei de Laplace. O aumento da pós-carga deixa efetivamente de resultar no aumento da pré-carga e o coração gasta muita energia para realizar sua performance de bomba o que resulta em falência da bomba cardíaca (Gerdes, 2002).

Além da hipertrofia após o IM, ocorre aumento na deposição de colágeno na matriz extracelular, o que contribui para alterar o desempenho sistólico e reduzir a complacência da câmara, dificultando o enchimento do ventrículo (Mill et al., 1990; Mill e Vassallo, 2001; Zornoff et al; 2009). O tecido hipertrofiado não possui as mesmas características funcionais do tecido do miocárdio normal. A densidade capilar cai proporcionalmente à hipertrofia e a reserva do fluxo coronariano é reduzida (Marcus et al., 1983). As reservas de substratos de alta energia, como a fosfocreatina, reduzem-se, principalmente no subendocárdio. Assim, a hipertrofia predispõe a um quadro crônico de mecanismos compensatórios que resultam na IC (Mill et al., 1990; Olivetti et al., 1991; Mill e Vassallo, 2001; Matos-Souza et al; 2008).

1.2.2 Ativação neurohumoral

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

A ativação do SNS é um aspecto presente nos estágios mais recentes da disfunção ventricular e está envolvida na progressão e no aumento da mortalidade na IC (Francis et al., 1993). Grassi et al; (1995) utilizaram uma técnica de registros através da microneurografia para avaliar a atividade do sistema nervoso simpático no nervo peroneal em humanos e observaram que a atividade do SNS para os vasos sanguíneos dos músculos estava aumentada em pacientes com IC secundária à disfunção do VE. Por outro lado, Benedict et al; (1993) não encontraram os mesmos resultados quando avaliaram pacientes com IC secundária à disfunção do VD. Contudo, estes resultados sugerem que a ativação do SNS reflete mais do que a clínica IC, mas também uma disfunção do VE (Matos-Souza et al; 2008). Em pacientes com IC, a atividade do SNS no coração está aumentada três vezes mais que o normal, sendo ele o primeiro órgão alvo desta ativação. Além disso, os rins e a circulação muscular são também precocemente envolvidos (Rundqvist et al., 1997).

A contínua e prolongada atividade adrenérgica, bem como a vasoconstrição periférica leva a um aumento da pós-carga, diminuição do débito cardíaco e da perfusão renal, contribuindo para o aumento da retenção de água e sódio. Ao mesmo tempo, aumenta a FC e o gasto energético do miocárdio, podendo ocasionar hipertrofia, isquemia, taquiarritmias e danos aos miócitos (Middlekauff e Mark, 1998; Braunwald e Bristow, 2000; Zdanowicz, 2002).

Embora seja conhecida a ativação do SNS durante a IC, as vias envolvidas neste processo ainda não estão completamente claras. Os possíveis mecanismos envolvidos são: atenuação da sensibilidade dos mecanorreceptores arteriais e cardíacos; alteração pressórica na artéria e no capilar pulmonar; exacerbação do quimiorreflexo periférico e central; ativação das aferências simpáticas cardíacas que estão relacionadas à sensação de dor cardíaca durante a isquemia coronariana;

ativação dos aferentes renais sensíveis a estímulos mecânicos ou químicos; ativação do SRA, atenuação da resposta inibitória para o SNC; ativação da resposta excitatória para o sistema nervoso central (SNC); e mudanças nos fatores humorais e locais do cérebro afetando a regulação neural simpática central (Middlekauff e Mark, 1998; De Angelis et al., 2004).

O aumento do tônus adrenérgico resulta no aumento da resistência vascular periférica (RVP) que acontece tanto por estimulação direta, quanto indireta, da contração do músculo liso. A liberação aumentada não só de catecolaminas, mas também de endotelina, e indiretamente, a ativação do SRAA, contribuem para restaurar a pressão e a volemia (Zdanowicz, 2002; Ledoux et al., 2003).

Na IC há um aumento na quantidade de angiotensina II tecidual e circulante que aumenta a pré-carga e a pós-carga, causando remodelamento cardíaco e vascular.

A angiotensina II estimula a liberação de endotelina-1, um potente vasoconstritor, bem como de aldosterona, que estimula a reabsorção renal de sódio. Outras ações importantes da angiotensina II são a facilitação da ativação do músculo liso vascular pelas catecolaminas, bem como a redução da sua recaptação pelos terminais pré-sinápticos e a ativação central do SNS (Falkenhahn et al., 1994; Griendling et al., 1997).

Uma importante função da angiotensina II refere-se ao seu envolvimento na modulação da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) por meio do estímulo à produção de ânion superóxido. Há evidências de que o ânion superóxido inativa o NO, alterando a função endotelial. A inibição da síntese de superóxido ou o uso de "varredores" de radicais livres pode melhorar a função endotelial. A diminuição do NO é encontrada em várias doenças que cursam com disfunção endotelial como a hipertensão arterial (Panza et al., 1990; Drexler, 1998), a hipercolesterolemia (Creager et al., 1990), a IC (Lopez e Casado, 2001) e o diabetes (Vallance, 1992). A diminuição da biodisponibilidade do NO durante a IC pode ocorrer por dois motivos: acentuada diminuição da expressão da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS); e aumento da liberação vascular de ânion superóxido (Schafer et al., 2004). Outros hormônios que também se apresentam em elevadas concentrações em pacientes com IC são os peptídeos natriuréticos. O FAN e o fator natriurético cerebral (FNC) são secretados pelo coração em resposta ao estiramento do átrio desencadeado pelo aumento da pressão de enchimento ventricular. Suas ações sobre o músculo liso vascular (MLV), sobre os rins e supra-renais causam, respectivamente,

vasodilatação, diminuição da secreção de renina, bem como diminuição da liberação de aldosterona e natriurese (Braunwald e Bristow, 2000; Nakayama, 2005). Quando Francis et al. (2001) avaliaram a progressão da IC após 8 semanas do infarto em rato, foi demonstrado que o FAN aumentou logo na primeira semana e manteve este aumento constante até o fim do experimento. Assim, segundo estes pesquisadores, há uma correlação entre FAN e a progressão temporal do IM para IC.

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

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

Além dos fatores humorais alterados na IC, há também a superexpressão das citocinas pró-inflamatórias. Elas compõem um grupo heterogêneo de proteínas com peso molecular relativamente pequeno que se caracterizam por exercer seus efeitos a curtas distâncias de forma parácrina ou endócrina. No entanto, não são hormônios, pois não atuam pela via humoral. Duas classes de citocinas foram relacionadas ao desenvolvimento da IC: 1) citocinas vasoconstritoras e inotrópicas positivas; e 2) citocinas pró-inflamatórias vasodilatadoras. As citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e interleucina-1 β enquadram-se na segunda classe. Elas desempenham papel expressivo na patogênese da IC por diminuírem as reservas intracelulares de anti-oxidantes e promoverem a formação de espécies reativas de oxigênio. Além dos efeitos desses mediadores pró-inflamatórios na estrutura e na função cardíaca após o infarto do miocárdio, são crescentes as evidências de que existe contribuição das citocinas na disfunção endotelial. O TNF- α , encontrado no plasma dos pacientes com IC, já foi

demonstrado por sua capacidade de modular a função endotelial, através da indução de apoptose das células endoteliais e diminuição da expressão eNOS da veia umbilical humana (Braunwald e Bristow, 2000; Douglas, 2002; Nian *et al.*, 2004).

1.2.3 Reatividade vascular e disfunção endotelial

Embora bastante estudada, não há um consenso sobre a disfunção vascular na IC devido à heterogeneidade das alterações na reatividade vascular que dependem da duração da doença, do tipo de artéria estudada e do gênero (Stassen *et al.*, 1997; Baggia *et al.*, 1997; Palacios *et al.*, 2004).

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

Substâncias locais derivadas do endotélio são importantes moduladores do tônus vascular. Os principais fatores vasoconstritores são: tromboxano A₂ (TXA₂), prostaglandina H₂ (PGH₂), angiotensina II, endotelina-1 e espécies reativas do oxigênio (EROS). Os principais fatores vasodilatadores são: NO, prostaciclina (PGI₂), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Os principais mediadores pró-inflamatórios são as citocinas liberadas localmente pelo endotélio, terminações nervosas, plaquetas e leucócitos (Fang e Marwick, 2002; Ledoux *et al.*, 2003).

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

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

A IC é caracterizada pela diminuição do débito cardíaco e aumento da resistência vascular periférica que pode ocorrer por causa do relaxamento anormal dependente do endotélio (Drexler, 1998). Tanto a condutância quanto a resistência nos vasos sanguíneos de animais com IC estão modificadas (Drexler, 1998; Endemann e Schiffrin, 2004). A vasodilatação dependente do endotélio tem-se mostrado reduzida tanto em humanos quanto em animais com função cardíaca comprometida (Kubo et al., 1991; Drexler et al., 1992; Bauersachs et al., 1999). A alteração funcional do endotélio é caracterizada por uma vasodilatação reduzida, ou por uma vasoconstrição aumentada. A redução da vasodilatação mediada pelo endotélio na IC pode ser ocasionada por menor produção de NO, aumento da sua degradação ou diminuição da resposta do MLV aos fatores vasodilatadores (Teerlink et al., 1993; Teerlink et al., 1994; Didion et al., 1997; Stassen et al., 1997; Bauersachs et al., 1999; Indik et al., 2001).

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

O aumento da degradação de NO pode ocorrer devido ao aumento das EROs produzidas pelas células endoteliais e do MLV (Lopez e Casado, 2001). A produção de EROs está aumentada no coração e na circulação após a IC, estando relacionada à sobrecarga cardíaca e à isquemia do miocárdio, ao aumento das citocinas semelhantes ao TNF- α , ao aumento da produção de catecolaminas circulantes, de aldosterona e de angiotensina II (Fang e Marwick, 2002; Ledoux et al., 2003; Schafer et al; 2003; Sartório et al; 2007). O aumento da produção de EROs, especialmente do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), bem como a redução da defesa antioxidante na IC contribui para diminuição da biodisponibilidade de NO (Bauersachs et al; 1999).

O $O_2^{\cdot-}$ é formado pela redução univalente do oxigênio. Esta reação é mediada por várias enzimas incluindo a NAD(P)H oxidase e xantina oxidase. Quando o NO se

combina com o ânion superóxido forma o peroxinitrito, que sendo tóxico para as células, oxida os lipídios, as proteínas e o DNA (Indik et al; 2001). A superóxido desmutase (SOD) é uma isoforma extracelular que promove desmutação de O_2^- produzindo uma ERO mais estável, a H_2O_2 , que é então convertida em H_2O pela catalase e glutathione peroxidase (Taniyama e Griending, 2003). Desta forma, a degradação de NO pode ser prevenida (Förstermann, 2010). Indik et al. (2001) propuseram que o prejuízo no relaxamento dependente do endotélio em ratos com IC após o IM se devia em parte à excessiva degradação do NO e à reduzida atividade da SOD.

O SRAA está ativado na progressão da IC e também está correlacionado ao aumento do estresse oxidativo nesta doença (Schafer et al; 2004; Sartório et al; 2007). Tanto a síntese de aldosterona quanto os receptores de mineralocorticóides tem sido descritos na parede vascular (Funder et al; 1989; Takeda et al; 1995). A aldosterona estimula a expressão e atividade da ECA, bem como potencializa o efeito da angiotensina II. A aldosterona e a angiotensina II estimulam a produção de O_2^- vascular, promovendo a degradação de NO e reduzindo sua biodisponibilidade (Förstermann, 2010). A angiotensina II tem sido descrita como mais importante estímulo para formação de ânion superóxido na parede vascular (Bauersachs et al; 1999). Em pacientes com IC, o tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina foi capaz de reduzir a mortalidade e aumentar a dilatação vascular dependente do endotélio (Varin et al; 2000). Sartorio et al. (2007) também relatam que em aorta de ratos o bloqueio com eplerenona (inibidor do receptor mineralocorticóide) melhora a disfunção endotelial, a biodisponibilidade de NO, e diminui o estresse oxidativo em ratos com IC após sete dias de IM.

A disfunção endotelial e o aumento das EROs também tem sido relacionados a NAD(P)H oxidase. Na parede da aorta este cofator foi identificado como a maior fonte de aumento das EROs na IC. Estratégias que contribuam para diminuir a NAD(P)H também são capazes de diminuir a produção de EROs e melhorar a função endotelial na IC (Bauersachs et al; 1999; Bauersachs et al; 2002; Sartório et al; 2007).

Taddei et al. (2000) propuseram uma redução da sensibilidade do MLV ao NO devido à produção aumentada de endotelina-1 na IC. A endotelina-1, ao interagir com os receptores ET_A encontrados no MLV, causa vasoconstrição. Entretanto, ao interagir com os receptores ET_B endoteliais, a endotelina-1 promove a produção de

substâncias vasodilatadoras, como o NO e a prostaciclina (PGI_2). Alguns receptores ET_B , farmacologicamente diferentes dos ET_B endoteliais, podem localizar-se no MLV, onde causam uma vasoconstrição ao serem estimulados (Kuc et al., 2000).

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

Bianchi et al. (2006) verificaram um aumento na reatividade a fenilefrina em aortas de ratas, 60 dias após o IM, que era dependente do endotélio e estava relacionada à diminuição da biodisponibilidade de NO. Neste mesmo estudo, embora a biodisponibilidade do NO estivesse diminuída, o relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) estava preservado. Pereira et al. (2005) demonstraram também que a reatividade vascular no leito arterial caudal de ratos 30 dias após o IM, com mesma área de cicatriz, dependia do fato destes animais apresentarem ou não sinais de IC. Um aspecto relevante do estudo de Pereira et al. (2005) foi à demonstração, pela primeira vez na literatura, de que a reatividade vascular do leito caudal, em resposta a fenilefrina, estava aumentada em animais que apresentaram infarto sem sinais de IC, enquanto, nos animais com sinais de IC, a reatividade vascular estava diminuída. A identificação de dois grupos experimentais distintos quando se induziu o infarto agudo do miocárdio em ratos, apresentando a mesma área de cicatriz, poderia explicar, pelo menos em parte, a variedade de resultados, muitas vezes com conclusões contraditórias, obtidos em modelos experimentais de IC descritos na literatura.

Assim, é possível que diferentes fatores estivessem envolvidos nas alterações da reatividade vascular após o infarto do miocárdio em animais dependendo da presença ou não de IC. Os resultados demonstrados por Pereira et al. (2005) sugeriram a existência de algum mecanismo que envolvesse também o acoplamento excitação-contração do MLV nessas diferentes respostas.

Como a Na^+K^+ -ATPase e os canais para K^+ participam dos processos de manutenção do potencial de membrana, dos mecanismos envolvidos na despolarização e repolarização, bem como da manutenção da concentração iônica celular, os mesmos são de fundamental importância durante a contração do MLV e

poderiam estar envolvidos na gênese das doenças cardiovasculares (Therien e Blostein, 2000; Skou, 1997; Jackson, 2005; Haddy et al; 2006; Ko et al; 2008).

1.3 Na⁺K⁺-ATPase

A Na⁺K⁺-ATPase é uma proteína integral de membrana da família das P-ATPases caracterizada por um número específico de seqüências relacionadas a sua função hidrolítica e a presença de vários domínios hidrofóbicos necessários para a formação das α -hélices transmembrana (Horisberger, 2004). Ela foi descrita primeiramente por Skou em 1957, e desde então sua estrutura, função de bomba e regulação tem sido bem caracterizada (Skou, 1957; Xie e Cai, 2003).

A Na⁺K⁺-ATPase é encontrada na maioria das células procariotas e eucariotas contribuindo para a regulação da concentração intracelular de Na⁺, que é de grande importância para o controle da homeostase celular. Sua função básica é manter elevados gradientes de Na⁺ e K⁺ através da membrana plasmática que são utilizados como fonte de energia para a manutenção do potencial de membrana, para os eventos da despolarização e repolarização, bem como para a regulação da composição iônica citoplasmática. A Na⁺K⁺-ATPase também possui importante papel na regulação do volume celular, do tônus vascular, do crescimento e diferenciação celular, do pH e da concentração de Ca⁺², além de influenciar inúmeros transportes secundários como o transporte de glicose dependente de Na⁺, transporte de aminoácidos e transporte trans-epitelial (Vassalle, 1987; Skou e Esmann, 1992; Blaustei, 1993; Rose e Valdes, 1994; Therien e Blostein, 2000; Frasen, 2005; Lynch et al 2008; Pritchard et al; 2010).

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

se liga aos íons, os transporta e também assume o estado ocluído, onde os dois portões da proteína estão fechados (Sen e Tobin, 1969; Skou e Esmann, 1992; Horisberger, 2004).

1.3.1 As subunidades da Na⁺K⁺-ATPase

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

1.3.1.1 Subunidade catalítica α

A subunidade catalítica α possui aproximadamente 8 domínios transmembrana e 4 isoformas: α_1 , α_2 , α_3 e α_4 . Ela contém sítios de ligação para Na⁺ e K⁺, ATP e compostos digitálicos (como por exemplo, a ouabaína) que são ligantes conhecidos por modular a função da Na⁺K⁺-ATPase (Sweadner, 1979; Rose e Valdes, 1994; Shamraj e Lingrel, 1994; Mobasheri et al; 2000; Dostanic-Larson et al., 2006).

Muitos estudos propõem que a apresentação das isoformas da Na⁺K⁺-ATPase varia com a espécie e é tecido específica, indicando que cada isoforma exibe uma função particular associada com o tecido no qual esta sendo expressada (Orlowski e Lingrel, 1988; Gick et al., 1993; Juhaszova e Blaustein, 1997; Mobasheri et al; 2000). Além disso, recentes pesquisas demonstram que a distribuição e o local de expressão das isoformas da Na⁺K⁺-ATPase pode variar, inclusive, no interior de uma mesma célula. Por exemplo, a isoforma α_1 , que se distribui uniformemente na membrana plasmática dos neurônios, astrócitos e miócitos da artéria mesentérica.

Ao contrário da α_3 (presente em neurônios e miócitos arteriais) e α_2 (presente em astrócitos, miócito arterial) que parecem estar confinadas a microdomínios na

membrana plasmática, adjacentes a elementos periféricos ou juncionais do retículo sarcoplasmático, como trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, canais para K^+ e canais operados por estoque (Juhaszova e Blaustein, 1997; Arnon et al., 2000; Xie e Cai, 2003).

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

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

1.3.1.2 A subunidade glicosilada β

A subunidade β foi identificada por Brotherus et al. (1983) em preparações experimentais nas quais se realizava purificação enzimática da Na^+K^+ -ATPase. Ela possui um pequeno domínio N-terminal citoplasmático, um segmento único que atravessa a membrana e um grande domínio extracelular C-terminal. O domínio transmembrana é hidrofóbico, altamente glicosilado e possui 3 anéis de bissulfeto que se ancoram na superfície da membrana (Farley et al., 1986; Chow e Forte, 1995). Também são encontrados sítios para ligação com o K^+ na porção extracelular desta subunidade. Assim, Hiatt et al. (1984) postularam que ela serviria para orientar e estabilizar a subunidade alfa na membrana, facilitando o seu ancoramento e participaria também, na mudança conformacional da Na^+K^+ -ATPase dependente da ligação com o K^+ . Assim, quando os íons K^+ ligam-se aos sítios da subunidade β , há uma mudança conformacional da Na^+K^+ -ATPase do estado E1 para o E2, sendo que este último estado, seria considerado a conformação mais estável da Na^+K^+ -ATPase, visto que os anéis de bissulfeto estariam mais fortemente ligados à membrana. Além disso, a Na^+K^+ -ATPase no estado conformacional E2 apresenta-se desfosforilada, e a subunidade β seria a responsável pela oclusão à passagem de K^+ (McDonough et al., 1990; Chow et al., 1992; Chow e Forte, 1995; Pontiggia e Gloor, 1997).

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

1.3.1.3 A subunidade regulatória γ

Em mamíferos, a família de proteínas da membrana celular chamadas de FXYP contém sete membros, dentre elas estão a FXYP₁ (ou phospholemman); e FXYP₂ (conhecida como subunidade gama da Na^+K^+ -ATPase) (Mercer et al; 1993);

Além da modulação da Na^+K^+ -ATPase por neurotransmissores e hormônios, evidências experimentais demonstram um mecanismo regulador que envolve a interação da Na^+K^+ -ATPase da membrana com estas pequenas proteínas da família FXYP. Em contraste com a regulação hormonal, as proteínas FXYP não produzem uma mudança na expressão Na^+K^+ -ATPase, mas sim modificam suas propriedades de transporte de forma tecido e isoforma-específicas (Geering, 2006).

A FXYP₂ ou subunidade gama pode aumentar a afinidade da Na^+K^+ -ATPase ao K^+ quando o potencial de membrana está negativo, tanto na presença, quanto na ausência de Na^+ extracelular. Por outro lado, esta proteína diminui a afinidade da Na^+K^+ -ATPase ao K^+ em potenciais de membrana menos negativos, mas apenas na presença de Na^+ extracelular. Isto sugere uma influência desta proteína na mudança de conformação da Na^+K^+ -ATPase. A FXYP₂ também é descrita por aumentar a afinidade da Na^+K^+ -ATPase pelo ATP e assim, regular a atividade da bomba (Therien et al; 1997; Therien et al; 1999; Geering, 2006).

Para compreender um dos papéis funcionais propostos para a subunidade γ , em relação à atividade da Na^+K^+ -ATPase, deve-se considerar o estudo de Aw e Jones (1985). Eles observaram, pelo método de captação de rubídio, em hepatócitos que há relação entre a hipóxia e a diminuição da atividade da Na^+K^+ -ATPase.

Estudos recentes mostraram também que mesmo em organismos normais, livres de doença, ao menos um tecido, como o da medula renal, deve funcionar sob as circunstâncias próximas a hipóxia (Brezis e Rosen, 1995). Um exemplo é o caso da maioria dos segmentos do néfron, onde a reabsorção da água e a secreção de soluto, estão sob o controle da Na^+K^+ -ATPase. Como a contínua atividade desta enzima é crucial para a função apropriada dos rins, a existência de um regulador reversível da afinidade do ATP à Na^+K^+ -ATPase, como a isoforma γ , permitiria o ajuste fino da atividade da Na^+K^+ -ATPase sob circunstâncias onde o ATP estivesse esgotado (Therien e Blostein, 2000; Cortes et al., 2006).

1.3.2 Mecanismos de regulação da Na⁺K⁺-ATPase

1.3.2.1 Eventos que envolvem a sinalização das ações hormonais

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

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

Outras evidências sugerem que os mensageiros intracelulares podem também afetar a atividade da Na⁺K⁺-ATPase através de um mecanismo importante de regulação chamado de fosforilação. Assim, muitos hormônios que regulam a atividade da Na⁺K⁺-ATPase o fazem através de mecanismos que modulam a atividade de um grupo de cinases, fosfolipases e fosfatases (Frasen, 2005). Dependendo do tecido, a ativação de cinases pode induzir um aumento ou uma diminuição na atividade da Na⁺K⁺-ATPase. Os agentes que aumentam o 3', 5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) intracelular conduzem à inibição Na⁺K⁺-ATPase em MLV da aorta (Borin, 1995; Therien e Blostein, 2000). A pesquisa de Borin (1995) forneceu diversas evidências de que, células de MLV de aorta de ratos, estimuladas por diferentes agentes que aumentam o AMPC, como 3,5 - monofosfato cíclico, 8 - bromoadenosina (8-BrcAMP – análogo do AMPC), a combinação do forskolin (estimulador do AMPC) e do 3 - isobutil-1-metilxantina (IBMX –inibidor da fosfodiesterase), e o isoproterenol, causam um aumento do Na⁺ intracelular mediado pela inibição da Na⁺K⁺-ATPase. Assim, o aumento de AMPC ativa a proteína cinase A (PKA) , que por sua vez, pode fosforilar a subunidade α da Na⁺K⁺-ATPase, inibindo-a de forma direta, ou estimular a fosfolipase A₂ e aumentar a liberação de produtos da via do ácido araquidônico, como a Prostaglandina E₂ (PGE₂), que também podem inibir a atividade da Na⁺K⁺-ATPase. Funcionalmente, a inibição da

Na^+K^+ -ATPase pode levar a um aumento da resposta a agentes vasoconstritores e a um aumento do tônus vascular (Sato et al., 1993; Borin, 1995; Blanco e Mecer, 1998; Therien e Blostein, 2000; Chen et al., 2005).

A fosforilação da subunidade α da Na^+K^+ -ATPase é reversível. Isto sugere que um evento de fosforilação/desfosforilação pode dinamicamente regular a atividade da Na^+K^+ -ATPase (Therien e Blostein, 2000).

Além disso, a proteína cinase C (PKC) também regula a atividade da Na^+K^+ -ATPase, embora sua participação neste processo ainda seja controversa. Os resultados das pesquisas demonstram informações contraditórias, mas sabe-se que a função da PKC depende da isoforma estudada, da concentração de Ca^{+2} e da espécie do animal. Contudo, Chen et al. (2005) verificaram que a PKC inibe a atividade da Na^+K^+ -ATPase no MLV de aortas de ratos, enquanto Lahaye et al., (1998) observaram que no mesmo tecido e animal, a PKC aumentava a atividade da Na^+K^+ -ATPase através da fosforilação da subunidade α (Beguin et al., 1994; Therien e Blostein, 2000). Além disso, Beguin et al. (1996) mostraram em seus estudos que a PKC é capaz de fosforilar a isoforma α_2 e, de forma menos intensa, a isoforma α_1 , em tecidos de rato.

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

O GMPc está envolvido na ativação da Na^+K^+ -ATPase na aorta e em artérias de mamíferos (Ferrer et al; 1995). O mecanismo de ativação de PKG parece envolver a ativação da guanilato ciclase pelo óxido nítrico. O aumento de NO, através da ativação hormonal ou incubação com doadores de NO, tais como nitroprussiato de sódio, podem aumentar a concentração de GMPc em culturas de células musculares lisas vasculares de aorta (Ferrer et al; 1995). Não é possível afirmar ainda se a PKG regula a bomba através de moduladores secundários ou por fosforilação direta da bomba. O GMPc parece estimular a Na^+K^+ -ATPase, aumentando indiretamente o fluxo de Na^+ através do co-transportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ (O'Donnell et; 1987).

Por estas vias descritas acima os estímulos fisiopatológicos desencadeiam aumento ou diminuição da atividade da Na^+K^+ -ATPase. Portanto, mudanças nas condições do meio celular, como a concentração iônica de substratos (Na^+ , K^+ e

ATP) e a secreção de hormônios, podem alterar o transporte transmembrana e modular a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$.

1.3.2.2 Regulação da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ por íons e ATP

Um importante regulador da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ é o íon Na^+ , que se liga aos sítios intracelulares desta proteína. Pequenas mudanças na concentração citoplasmática de Na^+ secundárias a ativação de vários transportadores ou canais para Na^+ possuem um efeito intenso sobre a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$. Muitos hormônios alteram a atividade desta proteína através da mudança na sua afinidade ao Na^+ . Além dos efeitos diretos sobre a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$, também são atribuídos aos íons Na^+ , mecanismos de super-expressão e aumento da densidade destas proteínas na membrana (Therien e Blostein, 2000; Aperia, 2001). Um exemplo pode ser observado nos estudos de Liu e Songu-Mize (1998), onde a elevação da concentração de Na^+ intracelular, aumentou a expressão das isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$, e foi responsável pelo aumento da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ em cultura de MLV de aorta.

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

Em relação ao ATP, sabe-se que variações na concentração e na afinidade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ a este nucleotídeo podem constituir um relevante mecanismo de regulação da atividade desta proteína, principalmente em tecidos que trabalham sob

condições hipóxicas, como a medula renal (Soltoff e Mandel, 1984; Brezis e Rosen, 1995).

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

1.3.2.3 Hormônios na regulação da Na^+K^+ -ATPase

A aldosterona, produzida pelo córtex da supra renal, possui efeitos genômicos e não-genômicos sobre a Na^+K^+ -ATPase. A curto prazo (efeitos não genômicos) Alzamora et al. (2003) demonstraram que a aldosterona possui um efeito transiente inibitório sobre a atividade desta enzima. Quando células de MLV de aorta foram estimuladas pela aldosterona, nos primeiros 20 minutos, houve uma diminuição da atividade da Na^+K^+ -ATPase, que foi inibida por bloqueadores da PKC e não foi afetada quando bloqueadores da transcrição ou translação foram utilizados. Sugerindo assim, que os efeitos não-genômicos da aldosterona sobre a Na^+K^+ -ATPase incluiriam o aumento do Ca^{+2} intracelular, a via do 1, 4, 5 – inositol trifosfato (IP_3) e da PKC, além de mecanismos envolvendo o sistema de microtúbulos. Um dos efeitos, a longo prazo (genômicos), da aldosterona sobre a Na^+K^+ -ATPase é o aumento da sua expressão em MLV de aorta. Oguchi et al. (1993) foram os primeiros a demonstrar, por exemplo, que $\alpha 1$, mas não $\alpha 2$ e $\alpha 3$, está super-expressada em cultura de MLV de aortas estimulada pela aldosterona (Oguchi et al., 1993; Michea et al., 1998; Therien e Blostein, 2000).

Ao contrário, a dopamina, uma catecolamina sintetizada nos túbulos proximais dos rins, inibe a atividade da Na^+K^+ -ATPase no MLV de artérias aorta (Rashed e Songu-Mize, 1996) e da cauda de ratos (Rashed e Songu-Mize, 1995). Nos rins, ela representa um importante mecanismo fisiológico de regulação da

reabsorção de sal durante o aumento da ingestão de Na^+ e envolve vias dependentes de PKC (Therien e Blostein, 2000).

Já as catecolaminas, como a norepinefrina, possuem ações contraditórias e dependentes do tecido estudado. Sabe-se contudo, que atuam por dois mecanismos: efeito direto sobre a Na^+K^+ -ATPase; efeito via estimulação α e β -adrenérgica, através de receptores na membrana celular. Nos vasos sanguíneos, já na década de 80, Vanhoutte e Lorenz (1984) descreveram o efeito inibidor da norepinefrina sobre a Na^+K^+ -ATPase e seu papel na contratilidade vascular.

A insulina é um hormônio peptídico que regula os estoques de glicose e possui uma importante ação na homeostase do K^+ , através da modulação da Na^+K^+ -ATPase. Ela é capaz de ativar a Na^+K^+ -ATPase em aorta de coelhos, de forma independente do NO derivado do endotélio e provavelmente, esta ativação é mediada pelo aumento da atividade da PKC (Gupta et al., 1996; Therien e Blostein, 2000). Davel et al. (2000) estudaram a atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase no leito caudal da ratos diabéticos e verificaram que a diminuição da insulina diminui a atividade desta proteína, o que leva a um aumento da reatividade vascular e da pressão arterial.

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

1.3.2.4 Fatores vasoativos derivados do endotélio na regulação da Na^+K^+ -ATPase

Sabe-se que o óxido nítrico (NO) é um fator de relaxamento do MLV, com meia-vida curta, produzido por muitas células a partir do aminoácido L-arginina que é metabolizado em NO e L-citrulina. A enzima óxido nítrico sintase (NOS) cataliza esta reação e possui co-fatores como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida da NADPH), tetrahydrobiopterina (BH_4), flavina adenina de nucleotídeo (FAD) e a flavina mononucleotídeo (FMN) (Furchgott e Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1987; Angus e Cocks, 1989; Moncada et al., 1991; Behrendt e Ganz, 2002). Vários estímulos são capazes de induzir a liberação de NO pelo endotélio.

Dentre eles, podem ser citados, por exemplo, o estresse de cisalhamento promovido pelo atrito entre o fluxo sanguíneo e a parede vascular (“*shear stress*”), estiramento vascular, agregação plaquetária, serotonina (5-HT), ACh, bradicinina, trombina, substância P, ADP, endotelina-1 e angiotensina II (Moncada et al., 1991; Songu-Mize et al., 2001; Behrendt e Ganz, 2002). Ele se difunde para o MLV e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, que catalisa a reação de transformação do 5`-trifosfato de guanosina (GTP) em GMPc. O aumento de GMPc ativa a PKG que é responsável pela fosforilação de várias proteínas e pelo relaxamento do MLV, através da diminuição da concentração intracelular de Ca^{+2} (Rapoport e Murad, 1984; Ignarro e Kadowitz, 1985). Sabe-se que a remoção do endotélio inibe a atividade da $Na^{+}K^{+}$ -ATPase. Além disso, o papel do endotélio intacto na manutenção da atividade basal da $Na^{+}K^{+}$ -ATPase é inibido por um inibidor “não-seletivo” da NOS (L-NAME) (Rossoni et al., 2003; Dos Santos et al., 2003; Chen et al., 2005).

Portanto, o NO é considerado um estimulador da atividade da $Na^{+}K^{+}$ -ATPase. Um dos mecanismos propostos para o NO ativar a $Na^{+}K^{+}$ -ATPase e promover o relaxamento do MLV é o aumento dos níveis intracelulares de GMPc (Rapoport et al., 1985). Porém, Gupta et al., (1994) propuseram que o mecanismo de ativação da $Na^{+}K^{+}$ -ATPase ocorreria por uma via independente do aumento do GMPc. Como no MLV, a atividade da $Na^{+}K^{+}$ -ATPase é estimulada por agonistas que aumentam a concentração intracelular de Na^{+} , o trocador $Na^{+}H^{+}$, o principal responsável pelo influxo de Na^{+} nos vasos sanguíneos, poderia participar da regulação da atividade da $Na^{+}K^{+}$ -ATPase.

Assim, as hipóteses para o mecanismo de ativação da $Na^{+}K^{+}$ -ATPase seria o próprio NO ativá-la, ou a estimulação do trocador $Na^{+}H^{+}$ pelo NO, o que aumenta a concentração intracelular de Na^{+} , ativando a $Na^{+}K^{+}$ -ATPase, promovendo assim, relaxamento vascular (Ando et al., 1991; Gupta et al., 1994).

Dentre os fatores derivados do endotélio, a endotelina é um polipeptídeo, sintetizado pelas células endoteliais que possui, principalmente, ação vasoconstritora. Além disso, a endotelina promove retenção de sódio e água, ativação do SNS e do SRAA, exerce estímulo proliferativo sobre os músculos lisos, miócitos e fibroblastos. Sob condições fisiológicas, sua concentração plasmática é baixa (Yanagisawa et al., 1988; Attina, 2005). Sua liberação é estimulada por muitos fatores, tais como o “*shear stress*”, hipóxia, epinefrina, Angiotensina II, cortisol, trombina, citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-2) e o fatores de crescimento

(Haynes e Webb, 1998). Três isopeptídeos da endotelina já foram identificados, a endotelina-1, -2, -3. Suas ações são realizadas através da interação com receptores ET_A e ET_B . A estimulação destes receptores aumenta a concentração de cálcio intracelular, produzindo vasoconstrição. A endotelina-1 liga-se aos receptores ET_A que são expressados preferencialmente nos MLV produzindo contração. Já os receptores ET_B , podem se ligar a endotelina-1, -2, e -3. Eles são expressados no endotélio vascular, e quando ativados, estimulam a liberação de NO e prostaciclina pelo endotélio (Masaki e Vane, 1994; Pinet, 2004). Os receptores de endotelina estão acoplados à fosfolipase C, via proteína G regulatória, e quando ativados, aumentam a formação de 2º mensageiros como IP_3 e diacilglicerol (DAG), e ativam a PKC (Takuwa et al., 1990). Então, Gupta et al. (1991) observaram em seus experimentos que a endotelina estimula a atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à ouabaína em aorta de coelhos. Sugerindo que esta estimulação era resultado do aumento da atividade do trocador Na^+H^+ e do co-transporte $Na^+K^+Cl^-$, mediada pela PKC.

A angiotensina II é um octapeptídeo, biologicamente ativo, integrante do SRAA, produzido por uma série de reações químicas ocorridas na circulação. Seu efeito vasoconstritor é possível via ativação dos receptores AT_1 e AT_2 , presentes no MLV. As alterações da permeabilidade ao Na^+ parecem estar envolvidas na vasoconstrição induzida pela angiotensina II. O aumento da concentração de Na^+ no banho, com anéis de aorta, potencializa a contração induzida pela angiotensina II nestes vasos. E a diminuição da concentração de Na^+ no banho que perfunde artérias caudais, diminui a contração induzida pela angiotensina II (Moore e Khairallah, 1979). Já em 1982, Brock et al. relatavam que havia um aumento da permeabilidade ao Na^+ e um aumento da atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase, em cultura de MLV de aorta estimulada por angiotensina II. Entretanto, os mecanismos implicados na ação da angiotensina II sobre o MLV ainda não podiam ser elucidados. Em 2004, Isenovic et al. propuseram que a angiotensina II, estimula a atividade da Na^+K^+ -ATPase do MLV, através dos receptores AT_1/AT_2 , via sinalização do IP_3 e da proteína cinase serina/treonina (p42/44MAPK), possibilitando uma “*up-regulation*” da transcrição do gene da subunidade catalítica α_1 da Na^+K^+ -ATPase. Além disso, propuseram que a sustentação do efeito constritor da Angiotensina II sobre o MLV via Na^+K^+ -ATPase, envolveria o trocador Na^+/H^+ . Como a angiotensina II é um fator tecidual com produção autócrina/parácrina, que pode ter seus níveis

alterados na presença de diversas doenças, a regulação da Na^+K^+ -ATPase pela angiotensina II assume uma importância fisiológica na manutenção da homeostase, por exemplo através do controle do tônus vascular (Brock et al., 1982; Isenovic et al., 2004).

As prostaglandinas, derivadas do endotélio, também participam da regulação da atividade da Na^+K^+ -ATPase. Elas podem induzir a um aumento ou a uma diminuição da atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase, de acordo com o tecido, a espécie animal estudada e o tipo de prostaglandina. PGE_2 , por exemplo, age estimulando a atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase e induzindo um aumento no relaxamento em artérias coronárias de grande e pequeno calibre em porcos (Fukuda et al., 1992). Lockette et al. já em 1980 demonstraram que a vasodilatação induzida pelas prostaglandinas era causada pela ativação da Na^+K^+ -ATPase. Então, em suas pesquisas com anéis de artéria caudal, em solução livre de K^+ , eles observaram que a prostaglandina A_1 (PGA_1), PGE_2 e prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) aumentavam a magnitude do relaxamento do MLV. O relaxamento do MLV induzido pela PGE_2 foi inibido quando adicionou-se ouabaína ao banho e a indometacina reduziu o relaxamento 30% em relação ao grupo controle (Lockette et al., 1980). Ao contrário, Satoh e Karaki em 1988, sugeriram que a contração da aorta induzida pela ouabaína e pela solução livre de K^+ , não se devia somente a despolarização da membrana e ao trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, mas também à liberação de prostaglandinas.

1.3.2.5 Regulação da Na^+K^+ -ATPase através dos seus inibidores endógenos

Os glicosídeos digitálicos são utilizados há mais de dois séculos para o tratamento da IC. Sua função clássica é a inibição da Na^+K^+ -ATPase que afeta vários tipos de células e regula diversos processos fisiológicos e patológicos (Blaustein, 1993; Schoner, 2002). Os bufodienolídeos, cardenolídeos e a ouabaína (OUA) são exemplos de glicosídeos cardiotônicos sintetizados por plantas e utilizados, por egípcios, chineses, romanos e algumas tribos africanas para o controle de pragas, envenenamentos e propostas terapêuticas. Nas décadas de 60, 70 e 80 várias pesquisas foram realizadas com o objetivo de estudar a ação e a origem de uma substância, semelhante a OUA, presente no plasma sanguíneo de animais submetidos à expansão aguda de volume, que ao ser colocada em contato

com o plasma de animais normotensos, reduzia a atividade da Na^+K^+ -ATPase nos mesmos (Buckalew et al., 1970; Overbeck et al., 1976; Hamlyn et al., 1982). Mais tarde, foi demonstrado que o fator endógeno *digitalis-like*, presente no plasma de humanos, possuía características bioquímicas, imunológicas e fisiológicas semelhantes as da OUA (Ludens et al., 1991; Mathews et al., 1991; Bova et al., 1991). A OUA desde então é descrita como uma substância endógena presente no plasma de vários mamíferos, inclusive em humanos, produzida pelo córtex da supra-renal, pela região hipotalâmica e pela região anteroventral do terceiro ventrículo (Pamnani et al., 1981; Songu-Mize et al., 1982; Morgan et al., 1985; Hamlyn et al., 1991; Schoner, 2000).

A OUA é descrita por inibir a atividade da Na^+K^+ -ATPase (Skou e Esmann, 1992; Schoner, 2002) e assim, aumentar o tônus vascular. Logo, é importante saber os mecanismos pelos quais a OUA interfere no funcionamento da Na^+K^+ -ATPase. No MLV, a ouabaína plasmática liga-se à subunidade α da Na^+K^+ -ATPase inibindo sua atividade (Fedorova e Bagrov, 1997), elevando a concentração intracelular de Na^+ ($[\text{Na}^+]_{\text{cit}}$). Logo, a membrana é despolarizada e o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ reduz sua atividade, aumentando a concentração de Ca^{+2} no citosol ($[\text{Ca}^{+2}]_{\text{cit}}$) (Blaustein, 1977; Blaustein, 1993; Nishimura, 2006). O retículo sarcoplasmático (RS) então seqüestra rapidamente boa parte deste $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{cit}}$ permitindo que uma maior quantidade de Ca^{+2} seja estocada e possa ser mobilizada para a contração da célula. Estas etapas são verificadas nas concentrações de ouabaína de 1-1000 μM e induzem a contração do MLV e aumento da reatividade vascular (Blaustein, 1993; Arnon et al., 2000; Lynch et al., 2008; Pritchard et al., 2010).

Porém, um grande enigma é que em concentrações nanomolares de ouabaína (1-100 nM) também há aumento da contração do MLV (Weiss et al., 1993; Vassallo et al., 1997), indução de hipertensão (Rossoni et al., 2001) em ratos, mas com pequena ou nenhuma modificação da $[\text{Na}^+]_{\text{cit}}$ (Levi et al., 1994). Recentes trabalhos têm contribuído para esclarecer este processo. Por exemplo, foram demonstradas regiões na membrana plasmática, próximas ao RS e ao trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, que apresentavam alta afinidade à OUA. Os chamados “microdomínios da membrana plasmática”, descritos no MLV de artérias de ratos (Juhaszova e Blaustein, 1997) e em outros tipos de células. Eles poderiam mediar os efeitos cardiotônicos das baixas concentrações de OUA (Han et al., 2006). Nestes microdomínios, foram encontradas, em grande quantidade, as subunidades α_2 e α_3

da Na^+K^+ -ATPase, que possuem alta afinidade à OUA (Juhaszova e Blaustein, 1997; Xie e Cai, 2003). Além disso, verificou-se que no pequeno compartimento entre a membrana plasmática e a membrana do RS juncional uma elevada concentração de Na^+ não correspondia a uma elevação da $[\text{Na}^+]_{\text{cit}}$ (Wendt-Gallitelli et al., 1993).

Varias evidências também foram demonstradas de que a entrada e a saída de Ca^{+2} , bem como a modulação dos estoques do RS, era realizada nesta região (Van Breemen et al., 1995). Estas unidades funcionais seriam análogas às tríades e as diades do músculo esquelético e cardíaco, e foram chamadas de *plasmersomes* (Blaustein e Lederer, 1999). Contudo, a hipótese mais aceita é que doses nanomolares de OUA, inibiriam as subunidades $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da Na^+K^+ -ATPase e, conseqüentemente, aumentariam concentração de Na^+ nos *plasmersomes*, sem ocorrer aumento da $[\text{Na}^+]_{\text{cit}}$. Assim, a extrusão de Ca^{+2} pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ estaria inibida, aumentando a $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{cit}}$ local. O aumento de $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{cit}}$ nos *plasmersomes*, poderia aumentar a $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{cit}}$ global através da sensibilização dos receptores IP_3 ou pelo aumento do conteúdo de Ca^{+2} no RS (Arnon et al., 2000).

Portanto, a ouabaína tanto em baixas quanto em elevadas concentrações, pode regular a atividade da Na^+K^+ -ATPase e auxiliar no controle da concentração iônica de Na^+ e Ca^{+2} , participando do aumento da resistência periférica, do controle do tônus vascular e do fluxo sanguíneo (Juhaszova e Blaustein, 1997; Arnon et al., 2000).

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

renais; 3) promover vasoconstrição, mantendo ou aumentando a PA, através da inibição da Na^+K^+ -ATPase no MLV. Estas possíveis conseqüências da inibição da Na^+K^+ -ATPase explicam a importância dos glicosídeos cardíacos em pacientes com IC e sugerem que a deficiência de ouabaína endógena pode exacerbar a doença (Gottlieb et al., 1992).

1.4 FISIOLOGIA DOS CANAIS PARA POTÁSSIO DO MÚSCULO LISO VASCULAR

O potássio (K^+) é o íon mais abundante no meio intracelular. A manutenção de um gradiente transmembrana de Na^+ e K^+ é garantida pelo transporte ativo realizado pela Na^+K^+ -ATPase e proporciona energia para várias funções celulares essenciais como o controle do potencial de membrana (P_m), volume celular e pH. Como nas células mantém-se uma concentração intracelular de K^+ muito maior que a concentração extracelular, a abertura dos canais para K^+ induz a uma alteração do P_m em direção a valores mais negativos (repolarização ou hiperpolarização) (Haddy et al; 2006). Desta forma, os canais para K^+ desempenham papel chave na regulação do tônus do músculo liso vascular e, conseqüentemente do fluxo sanguíneo (Jackson, 2005; Haddy et al; 2006).

As células do músculo liso vascular (CMLV) possuem um aparato contrátil capaz de integrar várias vias de sinalização intracelular e possibilitar alteração do diâmetro e resistência hidráulica dos vasos sanguíneos (Jackson, 2000). A abertura dos canais para K^+ da membrana das CMLV aumenta o efluxo de K^+ , que ocasiona hiperpolarização do P_m . Em um P_m mais negativo os canais para Ca^{+2} voltagem-dependentes fecham-se diminuindo a entrada de cálcio, promovendo a vasodilatação. Ao contrário, quando os canais para K^+ são inibidos há uma despolarização da membrana celular que ocasiona a abertura dos canais para Ca^{+2} . Desta forma, há um aumento da concentração de cálcio intracelular que causa vasoconstrição (Nelson e Quayle, 1995; Sobey, 2001; Ko *et al*; 2008; Lloyd et al; 2009).

O P_m das CMLV, *in vitro*, esta entre -40 e -60 mV quando estas células estão submetidas a uma pressão intravascular normal. O P_m do MLV primariamente regula a contratilidade através da alteração do influxo de cálcio pelos canais para Ca^{+2}

voltagem-dependentes. Contudo, o P_m pode também regular a entrada de Ca^{+2} através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, bem como pode influenciar a liberação de Ca^{+2} através da produção de trifosfato de inositol. Uma despolarização ou hiperpolarização de 3 mV do potencial de membrana da CMLV, respectivamente pode duplicar, ou reduzir a metade a entrada de Ca^{+2} para o sarcoplasma. Desta forma, qualquer agente farmacológico ou fisiológico que alterar o P_m da CMLV poderá ocasionar uma alteração significativa no diâmetro do vaso sanguíneo (Nelson e Quayle, 1995).

A atividade contrátil das células do músculo liso vascular presentes em pequenas artérias e arteríolas é então considerada como o maior determinante da resistência ao fluxo sanguíneo. Assim, o tônus vascular influencia o controle da pressão arterial e a distribuição de sangue entre e dentro dos órgãos e tecidos (Jackson, 2000). Uma excessiva ativação dos canais para K^+ pode estar envolvida, por exemplo, na hipotensão durante o choque endotóxico (Landry e Oliver, 1992). Por outro lado, a inibição dos canais para K^+ causa despolarização levando a vasoconstrição, vasoespasmo ou pode comprometer a capacidade do vaso de dilatar-se (Nelson and Quayle, 1995). Então, alterações na função dos canais para K^+ do MLV podem estar envolvidas na gênese de doenças como hipertensão arterial sistêmica (Sobey, 2001; Callera et al; 2004), diabetes (Kamata *et al*; 1989), hipotensão durante o choque endotóxico (Landry e Oliver, 1992), infarto do miocárdio (Terata et al; 2000) e insuficiência cardíaca (Yildiz, 2007).

1.4.1 Tipos de canais para potássio do músculo liso vascular

No MLV são expressas três famílias de canais para K^+ que regulam o tônus vascular. Cada família caracteriza-se por um número de domínios transmembrana para cada subunidade protéica. A primeira família apresenta-se com 2 domínios transmembrana para cada subunidade protéica e inclui os canais para K^+ retificadores de influxo (K_{IR}) e os canais para K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}). A segunda família possui seis ou sete domínios transmembrana por subunidade protéica e inclui canais para K^+ ativados por cálcio (K_{Ca}) e os canais para potássio sensíveis à voltagem (K_{V}). Nestas duas famílias existe um poro, que é o local em que o K^+ move-

se através do canal (Bryan et al; 2007; Lloyd et al; 2009).

Para formar um canal funcional em uma destas duas famílias, quatro subunidades alfa precisariam reunir-se para estabelecer um poro permeável, ou seja, uma unidade funcional completa precisaria de quatro poros. Antes de 1996, todos os canais para K^+ conhecidos em mamíferos eram classificados nestas duas diferentes famílias de acordo com o número de domínios transmembrana e poros formados na subunidade alfa (Bryan et al; 2007). Recentemente, uma terceira família de canais para K^+ foi descoberta e caracterizada em humanos. Ela apresenta-se com quatro domínios transmembrana e dois poros para cada subunidade protéica. Membros desta nova família são codificados por 15 genes e tem recebido o nome de canais para K^+ com dois poros por domínio (K_{2P}) (Ketchum et al; 1995; Lesage et al; 1996).

Os principais métodos de avaliação dos canais para K^+ do MLV descritos na literatura envolvem principalmente: 1) a utilização de anéis isolados de artérias e arteríolas, para avaliar o papel funcional dos canais para K^+ nas alterações da força isométrica, ou nas alterações do diâmetro de artérias pressurizadas (Callera et al. 2004); 2) as técnicas eletrofisiológicas utilizadas com a finalidade de mensurar as correntes de K^+ através de um canal, ou através de toda a membrana (Nelson e Quayle, 1995; Tamaro et al; 2004); 3) utilização de camundongos transgênicos, a fim de compreender as alterações fenotípicas (disfunção do MLV e hipertensão arterial) que podem ocorrer a partir da manipulação genética destes canais (Köhler e Ruth, 2010); 4) a técnica de *Western blot*, a fim de avaliar a expressão protéica das isoformas dos canais para K^+ nos tecidos (Cox et al; 2001); e 5) as técnicas para localizar os canais para K^+ , através de anticorpos específicos, em uma célula (imunocitoquímica) ou em um tecido (imunohistoquímica) (Tamaro et al; 2004).

Durante a realização de alguns dos protocolos experimentais descritos acima fármacos agonistas e antagonistas dos canais para K^+ podem ser utilizados. Os principais fármacos descritos na literatura capazes de influenciar o funcionamento dos canais para K^+ serão abordados juntamente com os tópicos específicos relacionados a cada canal.

1.4.1.1 Canais de K⁺ voltagem dependentes (K_v)

Os K_v abrem-se quando o *Pm* da célula é despolarizado (aproximadamente -35 a -55 mV). Estes canais são extremamente importantes na fase de repolarização do *Pm* das células excitáveis (Yellen, 2002). Contudo, muitas células de MLV que não geram potencial de ação, respondem aos estímulos despolarizantes do *Pm* através do efluxo de K⁺ por estes canais. Desta forma, os canais para Ca⁺² se fecham, diminui a concentração de Ca⁺² intracelular, resultando em vasodilatação (Nelson e Quayle, 1995; Sobey, 2001). A função de Kv estaria então relacionada a limitação da despolarização e a manutenção do potencial de repouso da membrana celular com conseqüente controle do tônus vascular.

Os Kv são canais que apresentam estrutura tetramérica composta por seis domínios transmembrana (S1-S6) que formam a subunidade α . Estes domínios apresentam uma terminação amino e uma terminação carboxi no meio intracelular. O domínio S4 forma o sensor de voltagem deste canal. Enquanto a região chamada H5 ou poro, por onde o canal é permeável ao K⁺, é formada por sequências de S5-S6. Na arquitetura deste canal ainda está presente uma subunidade β que possivelmente serve para ancorar o canal à membrana (Nelson e Quayle, 1995; Yellen, 2002).

Várias subfamílias de K_v tem sido identificadas e são expressas em CMLV de diversos vasos (Nelson e Quayle, 1995; Cox et al; 2001; Tammaro et al; 2004). Mais de 30 diferentes genes estão relacionados a famílias de Kv. Conseqüentemente, há uma potencial diversidade na composição molecular e nas propriedades dos possíveis complexos de Kv que podem ser produzidos por heteromultimerização e *splicing* (Yellen, 2002; Cox, 2005). Recentemente, Tammaro et al. (2004) sugeriram em seu trabalho que Kv2.1 seria o maior responsável pelas as correntes de K⁺ em aorta de ratos. Estes pesquisadores atribuíram a esta isoforma a capacidade de modulação da atividade contrátil da aorta. Diferentes subunidades já foram encontradas em artéria pulmonar (Kv_{1.1}, Kv_{1.2}, Kv_{1.4}, Kv_{1.5}, Kv_{1.6}, Kv_{2.1} e Kv_{9.3}) (Standen e Quayle, 1998).

Os vários canais expressos no MLV apresentam diferenças na voltagem de ativação e inativação, na sensibilidade a inibidores e na condutância. Os Kv do MLV são descritos na literatura apresentando condutância desde pequena (4 – 8 pS) até grande (70 – 140 pS). A despolarização da membrana celular é capaz de ativar os

Kv quando o P_m atinge aproximadamente -35 a -55 mV (Sobey, 2001). Contudo, em artéria coronária e cerebral de coelhos o ponto médio da máxima ativação do Kv é, respectivamente -6 e -9 mV. Por outro lado, a inativação destes canais alcançaria um ponto médio da máxima inativação entre -25 a -45 mV. Isto se deve a diferenças dependentes da expressão de determinadas isoformas de Kv em diferentes vasos e a espécies (Nelson e Quayle, 1995; Ko et al; 2008).

A utilização de inibidores é imprescindível para a compreensão das propriedades e funcionamento dos canais iônicos. 4-Aminopridina (4-AP) é o mais seletivo inibidor dos K_v no MLV. Na concentração de 0,2 a 1,1 mM a 4-AP tem sido demonstrada capaz de inibir seletivamente os K_v do MLV produzindo metade da resposta máxima. Nesta concentração, 4-AP não é capaz de inibir K_{Ca} e K_{IR} , sendo possível desta forma avaliar os K_v seletivamente (Nelson e Quayle, 1995; Callera et al; 2004; Jackson, 2005). Outros agentes inibidores de K_v incluem quinidina (30 μ M), fenciclidina (30 μ M), correolide (1-10 μ M) e o tetraetilânionio (TEA) que inibe de forma não seletiva todos os canais para K^+ com concentrações acima de 5 mM (Nelson e Quayle, 1995; Jackson, 2005; Ko et al; 2008).

As vias de sinalização envolvidas na ativação dos K_v incluem: a proteína quinase A (PKA) dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que está relacionada ao mecanismo de ação de vasodilatadores semelhantes a adenosina, prostaglandina 2 (PGI_2) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP); o NO via guanosina monofosfato cíclico (GMPc); e a diminuição do pH, que é descrito ativando os K_v em miócitos de coronária. As vias de inativação dos canais que tendem a fechá-los envolvem: a proteína quinase C (PKC); o aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular; bem como, as Rho quinases (Sobey, 2001; Luykenaar et al; 2004; Jackson, 2005).

1.4.1.2 Canais de K^+ ativados por cálcio (K_{Ca})

Os K_{Ca} são definidos como canais ativados pelo aumento da concentração intracelular de cálcio. Contudo, estes canais também aumentam sua atividade com a despolarização e por ação de alguns estímulos vasodilatadores. Os K_{Ca} são

divididos em canais para K^+ de larga condutância (BK_{Ca} : 200 – 250 pS) e de baixa condutância (SK_{Ca} : 10 - 40 pS) (Nelson e Quayle, 1995; Ko et al; 2008).

1.4.1.2.1 Canais de K^+ ativados por cálcio de larga condutância (BK_{Ca})

Os BK_{Ca} são chamados canais para K^+ ativados por cálcio de larga condutância e descritos na literatura como canais “*big*” ou “*Maxi*”. A subunidade alfa deste canal possui 11 domínios transmembrana (S0 – S10). De forma similar aos outros canais para K^+ , a região S4 forma o sensor deste canal, bem como a região do poro é formada pela junção de 4 subunidades alfa e está localizada nos domínios S5 – S6. Recentes trabalhos sugerem que a subunidade alfa do BK_{Ca} apresentar-se-ia como um local de grande afinidade às variações da concentração de Ca^{+2} intracelular. Este local poderia ser considerado um sítio de ligação para o cálcio. Por outro lado, trabalhos supõem que esta região não esteja relacionada a sensibilidade ao cálcio, mas a uma região capaz de regular a condutância do canal (Ledoux et al; 2006; Ko et al; 2008).

A subunidade β do BK_{Ca} é composta por dois domínios transmembrana, com um grande sítio de ligação extracelular. Esta subunidade é capaz de exercer diferentes efeitos modulatórios sobre a farmacologia e a ativação do canal. Existem quatro subunidades β (1 - 4), porém a subunidade predominante em MLV é a $\beta 1$. Ela interage com o domínio S0 da subunidade α aumentando a voltagem e a sensibilidade dos BK_{Ca} (Tanaka et al; 2004; Ko et al; 2008).

A ativação dos BK_{Ca} por variações do P_m não é fixa, dependendo da concentração intracelular de Ca^{+2} . Em condições de pequena concentração intracelular de Ca^{+2} este canal comporta-se como um canal de K^+ dependente de voltagem. O mecanismo de sensibilidade à voltagem dos BK_{Ca} é independente da sua ligação com Ca^{+2} . No entanto, a variação da concentração intracelular de Ca^{+2} pode promover alterações da sensibilidade do canal à voltagem. Desta forma, aumentando a concentração intracelular de Ca^{+2} , este canal pode ser ativado em voltagens mais negativas (Tammaro et al; 2004; Ledoux et al; 2006).

Para compreender o funcionamento de BK_{Ca} é muito importante analisar ainda sua distribuição na membrana da CMLV. Os BK_{Ca} encontram-se co-localizados com

os receptores de rianodina. Estão no sarcolema, nas proximidades do retículo sarcoplasmático, o que permite aos mesmos entrarem em contato com um grande e rápido aumento de Ca^{+2} através dos *sparks* de Ca^{+2} ($> 10 \mu\text{M}$) (Ledoux et al; 2006). Os *sparks* são liberações de Ca^{+2} resultantes da abertura dos canais para rianodina do retículo sarcoplasmático que geram uma grande elevação da concentração de Ca^{+2} ($10 - 100 \mu\text{M}$) em uma área extremamente restrita da célula (cerca de 1% do volume celular) (Jaggar et al; 1998a). Contudo, a concentração de Ca^{+2} global da célula, durante os *sparks*, eleva-se extremamente pouco (somente 2 nM). Os *sparks* aumentam a concentração local de Ca^{+2} que ativam os BK_{Ca} . Desta forma, os BK_{Ca} promovem o efluxo de K^+ e causam hiperpolarização da membrana. A inibição dos *sparks* por bloqueio dos receptores de rianodina, ou dos canais BK_{Ca} por iberiotoxina, induz à despolarização da membrana, ativação dos canais para Ca^{+2} voltagem dependentes do tipo L, promovendo a vasoconstrição. Assim, os BK_{Ca} estão envolvidos na regulação do tônus miogênico, contribuindo para o controle da resistência vascular periférica e regulação do potencial de membrana do músculo liso vascular (Jaggar et al; 1998ab; Tanaka et al; 2004).

Os BK_{Ca} podem ser fosforilados por várias quinases incluindo PKA, PKG e PKC. Desta forma, os vasodilatadores endógenos elevam AMPc e GMPc, enquanto os vasoconstritores ativam a PKC. A fosforilação por PKA e PKG possibilita a modulação do canal, aumentando a sua probabilidade de abertura e deslocando a curva de ativação por voltagem para potenciais mais negativos, sem interferir na condutância do canal. Estas duas quinases podem também ativar BK_{Ca} de forma indireta através da fosforilação do fosfolambam do RS, que aumenta a carga de cálcio do RS por desinibição da cálcio ATPase, resultando em uma maior frequência e amplitude dos *sparks* de cálcio (Jackson, 2005; Ledoux et al; 2006).

São várias as substâncias, derivadas ou não do endotélio, envolvidas na modulação da atividade dos BK_{Ca} no MLV. Bolotina et al. desde 1994 relataram que o NO é capaz de ativar diretamente os BK_{Ca} . Dick e Sanders (2001) demonstram em seu trabalho que o estrogênio em altas concentrações (micromolares), também liga-se ao canal BK_{Ca} , primariamente na subunidade $\beta 1$, regulando diretamente sua função e expressão. Além disso, as espécies reativas de oxigênio são consideradas uma influência modulatória negativa sobre a atividade dos BK_{Ca} em doenças cardiovasculares (Tang et al; 2004).

De forma sintetizada, pode-se dizer que as correntes de BK_{Ca} são ativadas por despolarização, aumento da $[Ca^{+2}]_{cit}$, NO, CO, epoxi-eicosatetranóicos da via do ácido araquidônico, PKA e PKG. Por outro lado, são inibidas por hiperpolarização, diminuição da $[Ca^{+2}]_{cit}$ e PKC (Jackson, 2005).

Vários trabalhos demonstram a utilização de bloqueadores não específicos dos canais para potássio que também inibem a atividade de BK_{Ca} como o TEA (0.2 mM) e a caribdotoxina (1 – 10nM) (Nelson e Quayle, 1995; Callera et al; 2004; Tammaro et al; 2004; Ledoux et al; 2006; Ko et al; 2008). Por outro lado, a Iberiotoxina, uma toxina do escorpião, é descrita como o bloqueador mais específico destes canais. Em geral, esta toxina é utilizada em uma concentração de 1-10 nM (Callera et al 2004; Tammaro et al. 2004; Ledoux et al. 2006). Para simular os efeitos de BK_{Ca} , é descrito na literatura o agonista benzimidazolone ou NS-1619 (Callera et al; 2004; Ledoux et al. 2006; Ko et al; 2008).

1.4.1.2.2 Canais de K^+ ativados por cálcio de baixa (SK_{Ca}) e intermediária condutância (ISK_{Ca})

Os canais para SK_{Ca} são chamados de canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância e estão envolvidos no controle do tônus vascular e da pressão arterial (Ledoux et al; 2006). Eles foram identificados primeiramente no cérebro com pequena condutância e posteriormente, em linfócitos e eritrócitos (subunidade SK_{Ca} 4), sendo então considerados de condutância intermediária nestes locais (Ledoux, 2006).

De fato, SK_{Ca} são expressos em neurônios, endotélio, epitélio e em vários tipos de músculo liso, mas são pobremente expressos em MLV. Na verdade, foi demonstrado a expressão de SK_{Ca} 4 em MLV (Ledoux, 2006; Félétou, 2009). Porém, estes canais só estavam expressos em miócitos em proliferação (Neylon et al; 1999). Contraditoriamente, estudos demonstram que os SK_{Ca} são expressos que em CMLV da microcirculação (Jackson, 2005).

Os SK_{Ca} participam de uma família geneticamente muito conservada que possui quatro membros: SK_{Ca} 1, 2, 3 e 4. Os canais SK_{Ca} 1 a 3 incluem as subfamílias $SK_{Ca2.1}$, $SK_{Ca2.1}$ e $SK_{Ca2.3}$ e são descritos como canais para baixa condutância. O SK_{Ca} 4 também é conhecido como ISK_{Ca} , possui condutância intermediária e inclui a

subfamília SK_{Ca3.1} (Félétou, 2009). Cada um destes canais é formado por seis domínios transmembrana (S1 – S6) com terminações amino e carboxila no meio intracelular. A região do poro está localizada em S5-S6 de forma similar ao que acontece com as demais isoformas dos canais para potássio (Ledoux, 2006).

A ativação das correntes de SK_{Ca} devem-se ao aumento da $[Ca^{+2}]_{cit}$ e a inibição destas se dá pela diminuição da $[Ca^{+2}]_{cit}$. A abertura do poro de SK_{Ca} é independente do potencial de membrana, mas extremamente dependente da concentração de Ca^{+2} (Jackson, 2005; Ledoux, 2006).

A ligação do cálcio com a calmodulina induz a uma mudança conformacional do canal que leva a abertura do poro. Estes canais requerem calmodulina para ter sensibilidade ao cálcio, ao contrário dos BK_{Ca} que tem um sensor intrínseco capaz de detectar as variações de cálcio intracelular. Recentes trabalhos demonstram que a calmodulina está conectada a terminação carboxila de cada subunidade de SK_{Ca} e confere ao canal a sensibilidade ao cálcio citoplasmático em concentrações submicromolares. Sugere-se que cálcio-calmodulina seja capaz de regular a perfusão e as características do canal SK_{Ca} (Joiner et al; 2001; Ledoux, 2006).

A apamina, uma toxina de abelha, é descrita em vários estudos capaz de inibir seletivamente os SK_{Ca} 1 a 3. A corrente do SK_{Ca} 4 pode ser inibida pelo veneno de escorpião caribdotoxina (Jackson, 2005; Ledoux, 2006; Félétou, 2009). Callera et al. (2004) utilizou 0.5 μ M de apamina para bloquear seletivamente os canais SK_{Ca} e 0.1 μ M de caribdotoxina a fim de inibir todos os K_{Ca} de aorta de ratos.

Agonistas como clorzoxazone, zoxazolamina e riluzone são descritos na literatura capazes de simular as correntes de SK_{Ca}, mas não são capazes de substituir completamente a corrente original deste canal (Jackson, 2005).

1.4.1.3 Canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP})

Os canais para K⁺ sensíveis a adenosina de trifosfato (ATP) fecham-se pelo aumento do ATP intracelular e por isso são assim nomeados. Por outro lado, o aumento de adenosina de difosfato (ADP) intracelular é capaz de ativar as correntes de K_{ATP}. De forma similar aos demais canais para K⁺, os estímulos capazes de ativar a corrente através de K_{ATP} promovem a hiperpolarização da membrana que

possibilita o fechamento dos canais voltagem-dependentes de Ca^{+2} , ocasionando uma redução nas $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{cit}}$ e vasodilatação. É importante ressaltar que os K_{ATP} em músculo liso vascular não são voltagem-dependentes (Nelson e Quayle, 1995; Brayden, 2002). Estes canais foram primeiramente identificados em miócitos cardíacos (Noma, 1983). Sabe-se hoje que eles podem ser encontrados em músculo esquelético, células pancreáticas, neurônios e células de músculo liso vascular (Nelson e Quayle, 1995; Brayden, 2002).

O K_{ATP} é um complexo hetero-octamérico composto de quatro subunidades K_{IR} 6.2, as quais formam o poro iônico, acoplado a quatro subunidades reguladoras, os receptores de sulfoniluréias (SUR) (Brayden, 2002; Jackson, 2005; Ko et al; 2008).

Os K_{ATP} apresentam uma condutância variável que é atribuída às suas várias isoformas, expressão em diferentes células e as condições experimentais nas quais o mesmo é avaliado. Em uma condição de K^{+} alto, são identificadas: pequena/intermediária condutância (15-50 pS) - em células de MLV da veia porta, das coronárias e da bexiga urinária; Larga condutância (130 pS) - em MLV de mesentéricas, artéria caudal, e aorta de cão (Nelson e Quayle, 1995; Ko et al; 2008). A densidade destes canais por célula é baixa, atingindo cerca de 300-500 canais por célula (Nelson e Quayle, 1995).

Os K_{ATP} desempenham um papel importante na resposta vascular a uma variedade de vasodilatadores e vasoconstritores endógenos, bem como farmacológicos. Os K_{ATP} parecem estar tonicamente ativos em alguns leitos vasculares e contribuir para a regulação fisiológica do tônus vascular e do fluxo sanguíneo. Esses canais também são ativados sob condições fisiopatológicas, como hipóxia, isquemia, acidose e choque séptico, e nesses estados de doença, podem desempenhar um papel importante na regulação da perfusão tecidual (Sobey, 2001; Brayden, 2002). Um exemplo é o estudo de Celloto et al. (2011) que avaliou o mecanismo pelo qual a acidose extracelular promoveria relaxamento em aorta de ratos. Estes autores demonstraram que a acidose promove a vasodilatação mediada pelo NO e pela ativação dos canais para potássio K_{ATP} e SK_{Ca} .

Estudos demonstram que vasodilatadores como adenosina, PGI_2 , CGRP e NO podem ativar os K_{ATP} através da fosforilação das proteínas quinase A e G, bem como aumento dos níveis de AMPc e GMPc. Ao contrário, vasoconstritores como norepinefrina, vasopressina, endotelina e angiotensina II fecham estes canais através da ativação da PKC e elevação da $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{cit}}$ (Jackson, 2005).

Os K_{ATP} podem ser inibidos por fármacos anti-diabéticos (sulfoniluréias), como a glibenclamida e tolbutamida (Quayle et al; 1995). A glibenclamida parece ser o mais seletivo bloqueador destes canais e tem sido considerada um importante mecanismo de investigação do papel dos K_{ATP} na função celular. Em estudos com CMLV, a glibenclamida é utilizada na concentração de 20 e 200 nM para metade da inibição máxima. O tolbutamida é considerado menos efetivo que a glibenclamida e em geral é utilizado na concentração de 350 μ M para metade da ativação máxima (Quayle et al; 1995; Nelson e Quayle, 1995; Ko et al; 2008).

Os K_{ATP} não são inibidos por iberiotoxina, caribdotoxina e apamina, bem como são muito pouco sensíveis ao TEA (Nelson e Quayle, 1995; Ko et al; 2008). Todavia, numerosos ativadores sintéticos destes canais também têm sido produzidos incluindo a cromacalina, levcromacalina, nicorandil, pinacidil, minoxidil, diazoxide e BRL-55834 (Sobey, 2001; Ko et al; 2008).

1.4.1.4 Canais para potássio retificadores de influxo (K_{IR})

Os K_{IR} estão presentes em uma variedade de células excitáveis e não-excitáveis, incluindo células de músculo liso arterial. Contudo, estes canais são abundantes em CMLV de vasos de resistência de pequeno diâmetro (Quayle et al; 1996; Ko et al; 2008).

Quando o potencial de membrana é controlado, por exemplo, durante a realização da técnica de *voltage clamp*, as correntes de influxo através dos canais K_{IR} são sempre maiores do que as correntes de efluxo. Isso ocorre porque o K_{IR} é ativado pela hiperpolarização da membrana, em contraste aos K_v e KCa que são ativados por despolarização. Através desta observação experimental é possível então identificar a origem do nome deste canal (Nelson e Quayle, 1995).

Os K_{IR} são tetrâmeros cujas subunidades contem cada uma dois domínios transmembrana. Eles são formados a partir de subunidades codificadas pelos genes da subfamília K_{IR} 2.0 que apresentam propriedades retificadoras. Sugere-se que K_{IR} 2.1, mas não K_{IR} 2.2 ou K_{IR} 2.3, seja expressa no músculo liso vascular (Quayle et al 1996; Nelson e Quayle, 1995; Ko et al; 2008). Poucos estudos relatam as propriedades específicas dos K_{IR} no MLV. A primeira publicação que descreveu

especificamente a corrente através de K_{IR} (KIR 2.1) o fez em artérias coronárias de pequeno diâmetro e demonstrou uma condutância de aproximadamente 21 pS nestes canais (Park et al; 2005).

Embora a função exata dos canais K_{IR} no músculo liso vascular não esteja ainda completamente estabelecida, é possível especular que os canais K_{IR} contribuam para a manutenção do P_m e tônus de repouso em vasos de pequeno diâmetro. A regulação do P_m impossibilita a hiperpolarização da membrana para valores mais negativos que o potencial de equilíbrio do K^+ , mantido pela atividade da Na^+K^+ -ATPase, minimizando a perda celular de K^+ e, desta forma reduzindo o gasto energético durante a sustentada despolarização da membrana. Além disso, estes canais seriam ativados em resposta ao aumento moderado da concentração extracelular de K^+ (10 - 15 mM) ocasionando vasodilatação (Nelson e Quayle, 1995; Quayle et al 1996).

De acordo com a maior parte dos trabalhos publicados na literatura, as correntes através dos K_{IR} podem ser ativadas por hiperpolarização, aumento da concentração de K^+ extracelular, peptídeo natriurético tipo C e NO (Chauhan et al; 2003; Schubert et al; 2004). Por outro lado, podem ser inibida por despolarização e diminuição do K^+ extracelular. Estes canais não são bloqueados por glibenclamida, caribdotoxina, iberiotoxina, TEA e 4-aminopridina nas concentrações convencionais que inibem os demais canais para K^+ . Para inibir seletivamente sua função é necessário uma concentração de 50 μ M de Ba^{+2} (Jackson, 2005). Contudo, também é descrita capaz de inibir estes canais a concentração de 2 μ M em um P_m igual a -60 mV (Nelson e Quayle, 1995).

1.4.1.5 Canais para K^+ com dois poros por domínio (K_{2P})

Em meados de 1990, pesquisas do genoma com codificação de seqüências de DNA para o domínio que contém o poro dos canais para K^+ (domínio altamente conservado entre as espécies) revelaram em leveduras e *Caenorhabditis elegans* uma subunidade α que continha dois poros dentro de um único domínio (Ketchum et al; 1995). No ano seguinte, foi clonado em humanos um canal de K^+ com as mesmas características. Este canal foi chamado de "*Tandem of P domains in a weak*

inward rectifying K⁺ channels” (TWIK-1) que significa algo semelhante a: duas alças de poros (P) em cada domínio da subunidade que formam o canal de potássio com corrente retificadora de vazamento (Lesage et al; 1996). Seis classes destes canais têm sido identificadas: 1) retificadores fracos de influxo (TWIK-1, TWIK-2, KCNK7); 2) ativados mecanicamente (TREK-1, TREK-2, TRAAK; 3) ativados por meio alcalino (TALK-1, TALK-3, TASK-2); 4) inibidos por ácidos (TASK-1, TASK-3, TASK-5); 5) inibidos por halotano (THIK-1, THIK-2); e 6) ativados por cálcio (TRESK) (Goldstein et al; 2005).

Os K_{2P} são abertos em potenciais de membrana mais negativos, e em geral são referidos como canais para vazamento presentes em situação de repouso. Sua expressão é encontrada em diversos tecidos do corpo, contudo uma fonte particularmente rica nestes canais é o tecido nervoso. Desta forma, tem sido descrita importante participação dos K_{2P} na manutenção do potencial de repouso dos neurônios e regulação da excitabilidade (Goldstein et al; 2005; Bryan et al; 2007).

Os vasos sanguíneos também expressam muitos tipos de canais K_{2P} (Lloyd et al; 2009). Entretanto, a função vasodilatadora tem sido atribuída aos demais canais para potássio do MLV, sendo muito recentes relatos da literatura sobre a participação dos canais K_{2P} no relaxamento vascular. Dois trabalhos recentes são exemplos da participação dos K_{2P} no relaxamento do MLV: Gurney et al. (2003) relatam que os canais para potássio da família K_{2P}, chamados TASK-1, são os maiores responsáveis pelo potencial de repouso do MLV de artéria pulmonar de coelhos; e Bryan et al. (2006) demonstram que o ácido araquidônico pode ativar as correntes por K_{2P} em MLV de artéria cerebral média de ratos, induzindo a efeitos vasodilatadores.

Os inibidores específicos dos K_{2P} ainda não foram avaliados. Além disso, os K_{2P} apresentam-se resistentes a inibidores comuns como TEA e 4-AP (Bryan et al; 2007). Estes últimos são largamente utilizados na literatura para bloqueio não seletivo dos canais para K⁺ e inibição dos canais para K_v, respectivamente (Callera et al; 2004).

Diferentes estímulos físicos e químicos podem modular o funcionamento dos K_{2P}, como as variações na concentração de oxigênio, de hidrogênio (pH) intra e extracelular, bem como por influencia dos agentes anestésicos, calor, estiramento, proteínas quinase e agentes que podem deformar a membrana citoplasmática como os lipídios (Goldstein et al; 2005; Honore, 2007). Blondeau et al; 2007 relatam por

exemplo que a reatividade vascular cerebral de ratos é alvo de lipídios vasoativos que atuam influenciando os K_{2P} . A deformação das artérias promovida pelos lipídios incluindo ácido araquidônico e lipídios poliinsaturados, promoveria dilatação destas artérias por ativação efluxo de potássio através dos K_{2P} .

De forma geral os canais para K^+ do MLV são ativados e inativados por diversas substâncias vasoativas capazes de influenciar as vias de sinalização que envolvem a proteína quinase A (PKA), a proteína quinase C (PKC), o aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular, bem como as Rho quinases (Sobey, 2001; Luykenaar et al. 2004; Jackson, 2005). Dentre estas substâncias pode-se citar a adenosina, prostaglandina 2 (PGI₂) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), o NO (via GMPc), a diminuição do pH, o estrogênio e as espécies reativas de oxigênio (Dick e Sanders, 2001; Sobey, 2001; Luykenaar et al. 2004; Tang et al; 2004; Jackson, 2005; Rodrigues et al; 2011).

Da mesma forma, a atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase é influenciada por fatores vasoativos derivados do endotélio, glicosídeos cardíacos circulantes, hormônios, concentração hidroeletrólítica e até o shear stress (Xie e Cai, 2003; Mobasher et al; 2000).

Todas estas substâncias podem ter sua biodisponibilidade alterada durante as doenças cardiovasculares e, assim podem influenciar a função da Na^+K^+ -ATPase e dos canais para K^+ do MLV. Têm sido descrito na literatura, por exemplo, a participação da Na^+K^+ -ATPase nas alterações da reatividade vascular durante o desenvolvimento de hipertensão arterial e diabetes (Rose e Valdes, 1994; Davel et al., 2000; Rossoni et al., 2002; Xavier et al., 2004b; Callera et al., 2004; Gallo et al; 2010). Adicionalmente, trabalhos demonstram as alterações na função dos canais para K^+ do MLV envolvidas na gênese de doenças como hipertensão arterial (Sobey, 2001; Callera et al; 2004), diabetes (Kamata et al; 1989), hipotensão durante o choque endotóxico (Landry e Oliver, 1992), infarto do miocárdio (Terata et al; 2000) e insuficiência cardíaca (Yildiz, 2007).

Diversas pesquisas tem sido desenvolvidas no intuito de conhecer os mecanismos envolvidos nas alterações cardíacas e sistêmicas decorrentes do IM, bem como possibilidades terapêuticas para prevenir a instalação ou minimizar as manifestações da síndrome da IC. Contudo, a maior parte dos trabalhos tem demonstrado alterações vasculares na fase onde já se estabeleceu a IC, visto que é

nesta etapa que se realizam a grande maioria das investigações experimentais e clínicas.

Trabalhos realizados por nosso laboratório caracterizaram dois grupos experimentais formados após o IM, com área de cicatriz semelhante. Os ratos com sinais de IC após o IM apresentam clássicos sinais da síndrome da IC, como elevada massa do corporal e redução da ingestão de comida e água (Faria et al; 2011), bem como diferentes modelos de remodelamento da matriz ventricular direita e esquerda (Cachoeiro et al. 2010), de contractilidade do miocárdica (Moura et al; 2007; Stefanon et al; 2009; Fernandes et al; 2010) e de reatividade vascular (Pereira et al; 2005; Dias et al; 2007; 2009; 2010; Faria et al; 2010) comparados com os animais sem sinais de IC. Os resultados demonstrados por Pereira et al. (2005) sugeriram a existência de algum mecanismo de relaxamento vascular que diferenciava funcionalmente estes dois grupos de animais. Como a Na^+K^+ -ATPase participa da regulação do potencial de membrana e do tônus do MLV (Therien & Blostein, 2000; Skou, 2003, na modulação da reatividade vascular nas doenças do sistema cardiovascular, como a hipertensão arterial e o diabetes (Rose & Valdes, 1994; Davel et al; 2000; Rossoni et al., 2002; Xavier et al., 2004; Callera et al., 2004; Bonaventura et al; 2011) seria possível que as alterações na reatividade vascular após IAM, descritas por Pereira et al. (2005) estivessem envolvidas com a alteração funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à OUA.

Desta forma, em 2007, nosso laboratório desenvolveu um trabalho com o objetivo de estudar a atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à OUA em anéis de aorta de ratas após o IM, com mesma área de cicatriz, com e sem sinais de insuficiência cardíaca. Os principais resultados deste trabalho conduziram a elaboração da hipótese de que a capacidade da OUA de estimular a liberação de NO ou de deixá-lo biodisponível através do endotélio estaria prejudicada nos animais infartados sem sinais de IC, mas preservada nos animais infartados com sinais de IC. É interessante ressaltar que a perda da produção de NO parece ter sido específica desta via mediada pela OUA, visto que a produção basal de NO, independente de OUA, permaneceu preservada. Os animais infartados sem sinais de IC apresentavam ainda diminuição do relaxamento induzido pelo KCl que poderia estar relacionada a um prejuízo da hiperpolarização destes vasos. Portanto, os resultados apresentados demonstraram que a atividade da Na^+K^+ -ATPase sensível

à OUA era modulada pelo NO de forma diferente nos grupos Inf e IC (Dias et al; 2007).

A detecção do menor relaxamento induzido pelo KCl em aorta de ratas infartadas sem sinais de IC (Dias et al; 2007) gerou o questionamento sobre a alteração funcional da Na^+K^+ -ATPase não ser o único mecanismo responsável por este resultado, induzindo a busca na literatura por outros mecanismos que participariam do acoplamento excitação–contração do MLV e também pudessem estar alterados após o IM.

Boaventura et al. relataram que em ratos com hipertensão, ocasionada pelo modelo 2R1C, o relaxamento induzido por doadores de NO em anéis de aorta de ratos estava diminuído. Estes autores sugeriram a diminuição da participação dos canais para K^+ no relaxamento vascular como uma das hipóteses para explicar os resultados encontrados. Em trabalho realizado por Callera et al. (2004) foi demonstrado um prejuízo do relaxamento a ACh nos animais com hipertensão ocasionada pelo modelo dois rins um clipe (2R1C) que foi atribuído a uma diminuição da atividade funcional dos canais de K^+ dependentes de cálcio no MLV. Por outro lado, estes autores encontraram também um aumento na atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à OUA em animais 2R1C. Portanto, os resultados de Callera et al. (2004) conduziram a uma pergunta: será que o aumento da atividade da Na^+K^+ -ATPase sensível à OUA em animais 2R1C seria um mecanismo compensatório à diminuição do relaxamento à ACh e a redução da atividade funcional dos canais de K^+ dependentes de cálcio nestes animais? Assim, surgiram as hipóteses a cerca dos resultados do trabalho de Dias et al. (2007): **Hipótese 1)** será que o menor relaxamento induzido pelo KCl em aorta de ratas infartadas sem sinais de IC encontrado neste trabalho poderia estar relacionado a uma alteração da função dos canais de potássio do MLV? **Hipótese 2:** Poder-se-ia especular que o aumento da atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à OUA nos animais infartados sem sinais de insuficiência seria um mecanismo compensatório, como ocorreu nos animais 2R1C?

Desta forma, seria necessário estudar o papel dos canais de K^+ e da atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à OUA, observando aspectos como expressão das isoformas da sintase do óxido nítrico, Na^+K^+ ATPase e a influência do estresse

oxidativo nas alterações da reatividade vascular, que juntos perfazem os objetivos do presente trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação funcional da Na^+K^+ -ATPase e dos canais para K^+ nas diferenças da reatividade de anéis isolados de aorta de ratos infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as diferenças entre os grupos cirurgia fictícia (Sham), infartados sem sinais de insuficiência cardíaca (Inf) e infartados com sinais de Insuficiência cardíaca (IC) em relação aos parâmetros ponderais e hemodinâmicos;
- Avaliar a área de cicatriz do infarto do miocárdio pelos métodos histológico e planimétrico;
- Avaliar a atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à ouabaína em anéis isolados de aorta de ratos infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca;
- Estudar a participação dos canais para potássio no relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis isolados de aorta de ratos infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca.
- Verificar a produção de O_2^- entre os grupos trinta dias após o infarto;
- Avaliar a expressão das isoformas das proteínas α_1 - Na^+K^+ -ATPase, isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS), e da sua forma fosforilada (p-eNOS), entre os grupos trinta dias após o infarto.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ETICA

Todos os procedimentos experimentais que são descritos nesta pesquisa foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em animais da EMESCAM – CEUA (005/2007).

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 89 ratos Wistar machos, com peso entre 320 - 340 g, cedidos pelo biotério da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, mantidos em caixas de polipropileno, com controle de claro/escuro (12/12 horas), com livre acesso à água e à ração.

3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Infarto agudo do miocárdio

Os procedimentos para indução ao infarto foram realizados de acordo com a técnica descrita por Seyle et al; (1960). Os animais foram anestesiados com mistura de Xilazina (10 mg/Kg) e Quetamina (50 mg/Kg) por via intraperitoneal. Em seguida foi realizada uma toracotomia entre o terceiro e quarto espaço intercostal esquerdo. O músculo peitoral foi separado e as costelas expostas. O coração foi gentilmente exteriorizado e a artéria coronariana descendente anterior esquerda ligada aproximadamente a 3 mm de distância da sua origem, utilizando um fio mononylon 6.0 (Pfeffer et al., 1979) (Figura 1 A e B). Após a sutura do tórax, os animais permaneciam em observação por período de 15 minutos, até que a respiração normal estivesse restabelecida. O procedimento cirúrgico para o infarto, após

abertura do tórax, teve duração de, no máximo, 40 segundos. Através de tal procedimento objetivou-se obter infartos do miocárdio transmuralis, caracterizados por necrose isquêmica, envolvendo toda ou quase toda a espessura da parede ventricular. O grupo controle (Sham) foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, exceto pela ligação da artéria coronariana.

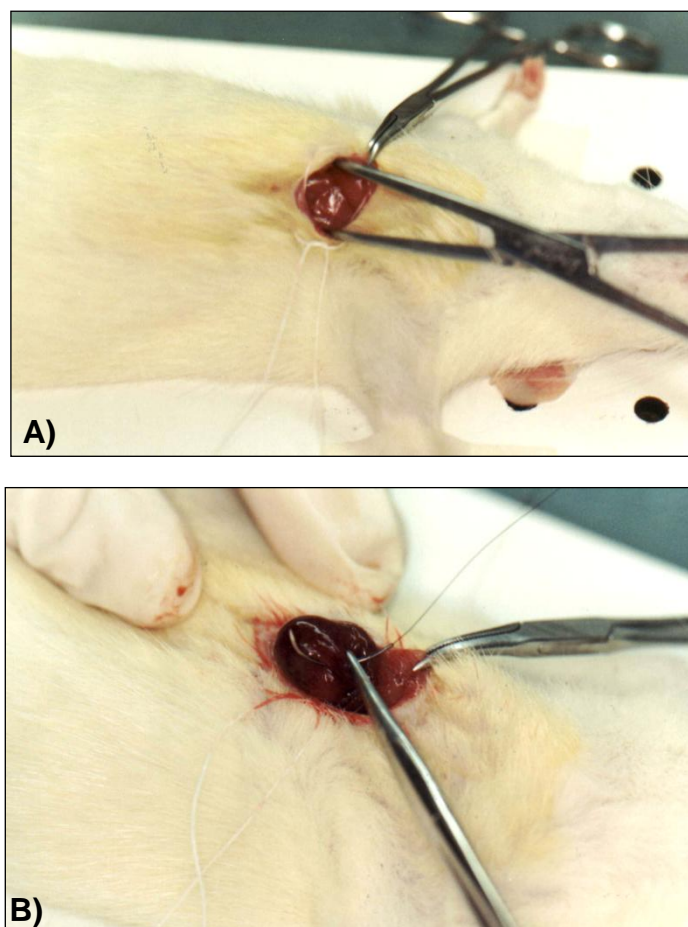


Figura 1: Procedimento para indução ao infarto do miocárdio através da oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda. A) Toracotomia entre o 3º e 4º espaços intercostais; B) Exteriorização do coração e amarradura da artéria coronária descendente anterior esquerda.

3.3.2 Medidas hemodinâmicas e avaliação da função ventricular esquerda

Quatro semanas após a indução ao infarto do miocárdio através da cirurgia, os animais foram pesados, anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i. p.) e a artéria carótida esquerda foi canulada com cateter de polietileno (PE-50, Clay-Adams), preenchido com heparina (100 UI/ml). Este cateter foi conectado a um transdutor de pressão (TSD 104A - Biopac) e acoplado a um pré-amplificador (MP 100, Funbec, São Paulo, SP) que por sua vez, estava conectado a um conversor analógico digital (MP 30 Biopac Systems, Inc; CA) (Figura 2 A e B). Para mensurar a pressão diastólica final, o cateter foi introduzido dentro do VE. Foram registradas a pressão diastólica final do VE (PDfVE), pressão arterial diastólica (PAD), a pressão arterial sistólica (PAS), a pressão arterial média (PAM), a pressão sistólica no ventrículo esquerdo (PSVE), a frequência cardíaca (FC), além da primeira derivada de pressão positiva (dP/dt+) e a negativa (dP/dt-).

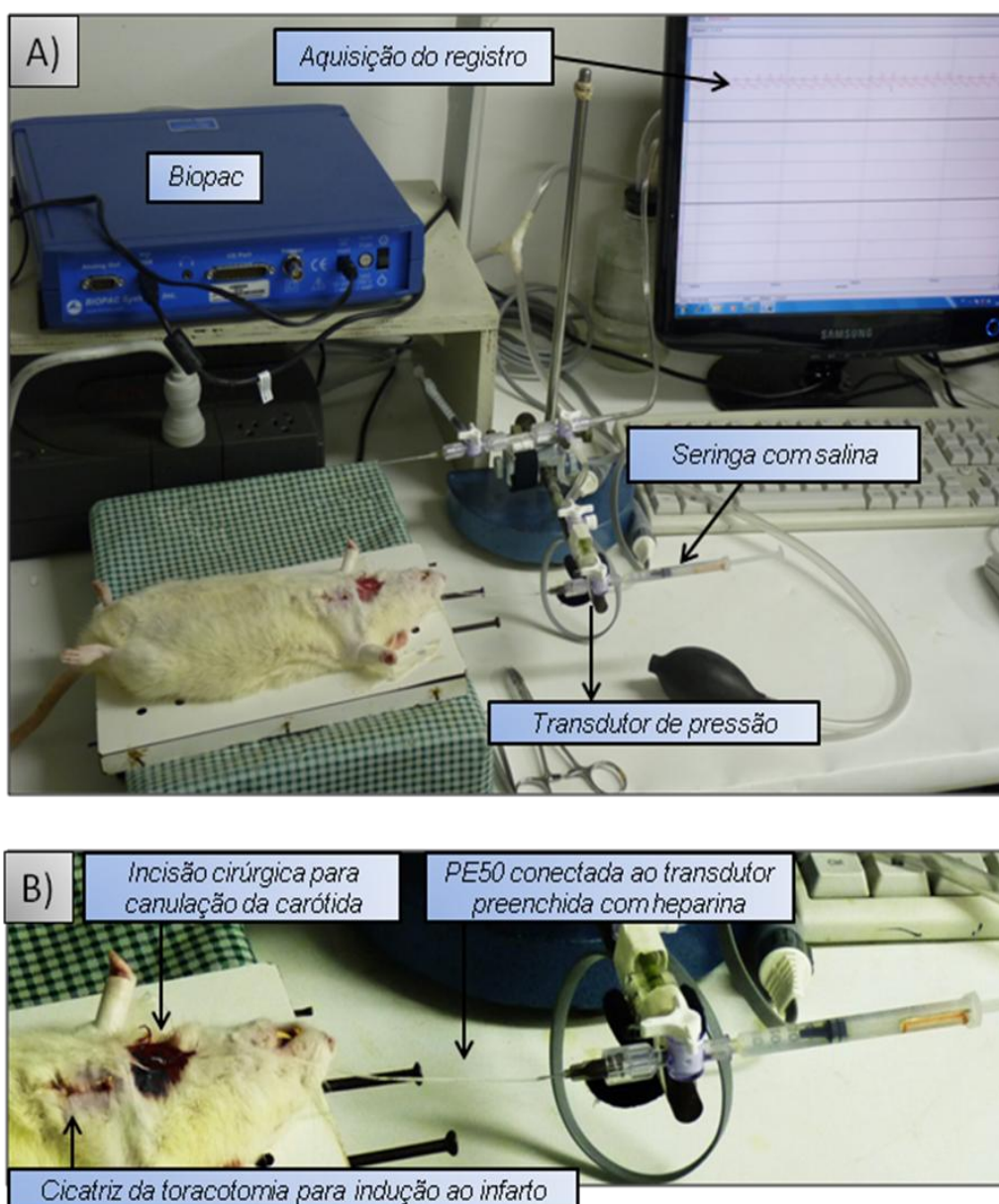


Figura 2: A) Sistema de avaliação das pressões arterial e ventricular (hemodinâmica) composto por um cateter (PE-50, Clay-Adams), conectado a um transdutor de pressão (TSD 104A - Biopac), acoplado a um pré-amplificador (MP 100, Funbec, São Paulo, SP) que por sua vez, foi conectado a um conversor analógico digital (MP 30, Biopac Systems, Inc; C A). O registro foi adquirido por um computador Pentium 4, 3.06 Ghz; B) Ampliação de parte da imagem para visualização da incisão cirúrgica (região esquerda do pescoço), para canulação da artéria carótida; cânula PE-50; e cicatriz da toracotomia para indução ao infarto do miocárdio. Foram avaliados os seguintes parâmetros: pressão diastólica final do VE (PdVE), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial média (PAM), pressão sistólica no ventrículo esquerdo (PSVE), frequência cardíaca (FC), primeira derivada de pressão positiva ($dP/dt+$) e a negativa ($dP/dt-$).

3.3.3 Avaliação dos dados ponderais

Após a realização das medidas hemodinâmicas e avaliação da função ventricular esquerda os ratos foram eutanaziados por deslocamento cervical e exanguinação. A aorta torácica descendente foi gentilmente retirada para realização do protocolo de reatividade vascular, com descrito no tópico 3.3.4.

O coração e os pulmões foram removidos e imersos em solução salina (NaCl, 0,9%) para limpeza tecidual. Após a dissecação e secagem em papel de filtro, foi realizada a mensuração do massa úmida total dos pulmões e este valor foi normalizado pela massa corpórea do animal. Desta forma, foi obtida a razão PP/MC a fim de avaliar a instalação da congestão pulmonar presente na insuficiência cardíaca.

Para avaliação da hipertrofia cardíaca os ventrículos foram removidos, dissecados, separados, pesados, e suas massas úmidas foram normalizadas pela massa corporal. Assim obtiveram-se as razões VD/MC e VE/MC. O septo interventricular e a área de infarto também foram considerados para a mensuração da massa do ventrículo esquerdo.

3.3.4 Avaliação da área de infarto do miocárdio

A quantificação da área de infarto foi realizada através de dois diferentes métodos. O primeiro método utilizado foi a mensuração da área de infarto por planimetria. Nesta técnica a visualização macroscópica do tecido infartado foi realizada por transluminação, onde o ventrículo esquerdo era posicionado contra a luz a fim de ser possível diferenciar o tecido infartado do ventrículo esquerdo remanescente. Isto é possível, pois a borda do infarto é claramente delineada, uma vez que o infarto transmural resulta em um tecido fino e fibroso (Kim et al., 2002). Após a visualização, o tecido remanescente foi minuciosamente separado da área de cicatriz. As duas fatias foram posicionadas sobre papel milimetrado e contornadas. As medidas foram realizadas por contagem dos pontos com a área calculada em mm^2 . A soma das áreas do ventrículo esquerdo remanescente e a

cicatriz corresponderam à área total e a área de cicatriz foi calculada pela porcentagem da área total (Mill et al., 1990). O septo interventricular foi sempre considerado parte do ventrículo esquerdo e corações com área de infarto menores que 20% foram descartados do estudo (Figura 3).

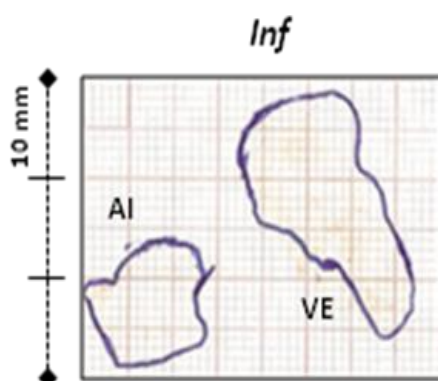


Figura 3: Avaliação por planimetria das fatias da área infartada (AI) e da área remanescente ao infarto no ventrículo esquerdo (VE). As bordas das fatias são contornadas e medidas por contagem de pontos em papel milimetrado com área calculada em mm^2 . Cada quadrado pequeno apresenta lado igual a 1 mm e delimita uma área de 1 mm^2 . A área total representa a soma das áreas do ventrículo esquerdo remanescente e área de cicatriz. A área de cicatriz foi calculada pela porcentagem da área total. Coração do rato 54, infartado (Inf).

O segundo método foi a quantificação da área de infarto por histologia. Esta análise foi realizada para avaliar se a semelhança das áreas de cicatriz entre os grupos Inf e IC, que foi encontrada como resultado do método de planimetria foi influenciado pela técnica empregada. Para análise histológica, o ventrículo esquerdo foi cortado em 3 secções transversas: ápice, anel mediano (aproximadamente 3 mm) e base. O anel mediano foi conservado em formalina 4% e depois incluído em parafina. Para tal os seguintes passos foram seguidos:

- a) etanol 70% por 30 minutos
- b) etanol 80% por 30 minutos
- c) etanol 100% por 30 minutos
- d) xilol+etanol (1:1) por 30 minutos
- e) xilol por 30 minutos

- f) xilol +parafina (1:1) por 30 minutos
- g) parafina à 60°C por 60 minutos
- h) parafina à 60°C rapidamente
- i) inclusão em parafina à 60°C em formas e secagem

Foi então feita a secagem por no mínimo 24 horas destes blocos de parafina. De cada bloco de parafina com anel mediano de VE foram realizados cortes de 5 micrômetros, sendo feitos a intervalos de 100 micrômetros. Procedeu-se então à coloração com *picrosirius red*, o qual promove uma coloração avermelhada na área cicatricial necrótica e amarelada no tecido não infartado. As imagens foram gravadas utilizando-se um scanner e analisadas através do programa Image J. Com uma ferramenta chamada “*segmented line*” era delineada uma linha pontilhada sobre a superfície do coração a ser medida. Após o delineamento, clicava-se em “*perimeter*” e o perímetro da superfície era fornecido pelo programa. O cálculo da porcentagem de infarto foi realizado pela divisão do perímetro da cicatriz na superfície endocárdica (CEN) pelo perímetro endocárdico total (PEN) mais o perímetro da cicatriz epicárdica (CEP) dividido pelo perímetro epicárdico total (PEP) dividido por 2 e multiplicado por 100 ($[(CEN/PEN + CEP/PEP)/ 2 \times 100]$) (Figura 4). O tamanho do infarto dos grupos (porcentagem do ventrículo esquerdo infartado) foi calculado pela média de todos os cortes avaliados e expresso como porcentagem da extensão (Pfeffer et al., 1995).

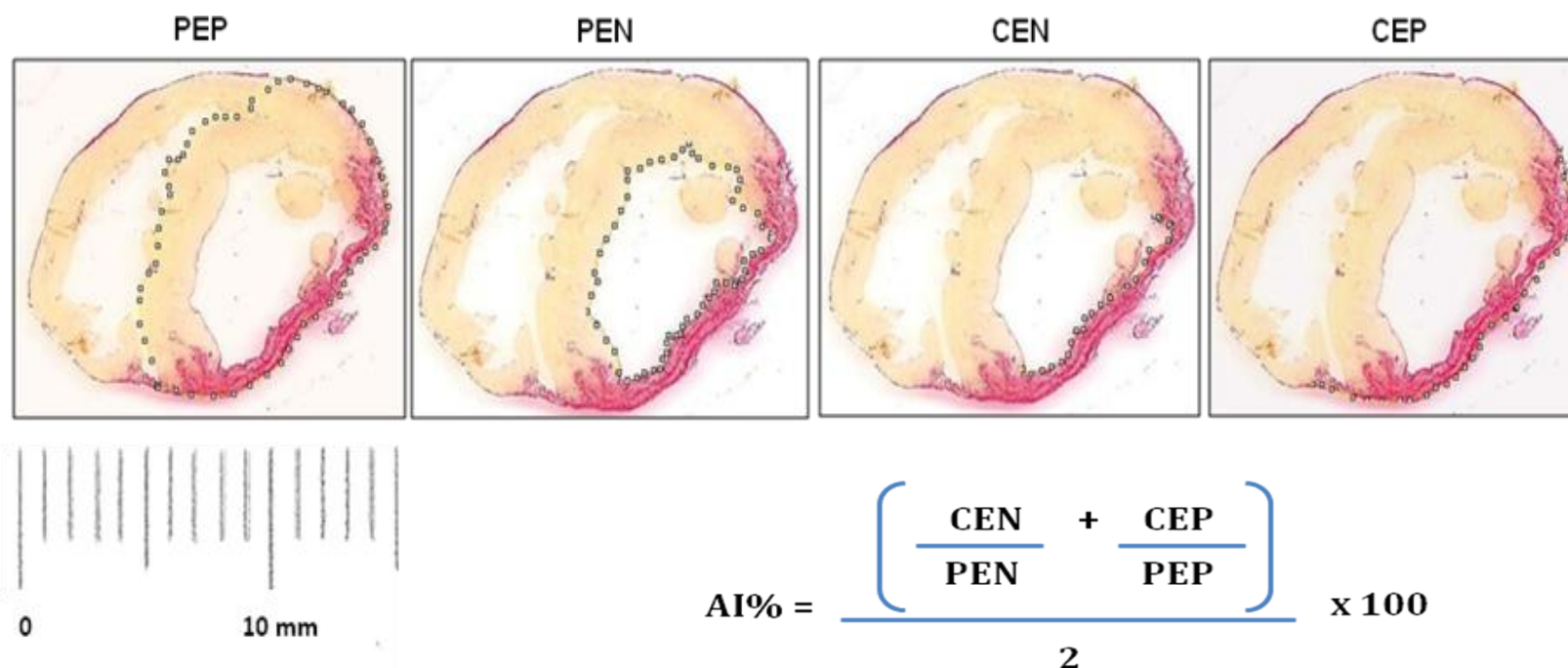


Figura 4: Figura demonstrando a medida histológica da área de infarto (coloração com picosirius red). Com uma ferramenta chamada “segmented line”, do programa Image J, era delimitada uma linha pontilhada sobre a superfície do coração a ser medida. Após o delimitamento, clicava-se em “perimeter” e o perímetro da superfície era fornecido pelo programa. O cálculo da porcentagem de infarto (AI%) foi realizado pela divisão do perímetro da cicatriz na superfície endocárdica (CEN) pelo perímetro endocárdico total (PEN) mais o perímetro da cicatriz epicárdica (CEP) dividido pelo perímetro epicárdico total (PEP), dividido por 2, e multiplicado por 100.

3.3.5 Separação dos Grupos Experimentais

Trinta dias após o infarto do miocárdio os ratos foram subdivididos em: grupo Sham, que sofreu cirurgia fictícia; grupo infarto sem insuficiência cardíaca; e grupo com IC. Para esta subdivisão foi considerada a avaliação hemodinâmica e ponderal. Para que os animais infartados fossem considerados integrantes do grupo de animais com sinais de IC os mesmos deveriam apresentar no mínimo dois dos critérios descritos a seguir: $PDfVE \geq a 15 \text{ mmHg}$ (Anversa, 1986); aumento de + 2 desvios padrão da razão da massa do pulmão e a massa corporal em relação ao grupo Sham ($PP/MC_{IC} \geq PP/MC_{sham} + 2 \text{ DS}$) e a presença de hipertrofia do VD calculada pelo aumento de + 2 desvios padrão da razão da massa do VD e a massa corporal ($VD/MC_{IC} \geq VD/MC_{sham} + 2 \text{ DS}$) (Figura 5) (Anversa et al., 1985; Francis et al.; 2001; Daviddof et al., 2004; Pereira et al., 2005).

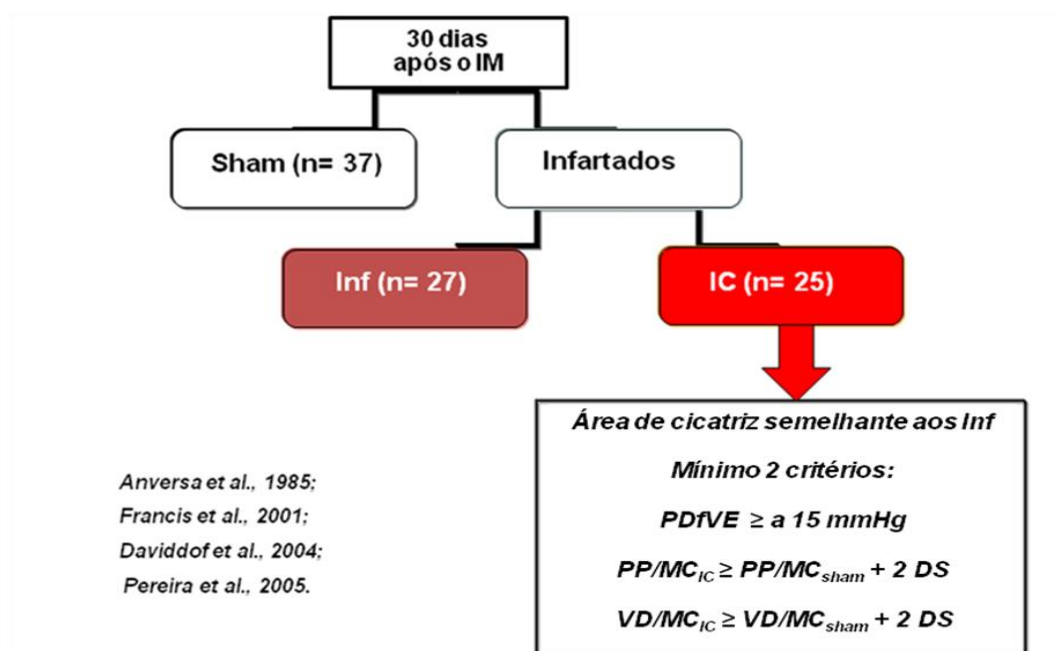


Figura 5: Organograma da divisão dos grupos experimentais, trinta dias após o infarto do miocárdio (IM), a partir dos critérios estabelecidos como sinalizadores de insuficiência cardíaca citados na literatura científica. Cirurgia fictícia de infarto do miocárdio (Sham); ratos infartados sem sinais de insuficiência (Inf); ratos infartados com sinais de insuficiência (IC). Pressão diastólica final no ventrículo esquerdo (PDfVE); Razão entre a massa do ventrículo direito e a massa corporal (VD/MC); Razão entre a massa dos pulmões e a massa corporal (PP/MC).

3.3.6 Preparação dos anéis isolados de aorta

Após a realização das medidas hemodinâmicas os ratos foram eutanaziados por deslocamento cervical e exanguinação. A aorta torácica descendente foi gentilmente retirada e rapidamente colocada em uma placa de Petri imersa em solução de Krebs-Henseleit (composição em mmol/L: NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ .2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 25; EDTA 0,01 e glicose 11), gaseificada com mistura carbogênica contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂, pH = 7,4 e temperatura de 36,5 °C . Então, foi removido o tecido conjuntivo e adiposo adjacente à artéria. O vaso foi cortado em anéis de 4 a 5 mm de comprimento (Figura 6).

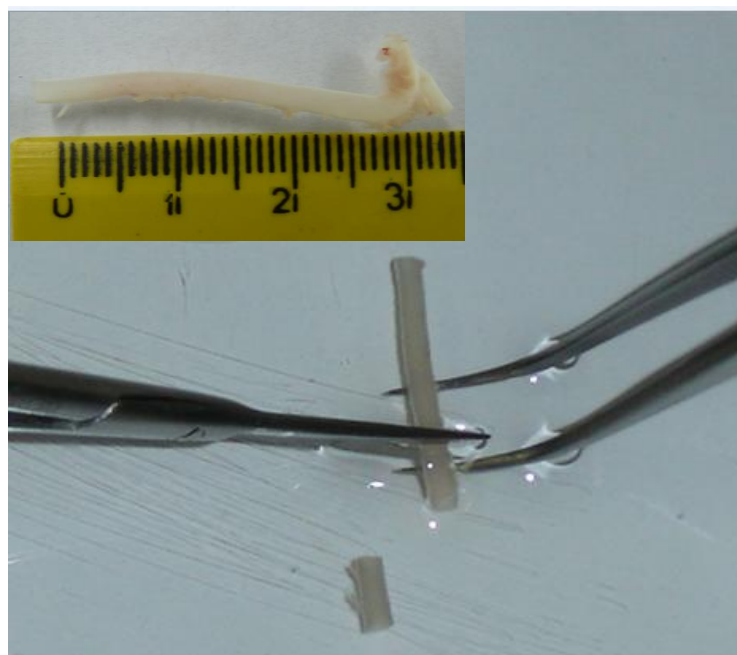


Figura 6: Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, após a remoção do tecido conjuntivo e adiposo adjacente à artéria e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (Modificado de Angeli, 2009).

Para a obtenção do registro de tensão isométrica, cada anel vascular foi colocado em um banho, de acordo com o método descrito por Marin et al. (1988). Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que permanecessem paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, as alterações do diâmetro do vaso eram captadas pelo

transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100, Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA- USA) e este a um computador (Figura 7).

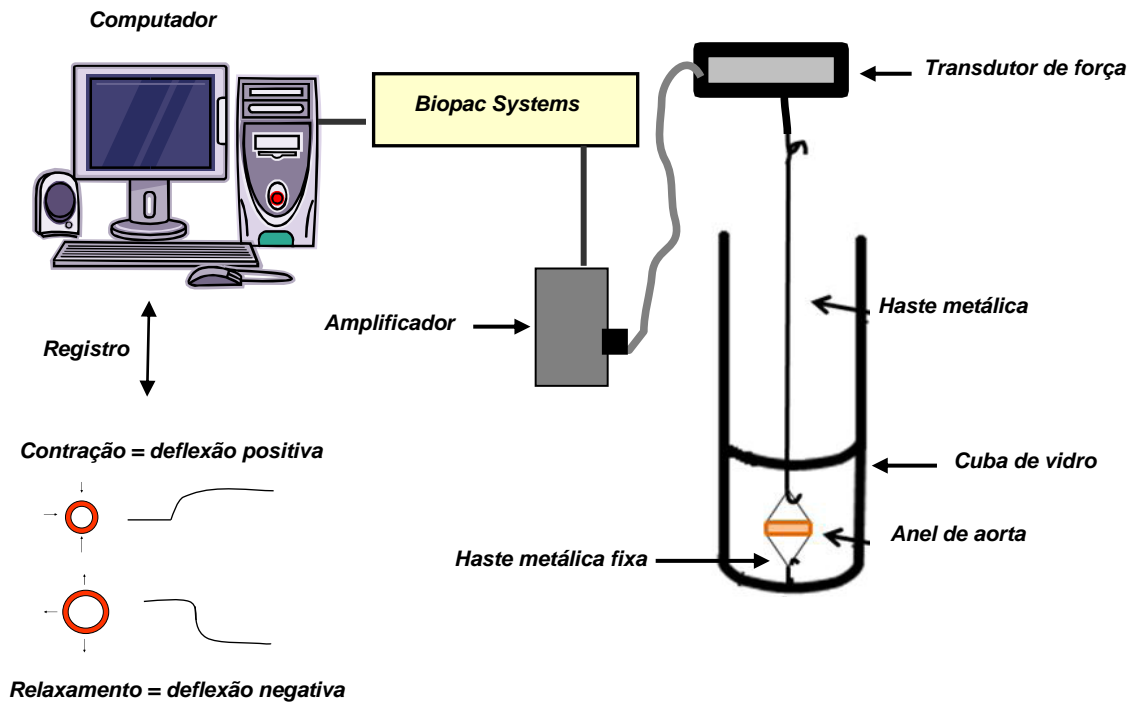


Figura 7: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “in vitro”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems (modificado de Dias, 2007).

Uma tensão de repouso de 1 g foi aplicada aos anéis, eles foram lavados quatro vezes e a tensão foi ajustada caso necessário a cada 15 minutos, durante um período de 45 minutos de estabilização (Figura 8A).

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

retornasse ao basal, ele era submetido a uma nova lavagem. Foi realizada então, uma avaliação da integridade funcional do endotélio. Os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (Fe) 10^{-4} M ou o quanto fosse necessário para se atingir 50-75% da contração máxima ao segundo KCl. Ao final da contração, quando o platô fosse atingido, uma dose única de acetilcolina (ACh) 10^{-3} M era adicionada (Figura 8, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L). Os anéis que relaxavam menos que 90% do platô eram descartados. Os anéis sem endotélio relaxaram no máximo 10% ou até contraíram.

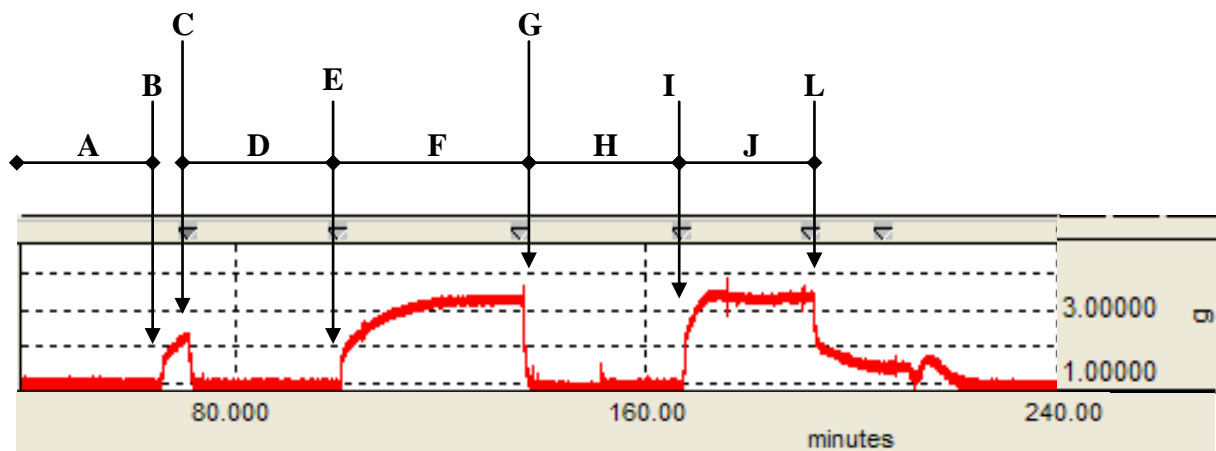


Figura 8: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 1g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contração com fenilefrina (Fe) 10^{-4} M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-3} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical.

Após a avaliação da viabilidade do músculo liso vascular e da integridade do endotélio, foram realizados os protocolos reatividade vascular: avaliação da atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à ouabaína e avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio. São descritos nos itens a seguir os protocolos e os fármacos utilizados em cada etapa da avaliação.

3.3.7 Estudo da atividade funcional da Na⁺K⁺-ATPase sensível à ouabaína

Para a realização da avaliação funcional da Na⁺K⁺-ATPase sensível à ouabaína foi utilizada a técnica de relaxamento induzido pelo potássio, previamente descrita por Webb e Bohr (1978). Após o teste do endotélio (Figura 9), a preparação foi perfundida por 30 minutos com solução Krebs sem potássio (para a obtenção da solução livre de potássio, o KH₂PO₄ foi substituído por NaH₂PO₄). Em seguida foi realizada uma pré-contração com fenilefrina (10⁻⁴ M). Quando o platô foi atingido, KCl (1, 2, 5 e 10 mM) foi adicionado em intervalos de dois minutos e meio. Foi analisada a resposta de relaxamento do vaso em presença das concentrações crescentes e cumulativas de potássio, sendo que este relaxamento foi atribuído à ativação da Na⁺K⁺-ATPase. Em seguida, as preparações foram incubadas com solução livre de potássio e com ouabaína (OUA) 10⁻⁴ M por 30 minutos. Novamente foi repetida a adição KCl (1, 2, 5 e 10 mM) ao banho, com o objetivo de avaliar a resposta de relaxamento do vaso ao KCl na presença de um inibidor da Na⁺K⁺-ATPase (Figura 9, A, B, C, D, E, F, G, H, I).

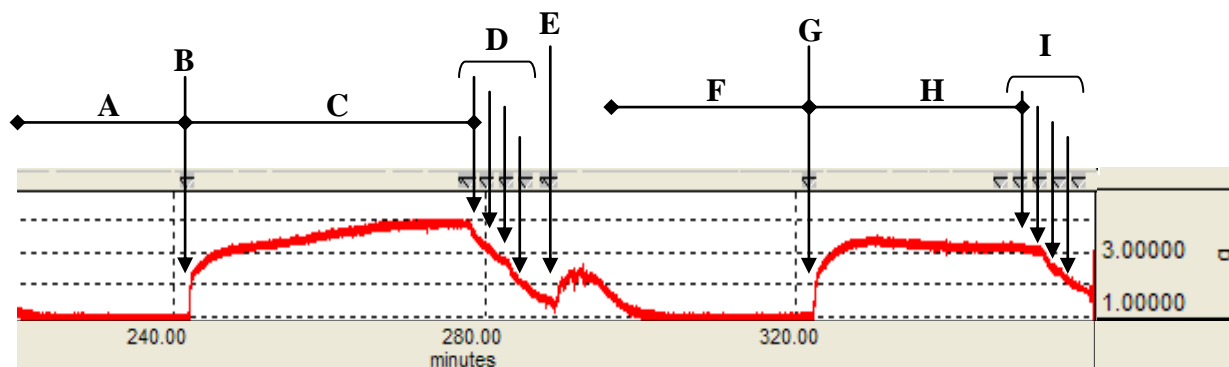


Figura 9: Registro com curvas representando avaliação da atividade funcional da Na⁺K⁺-ATPase sensível à OUA em aortas de ratas com e sem sinais de insuficiência cardíaca após o infarto do miocárdio. A) Perfusão por 30 minutos com solução Krebs sem potássio; B) Pré-contração com fenilefrina (Fe) 10⁻⁴ M; C) Platô da contração induzida pela Fe; D) Primeira curva de KCl (adição de 1, 2, 5 e 10 mM ao banho em intervalos de 2' 30"); E) Lavagem com solução Krebs sem potássio; F) Adição de OUA 10⁻⁴ M e estabilização por 30 minutos; G) Pré-contração com Fe 10⁻⁴ M; H) Platô da contração induzida pela Fe; I) Segunda curva de KCl (adição de 1, 2, 5 e 10 mM ao banho em intervalos de 2' 30"). O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. Caso um fármaco fosse utilizado durante este protocolo, o mesmo era administrado nos períodos A) e F), e incubado por no mínimo 30 minutos.

3.3.7.1 Modulação do endotélio sobre a resposta de relaxamento ao KCl e sobre a capacidade da ouabaína de inibir a atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase

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

3.3.7.2 Efeito do bloqueio com L-NAME sobre resposta de relaxamento ao KCl e sobre a capacidade da ouabaína de inibir a atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase

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

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

3.3.7.3 Efeito do bloqueio com tetraetilamônio (TEA) sobre resposta de relaxamento ao KCl e sobre a capacidade da ouabaína de inibir a atividade funcional da Na^+K^+ - ATPase

A contribuição dos canais para potássio para a atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à ouabaína foi avaliada através da incubação dos anéis de aorta com um bloqueador dos canais para potássio por 30 minutos e a realização da curva de relaxamento induzida pelo KCl. Foi utilizado o TEA que é um bloqueador não-seletivo dos canais para K^+ na concentração de 2 mM.

3.3.8 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio

O relaxamento dependente do endotélio foi avaliado nos ratos, trinta dias após o infarto do miocárdio, com mesma área de cicatriz, com e sem sinais de insuficiência cardíaca. Uma curva concentração-resposta de relaxamento vascular induzido pela acetilcolina (0,01 nM a 10 μM) foi realizada nos anéis de aorta torácica após a pré-contração com fenilefrina (10^{-4} M, ou a quantidade necessária para produzir 50% da contração induzida pelo KCl (75 mM). Previamente a realização da curva de relaxamento induzido pela acetilcolina, foram adicionados ao banho e incubados por 30 minutos, os fármacos a serem estudados (Figura 10).

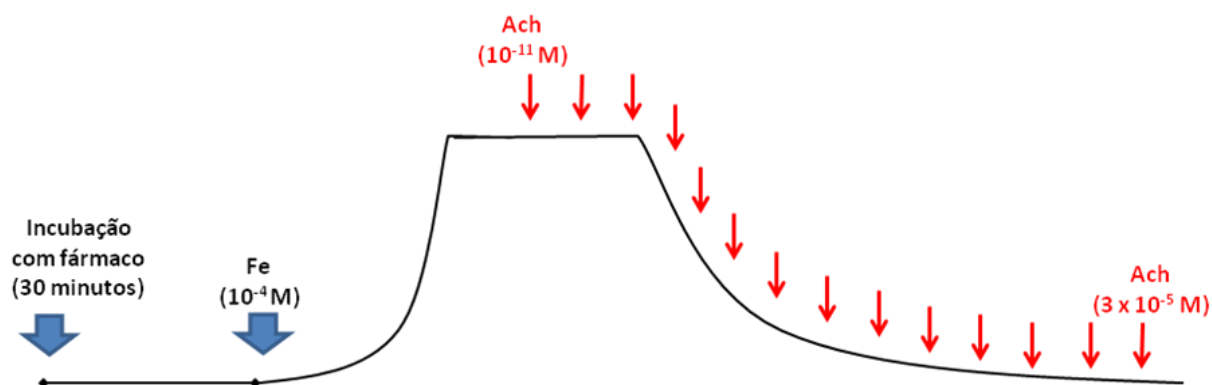


Figura 10: Esquema demonstrativo do protocolo experimental da avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio. Foi realizada a incubação por 30 minutos com o fármaco a ser estudado. Após, o término do período de incubação, adicionou-se fenilefrina (Fe 10^{-4} M) ao banho. Quando o platô da contração à Fe foi atingido realizou-se a curva concentração-resposta à acetilcolina, adicionando-se concentrações crescentes de acetilcolina ao banho (10^{-11} a 3×10^{-5}).

3.3.8.1 Efeito do bloqueio com L-NAME sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, os anéis foram incubados com L-NAME (100 μ M), um inibidor da sintase do óxido nítrico.

Após o período de estabilização em solução normal de Krebs-Henseleit, a preparação foi perfundida por mais 30 minutos com L-NAME (100 μ M). Em seguida foi realizada uma pré-contração com fenilefrina (10^{-4} M). Quando o platô foi atingido, concentrações crescentes de acetilcolina foram adicionadas ao banho (10^{-11} a 3×10^{-5} M).

3.3.8.2 Efeito dos bloqueadores dos canais para potássio sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio

A contribuição dos canais para potássio para o relaxamento vascular sensível à acetilcolina foi avaliada através da incubação dos anéis de aorta com bloqueadores dos canais para potássio por 30 minutos. Após a incubação foi realizada uma pré-contracção com fenilefrina (10^{-4} M). Quando o platô foi atingido, concentrações crescentes de acetilcolina foram adicionadas ao banho (10^{-11} a 3×10^{-5} M). Os bloqueadores utilizados foram: tetraetilamônio (bloqueador não-seletivo dos canais para K^+ , 2 mM); 4-aminopiridina (bloqueador de muitos K_v , 5 mM); apamina (bloqueador seletivo de SK_{Ca} , 0,5 μ M); iberiotoxina (bloqueador seletivo de BK_{Ca} , 30 nM); caribdotoxina (bloqueador dos canais para K_v e K_{Ca} , 0,1 μ M); e duplo bloqueio com apamina (0,5 μ M) mais iberiotoxina (30 nM).

3.3.9 Quantificação da produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) “in situ”.

3.3.9.1 Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE).

Com o objetivo de verificar a produção de $O_2^{\cdot-}$ em animais trinta dias após o infarto, com e sem sinais de insuficiência cardíaca, foi avaliada a fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE). O DHE é um derivado do etídio que entra em contato com $O_2^{\cdot-}$ oxida-se e posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha. Este método permite analisar a produção “in situ” nos segmentos arteriais. Os segmentos de aorta foram retirados dos animais, em seguida, limpos e mantidos por 1 hora em solução Krebs-Henseleit com sacarose 30%. Posteriormente, estes segmentos foram congelados em meio adequado (meio de congelamento). Assim, as amostras foram mantidas a -80° C até o dia do experimento.

Os segmentos de aorta foram cortados no criostato em anéis com 10 μ m de espessura. Posteriormente estes anéis foram recolhidos em lâminas gelatinadas e

secos em estufa a 37° C durante 30 minutos. Após este procedimento, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e posteriormente incubadas com Krebs HEPES (para 100 ml de Krebs: 29,4 mg de CaCl₂, 759 mg de NaCl, 41,7 mg de KCl, 4,9 mg de MgCl₂, 197,8 mg de HEPES e 198,2 mg de glicose) por 30 minutos em uma câmara úmida à 37°C. Decorridos os 30 minutos, o Krebs foi escorrido e o excesso seco. Em seguida, foi realizada incubação com dihidroetídio (DHE) 2 µM por duas horas na estufa com câmara fechada a 37°C. A luminescência emitida foi visualizada com microscópio fluorescência invertido (NIKON eclipse Ti-S) e câmara fotográfica (NIKON digital sighth DS-U₂) com filtro de fluorescência para DHE (verde). O etídeo unido ao núcleo das células foi visualizado com $\lambda_{exc} = 546$ nm e detectado com $\lambda_{em} = 600-700$ nm. As imagens foram quantificadas pelo programa NISS Element - BR.

3.3.10 Quantificação da expressão protéica através do Western blot

Foi realizada a técnica de *Western blot* a fim de detectar a expressão protéica das isoformas das proteínas α_1 -Na⁺K⁺-ATPase, isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) e da sua forma fosforilada (p-eNOS), em aortas de animais que apresentaram ou não sinais de insuficiência cardíaca trinta dias após o infarto.

O método de realização do *Western blot* seguiu as seguintes etapas: preparação do tecido; eletroforese em gel e transferência; bloqueio e incubação com anticorpos; detecção das subunidades; e análise. A expressão protéica de todas as proteínas foi realizada em condições basais (segmentos retirados logo depois do animal ser sacrificado).

As amostras foram preparadas utilizando segmentos de aorta torácica dos grupos Sham, Inf e IC. Os anéis da aorta eram congelados com nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até o momento em que foram utilizados. A homogeneização dos segmentos arteriais congelados foi realizada com homogeneizador de vidro contendo uma solução de Tris HCl 50 mM, NaCl 0,9 M, pH: 7,4. Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier-Hinz GmbH 22331, Alemanha) durante 10 minutos, 6.000 rpm a 4°C. Em seguida, o

sobrenadante foi retirado e realizada a quantificação protéica (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil) pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Posteriormente, foi calculado o volume necessário para uma carga de 50 µg de proteína, sendo este volume de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizados foram diluídas em solução de Laemmli 2X (0,5 mM de uréia, 0,17 mM de SDS, 39 µM de ditiodiol, 0,01 M de Tris e azul de bromofenol 0,5%). As amostras depois de preparadas foram aquecidas a 95°C durante 4 minutos. Para p-eNOS, as amostras não foram aquecidas.

Para a realização da eletroforese e transferência as amostras foram carregadas em geles de SDS-poliacrilamida 7,5% e 10% para eNOS, p-eNOS e α_1 -Na⁺K⁺-ATPase (1,5 M Tris HCl pH: 8.8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em um tampão para eletroforese (25 mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas a uma corrente constante de 80 V por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura). Para p-eNOS, a cuba de eletroforese foi imersa no gelo. Após o término da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (Amersham, UK) previamente ativada por água durante 20 segundos. Para a transferência, o gel, a membrana, o papel Whatman foram montados em um sistema de sanduíche banhados por uma solução tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1% e Metanol 20%) à temperatura ambiente usando um semi-dry (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) com uma corrente de 25 V por 1 hora.

Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução bloqueante (leite desnatado 5%, Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas eram incubadas durante toda a noite à 4 °C, sob agitação, em solução à 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) adicionados aos anticorpos primários para eNOS (1:250 – Transduction Laboratories KY), p-eNOS (1:250–Transduction Laboratories KY) e α_1 -Na⁺K⁺-ATPase (1:250 - transduction Laboratories KY) e α -actina (1:5000, Sigma Chemical, CO, St Louis USA). Depois disto, as membranas foram lavadas, sob agitação, com solução TBS-T

durante 30 minutos para remoção do excesso do anticorpo primário, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 5 minutos. Posteriormente as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário, Imunoglobulina IgG anti-camundongo para a eNOS, p-eNOS e α_1 -Na⁺K⁺-ATPase (1:5000, Sigma Chemical, CO, St Louis USA).

As proteínas correspondentes a eNOS, p-eNOS, α_1 -Na⁺K⁺-ATPase e α -actina foram detectadas por uma reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, a um sistema de detecção (ELC Plus, AmershamTM GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas eram colocadas em contato com filme fotográfico (Hyperfilm, AmershamTM, UK), sendo as bandas impregnadas e posteriormente reveladas.

A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas e, para isto, os filmes com as bandas protéicas impregnadas foram escaneadas. O programa Image J foi utilizado para analisar as bandas.

3.4 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (média \pm EPM). O valor de n foi correspondente ao número de animais utilizados. As respostas de relaxamento à acetilcolina foram expressas em gramas de contração. Porém, foram avaliadas a partir do platô da pré-contração de fenilefrina, que foi considerado 100% da contração do músculo liso vascular. Assim, as respostas de relaxamento à acetilcolina foram expressas como porcentagem de contração residual. Para a determinação dos valores de resposta máxima (R_{máx}) e pD₂ (-log EC₅₀, que corresponde ao valor da concentração de acetilcolina que produz 50% da resposta máxima), em resposta aos diferentes fármacos utilizados, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta, utilizando-se *GraphPad Prism 5 Software*, San Diego, CA, USA.

A resposta de relaxamento ao KCl dos anéis vasculares foi expressa como a porcentagem de contração residual à fenilefrina. As curvas de relaxamento ao KCl

foram construídas através da análise de regressão não-linear das curvas concentração-resposta obtidas. Para tal foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5 Software* (San Diego, CA, USA).

Para comparar a atividade funcional da Na⁺K⁺-ATPase sensível à ouabaína entre os grupos estudados foi realizada ANOVA duas vias, com *post hoc* de Bonferroni, entre as curvas de relaxamento induzido pelo KCl. Assim, foi avaliado tanto o relaxamento induzido por doses cumulativas de KCl (1, 2, 5, 10 mM), quanto a capacidade da ouabaína de inibir este relaxamento.

Os resultados da expressão protéica obtidos pela técnica de *Western blot* estão expressos como relação entre a densidade óptica para estas proteínas em relação a α actina. Adicionalmente, com a finalidade de evitar erros por diferenças de exposição dos filmes à revelação, estes resultados também foram demonstrados como dados normalizados, considerando o valor de 1 para a densidade da banda correspondente ao animal Sham. Desta forma, foi realizada a relação entre a banda Sham e a banda par dos animais infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca, que apresentavam-se dentro do mesmo gel. Já os resultados da expressão protéica da p-eNOS estão expressos como a razão entre p-eNOS/eNOS. Em todas as membranas utilizadas houve amostras de todos os grupos experimentais estudados, Sham, Inf e IC, bem como os controles positivos e os marcadores de peso molecular.

A análise estatística dos demais dados foi realizada por análise de variância, ANOVA uma e duas vias, seguida respectivamente por *post hoc* de Tukey e *post hoc de Bonferroni*. O teste *t* não pareado também foi utilizado quando necessário. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $P < 0,05$.

3.5 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

- Acetilcolina, Cloridrato (Sigma)
- Ácido acético glacial (Sigma)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido bórico (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Ácido hidroxietilpiperazina (HEPES) (Sigma)
- Ácido orto-fosfórico (Sigma)
- Albumina bovina (Sigma)
- Anticorpo produzido em camundongo para alfa actina (Sigma)
- Anticorpo produzido em camundongo para eNOS (Transduction Laboratories)
- Anticorpo produzido em camundongo para peNOS (Transduction Laboratories)
- Azul brilhante de Coomassie (Sigma)
- Azul de Bromofenol (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Vetec)
- Bromophenol Blue (Sigma)
- Cloreto de cálcio dihidratado (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Dihidroetidio (Sigma)
- Dodecil sulfato de sódio (Sigma)
- Etanol absoluto (Sigma)
- Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Fosfato de Potássio Monobásico (Merck)
- Glicerol (Sigma)
- Glicose (Merck)
- Hidróxido de sódio (Sigma)
- Hip-His-Leu (Sigma)
- Indometacina (Sigma)
- Leite desnatado (Nestlé)
- L-Fenilefrina, Hidrocloreto (Sigma)
- N,N, N',N'- Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)

-
- N,N'- Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)
 - N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
 - Ouabaína, octahidrato (Sigma)
 - Persulfato de amônio (Sigma)
 - Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)
 - Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (Amersham)
 - Tetraetilamonio (TEA) (Sigma)
 - Tiopental Sódico (Amental®)
 - Tris HCl (Sigma)

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

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

A tabela 1 apresenta os valores hemodinâmicos dos grupos Sham, Inf e IC trinta dias após a cirurgia para oclusão da coronária ou cirurgia fictícia. Não houve diferença estatisticamente significativa na pressão arterial sistólica, diastólica e média entre os grupos. A PSVE e a FC apresentaram-se também semelhantes entre os grupos. Contudo, houve diferença significativa na PDfVE que estava aumentada no grupo IC em comparação com os animais Sham e Inf. As derivadas de pressão positiva e negativa em função do tempo no VE foram menores no grupo IC em comparação ao grupo Sham e Inf (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados hemodinâmicos dos grupos Sham, Inf e IC 30 dias após IM

Dados hemodinâmicos			
	Sham (n= 7)	Inf (n= 6)	IC (n= 6)
Pressão Arterial (mmHg)			
Sistólica	83 ± 7,58	104 ± 5,77	101 ± 8,18
Diastólica	75 ± 6,60	75 ± 6,46	76 ± 10,52
Média	79 ± 5,52	89 ± 3,35	89 ± 1,81
FC (bpm)	287 ± 18	291 ± 4	300 ± 17
PSVE (mmHg)	81 ± 3,56	110 ± 7,0	104 ± 6,62
PDfVE (mmHg)	5,26 ± 0,52	7,20 ± 0,64	19,65 ± 2,13**
dP/dt + VE(mmHg)	5103 ± 298	5120 ± 215	4098 ± 231**
dP/dt - VE (mmHg)	4683 ± 327	3971 ± 132	3184 ± 185**

Dados hemodinâmicos dos animais Sham, Infarto (Inf) e Infarto com insuficiência cardíaca (IC), 30 dias após o infarto: Frequência cardíaca (FC); Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE); Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDfVE); Derivada positiva (dP/dt+); Derivada negativa (dP/dt-). Os resultados foram expressos como média ± EPM, considerando significantes as diferenças para $P < 0,05$. ANOVA uma via com *post hoc* de Tukey: * $P < 0,05$ vs. Sham; ** $P < 0,05$ vs. Inf.

4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PONDERAIS

Trinta dias após a indução cirúrgica ao IM através da oclusão coronariana foram avaliados os parâmetros ponderais. A razão entre a área de cicatriz de infarto e a massa corporal (AI/MC) e a razão entre a massa do ventrículo esquerdo e a massa corporal (VE/MC) não foram diferentes entre os grupos de ratos Inf e IC quando foi realizado Teste *t* de Student não pareado e ANOVA uma via com *post hoc* de Tukey, respectivamente (Figura 11 – B; Tabela 2). Entretanto, as razões entre a massa do ventrículo direito e a massa corporal (VD/MC), bem como a massa dos pulmões e a massa corporal (PP/MC) estavam aumentadas no grupo IC quando o mesmo foi comparado com os grupos Sham e Inf (Figura 11 C, D; Tabela 2). A massa corporal dos animais Sham, Inf e IC não foi diferente entre os grupos após 30 dias decorridos do IM (Figura 11 A; Tabela 2).

Tabela 2 – Dados ponderais dos grupos Sham, Inf e IC 30 dias após IM

	Dados ponderais		
	Sham (n= 37)	Inf (n= 27)	IC (n= 25)
Massas (g)			
MC	322 ± 7	341 ± 5	337 ± 7
VE	0,68 ± 0,02	0,79 ± 0,02	0,74 ± 0,02
VD	0,24 ± 0,03	0,27 ± 0,01	0,41 ± 0,03 ^{*+}
PP	1,69 ± 0,05	1,94 ± 0,06	3,18 ± 0,12 ^{*+}
Razões (mg/g)			
VE/MC	2,12 ± 0,03	2,19 ± 0,05	2,27 ± 0,07
VD/MC	0,64 ± 0,09	0,74 ± 0,04	1,25 ± 0,08 ^{*+}
PP/MC	4,41 ± 0,35	3,91 ± 0,48	8,34 ± 0,69 ^{*+}
AI/MC (mm ² /g)		0,42 ± 0,05	0,39 ± 0,03
AI (mm²)	---	152,6 ± 20,3	134,3 ± 11,1
AI (%)	---	33,67 ± 1,62	38,7 ± 2,45

Dados ponderais dos animais Sham, Infarto (Inf) e Infarto com sinais de insuficiência cardíaca (IC), 30 dias após o infarto. Valores de massa corporal (MC); Massa do ventrículo esquerdo (VE); Massa do ventrículo direito (VD); Massa dos pulmões (PP); Razão entre a massa do ventrículo esquerdo e a massa corporal (VE/MC); Razão entre a massa do ventrículo direito e a massa corporal (VD/MC); Razão entre a massa dos pulmões e a massa corporal (PP/MC); Razão entre a AI em mm² e a massa corporal (AI/MC); Perímetro da área de cicatriz após o infarto do ventrículo esquerdo em milímetros quadrados pelo método da planimetria (AI mm²); Porcentagem da área de cicatriz após o infarto em relação ao VE (AI%). Os resultados foram expressos como média ± EPM, considerando significantes as diferenças com P < 0,05. ANOVA uma via com *post hoc* de Tukey: *P < 0,05 vs. Sham; ⁺P < 0,05 vs. Inf. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença da AI entre os grupos Inf e IC (P = 0,30).

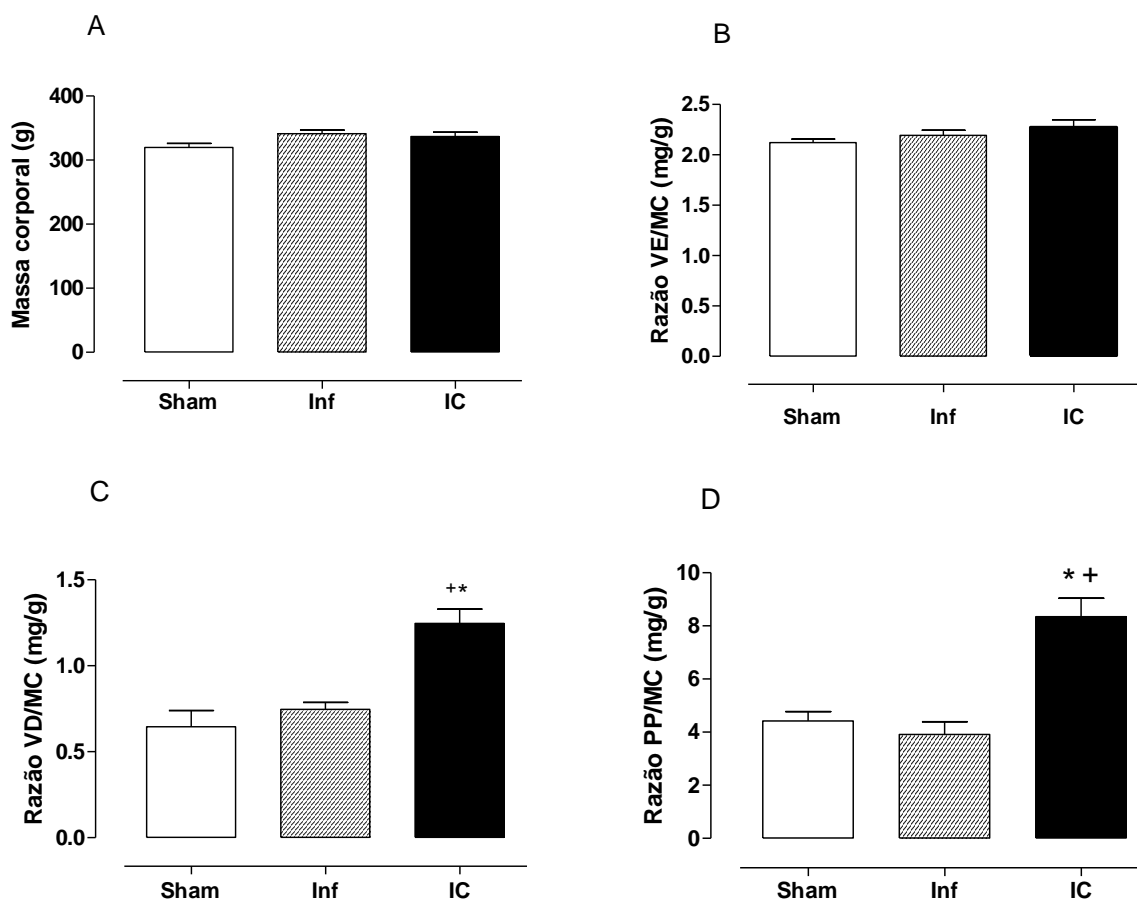


Figura 11: Dados ponderais dos animais Sham, Infarto (Inf) e Infarto com sinais de insuficiência cardíaca (IC), 30 dias após o infarto: **A)** Massa corporal (MC); **B)** Razão entre a massa do ventrículo esquerdo e a massa corporal (VE/MC); **C)** Razão entre a massa do ventrículo direito e a massa corporal (VD/MC); **D)** Razão entre a massa dos pulmões e a massa corporal (PP/MC). Os resultados foram expressos como média \pm EPM, considerando significantes as diferenças para $P < 0,05$. ANOVA uma via com *post hoc* de Tukey: * $P < 0,05$ vs. Sham; + $P < 0,05$ vs. Inf.

4.3 AVALIAÇÃO DA ÁREA DE CICATRIZ APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO

A quantificação da área de cicatriz após o IM foi realizada através de dois diferentes métodos: 1) planimetria - medidas realizadas por contagem dos pontos em papel milimetrado com a área calculada em mm^2 . A soma das áreas do VE remanescente e a cicatriz corresponderam à área total, e a AI foi calculada pela porcentagem da área total; 2) histologia - realizada para avaliar se a semelhança das AI entre os grupos Inf e IC, que foi encontrada como resultado do método de planimetria, foi influenciada pela técnica empregada.

Na comparação dos resultados obtidos através da planimetria foi possível observar que a porcentagem da área de cicatriz de infarto, bem como a razão entre a área da cicatriz e a massa corporal dos animais foram similares nos grupos Inf e IC trinta dias após o IM (Figura 12 A, B; Tabela 2).

Na Figura 13 (A, B, C) é possível observar que não houve correlação entre a porcentagem da área de cicatriz do ventrículo esquerdo e a razão VE/MC, VD/MC e PP/MC de todos os animais.

A avaliação histológica da AI demonstrou que não há diferença entre os grupos Inf e IC de forma semelhante ao resultado da planimetria. Desta forma, não houve diferença estatística quando foram comparadas as AI%, avaliadas por histologia, entre os grupos (Inf: $51,70 \pm 2,37$; IC: $53,03 \pm 1,49$ %, $P > 0.05$) (Figura 14 A, B).

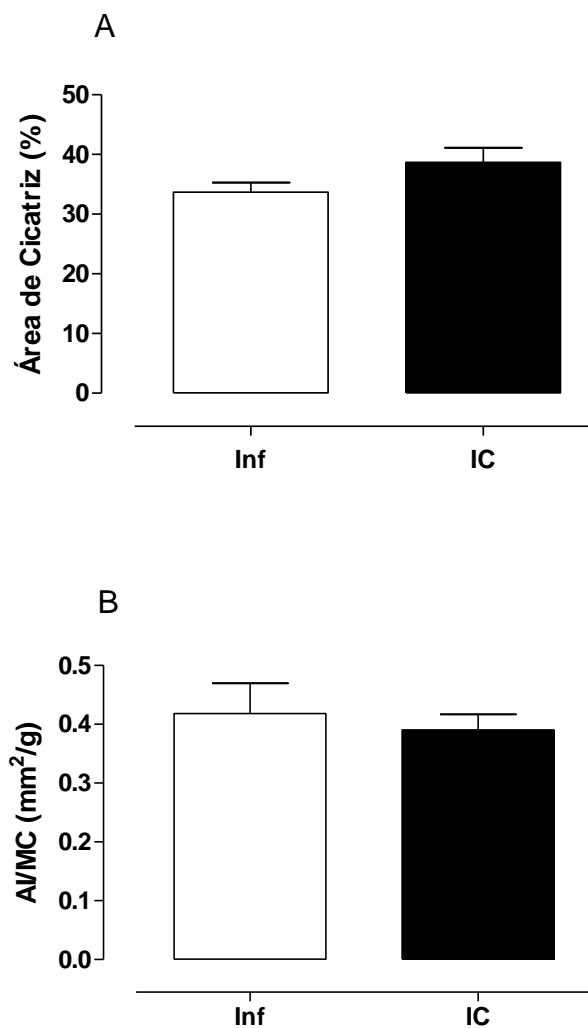


Figura 12: Área de cicatriz, medida por planimetria, dos animais Infarto (Inf) e Infarto com sinais de insuficiência cardíaca (IC) trinta 30 dias após o infarto. **A)** Porcentagem da área de cicatriz; **B)** Razão entre o perímetro da área de cicatriz do ventrículo esquerdo em mm² e a massa corporal em gramas (VE/MC). Os resultados foram expressos como média \pm EPM, considerando significantes as diferenças para $P < 0,05$. Para análise estatística foi utilizado teste *t* de Student não pareado.

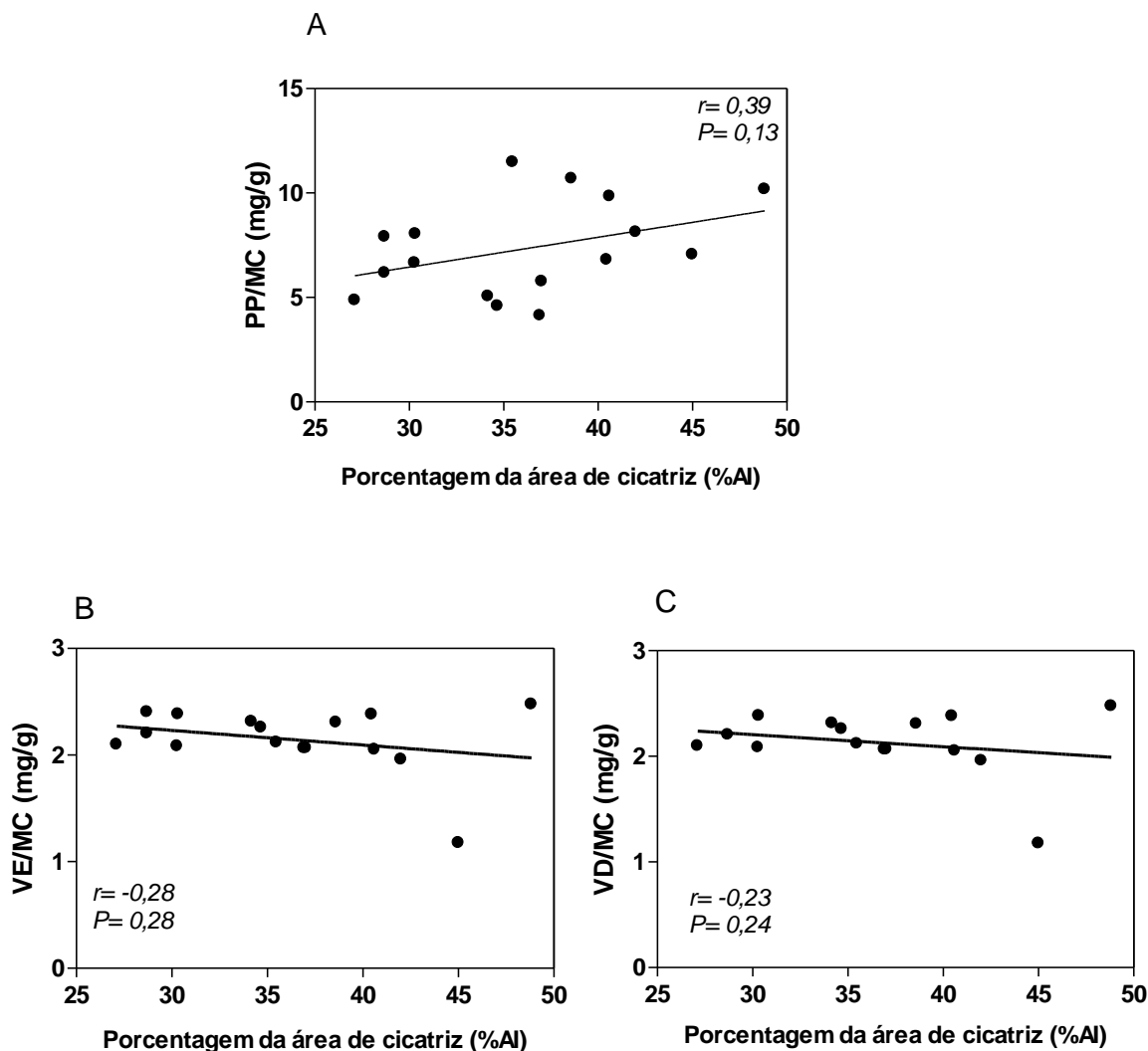


Figura 13: A) Correlação entre a razão da massa dos pulmões pela massa corporal (PP/MC) e a AI% de todos os animais. **B)** Correlação entre a AI% e a razão VE/MC de todos os animais; **C)** Correlação entre a AI% e a VD/MC de todos os animais. Os resultados foram expressos como correlação linear, com coeficiente de correlação de Pearson A) $r = 0,39$ e $P = 0,13$ (não houve correlação); B) $r = -0,28$ e $P = 0,28$ (não houve correlação); C) $r = -0,23$ e $P = 0,24$ (não houve correlação).

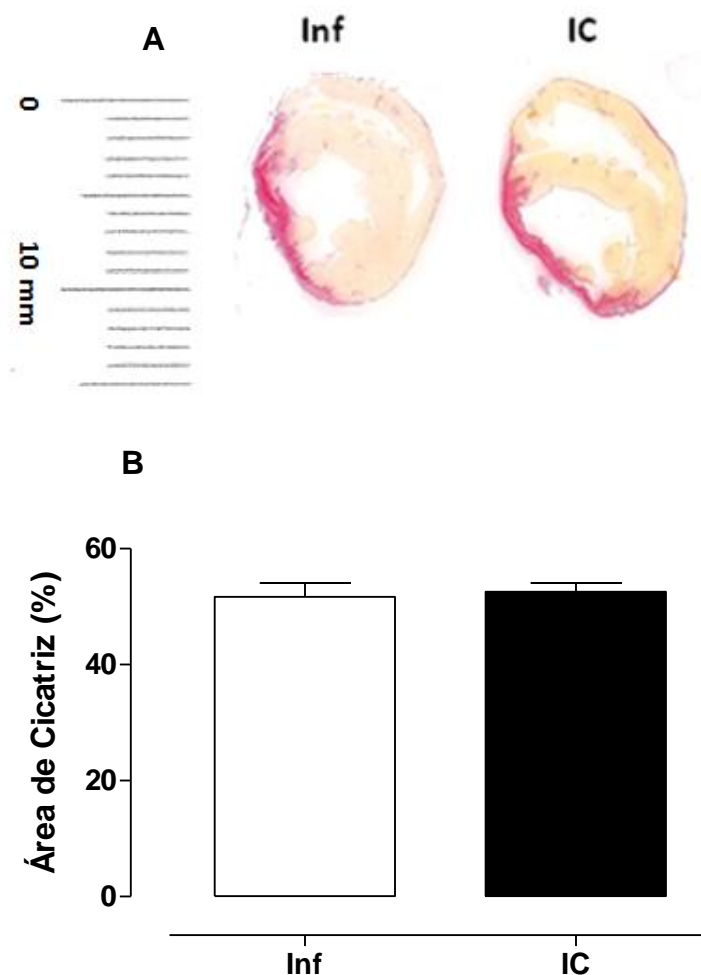


Figura 14: Avaliação histológica da área de cicatriz após o infarto. **A)** Fotografia das lâminas de corações de animais trinta dias após infarto do miocárdio, coradas com *picrosirius red* (corte de 5 μ m). À esquerda, área de cicatriz do animal infartado sem insuficiência (Inf) e à direita do animal infartado com insuficiência (IC); **B)** Resultado do cálculo da porcentagem da área de infarto (AI%) foi realizado pela divisão do perímetro da cicatriz na superfície endocárdica (CEN) pelo perímetro endocárdico total (PEN) mais o perímetro da cicatriz epicárdica (CEP) dividido pelo perímetro epicárdico total (PEP), dividido por 2, e multiplicado por 100. Os resultados foram apresentados como média \pm EPM, considerando significantes as diferenças para $P < 0,05$. Para análise estatística foi utilizado teste *t* de Student não pareado.

4.4 ATIVIDADE FUNCIONAL DA Na⁺K⁺-ATPase SENSÍVEL À OUABAÍNA 30 DIAS APÓS O INFARTO – COMPARAÇÃO INTRAGRUPO

4.4.1 Grupo Sham

A fim de avaliar o relaxamento induzido pelo KCl nos animais Sham foram realizados protocolos com o endotélio intacto, após a remoção do endotélio e também após a incubação com L-NAME ou TEA. Todas as avaliações foram realizadas antes e após a incubação com OUA por trinta minutos com o objetivo de verificar a atividade funcional da Na⁺K⁺-ATPase sensível à OUA. A partir deste ponto da descrição dos resultados todas as curvas que representem os animais Sham serão sempre apresentadas na cor preta.

Na figura 15 A, B e C, os anéis de aorta torácica dos animais Sham, 30 dias após o cirurgia fictícia para indução ao infarto, demonstraram diminuição do relaxamento induzido pelo KCl sempre que incubados com OUA.

Na figura 15 A, os resultados demonstram que não houve diferença no relaxamento induzido pelo KCl após a remoção mecânica do endotélio antes ou após a incubação com OUA. Na figura 15 B, não há diferença no relaxamento induzido pelo KCl quando os anéis E+ são comparados com os anéis que foram incubados com L-NAME. Embora a OUA tenha sido capaz de diminuir o relaxamento vascular de todos os anéis vasculares dos animais Sham, a incubação com OUA mais L-NAME não foi capaz de proporcionar inibição adicional do relaxamento induzido pelo KCl e, pelo contrário até diminuiu este relaxamento na concentração de 10 mM de KCl (na concentração 10mM, *P< 0,05, L-NAME OUA vs. E+ OUA).

Na figura 15 C, é possível observar que antes da incubação com OUA houve uma diminuição do relaxamento vascular dos anéis de aorta que foram previamente incubados com TEA quando comparados aos E+ (nas concentrações 2 e 5 mM, *P< 0,05 TEA vs. E+). Após a incubação destes anéis com OUA esta diferença desapareceu.

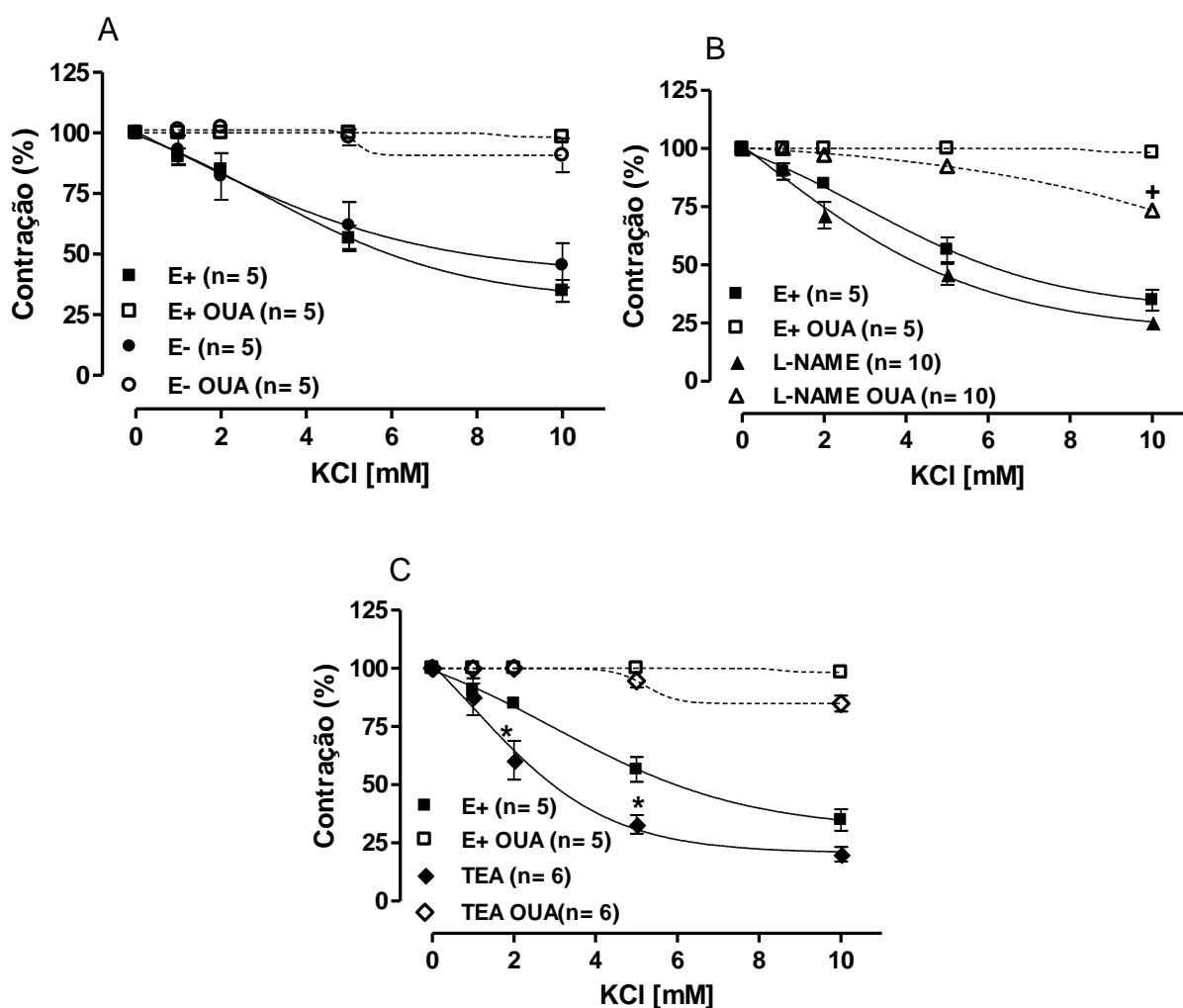


Figura 15: Curvas de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratos Sham, 30 dias após a cirurgia fictícia para indução ao infarto. Anéis isolados de aorta com endotélio íntegro (E+), após a remoção mecânica do endotélio (E-), após a incubação com L-NAME e tetraetilâmonio (TEA). **A)** Grupo Sham E+ vs. Sham E-. **B)** Grupo Sham E+ vs. Sham L-NAME. **C)** Grupo Sham E+ vs. Sham TEA. Todas as comparações foram realizadas antes e após a incubação por 30 minutos com OUA (100 μ M). A resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi realizada ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. Valores foram considerados significantes com $P < 0,05$.

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

* $P < 0,05$ TEA vs. E+.

4.4.2 Grupo Inf

Os animais que não apresentaram sinais de IC 30 dias após o infarto serão a partir deste ponto representados pela cor azul. A fim de avaliar o relaxamento dos anéis de aorta destes animais foram realizados os mesmos protocolos descritos no item 4.4.1 para os animais Sham.

Na figura 16 A observa-se que o relaxamento induzido pelo KCl estava diminuído nos animais Sham após a remoção do endotélio (concentrações 5 e 10 mM, *P< 0,05, E- vs. E+). Entretanto, a capacidade da OUA de inibir a Na⁺K⁺-ATPase não foi modificada após a remoção do endotélio.

Após a incubação com TEA ou com L-NAME não foi observada nenhuma diferença no relaxamento dos anéis de aorta dos animais Inf quando comparados aos anéis com endotélio intacto.

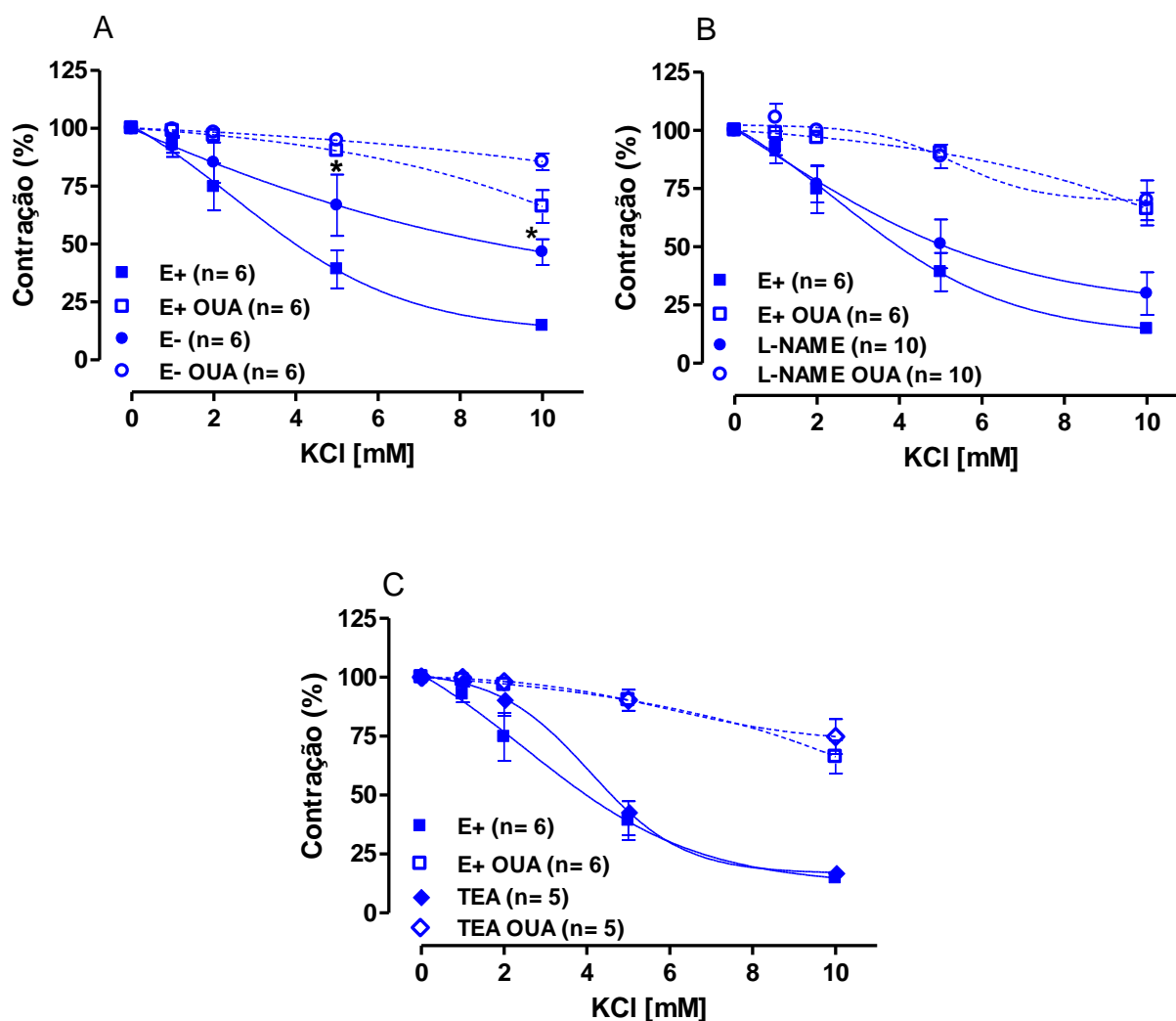


Figura 16: Curvas de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratos sem sinais de insuficiência cardíaca (Inf), 30 dias após o infarto. Anéis isolados de aorta com endotélio íntegro (E+), após a remoção mecânica do endotélio (E-), após a incubação com L-NAME e tetraetilâmonio (TEA). **A)** Grupo Inf E+ vs. Inf E-. **B)** Grupo Inf E+ vs. Inf L-NAME. **C)** Grupo Inf E+ vs. Inf TEA. Todas as comparações foram realizadas antes e após a incubação por 30 minutos com OUA (100 μ M). A resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi realizada ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. Valores foram considerados significantes com $P < 0,05$.

* $P < 0,05$, E- vs. E+;

4.4.3 Grupo IC

O grupo de animais infartados com sinais de IC foi avaliado de acordo com os protocolos descritos para os animais Sham e Inf citados no item 4.4.1. Todas as figuras que ilustram os resultados destes animais serão apresentadas a partir deste ponto com a cor vermelha.

Na figura 17 A foi avaliada a participação do endotélio no relaxamento induzido pelo KCl, em anéis de aorta de ratos IC. Após a remoção mecânica do endotélio houve diminuição do relaxamento induzido pelo KCl nestes animais (na concentração 5mM, *P< 0,05, E- vs. E+). Entretanto, a remoção do endotélio não foi capaz de modificar a capacidade da OUA de inibir a Na⁺K⁺-ATPase.

A incubação com L-NAME ocasionou uma diminuição do relaxamento dos anéis de aorta dos animais IC quando comparados aos anéis E+ (Concentrações 1, 2 e 5 mM, *P< 0,05, L-NAME vs. E+) (Figura 17 B).

A incubação dos anéis de aorta dos animais IC com TEA não promoveu nenhuma alteração do relaxamento induzido pelo KCl, antes e após a incubação com OUA, como pode ser observado na Figura 17 C.

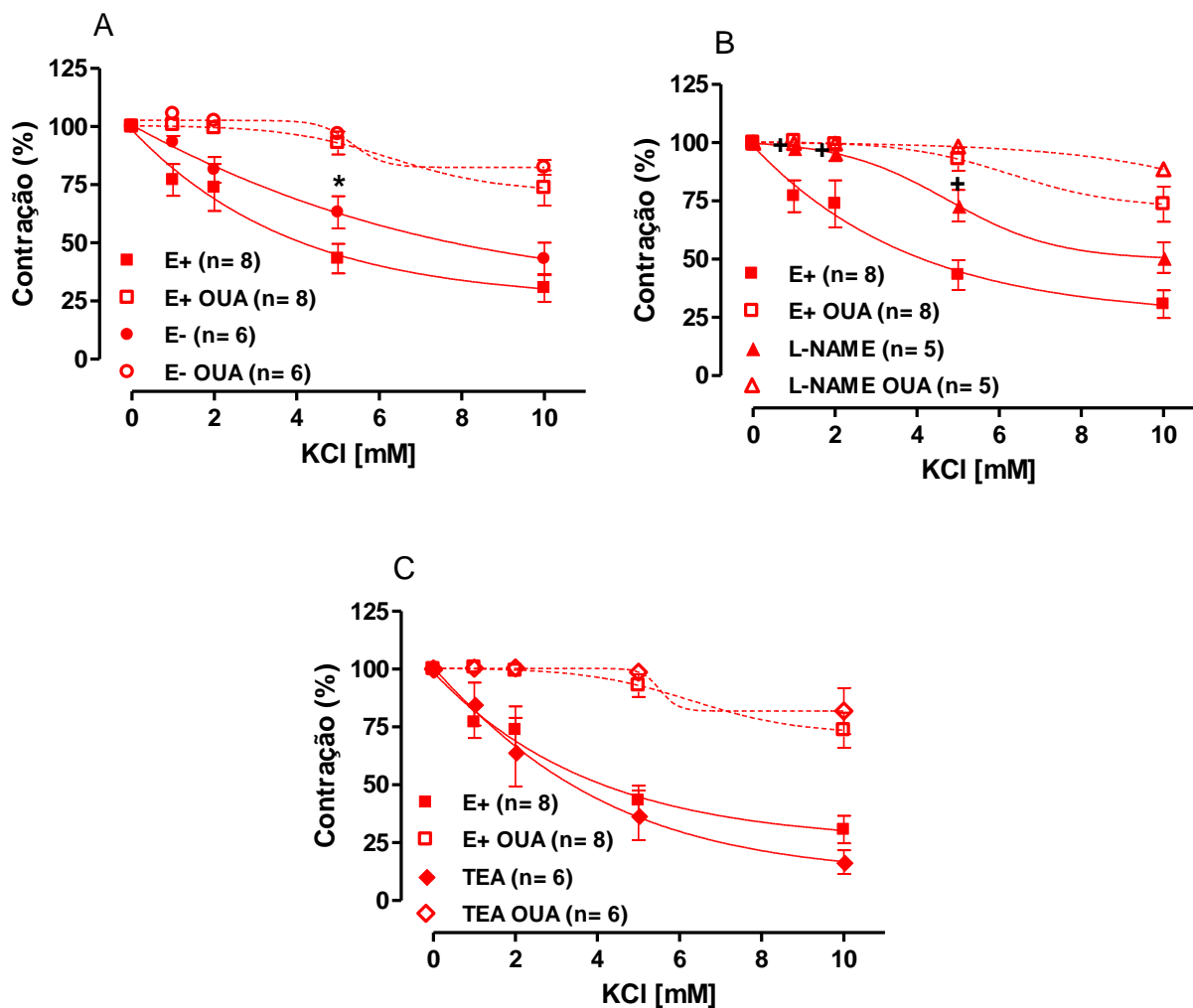


Figura 17: Curvas de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratos com sinais de insuficiência cardíaca (IC), 30 dias após o infarto. Anéis isolados de aorta com endotélio íntegro (E+), após a remoção mecânica do endotélio (E-), após a incubação com L-NAME e tetraetilâmonio (TEA). **A)** Grupo IC E+ vs. IC E-. **B)** Grupo IC E+ vs. IC L-NAME. **C)** Grupo IC E+ vs. IC TEA. Todas as comparações foram realizadas antes e após a incubação por 30 minutos com OUA (100 μ M). A resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi realizada ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. Valores foram considerados significantes com $P < 0,05$.

* $P < 0,05$, E- vs. E+;

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

4.5 ATIVIDADE FUNCIONAL DA Na⁺K⁺-ATPase SENSÍVEL À OUABAÍNA 30 DIAS APÓS O INFARTO – COMPARAÇÃO INTERGRUPOS

4.5.1 Comparação da atividade funcional da Na⁺K⁺-ATPase sensível à OUA em aortas de ratos com endotélio intacto dos grupos Sham, Inf e IC

Na figura 18 A, os anéis de aorta torácica dos animais infartados que não apresentaram sinais de insuficiência cardíaca, 30 dias após o infarto do miocárdio, demonstraram aumento do relaxamento induzido pelo KCl (*P> 0,001, nas concentrações 5 e 10 mM de KCl) quando comparados com os animais Sham. Quando os anéis foram incubados com OUA por 30 minutos, o relaxamento induzido pelo KCl apresentou-se diminuído em ambos os grupos Sham E+ e Inf E+. Entretanto, a inibição completa do relaxamento induzido pelo KCl só foi observada no grupo Sham E+ (*P> 0,001, na concentração 10 mM de KCl).

Comparando os animais IC com o grupo cirurgia fictícia (Figura 18 B) não foi observada diferença significativa no relaxamento induzido pelo KCl antes da incubação com OUA. Contudo, os anéis de aorta dos ratos IC que foram incubados com OUA apresentaram relaxamento induzido pelo KCl maior que nos animais Sham (&P> 0,01, na concentração 10 mM de KCl).

Quando os grupos Inf e IC foram comparados, o relaxamento induzido pelo KCl estava diminuído nos animais IC em relação aos Inf (#P> 0,05, na concentração 10 mM de KCl). Entretanto, a adição de OUA ao banho não foi capaz de promover diferenças entre o relaxamento induzido pelo KCl em animais Inf e IC (Figura 18 C).

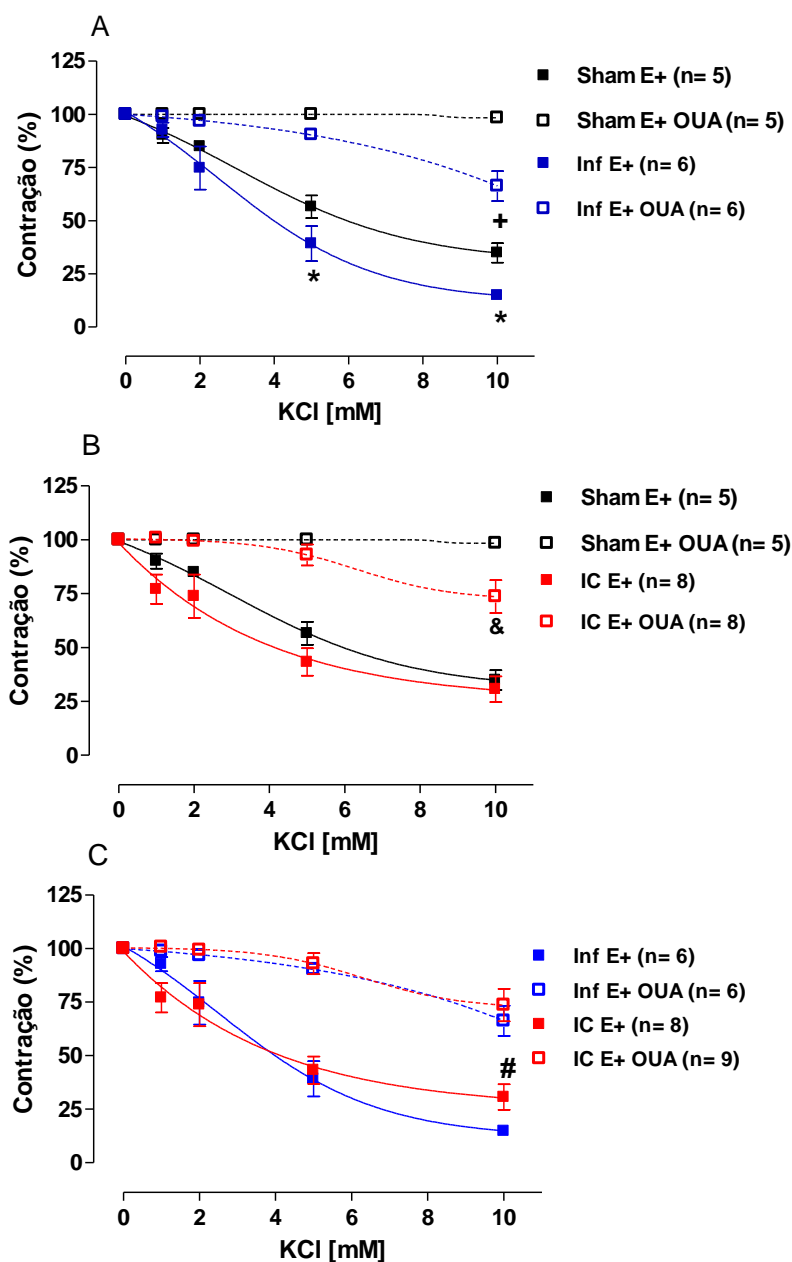


Figura 18: Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratos com endotélio íntegro (E+), 30 dias após o infarto. **A)** Grupo Inf E+ vs. Sham E+. **B)** Grupo IC E+ vs. Sham E+. **C)** Grupo IC E+ vs. Inf E+. Todas as comparações foram realizadas antes e após a incubação por 30 minutos com OUA (100 μ M). A resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi realizada ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. Valores foram considerados significantes com $P < 0,05$.

* $P < 0,001$ Inf E+ vs. Sham E+;

+ $P < 0,001$ Inf E+ OUA vs. Sham E+ OUA;

& $P < 0,01$ IC E+ OUA vs. Sham E+ OUA;

$P < 0,05$ IC E+ vs. Inf E+.

4.5.2 Comparação da modulação do endotélio sobre a atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à OUA nos anéis de aorta de ratos Sham, Inf e IC

Como pode ser observado na figura 19 A quando os animais infartados que não apresentaram sinais de insuficiência cardíaca, 30 dias após o infarto do miocárdio, foram comparados com os animais Sham não houve diferença estatisticamente significativa no relaxamento induzido pelo KCl, na presença ou na ausência de OUA.

Após a remoção mecânica do endotélio dos anéis de aorta, o relaxamento induzido pelo KCl também não foi diferente quando comparou-se os grupos Sham e IC, bem como Inf e IC. A ausência de diferença entre os grupos persistiu mesmo após a incubação com OUA ($P > 0,05$) (Figura 19 B e C).

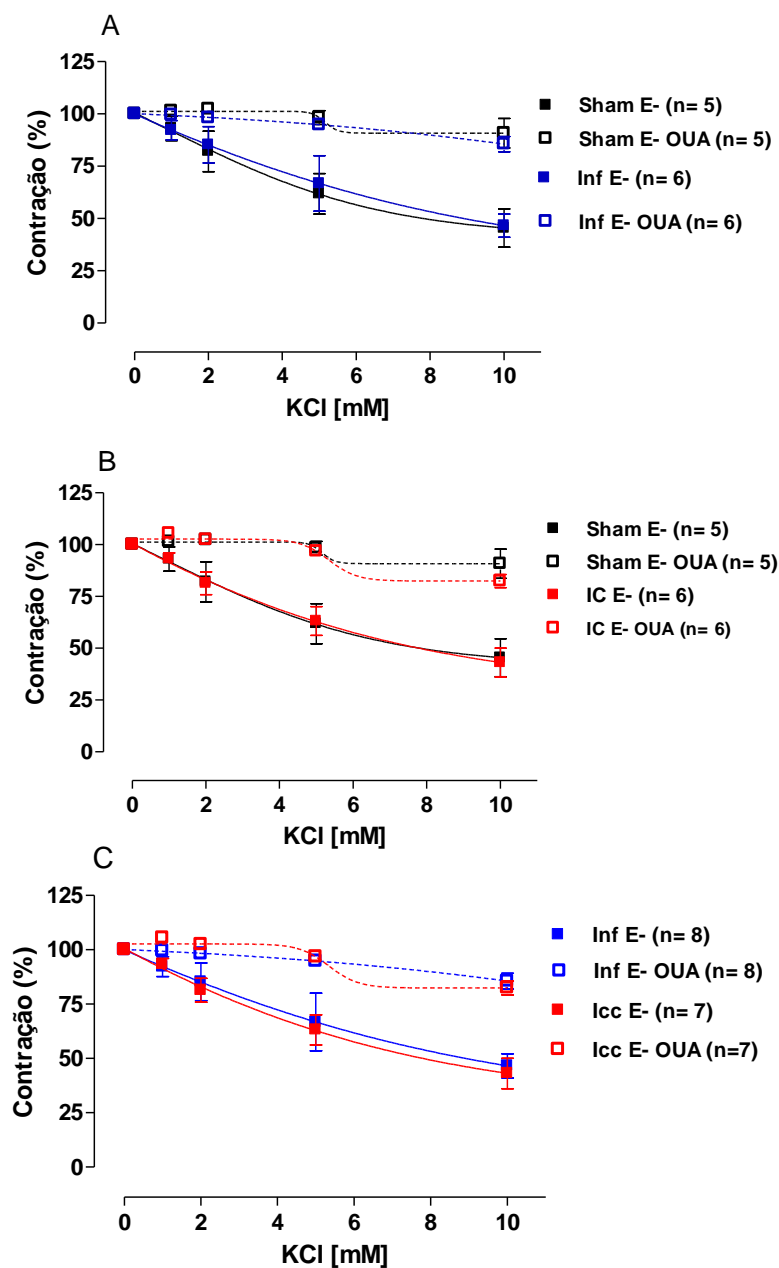


Figura 19: Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em aorta de ratos com endotélio removido mecanicamente (E-), 30 dias após o infarto. **A)** Grupo Inf E- vs. Sham E-; **B)** Grupo IC E- vs. Sham E-; **C)** Grupo IC E- vs. Inf E-. Todas as comparações foram realizadas antes e após a incubação por 30 minutos com OUA (100 μ M). A resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi realizada ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. Valores foram considerados significantes com $P < 0,05$.

4.5.3 Diferença da participação do NO sobre a atividade funcional da Na⁺K⁺-ATPase sensível à OUA em anéis de aorta dos grupos Sham, Inf e IC

Conforme observado na figura 20 A após a incubação com L-NAME não houve diferença no relaxamento induzido pelo KCl entre os grupos Inf e Sham, antes e após a incubação com OUA.

Na comparação entre os grupos IC e Sham, os animais IC apresentaram diminuição do relaxamento induzido pelo KCl, antes (**P > 0,001, na concentração 2 e 5 mM de KCl e *P < 0,05 na concentração de 10 mM) e após (+P < 0,05 na concentração de 10 mM) a incubação com OUA em relação aos animais Sham (Figura 20 B).

Quando os grupos IC e Inf foram comparados, os animais IC apresentaram diminuição do relaxamento induzido pelo KCl, antes (*P > 0,05, na concentração 5 e 10 mM de KCl) e após (+P < 0,05 na concentração de 10 mM) a incubação com OUA em relação aos animais Inf (Figura 20 C).

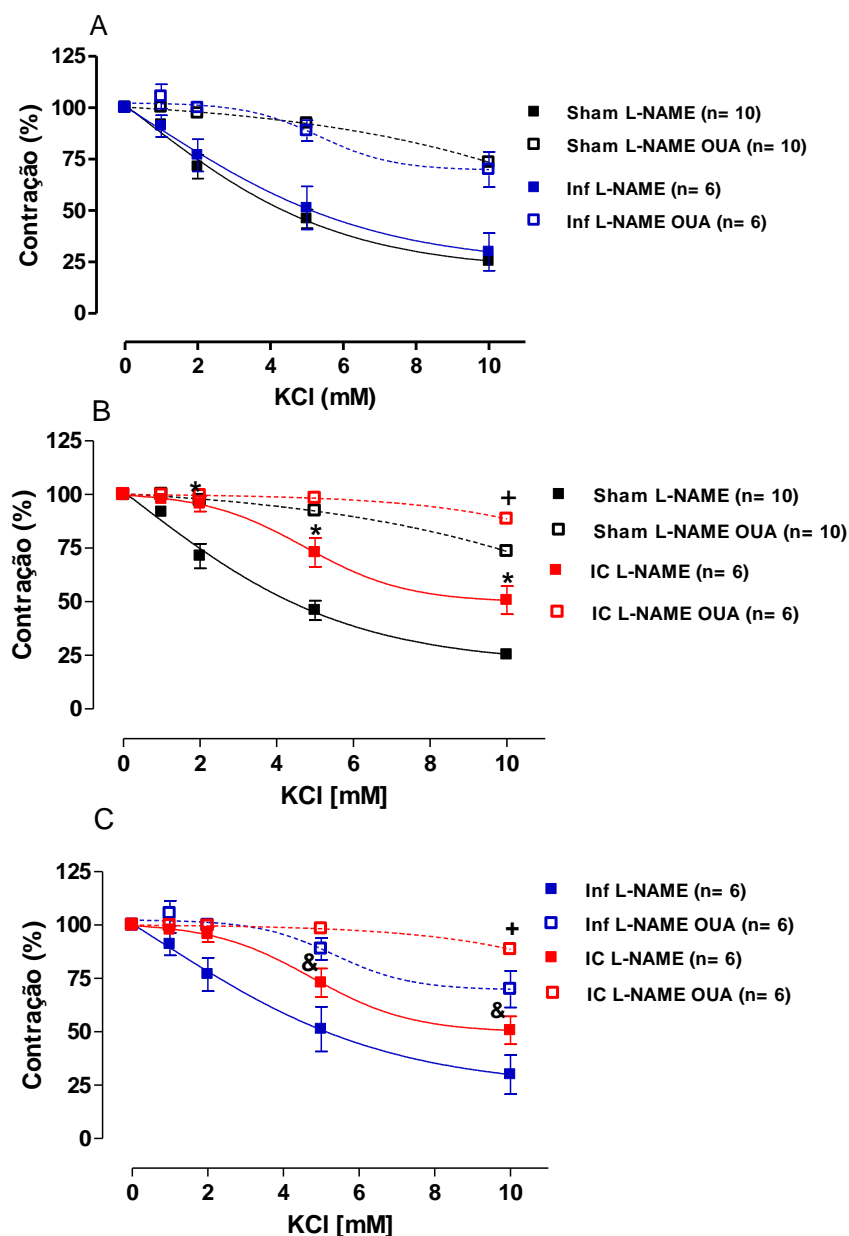


Figura 20: Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em anéis de aorta de ratos incubados por 30 minutos com L-NAME (100 μ M), 30 dias após o infarto. **A)** Grupo Inf L-NAME vs. Sham L-NAME; **B)** Grupo IC L-NAME vs. Sham L-NAME; **C)** Grupo IC L-NAME vs. Inf L-NAME. Todas as comparações foram realizadas antes e após a incubação por 30 minutos com OUA (100 μ M). A resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi realizada ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. Valores foram considerados significantes para $P < 0,05$.

* $P < 0,05$ IC L-NAME vs. Sham L-NAME;

+ $P < 0,05$ IC L-NAME OUA vs. Sham L-NAME OUA;

& $P < 0,05$ IC L-NAME e vs. Inf L-NAME.

4.5.4 Diferença da participação dos canais para K^+ sobre a atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à OUA em anéis de aorta dos grupos Sham, Inf e IC

Conforme observado na Figura 21 A, B e C a incubação com TEA não foi capaz de promover diferenças estatisticamente significantes no relaxamento induzido pelo KCl entre os grupos Sham, Inf e IC, antes e após a incubação com OUA.

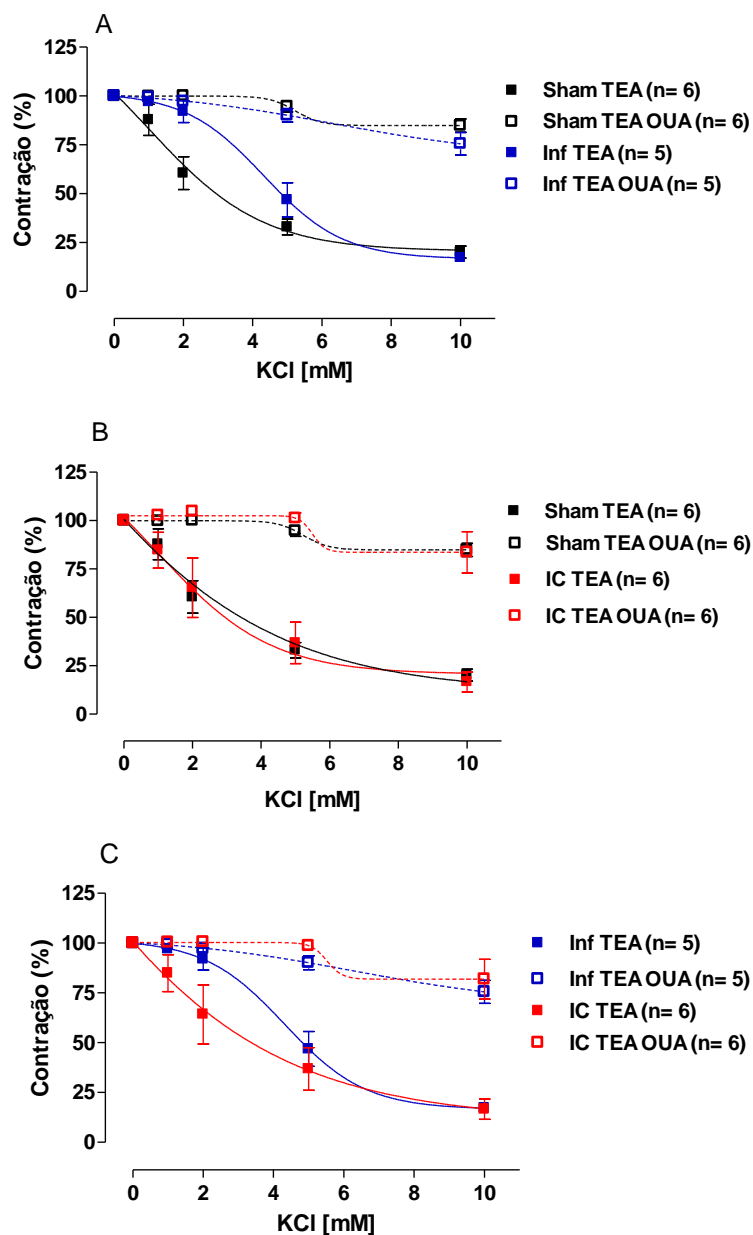


Figura 21: Curva de relaxamento induzido pelo KCl, em anéis de aorta de ratos incubados por 30 minutos com TEA (2 mM), 30 dias após o infarto. **A)** Grupo Inf TEA vs. Sham TEA; **B)** Grupo IC TEA vs. Sham TEA; **C)** Grupo IC TEA vs. Inf TEA. Todas as comparações foram realizadas antes e após a incubação por 30 minutos com OUA (100 μ M). A resposta de relaxamento ao KCl foi expressa como porcentagem de contração à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi realizada ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. Os valores foram considerados significantes para $P < 0,05$.

4.6 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS PARA K^+ NA RESPOSTA VASODILATADORA DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO

4.6.1 Avaliação da participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio nos animais Sham

Na figura 22 A é possível observar que após a incubação dos anéis de aorta com L-NAME (100 μ M) o relaxamento induzido pelo endotélio foi abolido. Com a finalidade de estudar também a participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, os anéis foram incubados com TEA (2 mM), um inibidor não seletivo dos canais para K^+ . A figura 22 B e tabela 3 demonstram que a incubação com TEA diminuiu a R_{max} e a sensibilidade dos anéis de aorta dos animais Sham à ACh.

O efeito da inibição dos canais para K^+ voltagem dependentes sobre o relaxamento induzido pela ACh foi avaliado utilizando 5 mM de 4-Aminopridina, um bloqueador específico para estes canais. A incubação com 4-AP reduziu a R_{max} e a sensibilidade dos anéis à ACh (Figura 22 C e Tabela 3).

Após a incubação dos anéis de aorta com os bloqueadores específicos dos canais para K^+ ativados por cálcio de baixa condutância (Apamina) e larga condutância (Iberiotoxina) não houve diferença no relaxamento vascular induzido pela ACh (Figura 23 A, B e Tabela 3). Contudo, o duplo bloqueio com apamina mais iberiotoxina ocasionou uma diminuição da sensibilidade à ACh nos anéis vasculares dos animais Sham (Figura 23 C e Tabela 3).

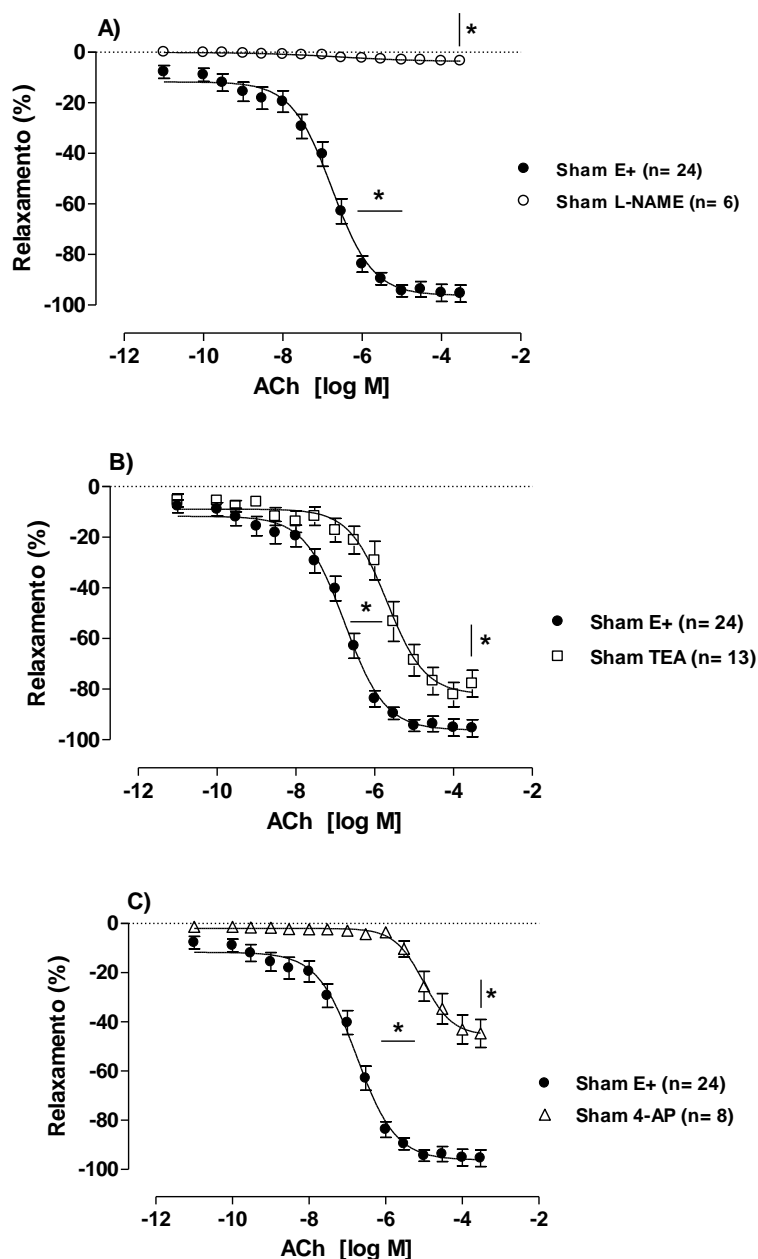


Figura 22: Curva de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh), em aorta torácica de ratos Sham, 30 dias após a cirurgia fictícia para indução ao infarto. **A)** Comparação entre os grupos Sham com endotélio intacto (E+) e Sham incubado com N^(W)-nitro-L-arginina metil éster (100 µM) (L-NAME); **B)** Comparação entre os grupos Sham E+ e Sham incubado com tetraetilamônio (2 mM) (TEA); **C)** Comparação entre os grupos Sham E+ e Sham incubado com 4-aminopiridina (5 mM) (4-AP). O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média ± EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para *P < 0,05 comparados com Sham E+.

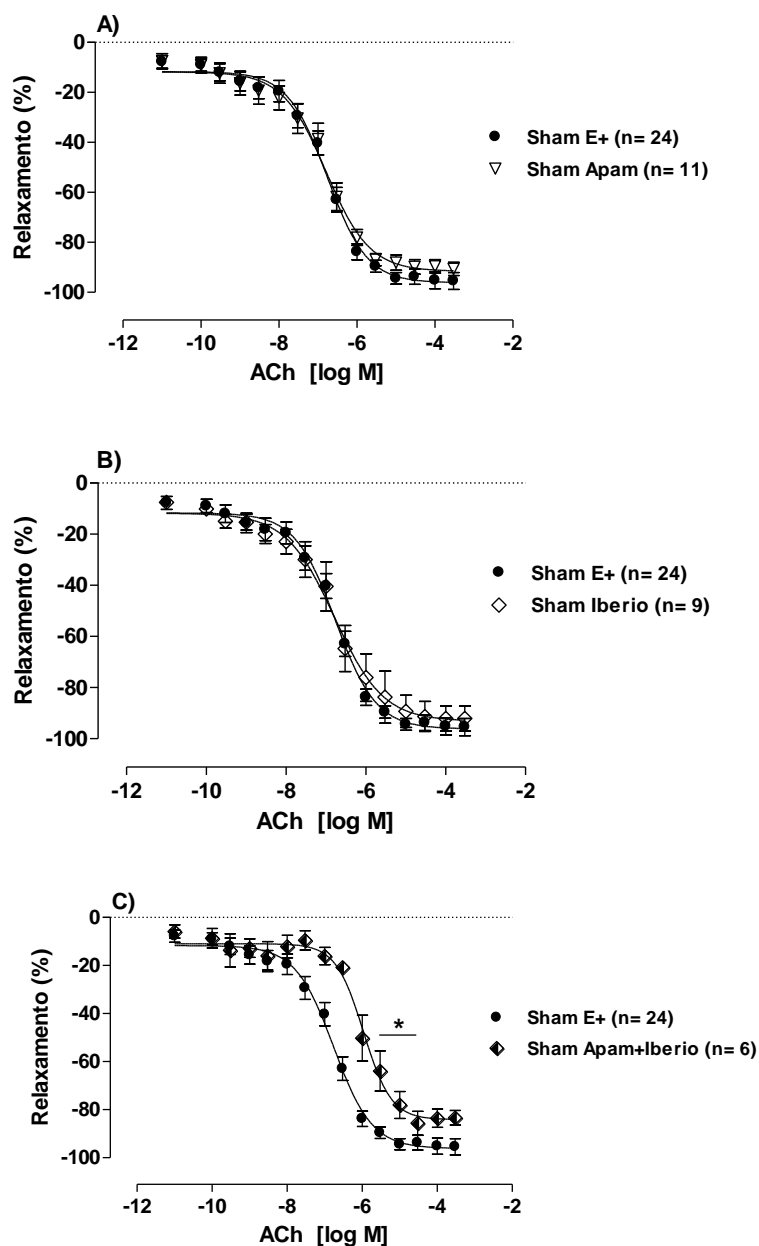


Figura 23: Curva de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh), em aorta torácica de ratos Sham, 30 dias após a cirurgia fictícia para indução ao infarto. **A)** Comparação entre os grupos Sham com endotélio intacto (E+) e Sham incubado com Apamina (0,5 μ M) (Apam); **B)** Comparação entre os grupos Sham E+ e Sham incubado com Iberiotoxina (30 nM) (Iberio); **C)** Comparação entre os grupos Sham E+ e Sham incubado com Apamina mais Iberiotoxina (0,5 μ M, 30 nM respectivamente) (Apam+Iberio); O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$ comparado com o Sham E+.

Tabela 3 – Efeitos do L-NAME, TEA, Aminopiridina, Apamina, Iberiotoxina e duplo bloqueio com Apamina +Iberiotoxina sobre a R_{max} e pEC_{50} no relaxamento induzido pela acetilcolina em aortas de ratos Sham 30 dias após a cirurgia fictícia para indução ao infarto do miocárdio.

Grupos	n	R_{max}	pEC_{50}
Sham E+	24	-96,83 ± 2,84	-6,85 ± 0,11
Sham L-NAME (100 µM)	6	-7,76 ± 2,09 [#]	-9,73 ± 0,17*
Sham TEA (2 mM)	13	-77,82 ± 4,91 [#]	-5,76 ± 0,14*
Sham 4-AP (5 mM)	8	-46,46 ± 5,63 [#]	-5,01 ± 0,21*
Sham Apam (0,5 µM)	11	-92,24 ± 2,16	-6,97 ± 0,16
Sham Iberio (30 nM)	9	-92,35 ± 5,19	-6,73 ± 0,27
Sham Apam+Iberio	6	-86,49 ± 3,31	-5,85 ± 0,17*

Os resultados foram expressos como média ± EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$. R_{max} , [#] $P < 0,05$ comparados com Sham E+. pEC_{50} , * $P < 0,05$ comparados com Sham E+).

4.6.2 Avaliação da participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio nos animais infartados sem sinais de IC

No grupo Inf, após a incubação dos anéis de aorta com L-NAME (100 μ M), o relaxamento induzido pelo endotélio foi abolido (Figura 24 A).

Para avaliar a participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, os anéis foram incubados com TEA, um inibidor não seletivo dos canais para K^+ . A figura 24 B e tabela 4 demonstram que a incubação com TEA diminuiu a R_{max} e a sensibilidade dos anéis de aorta dos animais Inf à ACh. Da mesma forma, a incubação dos anéis de aorta dos animais Inf com 4-AP, bloqueador seletivo de K_v , reduziu a R_{max} e a sensibilidade dos anéis à ACh (Figura 24 C, Tabela 4).

Como pode ser observado na figura 25 A, B e C, após a incubação dos anéis de aorta com os bloqueadores específicos dos canais para K^+ ativados por cálcio de baixa condutância (Apamina) e larga condutância (Iberiotoxina) não houve diferença no relaxamento vascular induzido pela ACh nos animais infartados sem sinais de IC. Da mesma maneira, o duplo bloqueio com apamina mais iberiotoxina não foi capaz de alterar a sensibilidade à ACh nos anéis vasculares desses animais (Figura 25 C, Tabela 4).

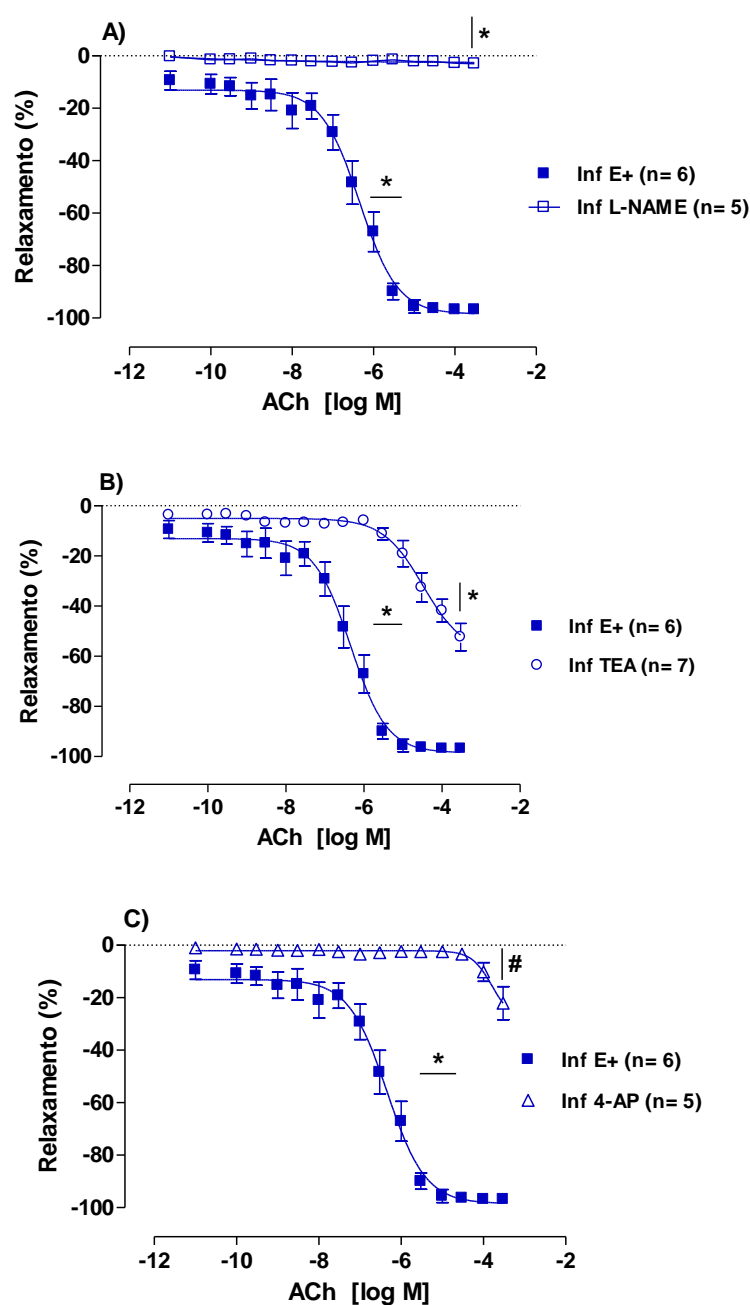


Figura 24: Curva de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh), em aorta torácica de ratos Inf, 30 dias após o infarto. **A)** Comparação entre os grupos Inf com endotélio intacto (E+) e Inf incubado com N^(W)-nitro-L-arginina metil éster (100 μM) (L-NAME); **B)** Comparação entre os grupos Inf E+ e Inf incubado com tetraetilamônio (2 mM) (TEA); **C)** Comparação entre os grupos Inf E+ e Inf incubado com 4-aminopiridina (5 mM) (4-AP). O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média ± EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para **P* < 0,05 comparados com Inf E+.

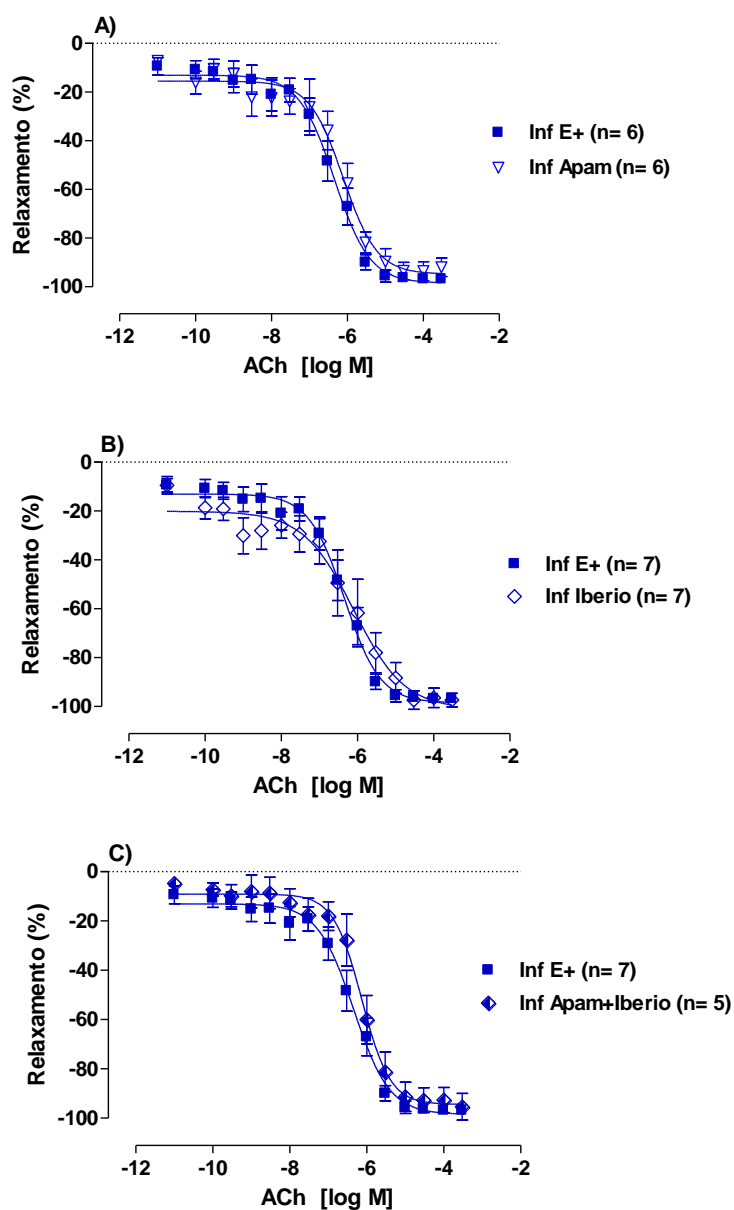


Figura 25: Curva de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh), em aorta torácica de ratos Inf, 30 dias após o infarto do miocárdio. **A)** Comparação entre os grupos Inf com endotélio intacto (E+) e Inf incubado com apamina (0,5 μ M) (Apam); **B)** Comparação entre os grupos Inf E+ e Inf incubado com iberiotoxina (30 nM) (Iberio); **C)** Comparação entre os grupos Inf E+ e Inf incubado com apamina mais iberiotoxina (0,5 μ M, 30 nM respectivamente) (Apam+Iberio); O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

Tabela 4 – Efeitos do L-NAME, TEA, Aminopiridina, Apamina, Iberiotoxina e duplo bloqueio com Apamina + Iberiotoxina sobre a R_{max} e pEC_{50} no relaxamento induzido pela acetilcolina em aortas de ratos Inf 30 dias após o infarto do miocárdio.

Grupos	n	R_{max}	pEC_{50}
Inf E+	7	-98,31 ± 1,93	-6,37 ± 0,15
Inf L-NAME (100 µM)	5	-3,74 ± 0,95 [#]	-7,26 ± 0,72*
Inf TEA (2 mM)	7	-49,19 ± 5,03 [#]	-4,77 ± 0,14*
Inf 4-AP (5 mM)	5	-23,11 ± 5,91 [#]	-2,38 ± 0,97
Inf Apam (0,5 µM)	6	-97,40 ± 5,58	-6,28 ± 0,18
Inf Iberio (30 nM)	7	-98,03 ± 3,48	-6,22 ± 0,27
Inf Apam+Iberio	5	-94,39 ± 5,93	-6,45 ± 0,32

Os resultados foram expressos como média ± EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para [#]P < 0,05 comparados com Inf E+.

4.6.3 Avaliação da participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio nos animais infartados com sinais de IC

No grupo de animais infartados que desenvolveram sinais de IC o relaxamento induzido pelo endotélio foi abolido após a incubação dos anéis de aorta com L-NAME (100 μ M) (Figura 26 A).

Para avaliar a participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, os anéis foram incubados com TEA, um inibidor não seletivo dos canais para K^+ . A figura 26 B e tabela 5 demonstram que a incubação com TEA diminuiu a R_{max} e a sensibilidade dos anéis de aorta dos animais IC à ACh. Da mesma forma, a incubação dos anéis de aorta dos animais IC com 4-AP, bloqueador seletivo de K_v , reduziu a R_{max} e a sensibilidade dos anéis à ACh (Figura 26 C, Tabela 5).

Após a incubação dos anéis de aorta com os bloqueadores específicos dos canais para K^+ ativados por cálcio de baixa condutância (Apamina) e larga condutância (Iberiotoxina) não houve diferença no relaxamento vascular induzido pela ACh (Figura 27 A, B e Tabela 5). Contudo, o duplo bloqueio com Apamina mais Iberiotoxina ocasionou uma diminuição da sensibilidade à ACh nos anéis vasculares dos animais IC (Figura 27 C e Tabela 5).

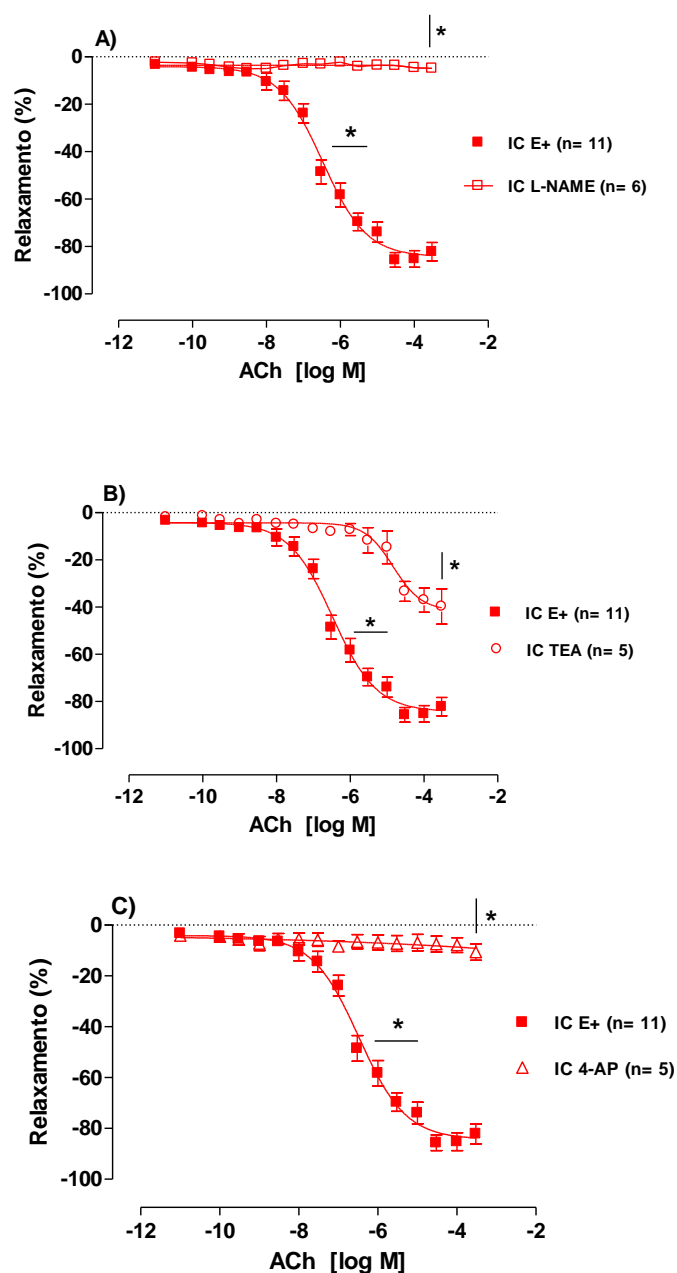


Figura 26: Curva de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh), em aorta torácica de ratos IC, 30 dias após o infarto. **A)** Comparação entre os grupos IC com endotélio intacto (E+) e IC incubado com N^(W)-nitro-L-arginina metil éster (100 μ M) (L-NAME); **B)** Comparação entre os grupos IC E+ e IC incubado com tetraetilamônio (2 mM) (TEA); **C)** Comparação entre os grupos IC E+ e IC incubado com 4-aminopiridina (5 mM) (4-AP). O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para **P* < 0,05 comparados com IC E+.

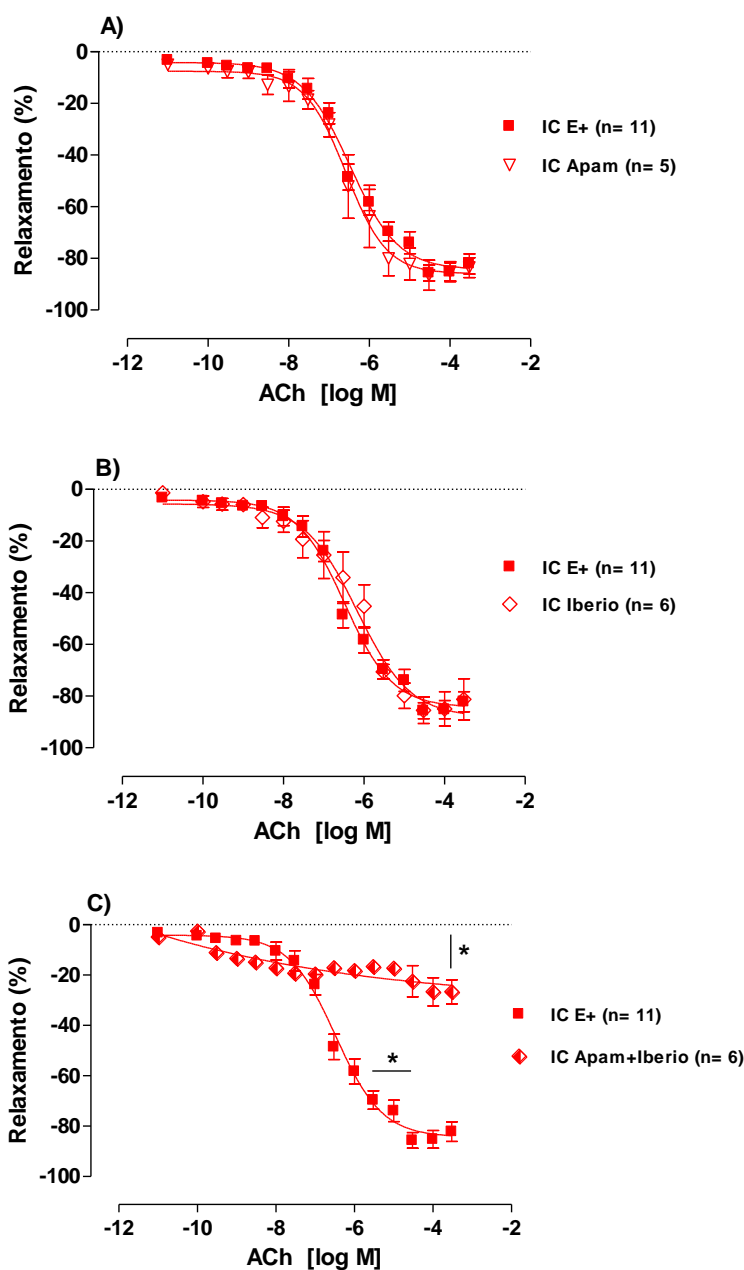


Figura 27: Curva de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh), em aorta torácica de ratos IC, 30 dias após o infarto do miocárdio. **A)** Comparação entre os grupos IC com endotélio intacto (E+) e IC incubado com apamina (0,5 μ M) (Apam); **B)** Comparação entre os grupos IC E+ e IC incubado com iberiotoxina (30 nM) (Iberio); **C)** Comparação entre os grupos IC E+ e IC incubado com apamina mais iberiotoxina (0,5 μ M, 30 nM respectivamente) (Apam+Iberio); O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $*P < 0,05$ comparado com IC E+.

Tabela 5 – Efeitos do L-NAME, TEA, Aminopiridina, Apamina, Iberiotoxina e duplo bloqueio com Apamina + Iberiotoxina sobre a R_{max} e pEC_{50} no relaxamento induzido pela acetilcolina em aortas de ratos IC 30 dias após o infarto do miocárdio.

Grupos	n	R_{max}	pEC_{50}
IC E+	11	-81,80 ± 3,69	-6,44 ± 0,18
IC L-NAME (100 µM)	6	-5,04 ± 2,09 [#]	-5,34 ± 0,59*
IC TEA (2 mM)	5	-39,71 ± 7,43 [#]	-2,71 ± 2,06*
IC 4-AP (5 mM)	5	-10,59 ± 3,24 [#]	-6,26 ± 1,19*
IC Apam (0,5 µM)	7	-88,51 ± 3,39	-6,29 ± 0,31
IC Iberio (30 nM)	6	-98,03 ± 3,48	-6,22 ± 0,29
IC Apam+Iberio	6	-94,39 ± 5,93 [#]	-10,80 ± 0,85*

Os resultados foram expressos como média ± EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para [#]P < 0,05 comparados com IC E+.

4.6.4 Comparação da participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio em animais Inf e Sham

Como pode ser observado na Figura 28 A o grupo Sham apresentou-se com maior sensibilidade à ACh que o grupo Inf. Após a incubação dos anéis de aorta com L-NAME (100 μ M), da mesma forma que nos animais Sham, no grupo de animais infartados sem sinais de IC o relaxamento induzido pelo endotélio foi abolido.

Para avaliar a participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, os anéis foram incubados com TEA, um inibidor não seletivo dos canais para K^+ . A figura 28 B demonstra que a incubação com TEA diminuiu a R_{max} e a sensibilidade dos anéis de aorta dos animais Inf à ACh. A diferença da área sobre a curva após a incubação com o TEA demonstra a maior participação funcional dos canais para K^+ no relaxamento vascular induzido por ACh nos animais Inf comparados com os Sham (Figura 28 D).

Após a incubação dos anéis de aorta dos animais Inf e Sham com 4-AP, bloqueador seletivo de K_v , a R_{max} e a sensibilidade dos anéis de aorta à ACh reduziu mais nos animais Inf que nos animais Sham (Figura 28 C). A participação dos K_v no relaxamento induzido pela ACh foi maior nos animais Inf que nos animais Sham como pode ser observado na diferença da área sobre a curva na figura 28 E.

Após a incubação dos anéis de aorta com Apamina foi possível observar que os animais Sham apresentaram maior sensibilidade à ACh que os animais Inf, contudo não foi observada diferença na dAUC entre os grupos (Figura 29 A e D). Como pode ser observado na figura 29 B, C, E e F não houve diferença na incubação com Iberiotoxina e com o duplo bloqueio com Apam+Iberio entre os grupos Sham e Inf.

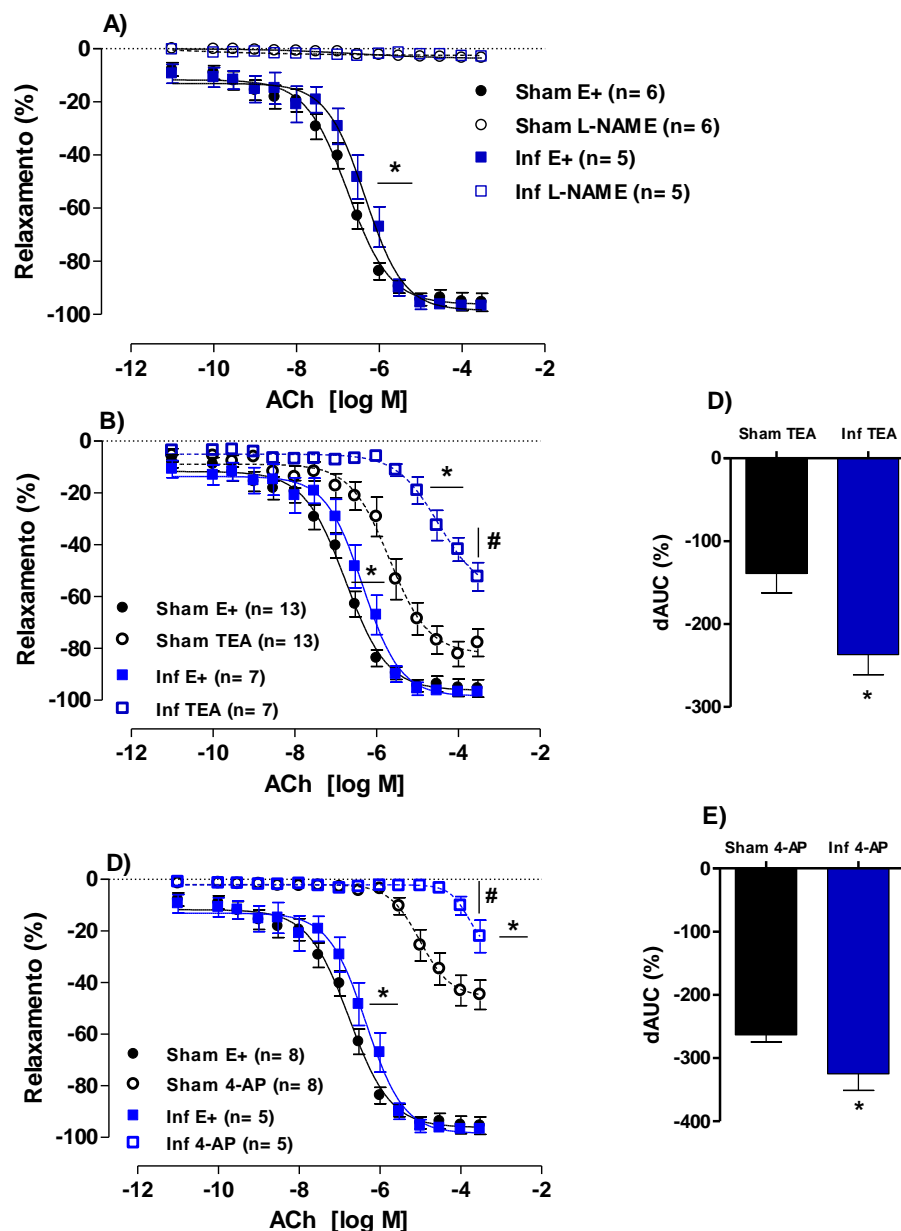


Figura 28: Comparação das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em aorta torácica de ratos Sham (preto) e Inf (azul) 30 dias após o infarto do miocárdio. **A)** Anéis com endotélio intacto (E+) e após a incubação com L-NAME (100 μ M); **B)** Após a incubação com TEA (2 mM); **C)** Após a incubação com 4-AP (5 mM); **D)** Diferença da área sobre a curva (dAUC) antes e após a incubação com TEA; **E)** dAUC antes e após a incubação com 4-AP. O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

$P < 0,05$, R_{max} (Inf TEA, Inf 4-AP vs. Sham TEA e Sham 4-AP, respectivamente).

* $P < 0,05$, pEC_{50} (Inf E+, Inf TEA e Inf 4-AP vs. Sham E+, Sham TEA e Sham 4-AP, respectivamente).

* $P < 0,05$, dAUC TEA e 4-AP (Inf vs. Sham).

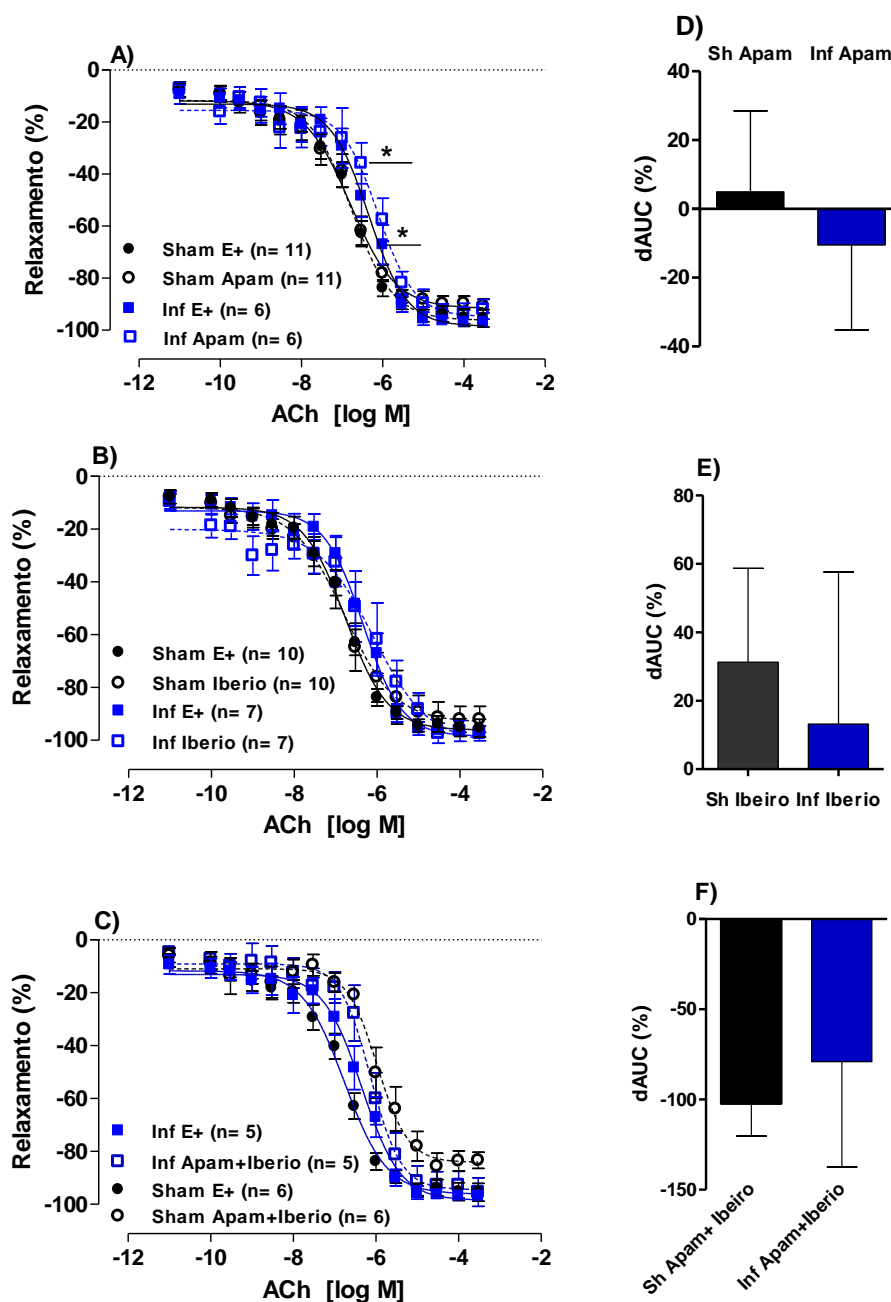


Figura 29: Comparação das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em aorta torácica de ratos Sham (preto) e Inf (azul) 30 dias após o infarto do miocárdio. **A)** Após a incubação com Apamina (Apam, 0.5 μM); **B)** Após a incubação com Iberiotoxina (Iberio, 30 nM); **C)** Após a incubação com Apamina mais Iberiotoxina; **D)** Diferença da área sobre a curva (dAUC) antes e após a incubação com Apam; **E)** dAUC antes e após a incubação com Iberio; **F)** dAUC antes a após a incubação com Apam+Iberio. O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média ± EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

* $P < 0,05$, pEC_{50} (Inf E+ vs. Sham E+; Inf Apam vs. Sham Apam).

4.6.5 Comparação da participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio em animais IC e Sham

Como pode ser observado na Figura 30 A, o grupo Sham apresentou-se com maior sensibilidade à ACh que o grupo IC. Nesta mesma figura também observa-se que a R_{max} dos animais Sham é maior que dos animais IC. Além disso, a incubação dos anéis de aorta com L-NAME (100 μ M) ocasionou abolição do relaxamento induzido pela ACh nos grupos Sham e IC.

Após a incubação dos anéis de aorta com TEA, um inibidor não seletivo dos canais para K^+ , houve uma menor sensibilidade à ACh e uma menor R_{max} dos anéis dos animais IC comparados com os animais Sham (Figura 30 B). A diferença da área sobre a curva após a incubação com o TEA demonstra a maior participação funcional dos canais para K^+ no relaxamento vascular induzido por ACh nos animais IC comparados com os Sham (Figura 30 D).

Após a incubação dos anéis de aorta dos animais IC e Sham com 4-AP, bloqueador seletivo de K_v , a R_{max} dos anéis de aorta à ACh reduziu mais nos animais IC que nos animais Sham (Figura 30 C). A dAUC dos animais Sham e IC confeccionada com as curvas antes e após a incubação com 4-AP não foi diferente entre os grupos figura 30 E.

Após a incubação dos anéis de aorta com Apamina foi possível observar que os animais IC apresentaram menor sensibilidade à ACh que os animais Sham, contudo não foi observada diferença na dAUC entre os grupos (Figura 31 A e D).

Como pode ser observado na figura 31 B e E não houve diferença nas curvas de relaxamento induzido pela ACh após a incubação com Iberiotoxina entre os grupos Sham e IC.

Após o duplo bloqueio com Apam+Iberio foi possível observar uma diminuição da R_{max} e da sensibilidade à ACh dos anéis de aorta dos animais IC comparados com os animais Sham (Figura 31 C). A dAUC dos animais IC foi maior que dos animais Sham em relação a participação dos canais para potássio após o duplo bloqueio com Apam+Iberio (Figura 31 F).

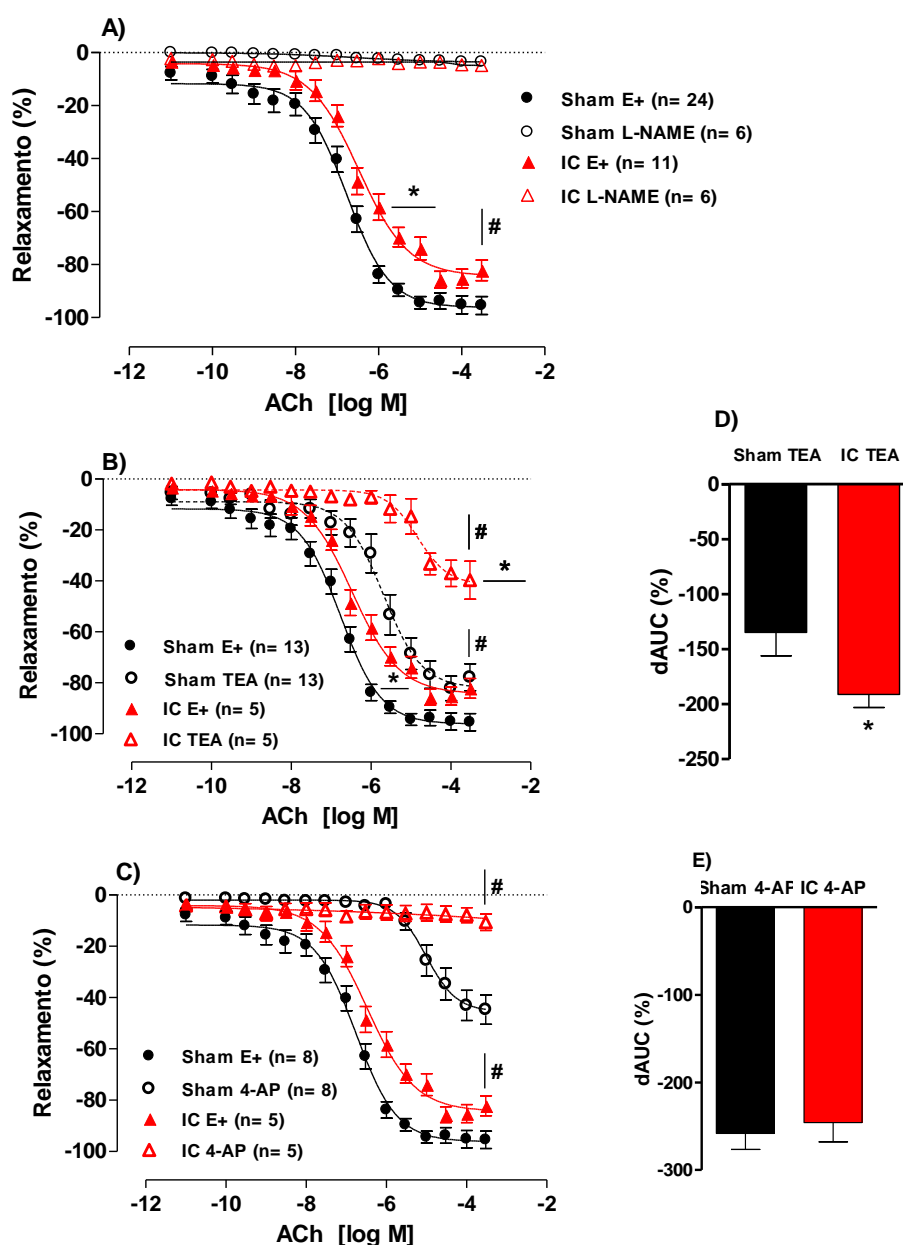


Figura 30: Comparação das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em aorta torácica de ratos Sham (preto) e IC (vermelho) 30 dias após o infarto do miocárdio. **A)** Anéis com endotélio intacto (E+) e após a incubação com L-NAME (100 μ M); **B)** Após a incubação com TEA (2 mM); **C)** Após a incubação com 4-AP (5 mM); **D)** Diferença da área sobre a curva (dAUC) antes e após a incubação com TEA; **E)** dAUC antes e após a incubação com 4-AP. O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

$P < 0,05$, R_{max} (IC TEA e IC 4-AP vs. Sham TEA e Sham 4-AP, respectivamente).

* $P < 0,05$, pEC_{50} (IC E+ e IC TEA vs. Sham E+ e Sham TEA, respectivamente).

* $P < 0,05$, dAUC TEA (IC vs. Sham).

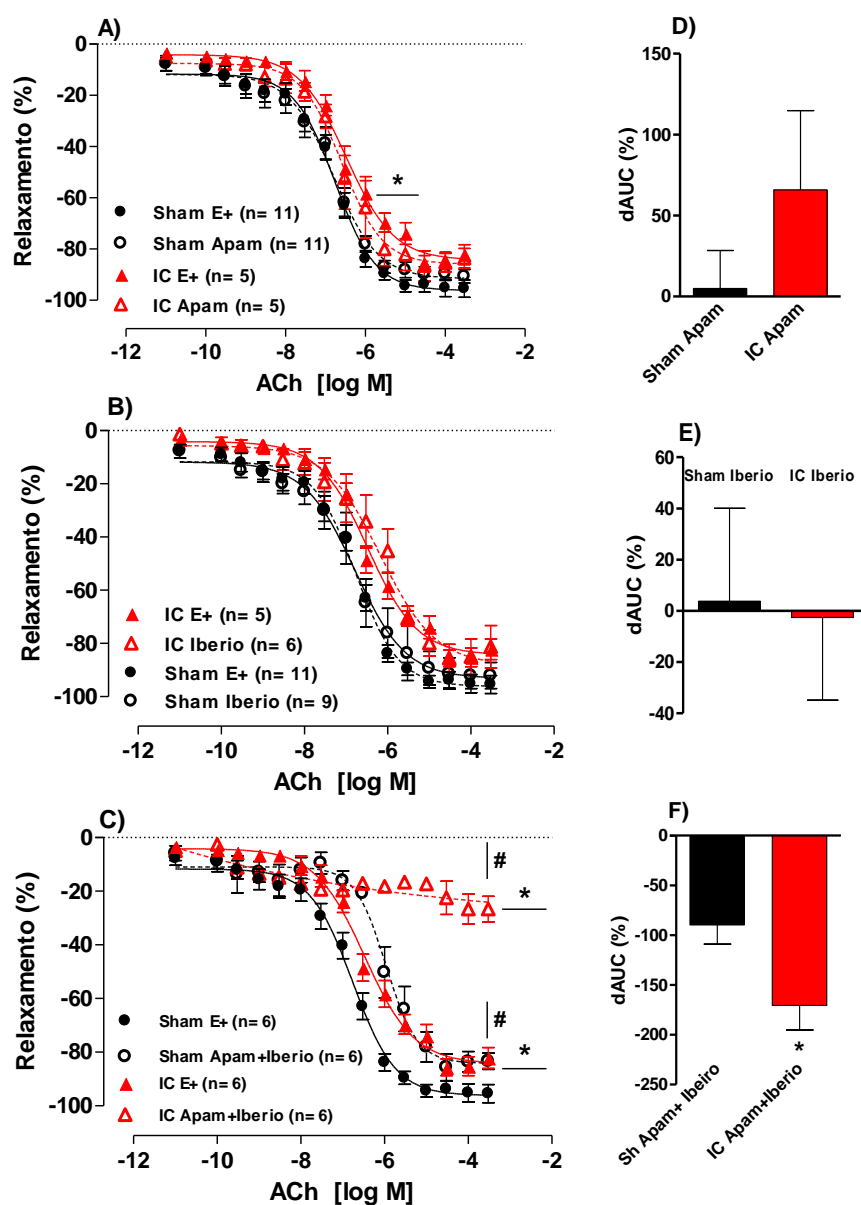


Figura 31: Comparação das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em aorta torácica de ratos Sham (preto) e IC (vermelho) 30 dias após o infarto do miocárdio. **A)** Após a incubação com Apamina (Apam, 0.5 μ M); **B)** Após a incubação com Iberiotoxina (Iberio, 30 nM); **C)** Após a incubação com Apamina mais Iberiotoxina; **D)** Diferença da área sobre a curva (dAUC) antes e após a incubação com Apam; **E)** dAUC antes e após a incubação com Iberio; **F)** dAUC antes a após a incubação com Apam+Iberio. O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

$P < 0,05$, R_{max} (IC Apam+Iberio vs. Sham Apam+Iberio).

* $P < 0,05$, pEC_{50} (IC Apam e IC Apam+Iberio vs. Sham Apam e Sham Apam+Iberio, respectivamente). * $P < 0,05$, dAUC Apam+Iberio (IC vs. Sham).

4.6.6 Comparação da participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio em animais Inf e IC

Como pode ser observado na Figura 32 A o grupo IC apresentou-se com menor R_{max} do relaxamento induzido pela ACh que o grupo Inf. Após a incubação dos anéis de aorta com L-NAME (100 μ M), da mesma forma que nos animais Inf, no grupo de animais infartados com sinais de IC o relaxamento induzido pelo endotélio foi abolido.

Para avaliar a participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, os anéis foram incubados com TEA. A figura 32 B demonstra que após a incubação com TEA não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Inf e IC. Da mesma forma, a diferença da área sobre a curva após a incubação com o TEA não demonstrou diferença na participação funcional dos canais para K^+ no relaxamento vascular induzido por ACh nos animais Inf comparados com os IC (Figura 32 D).

Após a incubação dos anéis de aorta dos animais Inf e IC com 4-AP, bloqueador seletivo de K_v , a R_{max} e a sensibilidade dos anéis de aorta à ACh não foram diferentes entre os grupos Inf e IC (Figura 32 C). Entretanto, a participação dos K_v no relaxamento induzido pela ACh foi menor nos animais IC que nos animais Inf, como pode ser observado na diferença da área sobre a curva na figura 32 E.

Após a incubação dos anéis de aorta com Apamina não foi possível observar diferença no relaxamento induzido pela ACh entre os animais Inf e IC (Figura 33 A e D).

Como pode ser observado na figura 33 B após a incubação dos anéis de aorta com Iberiotxina a R_{max} do relaxamento induzido pela ACh foi menor nos animais IC. A dAUC confeccionada com as curvas antes e após a incubação com Iberio não demonstrou diferença estatística entre os grupos (Figura 33 E). Com o duplo bloqueio com Apam+Iberio os anéis de aorta dos animais IC apresentaram menor sensibilidade e R_{max} à ACh que no grupo Inf (Figura 33 C). A dAUC dos animais IC foi maior que nos animais Inf após a incubação com Apam+Iberio (Figura 33 F).

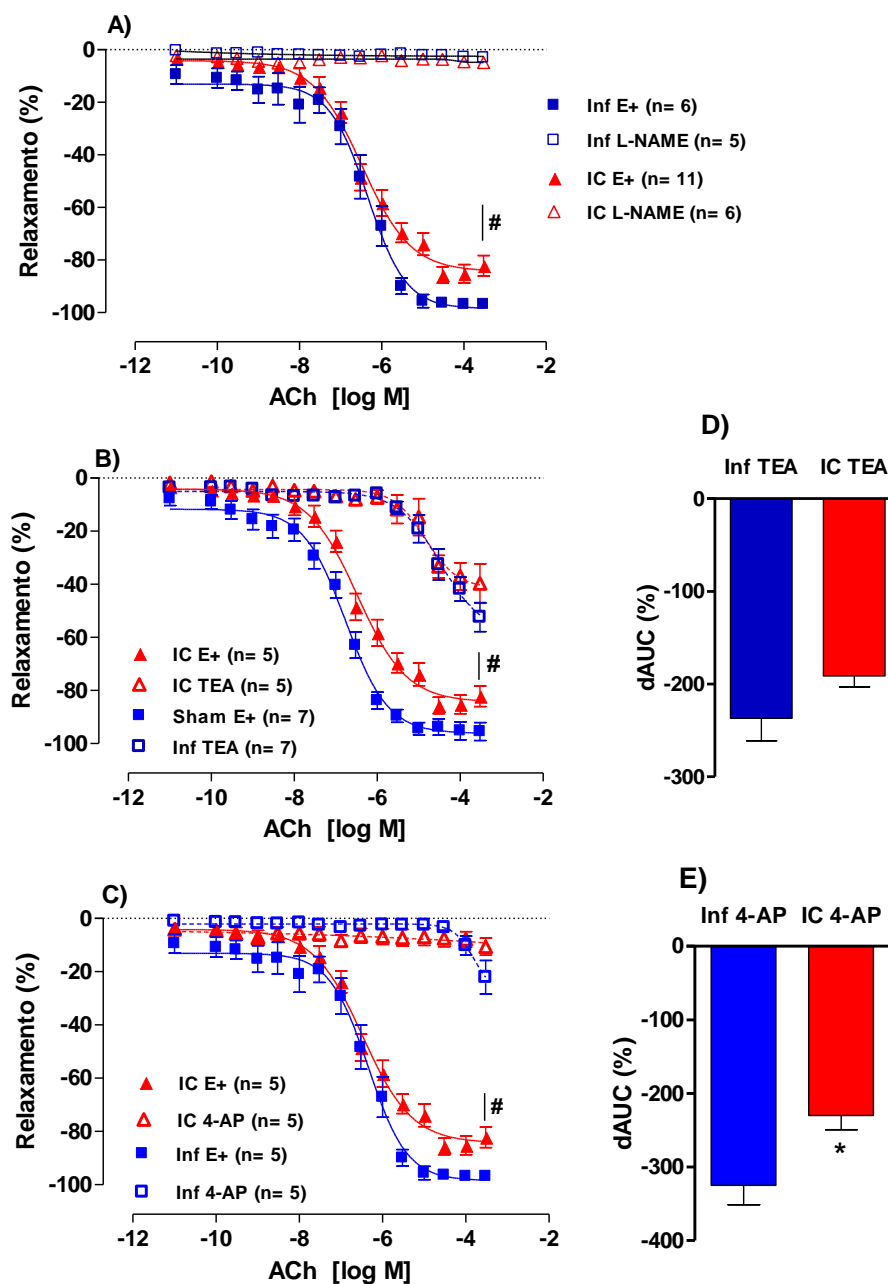


Figura 32: Comparação das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em aorta torácica de ratos Inf (azul) e IC (vermelho) 30 dias após o infarto do miocárdio. **A)** Anéis com endotélio intacto (E+) e após a incubação com L-NAME (100 μ M); **B)** Após a incubação com TEA (2 mM); **C)** Após a incubação com 4-AP (5 mM); **D)** Diferença da área sobre a curva (dAUC) antes e após a incubação com TEA; **E)** dAUC antes e após a incubação com 4-AP. O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

$P < 0,05$, R_{max} (IC E+ vs. Inf E+).

* $P < 0,05$, dAUC 4-AP (IC vs. Inf).

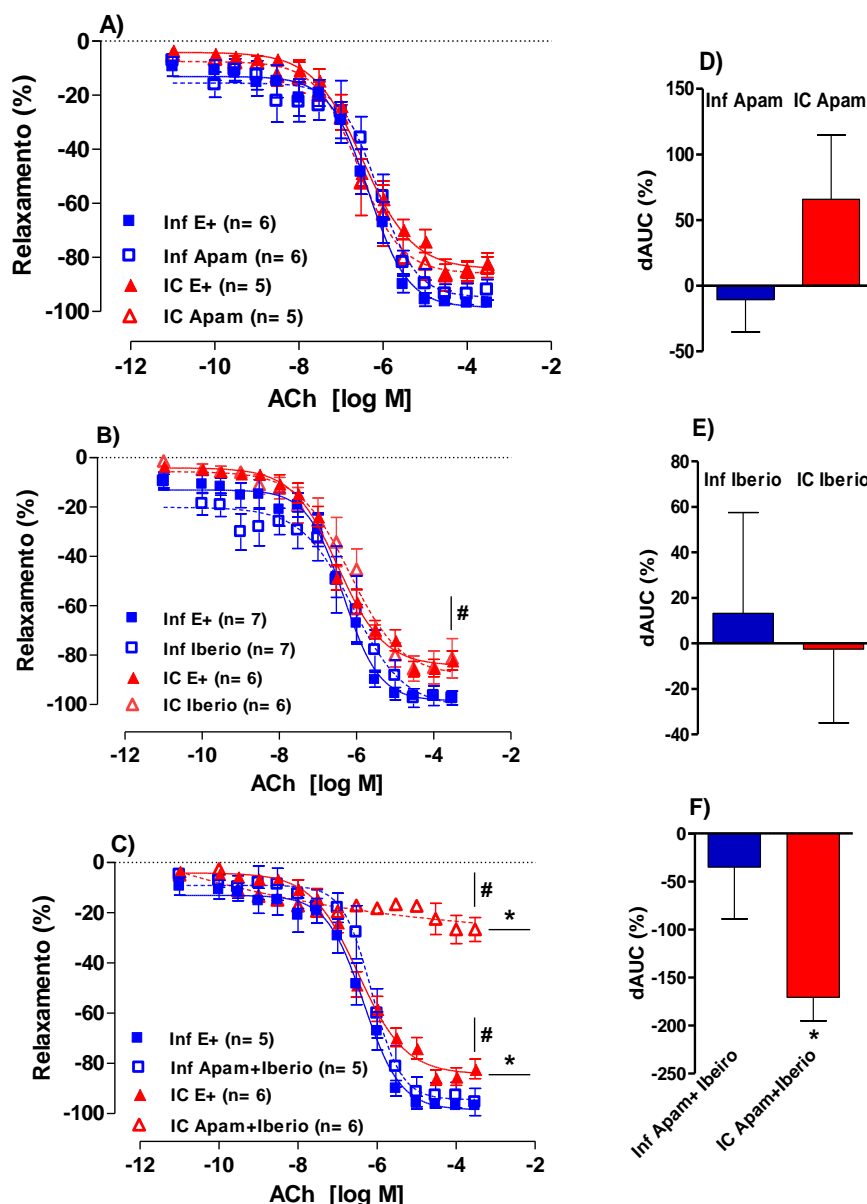


Figura 33: Comparação das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em aorta torácica de ratos Inf (azul) e IC (vermelho) 30 dias após o infarto do miocárdio. **A)** Após a incubação com Apamina (Apam, 0.5 μ M); **B)** Após a incubação com Iberiotoxina (Iberio, 30 nM); **C)** Após a incubação com Apamina mais Iberiotoxina; **D)** Diferença da área sobre a curva (dAUC) antes e após a incubação com Apam; **E)** dAUC antes e após a incubação com Iberio; **F)** dAUC antes a após a incubação com Apam+Iberio. O período de incubação com os fármacos foi de 30 minutos. A resposta de relaxamento à ACh foi expressa como a porcentagem da contração residual à fenilefrina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos que foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

$P < 0,05$, R_{max} (IC Iberio e IC Apam+Iberio vs. Inf Iberio e Inf Apam+Iberio, respectivamente).

* $P < 0,05$, pEC_{50} (IC Apam+Iberio vs. Inf Apam+Iberio).

* $P < 0,05$, dAUC Apam+Iberio (IC vs. Inf).

4.7 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA

4.7.1 *Western Blot* para detecção das isoformas eNOS e p-eNOS da sintase do óxido nítrico

Para avaliação da expressão protéica da eNOS foi realizada a técnica de *Western blot*. Na figura 34 é possível observar que a razão entre a densidade das bandas da eNOS e da α -actina não foi diferente entre os grupos Sham, Inf e IC.

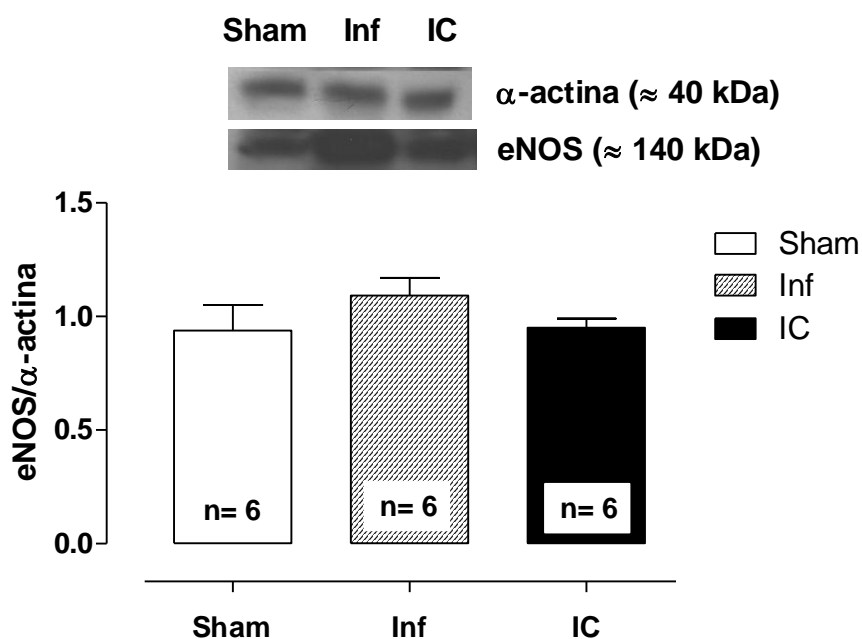


Figura 34: Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS), por meio da técnica de *Western Blot*, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n= 6), Inf (n= 6) e IC (n=6). Na parte superior da figura estão as bandas de *Western Blot* representativas da expressão da eNOS e da α -actina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Razão entre a densidade das bandas da eNOS e da α -actina. Os resultados não foram significantes, pois o $P > 0,05$.

A expressão protéica da forma fosforilada da sintase endotelial do óxido nítrico, no resíduo Ser¹¹⁷⁷ (p-eNOS), também foi avaliada através da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham, Inf e IC. Na figura 35 pode ser observado que a razão entre a densidade das bandas da p-eNOS e da α -actina foi menor nos animais IC comparados com os animais Sham e Inf.

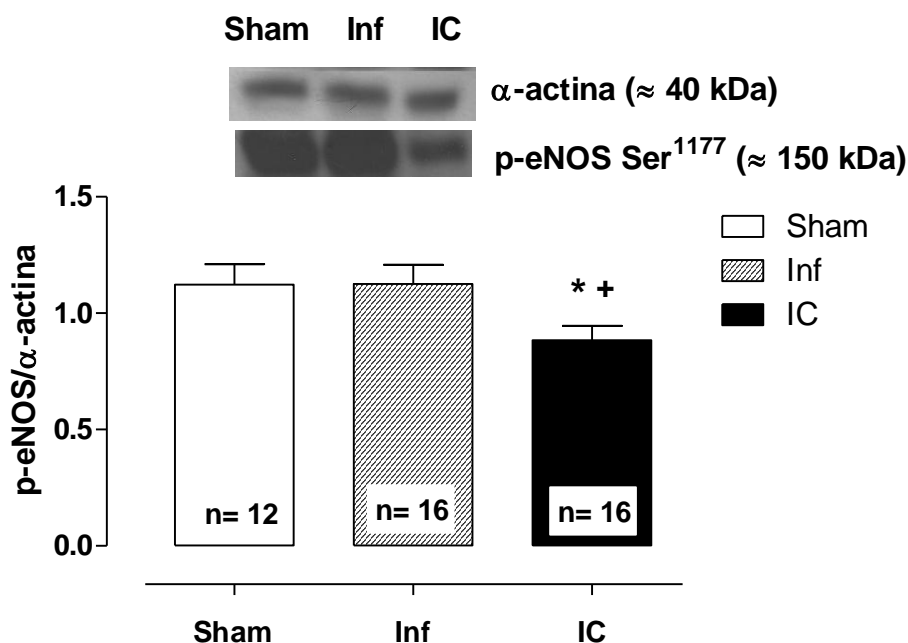


Figura 35: Expressão protéica da forma fosforilada da sintase endotelial do óxido nítrico, no resíduo Ser¹¹⁷⁷ (p-eNOS), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n= 12), Inf (n= 16) e IC (n=16). Na parte superior da figura estão as bandas de *Western Blot* representativas da expressão da p-eNOS e da α -actina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Razão entre a densidade das bandas da p-eNOS e da α -actina. *P< 0,05 IC vs. Sham; +P< 0,05 IC vs. Inf.

Na figura 36 pode ser observado que não houve diferença estatisticamente significativa na razão da expressão protéica da p-eNOS em relação a eNOS em aorta de ratos entre os grupos Sham, Inf e IC.

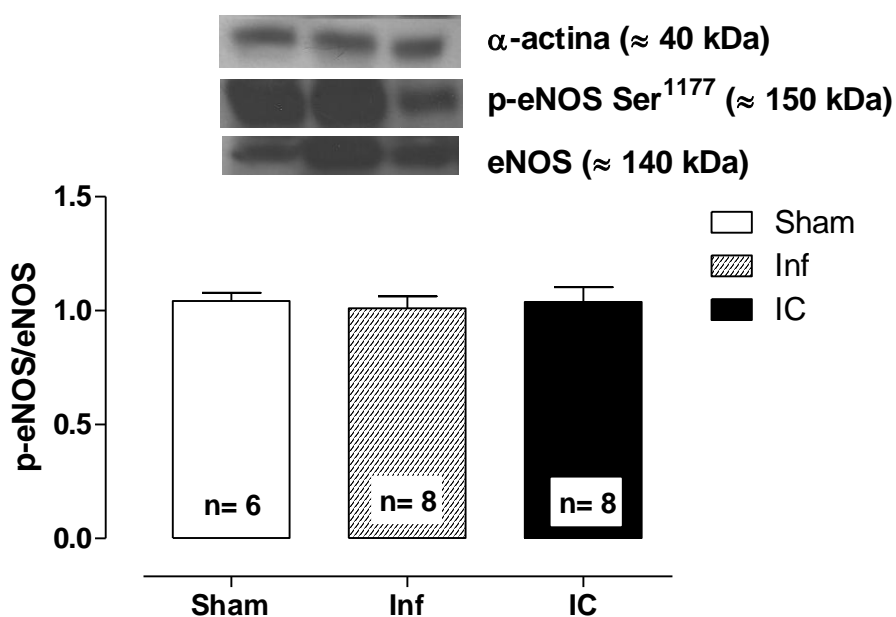


Figura 36: Razão da expressão protéica da sintase endotelial do óxido nítrico e da forma fosforilada da sintase endotelial do óxido nítrico, no resíduo Ser¹¹⁷⁷ (p-eNOS). Técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n= 6), Inf (n= 8) e IC (n=8). Na parte superior da figura estão as bandas de *Western Blot* representativas da expressão da p-eNOS, eNOS e da α -actina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Razão entre a densidade das bandas da eNOS/p-eNOS. Os resultados não foram significantes, pois o P > 0,05.

4.7.2 Western Blot para detecção da isoforma α -1 da Na^+K^+ -ATPase

Na figura 37 é possível observar que a razão entre a densidade das bandas da isoforma α -1 da Na^+K^+ -ATPase e da α -actina não foi diferente entre os grupos Sham, Inf e IC.

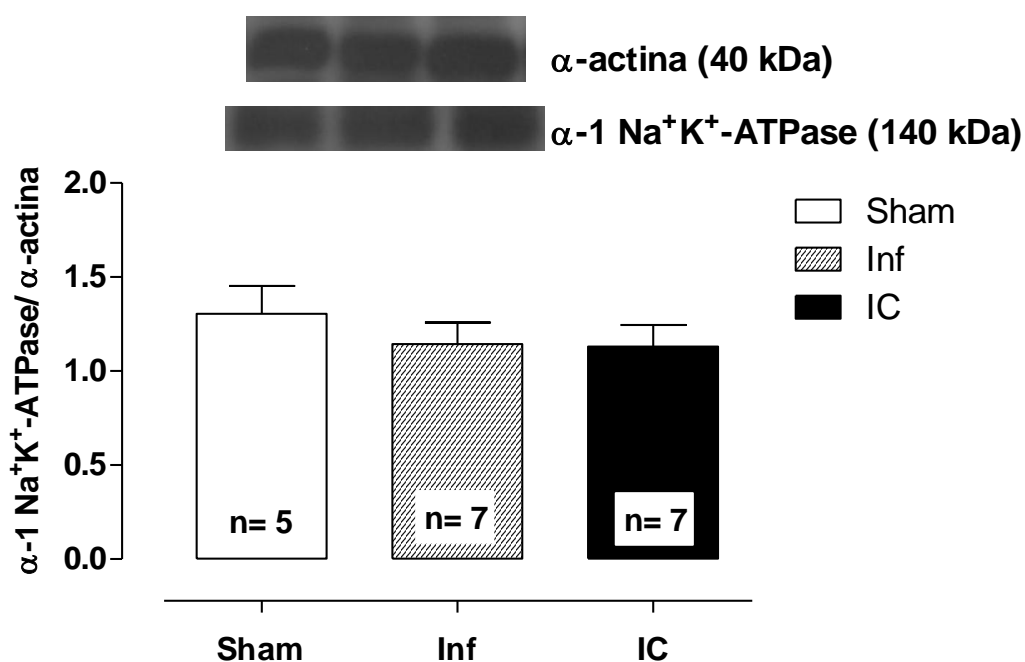


Figura 37: Razão da expressão proteica da isoforma α -1 Na^+K^+ -ATPase. Técnica de *Western Blot*, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n= 5), Inf (n= 7) e IC (n=7). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão da isoforma α -1 Na^+K^+ -ATPase e da α -actina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Razão entre a densidade das bandas da α -1 Na^+K^+ -ATPase / α -actina. Os resultados não foram significantes, pois o $P > 0,05$.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$) “*in situ*” ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA PRODUZIDA PELA OXIDAÇÃO DO DIHIDROETÍDIO (DHE)

Foi utilizada a fluorescência produzida pela oxidação do DHE para verificar a produção de $O_2^{\cdot-}$ em animais que desenvolveram ou não sinais de insuficiência cardíaca 30 dias após o infarto do miocárdio. A produção de $O_2^{\cdot-}$ foi significativamente maior nos anéis de aorta dos animais Inf e IC quando comparados aos animais Sham (Sham: $2,78 \pm 0,11$, n= 9; Inf: $3,07 \pm 0,04^*$, n= 9; IC: $3,05 \pm 0,03^+$ unidade arbitrárias, n= 8; $^{*+}P < 0,05$). Na figura 38 A, B e C estão as fotografias representativas dos grupos estudados.

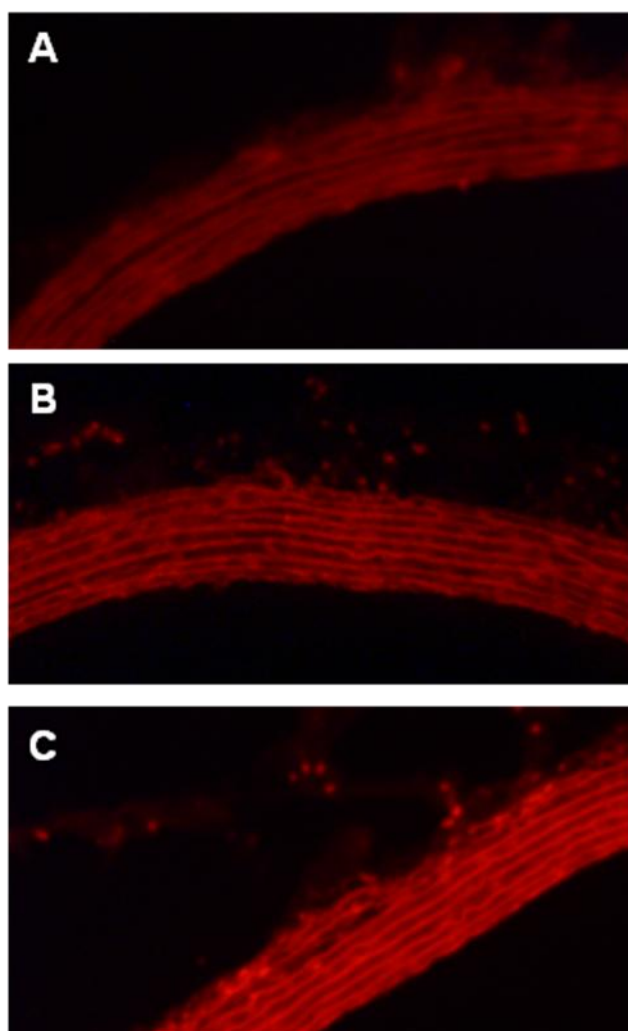


Figura 38: Produção *in situ* de $O_2^{\cdot-}$ em aortas de ratos após 30 dias do infarto do miocárdio. **A)** Cirurgia fictícia (Sham); **B)** Infartados sem sinais de insuficiência cardíaca, Inf; **C)** Infartado com sinais de Insuficiência cardíaca, IC

Resultados

Os resultados do presente trabalho foram sumarizados nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Sumário dos resultados obtidos pela curva de relaxamento induzido pelo KCl com endotélio intacto (E+), após a remoção do endotélio, após a incubação com L-NAME ou TEA; Expressão protéica das enzimas e-NOS, p-eNOS e α -1 Na⁺K⁺-ATPase; Fluorescência produzida por oxidação do dihidroetídio em animais Sham, Inf e IC.

<i>Grupos experimentais</i>			
Sham	Inf	IC	
Curva de Relaxamento induzido pelo KCl			
E+	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ o relaxamento induzido pelo KCl em relação aos Sham • ↑ o relaxamento induzido pelo KCl após a incubação com OUA em relação ao Sham 	<ul style="list-style-type: none"> • Relaxamento induzido pelo KCl foi igual em relação ao Sham • ↑ o relaxamento induzido pelo KCl após a incubação com OUA em relação aos Sham • ↓ o relaxamento induzido pelo KCl em relação ao Inf 	
Curva de Relaxamento induzido pelo KCl - protocolos			
Remoção do endotélio	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ o relaxamento induzido pelo KCl 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ o relaxamento induzido pelo KCl • Foram abolidas as diferenças em relação ao Sham 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ o relaxamento induzido pelo KCl • Foram abolidas as diferenças em relação ao Sham e Inf
Incubação com L-NAME	<ul style="list-style-type: none"> • Não alterou o relaxamento induzido pelo KCl 	<ul style="list-style-type: none"> • Não alterou o relaxamento induzido pelo KCl • Foram abolidas as diferenças em relação ao Sham 	<ul style="list-style-type: none"> • Não alterou o relaxamento induzido pelo KCl • ↓ o relaxamento induzido pelo KCl em relação ao Sham e Inf
Incubação com TEA	<ul style="list-style-type: none"> • Não alterou o relaxamento induzido pelo KCl 	<ul style="list-style-type: none"> • Não alterou o relaxamento induzido pelo KCl • Aboliu a diferença em relação ao Sham 	<ul style="list-style-type: none"> • Não alterou o relaxamento induzido pelo KCl • Aboliu as diferenças em relação ao Sham e Inf
Expressão protéica - enzimas			
eNOS		<ul style="list-style-type: none"> • Não houve diferença 	<ul style="list-style-type: none"> • Não houve diferença
p-eNOS			<ul style="list-style-type: none"> • Diminuiu a expressão protéica em relação aos animais Sham e Inf
α-1 Na⁺K⁺-ATPase		<ul style="list-style-type: none"> • Não houve diferença 	<ul style="list-style-type: none"> • Não houve diferença
Quantificação da produção de ânion superóxido (O₂⁻)			
Fluorescência produzida por oxidação do dihidroetídio		<ul style="list-style-type: none"> • Maior produção de O₂⁻ em relação aos animais Sham 	<ul style="list-style-type: none"> • Maior produção de O₂ em relação aos animais Sham

Resultados

Tabela 7 – Sumário dos resultados obtidos pela curva de relaxamento induzido pela ACh em anéis de aorta com endotélio intacto (E+) e após a incubação com L-NAME, TEA, Aminopiridina, Apamina, Iberiotoxina e duplo bloqueio com Apamina +Iberiotoxina de ratos Sham, Inf e IC.

<i>Grupos experimentais</i>			
	Sham	Inf	IC
Curva de ACh			
E+		<ul style="list-style-type: none"> • ↓ sensibilidade à ACh em relação aos Sham 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ R_{max} e sensibilidade à ACh em relação aos Sham • ↓ R_{max} em relação aos animais Inf
Curva de ACh - Incubação com fármacos			
L-NAME	Aboliu o relaxamento induzido pela ACh	<ul style="list-style-type: none"> • Aboliu o relaxamento induzido pela ACh 	Aboliu o relaxamento induzido pela ACh
TEA	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ R_{max} e sensibilidade à ACh 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ R_{max} e sensibilidade à ACh • ↓ R_{max} e sensibilidade à ACh em relação ao Sham • dAUC foi maior que nos animais Sham 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ R_{max} e sensibilidade à ACh • ↓ R_{max} e sensibilidade à ACh em relação ao Sham • R_{max} e sensibilidade à ACh não foram diferentes dos animais Inf • dAUC foi maior que nos animais Sham • dAUC não foi diferente em relação aos animais Inf
4-AP	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ R_{max} e sensibilidade à ACh 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ R_{max} e sensibilidade à ACh • ↓ R_{max} e sensibilidade à ACh em relação ao Sham • dAUC foi maior que nos animais Sham 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ R_{max} e sensibilidade à ACh • ↓ R_{max} em relação ao Sham • R_{max} e sensibilidade à ACh não foram diferentes dos animais Inf • dAUC não foi diferente em relação aos animais Sham • dAUC foi menor que nos animais Inf
Apam	<ul style="list-style-type: none"> • R_{max} e sensibilidade à ACh não foram diferentes 	<ul style="list-style-type: none"> • R_{max} e sensibilidade à ACh não foram diferentes • ↓ sensibilidade à ACh em relação ao Sham • dAUC não foi diferente em relação aos animais Sham 	<ul style="list-style-type: none"> • R_{max} e sensibilidade à ACh não foram diferentes • ↓ sensibilidade à ACh em relação ao Sham • R_{max} e sensibilidade à ACh não foram diferentes dos animais Inf • dAUC não foi diferente em relação aos animais Sham • dAUC não foi diferente em relação aos animais Inf
Iberio	<ul style="list-style-type: none"> • R_{max} e sensibilidade à ACh não foram diferentes 	<ul style="list-style-type: none"> • R_{max} e sensibilidade à ACh não foram diferentes • R_{max} e sensibilidade à ACh não foram diferentes em relação ao Sham • dAUC não foi diferente em relação aos animais Sham 	<ul style="list-style-type: none"> • R_{max} e sensibilidade à ACh não foram diferentes • R_{max} e sensibilidade à ACh não foram diferentes em relação ao Sham • ↓ R_{max} em relação aos animais Inf • dAUC não foi diferente em relação aos animais Sham • dAUC não foi diferente em relação aos animais Inf
Apam+Iberio	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ sensibilidade à ACh 	<ul style="list-style-type: none"> • R_{max} e sensibilidade à ACh não foram diferentes • R_{max} e sensibilidade à ACh não foram diferentes em relação aos Sham • dAUC não foi diferente em relação aos animais Sham 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ R_{max} e sensibilidade à ACh • ↓ R_{max} e sensibilidade à ACh em relação aos Sham • ↓ R_{max} e sensibilidade à ACh em relação aos Inf • dAUC é maior que nos animais Sham • dAUC é maior que nos animais Inf

5 DISCUSSÃO

O principal resultado deste estudo foi que em uma fase crônica após o infarto do miocárdio experimental, em ratos com área de cicatriz semelhante que desenvolveram ou não sinais de IC, existem diferenças nos mecanismos de relaxamento vascular que induzem a caracterização de dois grupos com respostas funcionais distintas. Dentre os mecanismos estudados estão envolvidos o aumento da participação dos canais para K^+ e o aumento do estresse oxidativo após o IM, bem como a expressão diminuída da eNOS e p-eNOS no grupo de animais que desenvolveram sinais de IC. Além disso, dentre os tipos de canais para K^+ expressos no MLV de aorta sugere-se que nos animais Inf os canais para K_v estejam contribuindo mais para o relaxamento vascular, enquanto os animais IC, parecem depender mais dos canais para K_{Ca} . As diferenças no relaxamento vascular, de acordo com os protocolos utilizados no presente trabalho, não estariam relacionadas à alteração da função e expressão da Na^+K^+ -ATPase entre os grupos.

No presente trabalho, o infarto foi realizado nos ratos Wistar pela técnica de oclusão da artéria coronária esquerda, como foi descrito nos trabalhos de Pfeffer et al. (1979) e Mill et al. (1990). Na tentativa de reproduzir a progressão da IC que ocorre em seres humanos por doença coronariana, modelos experimentais de isquemia miocárdica têm sido desenvolvidos por diferentes técnicas: microembolização, ligação da artéria coronária, constritores ameróides, rolos de esponja de “gelfoan” por via percutânea e crionecrose (Jensen et al; 1987; Mill et al; 1990; Monnet e Chachques, 2005; De Souza, 2005; Zornoff et al; 2009, Antonio et al; 2009; Pfeffer e Braunwald, 1990). Embora o modelo experimental perfeito para reproduzir a IC e os aspectos de evolução natural da doença ainda não exista, várias evidências demonstram que o padrão de cicatrização celular nestes modelos é similar ao IM em seres humanos (De Souza, 2005; Zornoff et al; 2008). De Souza (2005) faz uma comparação entre o modelo de ligação da artéria coronária esquerda e o modelo de crionecrose e conclui que os dois modelos de IM provocam lesão ventricular importante, contudo o primeiro modelo é o que apresenta maior similaridade com a fase de remodelamento ventricular após o IM observado na prática clínica. De acordo com Zornoff et al. (2008) este modelo também é o ideal para o estudo das intervenções terapêuticas capazes de minimizar as alterações funcionais e fisiológicas que ocorrem após o IM.

Assim, após a indução ao IM foi realizada nesta pesquisa a caracterização dos animais, em relação aos parâmetros ponderais e hemodinâmicos, bem como uma avaliação da área da cicatriz do infarto do miocárdio. Estas foram condições essenciais para o desenvolvimento do estudo. Desta forma, foi possível estabelecer critérios para inclusão e exclusão dos animais nos grupos experimentais e desenvolver o raciocínio lógico sobre as diferenças na reatividade vascular pós-infarto.

A discussão será apresentada, assim como nos resultados deste trabalho, em 5 partes: caracterização dos grupos experimentais através da avaliação ponderal, área de infarto e hemodinâmica; avaliação da atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à OUA 30 dias após o IM; avaliação da participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora dependente do endotélio nos animais Sham, Inf e IC; avaliação das isoformas α -1 Na^+K^+ -ATPase, eNOS, p-eNOS da sintase do óxido nítrico do MLV; e quantificação da produção de ânion superóxido (O_2^-) “in situ” através da fluorescência produzida pela oxidação do DHE.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO PONDERAL, ÁREA DE INFARTO E HEMODINÂMICA

Trinta dias após o infarto do miocárdio os ratos foram subdivididos em: grupo Sham, que sofreu cirurgia fictícia; Inf, grupo infarto sem insuficiência cardíaca; e grupo IC, animais infartados com sinais de insuficiência cardíaca. Para esta subdivisão foram consideradas a avaliação ponderal e hemodinâmica.

Os animais com sinais de IC deveriam apresentar no mínimo dois dos seguintes critérios: $PDfVE \geq 15$ mmHg (Anversa, 1986); aumento de + 2 desvios padrão da razão da massa do pulmão e a massa corporal em relação ao grupo Sham ($PP/MC_{IC} \geq PP/MC_{sham} + 2 DS$) e a presença de hipertrofia do VD calculada pelo aumento de + 2 desvios padrão da razão da massa do VD e a massa corporal ($VD/MC_{IC} \geq VD/MC_{sham} + 2 DS$) (Anversa et al., 1985; Francis et al; 2001; Daviddof et al., 2004; Pereira et al., 2005).

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o peso corporal, não foi diferente entre os grupos estudados. Fundamentando este resultado, vários estudos apresentam peso corporal entre grupos Sham, Inf e IC semelhantes até 16 semanas após o IM (Pereira et al; 2005; Fernandes, 2006; Dias et al., 2007).

A avaliação indireta da hipertrofia do VE e VD foi realizada pela mensuração da massa úmida das câmaras cardíacas dividida pela massa corporal. A avaliação da massa pode refletir indiretamente o remodelamento ventricular que ocorre após a lesão ou agressão do miocárdio devido a obstrução ao fluxo sanguíneo das coronárias. No ano de 2000, um fórum internacional de remodelamento cardíaco definiu o remodelamento ventricular como um conjunto de episódios cardíacos (moleculares, celulares e intersticiais) que conseqüentemente manifestam-se através de mudanças no tamanho, massa, geometria e função cardíaca (Cohn et al; 2000; Francis, 2001; Zornoff et al; 2009). A hipertrofia do VD está associada com o aumento no diâmetro dos miócitos (hipertrofia concêntrica) e no VE há um aumento no diâmetro, e no comprimento dos miócitos, culminando em hipertrofia concêntrica e excêntrica, respectivamente (Anversa et al., 1985). A característica da hipertrofia a ser desenvolvida dependerá do tipo de estresse inicial na parede do ventrículo (Grossman et al., 1975).

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

Na história clínica natural após o IM aproximadamente 50% dos pacientes desenvolvem algum grau de dilatação do ventrículo esquerdo. Desses, 50% dos pacientes desenvolvem aumento progressivo da câmara ventricular. Entretanto, 50% dos pacientes mantêm-se estáveis. Daqueles sem dilatação na fase aguda, um número não definido irá apresentar remodelamento após algumas semanas, meses ou anos do episódio isquêmico (Gaudron et al; 1993).

A avaliação da razão VD/MC demonstrou que houve um aumento da massa do ventrículo direito no grupo IC em relação aos demais grupos estudados. Este resultado também foi encontrado no trabalho de Pereira et al. (2005). Após o IM, a sobrecarga pressórica imposta a câmara cardíaca direita e a hipertrofia concêntrica do VD são amplamente descritas e estão correlacionadas com os resultados do presente estudo. A hipertrofia do VD pode ser desencadeada pelas alterações hemodinâmicas iniciadas no VE (Anversa et al; 1986; Pfeffer et al; 1995), por fatores de ativação humoral (Nahrendorf et al; 2003) e pela congestão pulmonar que se instala na insuficiência cardíaca (Jasmim et al; 2004).

A observação dos dados da massa pulmonar corrigida pela massa corporal demonstrou que no grupo IC esta razão foi maior que a mesma razão dos animais Sham, mais duas vezes o desvio padrão. Além disso, houve uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo IC e o grupo Inf. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados nos trabalhos de Francis et al. (2001), Pereira et al. (2005), Bianchi et al. (2006), Fernandes (2006), Giubert et al. (2007) e Faria et al. (2011). Estes pesquisadores demonstraram que a razão entre a massa pulmonar e a

massa corporal dos animais IC era maior que a mesma razão nos animais Sham, e também utilizaram este resultado como um critério para classificar os animais com insuficiência cardíaca. A razão PP/MC pode evidenciar indiretamente a hipertensão pulmonar, que é considerada uma complicação secundária a IC (Butler et al; 1999; Francis et al; 2001). Esta razão provavelmente está aumentada devido à congestão pulmonar e ao edema decorrente da IC. A pressão aumentada nas veias pulmonares é transmitida de modo retrógrado aos capilares e artérias o que resulta no remodelamento do parênquima pulmonar. O aumento da massa dos pulmões ocasionado pelo remodelamento pulmonar deve-se à deposição de colágeno e reticulina. Desta forma, ocorre também o enrijecimento do parênquima pulmonar (Jasmin et al; 2004).

Através da observação macroscópica dos corações, pela técnica de planimetria descrita por Mill et al. (1990) foi possível constatar que a área de cicatriz não foi diferente entre os animais trinta dias após o infarto. A fim de descartar a influência da massa corporal dos animais sobre o resultado encontrado, foi determinada a razão entre a área de cicatriz e a massa corporal. Não houve diferença estatística entre as razões AI/MC dos grupos Inf e IC. Também não houve correlação entre a AI e as razões PP/MC, VE/MC e VD/MC. Resultados semelhantes também foram encontrados no trabalho de Pereira et al; (2005) quatro semanas após o infarto. Logo, é possível sugerir que a alteração encontrada na razão PP/MC e VD/MC em animais IC não esteja associada diretamente ao tamanho da AI, mas às alterações do processo de remodelamento ventricular após o IM que podem, de forma retrógrada, atingir os pulmões.

Após a avaliação da AI por planimetria, as áreas de cicatriz foram mensuradas por histologia. Neste método, os resultados obtidos demonstraram uma média de AI de ambos os grupos superior ao resultado mensurado no método da planimetria (Média AI% por planimetria: $36,18 \pm 1,56$; Média AI% por histologia: $52,33 \pm 1,24$ %) (Figura 12 A; 14 A, B). Contudo, nos dois métodos utilizados para mensuração da AI% os grupos Inf e IC apresentaram AI semelhantes. Desta forma, foi possível confirmar que independente da técnica de avaliação da área de infarto, ambos os grupos estudados apresentaram AI de tamanho semelhante. Resultados semelhantes foram encontrados sete (Faria, 2009), trinta (Dias et al; 2007) e 60 dias (Pereira et al; 2004; Fernandes, 2006) após o IM.

Segundo Zornoff et al. (2009) o método de avaliação mais recomendado para determinar a AI é a medida da circunferência epicárdica e endocárdica em segmentos de coração infartado e não infartado. Corroborando nossos resultados estes autores relatam que a diferença no tamanho da AI mensurada através dos métodos deve-se principalmente a diferença dos procedimentos de mensuração relacionados de forma intrínseca à técnica escolhida para avaliação.

Através da visualização histológica foi possível demonstrar que uma extensa cicatriz de infarto foi formada na parede anterior do ventrículo esquerdo após 30 dias decorridos do IM (Figura 15 A). A ligadura da coronária esquerda resulta em geral em extensos a moderados infartos transmurais, localizados na parede anterior do ventrículo esquerdo com maior dilatação do VE (Souza, 2005; Zornoff et al; 2009).

A maioria dos trabalhos tem correlacionado a IC a episódios de infarto com grande área de cicatriz (Anversa et al., 1985; Pfeffer et al., 1991; Olivetti et al., 1991). Porém, de acordo com o trabalho de Pfeffer et al. (1979), as áreas de infarto encontradas em nosso estudo classificam-se como moderadas (Média AI% por planimetria: $36,18 \pm 1,56$ %), o que possibilitou a avaliação de um grupo mais homogêneo de animais infartados, desconsiderando aqueles com cicatriz muito pequena (menor que 30 %), ou muito grande (maior que 48 %).

A avaliação hemodinâmica após a oclusão da artéria coronária em ratos têm sido realizada e bastante discutida na literatura. Diferentes estudos mostram que o IM provoca a diminuição de variáveis funcionais, tais como volume sistólico, débito cardíaco, a pressão sistólica do ventrículo esquerdo e derivadas de pressão negativa e positiva. Em paralelo, é descrito um aumento na PDfVE. O IM é acompanhado, portanto, por disfunção sistólica e distólica que podem precocemente serem identificados após a oclusão coronariana (Fernandes, 2006; Zornoff et al; 2009; Faria, 2009).

As medidas hemodinâmicas realizadas no presente trabalho também indicaram que animais trinta dias após o IM, com área de cicatriz semelhante, apresentaram-se divididos em dois grupos distintos: Inf, que não desenvolveram sinais de IC; e IC, animais que apresentaram sinais de IC pós-IM. Esta divisão foi estabelecida pela elevação da pressão diastólica final no VE no grupo IC, acima do valor de 15 mmHg, conforme é indicado em várias pesquisas (Anversa et al; 1985;

Francis et al., 2001; Daviddof et al; 2004; Pereira et al. 2005; Fernandes, 2006; Dias et al; 2007). A PDfVE acima de 15 mmHg obtida através da avaliação hemodinâmica, somada a diminuição das derivadas de pressão negativa e positiva do VE, bem como o aumento das razões PP/MC e VD/MC no grupo IC são os fatores que sinalizam em nosso trabalho a caracterização destes dois grupos distintos. Esta caracterização está de acordo com vários trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório (Pereira et al; 2005; Fernandes, 2006; Dias et al; 2007; Arêas, 2009; Faria, 2009).

Não houve diferença estatisticamente significativa na pressão arterial sistólica, diastólica e média entre os grupos Sham, Inf e IC. Neste trabalho, além do aumento da PDfVE e da diminuição das derivadas de pressão positiva e negativa do VE, foi observada a diminuição da pressão sistólica no VE dos ratos com sinais de IC.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DA Na^+K^+ -ATPase SENSÍVEL À OUABAÍNA EM ANIMAIS Sham, Inf E IC

Para avaliação da atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase sensível à OUA após o IM, em animais que desenvolveram ou não sinais de IC, foi realizada a curva de relaxamento induzido pelo KCl (1, 2, 5 e 10 mM) em anéis de aorta incubados em solução livre de K^+ (Webb e Bohr, 1978). O relaxamento induzido pelo K^+ foi maior nos animais Inf comparados com os animais Sham nas concentrações 5 e 10 mM de KCl. Após a incubação por trinta minutos com OUA (10^{-4} M) o relaxamento induzido pelo KCl diminuiu. Entretanto, comparativamente, permaneceu maior que o relaxamento observado nos animais Sham, mas semelhante ao observado no grupo IC.

Sabe-se que a OUA é uma substância endógena presente no plasma sanguíneo capaz de inibir a bomba de Na^+K^+ -ATPase e assim, aumentar o tônus vascular (Skou e Esmann, 1992; Schoner, 2002). A concentração de 10^{-4} M utilizada no presente trabalho é descrita na literatura como sendo suficiente para bloquear completamente a função de todas as isoformas da Na^+K^+ -ATPase presentes na células vasculares (Blaustein, 1993; Arnon et al. 2000). Desta forma, como a adição de OUA ao banho não foi capaz de inibir o relaxamento induzido pelo KCl da mesma forma que nos animais Sham é possível especular que a participação da Na^+K^+ -ATPase neste relaxamento seja menor após o IM ou que outros fatores relacionados aos mecanismos vasodilatadores do MLV estivessem aumentados.

A Na^+K^+ -ATPase é considerada o principal componente da vasodilatação induzida pelo aumento da concentração de KCl, em solução com potássio zero, em células de MLV (McCarron e Halpern, 1990; Prior et al; 1998). Contudo, em estudo sobre a hiperpolarização induzida pelo K^+ em artérias mesentéricas de ratos foi evidenciado o papel tanto da Na^+K^+ -ATPase quanto dos canais para KCl (Weston et al; 2002). Desta forma, além da Na^+K^+ -ATPase, os canais para K^+ também participam do relaxamento induzido pelo KCl. De acordo com estes resultados nossa hipótese é que após o infarto do miocárdio os canais para K^+ do MLV dos animais que não desenvolveram sinais de IC estejam participando mais do relaxamento induzido pelo KCl.

A fim de verificar a participação dos canais para K^+ neste relaxamento, foi utilizado TEA, um bloqueador não específico dos canais para K^+ . Após a incubação por trinta minutos com TEA (2 mM), o relaxamento induzido pelo KCl, antes e após a incubação com OUA, foi similar nos animais Sham e Inf. Logo, a diferença que existia no relaxamento induzido pelo KCl entre estes grupos quando avaliados com endotélio intacto, foi abolida pelo bloqueio dos canais para K.

A Na^+K^+ -ATPase é o principal componente da vasodilatação induzida pelo KCl em solução com $[K^+]_o$ em MLV (McCarron e Halpern, 1990; Prior et al; 1998). Contudo, estudo sobre a hiperpolarização induzida pelo KCl em artérias mesentéricas de ratos evidenciou o papel tanto da Na^+K^+ -ATPase quanto dos canais para K^+ nesse relaxamento (Weston et al; 2002). Desta forma, como o TEA aboliu as diferenças entre os grupos, especula-se que sejam os canais para K^+ os responsáveis pela diferença no relaxamento induzido pelo KCl após o IM.

A fim de avaliar a modulação endotelial sobre o relaxamento induzido pelo KCl após o IM foram realizadas as curvas de relaxamento após a remoção mecânica do endotélio e a incubação com L-NAME por 30 minutos.

A remoção do endotélio aboliu a diferença no relaxamento induzido pelo KCl, antes da incubação com OUA, entre IC e Inf. Trabalhos demonstram que a remoção do endotélio inibe a atividade da Na^+K^+ -ATPase (Rossoni et al; 2003; Dos Santos et al; 2003; Chen et al; 2005) e dos canais para K^+ do MLV (Nelson e Quayle, 1995; Ko et al; 2008). Como a remoção do endotélio parece ter prejudicado mais os animais Inf do que os IC, é possível especular que mecanismos endoteliais, como os canais para K^+ do endotélio, participem do relaxamento induzido pelo KCl nos animais Inf.

A incubação com L-NAME acentuou a diferença entre IC e Inf antes e após a incubação com OUA. Além disso, a incubação com L-NAME possibilitou redução mais acentuada do relaxamento induzido pelo KCl em animais IC. Uma hipótese é que a diminuição do NO seja mais comprometedora para os animais IC em virtude dos mesmos já apresentarem disfunção endotelial acentuada.

O papel do endotélio intacto na manutenção da atividade basal da Na^+K^+ -ATPase e dos canais para K^+ pode também ser inibido pelo L-NAME e por outros inibidores não seletivos das sintases do óxido nítrico. Portanto, o NO é considerado

um estimulador da atividade da Na^+K^+ -ATPase. Um dos mecanismos propostos para o NO ativar a Na^+K^+ -ATPase e promover o relaxamento do MLV é o aumento dos níveis intracelulares de GMPc (Rapoport et al; 1985). Contudo, a ativação Na^+K^+ -ATPase independente do aumento do GMPc também já foi descrita (Gupta et al; 1994). O NO também pode estimular o trocador Na^+H^+ , que aumenta a concentração intracelular de Na^+ , estimulando o funcionamento da Na^+K^+ -ATPase promovendo relaxamento vascular (Ando et al; 1991; Gupta et al; 1994).

Para elucidar a fonte da diferença no relaxamento induzido pelo KCl, após o IM, entre os animais infartados que desenvolveram ou não sinais de IC dois questionamentos são importantes: 1) Será que os canais para K^+ participam mais do relaxamento induzido pelo KCl em animais Inf e/ou a Na^+K^+ ATPase participa menos deste relaxamento? 2) A diferença no relaxamento induzido pelo KCl em animais que desenvolveram sinais de IC em relação ao Inf poderia estar relacionada a diminuição da biodisponibilidade de NO e/ou aumento do estresse oxidativo neste grupo?

Demonstrando a participação do endotélio na modulação do relaxamento vascular induzido pelo KCl em animais IC, a remoção do endotélio ocasionou resultados similares entre Sham e IC. Contudo, quando L-NAME foi incubado ao banho houve uma diminuição do relaxamento induzido pelo KCl, antes e após a incubação com OUA, dos anéis de aorta dos animais IC em relação aos animais Sham e Inf. Assim, é possível hipotetizar que a modulação nitrérgica sobre o relaxamento induzido pelo KCl é maior nos ratos IC, ou estes animais dependem mais do NO que possuem para modular seu relaxamento.

Quando o TEA foi incubado ao banho por 30 minutos as diferenças no relaxamento induzido pelo KCl foram abolidas entre os grupos Sham, Inf e IC. Este resultado é sugestivo de que os canais para K^+ estejam participando mais do relaxamento vascular induzido pelo KCl após o IM. Para avaliar a participação dos canais para K^+ no relaxamento vascular vários protocolos são propostos como é possível observar na descrição realizada no item 1.4.1 na introdução deste trabalho. A utilização de fármacos inibidores específicos e inespecíficos dos canais para K^+ é uma alternativa para esta avaliação, e possibilita o estudo funcional destes canais em preparações isoladas de células.

Desta forma, utilizou-se como protocolo de avaliação dos canais para K^+ a curva de relaxamento induzido pela ACh. Nesta curva de relaxamento é possível avaliar o relaxamento dependente do endotélio em condições mais fisiológicas em relação ao potencial de membrana da célula, pois utiliza-se solução Krebs, com pH, temperatura e concentração iônica semelhante às concentrações plasmáticas. Outras preparações, como o protocolo de relaxamento induzido pelo K^+ poderiam influenciar os resultados funcionais dos canais para K^+ pois são realizados com solução K^+ zero. Nestas condições, o *steady state* dos canais para K^+ pode ter sido influenciado modificando a resposta dos mesmos a agonistas e antagonistas (Skaug e Detar, 1981).

Desta forma, foram realizadas as curvas de ACh na presença de bloqueadores dos canais para K^+ a fim de verificar a hipótese dos canais para potássio estarem participando mais do relaxamento dos animais após o IM, além de distinguir o papel específico de cada um destes canais na promoção do relaxamento.

5.3 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS PARA K⁺ NA RESPOSTA VASODILATADORA DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANIMAIS Sham, Inf E IC

O relaxamento dependente do endotélio foi avaliado nos ratos, trinta dias após o infarto do miocárdio, com mesma área de cicatriz, com e sem sinais de insuficiência cardíaca. Uma curva concentração-resposta de relaxamento vascular induzido pela ACh (0,01 nM a 10 µM) foi realizada nos anéis de aorta torácica após a pré-contracção com fenilefrina. O objetivo deste protocolo foi avaliar as respostas vasculares induzidas pela ACh após o IM entre os grupos Sham, Inf e IC.

O relaxamento induzido pela ACh nos tecidos vasculares é dependente da presença de endotélio e pode ser atribuído a liberação de fatores derivados do endotélio (Chen e Cheung, 1992; Fèlètou e Vanhoutte, 2009).

No presente trabalho nos animais infartados sem sinais de insuficiência cardíaca a sensibilidade à ACh foi menor em relação aos animais Sham. Nos animais que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca além da sensibilidade à ACh, a R_{max} também diminuiu quando estes animais foram comparados com os Sham. Na comparação entre os animais Inf e IC, a R_{max} ao relaxamento induzido pela ACh nos animais IC foi menor que nos animais Inf.

Corroborando com nossos resultados, estudos realizados com diferentes vasos em humanos com IM e IC demonstram uma redução do relaxamento dependente do endotélio (Belardinelli, 2001; Annuk et al. 2003; Linke et al. 2003).

Sartório et al. (2007) demonstraram que a resposta máxima e a sensibilidade vasodilatadora mediada por ACh apresentou-se reduzida já em uma fase aguda (7 dias) após infarto em artéria aorta. Neste trabalho os autores atribuíram os resultados da reduzida resposta à ACh após o IM possíveis mecanismos relacionados à disfunção da via do NO e ao estresse oxidativo vascular, não correlacionando-os a uma reduzida responsividade do músculo liso vascular. Bianchi et al. (2005) demonstraram que embora o relaxamento induzido pela ACh não tenha sido modificado após o infarto, ocorreu um aumento da reatividade à fenilefrina e diminuição da biodisponibilidade do NO em anéis de aorta de ratas após sessenta dias de infarto.

A vasodilatação dependente do endotélio está acentuadamente alterada na IC congestiva, contribuindo para a resistência periférica aumentada e a vasoconstrição

sistêmica (Drexler et al., 1992a). O prejuízo no relaxamento dependente do endotélio tem sido descrito em pacientes com IC crônica (IC) (Kubo et al. 1991; Katz et al. 1992; Hornig et al. 1998b), contribuindo para o aumento da resistência vascular.

Outros trabalhos com diferentes vasos de ratos mostraram redução, mas por outro lado também mostraram preservação do relaxamento dependente do endotélio em diferentes estágios do IM (Teerlink et al; 1993; Baggia et al; 1997; Bauersachs et al; 1999; Indik et al; 2001).

Takahashi et al. (2005) encontraram relaxamento induzido pela ACh diminuído quando avaliaram diferentes vasos de resistência com o mesmo diâmetro, no estágio inicial da IC. Além disso, no trabalho de Baggia et al. (1997) o relaxamento induzido pela ACh também estava diminuído em artéria pulmonar de ratos com IC.

Embora exista um volume expressivo de trabalhos que avaliam a reatividade vascular após o IM e durante o desenvolvimento da IC, há dificuldade de consenso em relação aos resultados dessas pesquisas encontradas na literatura. Isto se deve principalmente a diversidade de variáveis envolvidas nestes estudos. Assim, para avaliar precisamente os mecanismos de relaxamento dependentes do endotélio, deve-se considerar: espécie utilizada para estudo; leito vascular (Hirooka et al; 1994; Baggia et al; 1997; Takahashi et al; 2005); diâmetro do vaso (Mohri et al; 1997); estágio de desenvolvimento da IC (Takahashi et al; 2005); bem como a apresentação, ou não, de sinais de IC após o IM (Pereira et al; 2005).

Desta forma, quando as diferenças na resposta vascular em ratos após trinta dias de IM, com mesma área de cicatriz, que desenvolveram ou não sinais de insuficiência cardíaca foram avaliadas pela primeira vez na literatura, em leito vascular caudal, por Pereira et al. (2005), esses autores encontraram nos animais Inf, semelhante aos nossos resultados, uma diminuição do relaxamento dependente do endotélio. Entretanto, de forma contrária aos nossos resultados, esses autores demonstraram no grupo IC um aumento do relaxamento dependente do endotélio que foi atribuído a uma maior biodisponibilidade de NO nestes animais.

Os diferentes resultados encontrados no grupo de animais que desenvolveram sinais de IC, na comparação entre o presente trabalho e o trabalho de Pereira et al. (2005), podem ser atribuídos principalmente ao fato dos vasos estudados não serem iguais em ambos os trabalhos. Suportando esta hipótese cita-

se Baggia et al. (1997) relatando que o relaxamento dependente do endotélio não é uniformemente prejudicado na IC, sendo dependente do tipo de vaso estudado.

Corroborando nossos resultados que indicam diminuição do relaxamento dependente do endotélio em animais IC vários mecanismos são descritos na literatura e podem estar envolvidos nesta disfunção: 1) Redução da liberação ou aumento da degradação de NO (Drexler et al; 1994; Bauersachs et al; 1999; Indik et al; 2001); 2) Redução da expressão da eNOS (Comini et al; 1996; Schafer et al; 2004); 3) Aumento da liberação de substâncias vasoconstritoras (Kubo et al; 1991; Katz et al; 1993); 4) Dessensibilização da guanilato ciclase ao NO (Katz et al; 1992); e, 5) Diminuição da sensibilidade do MLV ao GMPc (Katz et al; 1992).

Para verificar a participação do óxido nítrico nas respostas vasculares induzidas pela ACh foi realizada uma curva de relaxamento induzido pela ACh, com os anéis de aorta previamente incubados com L-NAME. Após a incubação por trinta minutos com L-NAME houve abolição do relaxamento induzido pela ACh em todos os grupos estudados. Através deste resultado foi possível demonstrar que o relaxamento induzido pela ACh em anéis de aorta de ratos Sham, Inf e IC era modulado por uma via nitrérgica.

Similarmente aos nossos resultados, Takahashi et al. (2005) encontraram diminuição da resposta de relaxamento induzido pela ACh em vasos de resistência de ratos com IC quando utilizaram monometil-L-arginina (L-NMMA), um inibidor não específico da NOS semelhante ao L-NAME. No trabalho de Pereira et al. (2005) quando o endotélio dos anéis vasculares dos animais com e sem sinais de IC foram removidos, as diferenças entre os grupos também eram atenuadas.

Desta forma, até aqui é possível dizer que há um prejuízo do relaxamento vascular dependente do endotélio após o IM nos grupos Inf, ressaltando que o comprometimento no grupo de ratos IC é da sensibilidade e da R_{max} . Além disso, a participação do NO modula positivamente o relaxamento dos anéis de aorta em todos os grupos.

Então, quais seriam os mecanismos, modulados pelo NO, responsáveis pelo prejuízo do relaxamento após o IM? Dentre os vários mecanismos pelos quais o NO estimula o relaxamento vascular citam-se dois no presente trabalho: a Na^+K^+ -ATPase, já abordada anteriormente nesta discussão; e os canais para K^+ do MLV. O NO é um fator endotelial que estimula os canais para K^+ (Nelson e Quayle, 1995; Jackson, 2005, Ko et al; 2008; Briones et al; 2009; Fèlètou e Vanhoutte, 2009;

Rodrigues et al; 2011). Vários estudos sobre doenças que cursam com disfunção endotelial e/ou alteração da biodisponibilidade de NO têm relacionado o relaxamento vascular com o papel desempenhado pelos canais para K^+ no controle do tônus (Brandes et al; 2000; Dimitropoulou et al; 2002; Callera et al; 2004; Briones et al; 2009; Bonaventura et al; 2011).

Em resposta a vários estímulos neuro-humorais o endotélio libera NO e hiperpolariza as células de MLV subjacentes e desta forma é o mais estudado dos EDHFs (Fèlètou e Vanhoutte, 2006). Sabe-se que o mesmo pode estimular K_v , IK , K_{ATP} e K_{Ca} dependendo do vaso e da espécie estudada (Waldron e Cole, 1999; Jacson, 2005; Fèlètou e Vanhoutte, 2006; Félétou e Vanhoutte, 2009). O mecanismo de atuação do NO sobre os canais para K^+ pode ser dependente ou independente da formação de GMPc (Bolotina et al; 1994; Waldron e Cole, 1999; Fèlètou e Vanhoutte, 2006).

Os canais para K^+ do MLV desempenham um papel fundamental no controle do potencial de membrana e tônus. A ativação dos mesmos ocasiona hiperpolarização da membrana das células do MLV que diminui a atividade dos canais para Ca^{+2} voltagem dependentes do tipo L reduzindo o influxo de Ca^{+2} promovendo uma vasodilatação (Nelson e Quayle, 1995; Ko et al; 2008).

Estudos experimentais (Teerlink et al; 1994; Bauersachs et al; 1999) e clínicos (Kubo et al; 1991) demonstram a disfunção endotelial presente após o IM e no desenvolvimento de IC. Desta forma, seria possível que uma alteração da função nos canais para K^+ durante o desenvolvimento destas doenças também pudesse ser encontrada.

Mediante essas considerações e a fim de estudar a contribuição dos canais para potássio após o IM para o relaxamento vascular induzido pela ACh foram realizadas curvas de concentração resposta à ACh em anéis de aorta previamente incubados por 30 minutos com fármacos inibidores dos canais para K^+ .

Inicialmente utilizou-se TEA, um inibidor inespecífico dos canais para K^+ . O TEA foi capaz de reduzir a sensibilidade e a R_{max} nos grupos Sham, Inf e IC comparados a seus respectivos controles com endotélio intacto. Entretanto, na comparação da dAUC realizada a partir das curvas de relaxamento induzido pela ACh antes e após a incubação com o TEA, os grupos Inf e IC apresentaram dAUC

semelhante, mas ambos foram maiores que os animais Sham. A partir desses resultados seria possível especular que a participação dos canais para K^+ no relaxamento vascular induzido pela ACh é maior após o infarto nos grupos com e sem sinais de IC.

Diversos trabalhos que envolvem doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial e o diabetes sugerem a participação dos canais para K^+ como integrante dos mecanismos envolvidos nas alterações da reatividade vascular que ocorrem nestas doenças. Rossoni et al. (2002) demonstraram aumento da biodisponibilidade de NO em ratos tratados com OUA que desenvolveram hipertensão. Além disso, o TEA potencializou a resposta vasoconstrictora à fenilefrina em anéis de ratos tratados com OUA em maior proporção do que no grupo controle. Assim, estes autores sugeriram que o aumento do NO mediado pelo tratamento com OUA poderia estar ativando canais para K^+ .

Em animais com hipertensão arterial induzida pelo modelo dois rins um clipe, Callera et al. (2004) e Bonaventura et al. (2011) demonstraram que a redução do relaxamento induzido pela ACh em anéis de aorta de ratos estava relacionada com a diminuição do funcionamento dos canais para K^+ .

Dimitropoulou et al. (2002) sugerem em seu trabalho que o prejuízo no relaxamento na microvasculatura de animais com diabetes estaria relacionado a diminuição da corrente pelos canais para BK_{Ca} .

A aorta é muito utilizada em preparações experimentais para avaliação eletrofarmacomecânica de processos fisiológicos e patológicos. Porém, pouco se sabe sobre a contribuição dos canais K_v e BK_{Ca} neste vaso. Tamaro et al. (2004) estudaram o papel funcional e as propriedades das correntes através dos K_v em toda a membrana celular do miócito isolado de aorta. Neste trabalho os autores sugeriram que a corrente através de IK_v (via subunidade $\alpha-K_v 2.1$) e não a corrente via BK_{Ca} , é a principal corrente ativada, no repouso e durante a estimulação do MLV de aorta.

Para avaliar a participação dos canais K_v no relaxamento induzido pela ACh foi utilizado 4-AP, um inibidor seletivo destes canais. Após a incubação dos anéis de aorta com 4-AP, a sensibilidade dos anéis à ACh e a R_{max} foram reduzidas em todos os grupos. Quando a dAUC realizada a partir das curvas antes e depois da

incubação com 4-AP foram analisadas foi possível observar que no grupo Inf a dAUC foi maior que nos animais Sham e IC. Uma explicação para a dAUC dos animais Inf ser maior que nos animais Sham e IC seria então a maior participação dos K_v no relaxamento induzido pela ACh no grupo Inf.

Embora sejam escassos os trabalhos sobre a alteração do funcionamento dos K_v em doenças cardiovasculares, de forma diferente aos resultados do presente trabalho, estudos mostram diminuição da participação dos K_v na reatividade vascular na hipertensão e hipertrofia em artérias coronárias (Kim et al., 2001; Wellman et al., 2001). Parece que a atividade dos K_v está diminuída porque o potencial de membrana nestas doenças está mais positivo e a atividade dos K_v é dependente de voltagem. A maior positividade do Pm em repouso e um aumento dos níveis de Ca^{+2} intracelular parecem representar um mecanismo de feedback positivo que provoca uma diminuição da atividade dos canais K_v (Martens e Gelband, 1996; Kim et al., 2001; Wellman et al., 2001).

Para avaliar os K_{Ca} foram realizadas curvas de ACh com pré-incubação de fármacos bloqueadores específicos dos canais para K_{Ca} de larga (Iberiotoxina) e pequena (Apamina) condutância, além do duplo bloqueio destes canais (Apam+Iberio).

A incubação por 30 minutos com Apamina, inibidor seletivo de SK_{Ca} , ocasionou a diminuição da sensibilidade dos anéis de aorta à ACh nos grupos Inf e IC em relação ao grupo Sham. Quando a dAUC foi confeccionada com as curvas antes e depois da incubação com Apamina foi possível observar que a dAUC não foi diferente entre os grupos Sham, Inf e IC. Desta forma, embora tenha sido demonstrado que a inibição dos SK_{Ca} influencia a função vasorelaxante através da diminuição da sensibilidade à ACh em animais após o infarto do miocárdio, não foi possível verificar quanto os SK_{Ca} participam do relaxamento dos animais IC.

A incubação com Iberiotoxina, inibidor seletivo dos canais BK_{Ca} , não ocasionou diferença entre a sensibilidade a ACh e a R_{max} das curvas de relaxamento induzidas em aortas de animais Sham, Inf e IC quando comparados com seus respectivos controles com endotélio intacto. Também não foi diferente, em nenhum aspecto, o relaxamento induzido pela ACh na presença de Iberiotoxina, entre os animais Sham e Inf, bem como Sham e IC.

Nos ratos que apresentaram sinais de IC, houve diminuição da R_{max} da curva de relaxamento à ACh quando os mesmos foram comparados com os animais Inf. Contudo, a dAUC realizada com as curvas de relaxamento antes e após a adição de Iberiotoxina não foram diferentes entre os grupos. Como expressam estes resultados a inibição de BK_{Ca} pode influenciar o relaxamento induzido pela ACh diminuindo sua R_{max} somente nos animais IC. Assim como anteriormente apresentado em relação a avaliação do bloqueio dos canais SK_{Ca} nos animais Inf e IC não é possível mensurar a quantidade que os BK_{Ca} também participariam do relaxamento à ACh, visto que as dAUCs foram iguais entre os grupos. Seria possível especular que em uma situação de disfunção vascular ocasionada por mecanismos relacionados as alterações hemodinâmicas causadas após o infarto do miocárdio, estes canais participassem do relaxamento vascular de forma que na situação de um deles estar prejudicado, o outro poderia contribuir compensatoriamente para a manutenção da homeostase.

Para verificar a participação conjunta de SK_{Ca} e BK_{Ca} no relaxamento induzido pela ACh após o IM foi realizado o duplo bloqueio com Apamina mais Iberiotoxina. Nos animais Sham houve diminuição da sensibilidade à ACh durante o duplo bloqueio quando comparados com Sham com endotélio intacto. O bloqueio isolado destes canais não ocasionou nenhuma diferença no relaxamento induzido pela ACh nos animais Sham. Isto poderia então demonstrar um mecanismo fisiológico de participação conjunta dos canais ativados por cálcio no relaxamento à ACh, um contrabalançando o papel do outro.

Os animais infartados que não apresentaram sinais de IC não demonstraram diferenças em nenhum aspecto do relaxamento induzido pela ACh após o duplo bloqueio quando comparados com seu controle com endotélio intacto e com os animais Sham.

Tammaro et al. (2004) demonstraram que mudanças nas características voltagem-dependentes dos IK_v causadas por $\uparrow[Ca^{+2}]_{cit}$ podem afetar o número de canais abertos e influenciar a regulação do potencial de membrana. Estes autores sugeriram que este seria um importante mecanismo de hiperpolarização em MLV intacto quando estimulado por um agonista.

Seria possível especular que após o duplo bloqueio dos K_{Ca} os canais K_v estivessem compensando a ausência dos K_{Ca} mantendo normal o relaxamento induzido pela ACh nos animais Inf.

Por outro lado, nos animais com sinais de IC os resultados demonstram uma maior participação dos canais para K_{Ca} no relaxamento induzido pela ACh. Como pode ser observado nos resultados, a dAUC realizada com as curvas de relaxamento antes e após a incubação com Apam+Iberio foi maior nos ratos IC que nos grupos Sham e Inf.

Estudos recentes sugerem que os BK_{Ca} podem desempenhar um papel fundamental na regulação da pressão arterial e há fortes indícios de que o papel funcional de BK_{Ca} está aumentado em MLV durante a hipertensão crônica (Sobey, 2001). Briones et al. (2009) demonstraram que há um aumento das correntes por BK_{Ca} , mas não por K_v , em ratos que desenvolveram hipertensão após o tratamento com OUA. Estes autores sugerem o aumento das correntes de BK_{Ca} como um mecanismo compensatório ao aumento do tônus vascular que ocorre em algumas doenças.

Contudo, nenhum trabalho demonstrou até o presente momento a participação destes canais na reatividade vascular após o infarto e durante o desenvolvimento da IC.

Mas fica um questionamento, quando SK_{Ca} foi inibido isoladamente pela Apamina em animais Inf houve redução da sensibilidade à ACh. Contudo, quando o duplo bloqueio foi realizado sobre estes anéis não houve diferença no relaxamento entre os grupos Sham e Inf. Este resultado parece ter sido ocasionado pela variabilidade intrínseca dos resultados obtidos.

Como limitações do presente estudo destacam-se a variabilidade das respostas vasculares induzidas pela ACh quando os bloqueadores dos canais para K_{Ca} são incubadas ao banho. Contudo, mais do que uma limitação ou falha metodológica, estes dados parecem demonstrar um resultado no que se refere a importância destes canais na regulação do tônus em situações fisiológicas ou durante uma disfunção cardiovascular.

Ondas oscilatórias rítmicas são descritas após a aplicação de concentrações submáximas de fenilefrina em preparações de células isoladas de músculo liso vascular de aorta que produzem uma resposta complexa causando um aumento inicial na tensão basal, seguido por ondas lentas sobrepostas de contrações, as quais são chamadas ondas oscilatórias (Tammaro et al; 2004; Rocha e Bendhack, 2007). Tammaro et al. (2004) sugerem que o aumento das oscilações rítmicas estaria relacionado a concentração de cálcio intracelular e as correntes por K_v mediarão o feedback hiperpolarizante destas oscilações voltagem-dependentes em aorta de ratos.

Em estudo realizado por Rocha e Bendhack (2007) as contrações oscilatórias foram demonstradas em aorta de ratos com desnervação sinoaórtica. Além disso, estes autores verificaram que BK_{Ca} e K_{ATP} apresentavam-se com um papel dominante na regulação das contrações oscilatórias em aorta de ratos.

Talvez este componente fisiológico das oscilações rítmicas possa estar presente após a inibição dos canais para K_{Ca} no presente trabalho. Desta forma, seria possível especular que a variabilidade dos resultados obtidos no presente trabalho durante a inibição dos canais para K_{Ca} poderia estar relacionada as contrações oscilatórias.

5.4 AVALIAÇÃO DAS ISOFORMAS α -1 Na^+K^+ -ATPase, eNOS, p-eNOS DA SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO DO MLV

Em condições basais (segmentos arteriais retirados logo após o animal ser sacrificado) a expressão das isoformas α -1 Na^+K^+ -ATPase, eNOS, p-eNOS da sintase do óxido nítrico do MLV foi detectada através da técnica de *Western Blot* em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Sham, Inf e IC.

Não houve diferença na expressão protéica da isoforma α -1 Na^+K^+ -ATPase entre os grupos Sham, Inf e IC. Dias et al. (2007) não encontraram diferenças na expressão protéica da α 1- Na^+K^+ -ATPase em ratas após o IM com e sem sinais de IC. Callera et al. (2004) também não encontraram diferença na expressão protéica da Na^+K^+ -ATPase em animais que desenvolveram hipertensão no modelo dois rins um clipe (2R1C). Estes autores atribuíram a diferença no relaxamento induzido pela ACh entre os animais 2R1C e os controle que encontraram neste trabalho a uma diferente participação dos canais para K^+ entre os grupos.

Após o infarto do miocárdio e durante o desenvolvimento de IC a alteração da biodisponibilidade de NO, bem como o aumento do estresse oxidativo podem influenciar a participação da Na^+K^+ -ATPase (Kourie et al; 1998; Therien e Blostein, 2000) e, desta forma podem ter contribuído para este resultado.

Com o objetivo de verificar a participação do NO nas respostas de relaxamento vascular em uma fase crônica após o infarto do miocárdio a expressão protéica da eNOS foi avaliada. Posteriormente, estudou-se a fosforilação da eNOS no resíduo Ser¹¹⁷⁷ (p-eNOS). Esse resíduo, quando fosforilado, aumenta a atividade da enzima sintase do óxido nítrico e a produção de NO (Dimmeler et al., 1999; McCabe et al., 2000; Fleming e Busse, 2003; Wang et al; 2010). Dimmeler et al. (1999) compararam o potencial de fosforilação de diferentes resíduos Ser e concluíram que o resíduo Ser¹¹⁷⁷ exerce papel fundamental na produção de NO, enquanto em outro resíduo avaliado (Ser⁶³³), nenhuma fosforilação foi detectada. McCabe et al. (2000) ao analisar a fosforilação da eNOS, demonstraram aumento do fluxo de elétrons através do domínio reductase desta e, conseqüentemente houve aumento de NO (duas vezes acima do valor basal). A fosforilação da eNOS no resíduo Ser¹¹⁷⁷ está associada a um aumento de produção de NO e na ativação da enzima em concentrações muito mais baixas de cálcio/calmodulina do que a eNOS

não fosforilada (Dimmeler et al; 1999; Fleming e Busse, 2003). Desta forma estes dados sugerem a importância da fosforilação da eNOS para sua atividade e para a produção de NO.

No presente trabalho, a expressão da eNOS não apresentou-se diferente quando os grupos foram comparados. Entretanto, a expressão da p-eNOS apresentou-se diminuída nos animais IC em relação aos animais Sham e Inf.

Alterações na via do NO têm sido extensivamente descritas em estudos clínicos e experimentais após o infarto do miocárdio e IC. Na IC experimental, em ratos e cães, a redução da biodisponibilidade do NO foi evidenciada pelo decréscimo na expressão vascular da principal enzima responsável pela sua liberação, a eNOS (Comini et al; 1996; Smith et al; 1996). Gaballa e Goldman (1999) também mostraram que em artérias de resistência em ratos, 3 semanas após infarto, a expressão aumentada da eNOS, por transfecção de seu cDNA, promoveu uma melhoria na vasodilatação por ACh, bem como nos níveis de eNOS, previamente demonstrados reduzidos nos ratos com IC (Gaballa et al; 1999).

Em uma fase crônica após o IM (8 semanas), assim corroborando nossos resultados, Stathopoulos et al. (2001) também encontraram uma redução na atividade da isoforma cálcio-dependente da NOS em aorta de ratos.

Em aortas de cães com IC demonstrou-se redução na produção de nitrito, uma medida indireta da atividade da eNOS, tanto em resposta à estimulação pela ACh como pela bradicinina (Smith et al; 1996). Com isto, estes autores sugeriram que a vasodilatação dependente do endotélio estaria atenuada devido a uma redução da atividade da eNOS.

Corroborando com os dados funcionais encontrados no presente trabalho, a diminuição da expressão da p-eNOS poderia, de certa forma, explicar porque o aumento do relaxamento induzido pelo KCl na presença de OUA encontrado no presente trabalho foi revertido com a remoção do endotélio e TEA, mas não foi influenciado pela incubação com L-NAME.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$) “*in situ*” ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA PRODUZIDA PELA OXIDAÇÃO DO DHE

Em vasos de grande calibre como a aorta, o NO tem sido descrito como o vasodilatador predominante liberado no relaxamento dependente do endotélio (Moncada et al; 1991; Nagao et al; 1992). O mecanismo chave sugerido para a explicação da redução do relaxamento dependente do endotélio é a redução da biodisponibilidade de NO. Esta por sua vez está relacionada ao balanço entre a sua produção e degradação.

Para avaliar a produção de NO estudou-se no presente trabalho a expressão das isoformas da sintase do NO eNOS e p-eNOS. Contudo, sabe-se que é de fundamental importância para biodisponibilidade do NO a sua taxa de degradação. Evidências sugerem que a disfunção endotelial poderia resultar da redução da liberação ou da inativação aumentada do NO (Comini et al; 1996; Katz et al; 1999).

Os ânions superóxido parecem ser a principal fonte de inativação do NO (Gryglewski et al., 1986). Quando o NO combina-se com o ânion superóxido forma-se o radical peroxinitrito ($ONOO^-$) (Beckman et al; 1990) o qual pode formar radical hidroxil e promover a nitração de resíduos de tirosina (Bouloumie et al., 1997). O peroxinitrito pode, além de reduzir a biodisponibilidade do NO, oxidar grupos lipídios (Radi et al., 1991). Esta oxidação pode levar à formação de lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL) que, juntamente a outros produtos de peroxidação lipídica, pode reduzir a expressão da eNOS em células endoteliais (Liao et al., 1995).

Desta forma, no presente trabalho foi avaliada a fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio verificar a produção de $O_2^{\cdot-}$ em animais trinta dias após o IM, com e sem sinais de insuficiência cardíaca. O DHE é um derivado do etídio que entra em contato com $O_2^{\cdot-}$ oxida-se e posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha. Este método permitiu analisar a produção de $O_2^{\cdot-}$ “*in situ*” nos segmentos arteriais de aorta.

Foi encontrado significativo aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ nos anéis de aorta dos animais Inf e IC quando comparados aos animais Sham.

Trabalhos com animais experimentais (Bauersachs et al; 1999; Schafer et al; 2003; Schafer et al; 2004) e também com pacientes após infarto do miocárdio (Hornig et al; 1998b; Katz et al; 1999) corroboram os resultados encontrados no

presente trabalho, pois sugerem ou demonstraram um aumento na produção de ânions superóxido, que por sua vez, reduziria a biodisponibilidade de NO e levando à disfunção endotelial. O efeito da aldosterona como promotora de estresse oxidativo vascular tem sido enfaticamente sugerido por diversos estudos em vasos sanguíneos como coronárias (Sun et al., 2002) e vasos periféricos (Bauersachs et al; 2002; Schafer et al; 2003).

Indik et al. (2001) avaliaram a influência do estresse oxidativo sob o relaxamento induzido pela ACh em ratos com IC, 3 semanas após o IM. Semelhante aos resultados encontrados no presente trabalho, o relaxamento induzido pela ACh estava diminuído nos animais com IC. O prejuízo no relaxamento dependente do endotélio foi atribuído ao aumento das espécies reativas de oxigênio, excessiva degradação do NO e reduzida atividade da superóxido desmutase vascular (SOD, antioxidante capaz de prevenir a degradação de NO).

O aumento dos níveis de citocinas, como o TNF- α também pode estar envolvido nessas alterações do metabolismo oxidativo após o infarto (Heba et al; 2001). O TNF- α pode causar disfunção endotelial por aumentar a produção de radicais livres derivados do oxigênio, os quais, a seu turno, destroem o NO produzido pelo endotélio. Além disso, o TNF- α pode inibir a expressão da SOD extracelular (Marklund, 1992). Evidências experimentais sugerem que a concentração plasmática de TNF- α em pacientes com IC, se relaciona ao grau de disfunção endotelial como por estímulo à ACh (Katz et al; 1994).

A reduzida expressão da eNOS encontrada em animais com IC no presente trabalho pode ter sido ocasionada pelo aumento do estresse oxidativo. Entretanto, nos animais infartados sem sinais de IC, embora o estresse oxidativo estivesse aumentado, não houve diminuição da expressão da eNOS. Mais uma vez, ao desenvolvimento ou não de sinais de IC possibilita a caracterização de mecanismos diferentes quando se avalia disfunção endotelial e os fatores a ela relacionados como estresse oxidativo e biodisponibilidade de NO.

É importante ressaltar também que de forma contrária aos resultados encontrados no presente trabalho, Bauersachs et al. (1999) demonstraram um aumento na expressão vascular da eNOS, 8 semanas após infarto do miocárdio, em animais com IC, concomitante ao aumento do estresse oxidativo vascular. A liberação basal de NO também está descrita aumentada na IC em pacientes (Drexler et al., 1992a; Habib et al., 1994).

6 CONCLUSÃO

30 dias após o IM, em ratos com AI semelhante, com e sem sinais de IC, existem diferenças nos mecanismos de relaxamento vascular que induzem a caracterização de dois grupos com respostas funcionais distintas.

Dentre os possíveis mecanismos envolvidos nas diferenças entre os grupos, o presente trabalho propõe (Figura 39): o aumento da participação dos canais de K^+ e o aumento do estresse oxidativo após o IM, bem como a expressão diminuída da p-eNOS no grupo de animais que desenvolveram sinais de IC.

Sugere-se que nos animais Inf os canais K_v estejam contribuindo mais para o relaxamento vascular, enquanto os animais IC, parecem depender mais dos canais K_{Ca} . As diferenças no relaxamento vascular, de acordo com os protocolos utilizados no presente trabalho, não estariam relacionadas à alteração da função e expressão da Na^+K^+ -ATPase entre os grupos Inf e IC.

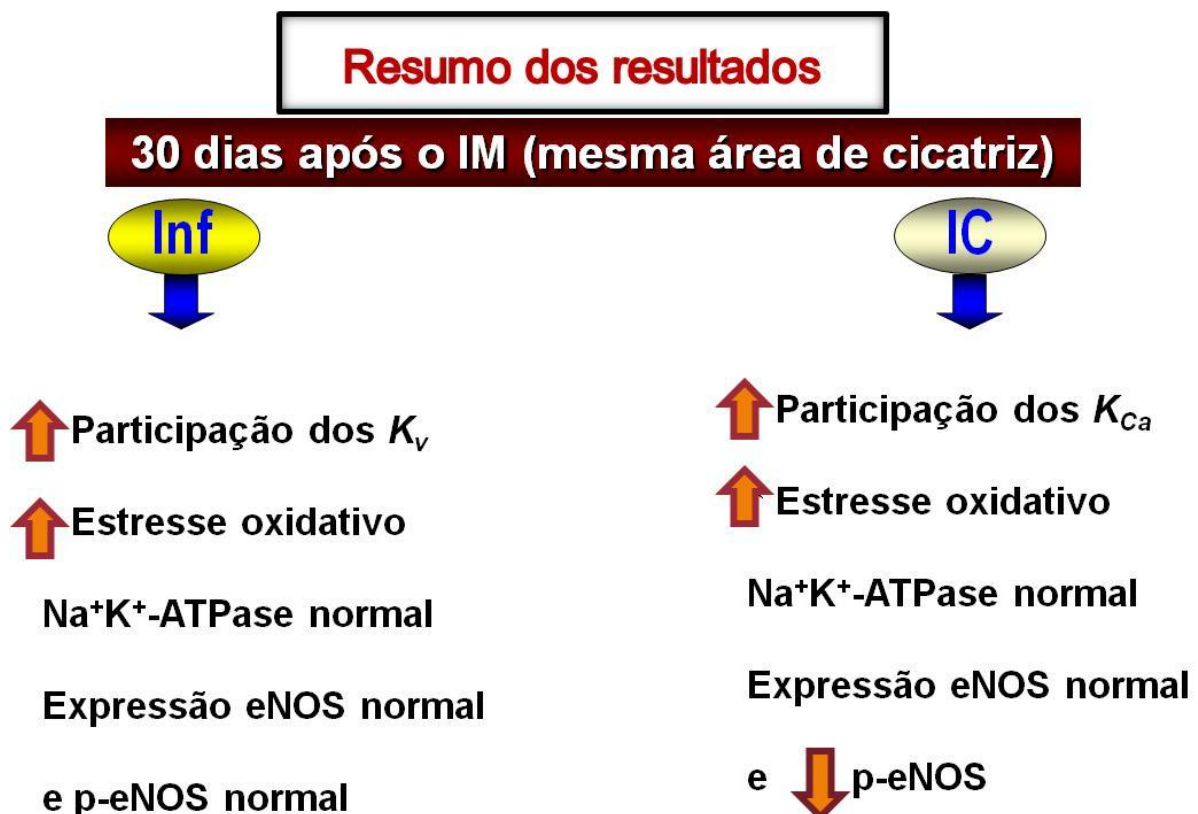


Figura 39: Esquema resumindo os principais resultados encontrados no presente trabalho.

7 REFERÊNCIAS

Alzamora R Marusic ET Gonzalez M, Michea L. Nongenomic effect of aldosterone on Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase in arterial vessels. *Endocrinology* 144 (4): 1266-72, 2003.

Ando K, Takahashi K, Ono A, Shimosawa T, Ogata E, Fujita T. Possible role of sodium-hydrogen antiport in acetylcholine-induced relaxation of rat aorta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 177 (1): 407-13, 1991.

Angeli JK. Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em aorta de ratos. 2009.113f. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.

Angus JA, Cocks TM. Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacology & Therapeutics* 41 (1-2): 303-52, 1989.

Antonio EL et al. Left ventricle radio-frequency ablation in the rat: a new model of heart failure due to myocardial infarction homogeneous in size and low in mortality. *J Card Fail.* 15(6):540-8, 2009.

Aperia A. Regulation of sodium/potassium ATPase activity: impact on salt balance and vascular contractility. *Current Hypertension Reports* 3 (2): 165-71, 2001.

Arêas GPT. Desempenho contrátil do ventrículo direito 7 dias após infarto em ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca. 2009.100f. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.

Arnon A, Hamlyn JM, Blaustein MP. Ouabain augments Ca^{2+} transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na^{+} . *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 279 (2): 679-91, 2000.

Attina T, Camidge R, Newby DE, Webb DJ. Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart* 91 (6): 825-31, 2005.

Aw TY, Jones DP. ATP concentration gradients in cytosol of liver cells during hypoxia. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 249: 385-92, 1985.

Baggia S, Perkins K, Greenberg B. Endothelium-dependent relaxation is not uniformly impaired in chronic heart failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 29: 389-96, 1997.

Bauersachs J, Bouloumié A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression. *Circulation*. 100: 292-98, 1999.

Bauersachs J, Heck M, Fraccarollo D, Hildemann SK, Ertl G, Wehling M, Christ M. Addition of spironolactone to angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: role of vascular superoxide anion formation and endothelial nitric oxide synthase expression. *Journal of American College of Cardiology* 39: 351-358, 2002.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (4): 1620-4, 1990.

Beguín P, Beggah AT, Chibalin AV, Burgener-Kairuz P, Jaisser F, Mathews PM, Rossier BC, Cotecchia S, Geering K. Phosphorylation of the Na,K-ATPase α subunit by protein kinase A and C in vitro and in intact cells. Identification of a novel motif for PKC-mediated phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 24437–45, 1994.

Beguín P, Peitsch MC, Geering K. α 1 but not α 2 or α 3 isoforms of Na,K-ATPase are efficiently phosphorylated in a novel protein kinase C motif. *Biochemistry* 35: 14098–108, 1996.

Behrendt D, Ganz P. Endothelial function: from vascular. Biology to clinical applications. *The American Journal of Cardiology* 90: 40–8, 2002.

Benedict CR, Weiner DH, Johnstone DE, Bourassa MG, Ghali JK, Nicklas J, Kirlin P, Greenberg B, Quinones MA, Yusuf S. Comparative neurohormonal responses in patients with preserved and impaired left ventricular ejection fraction: results of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) Registry. The SOLVD Investigators. *Journal of the American College of Cardiology*. 22(4): 146-153, 1993.

Bianchi PR, Gumz BP, Giuberti K, Stefanon I. Myocardial infarction increases reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings of ovariectomized rats. *Life Sciences* 78 (8): 875- 81, 2006.

Blanco G, Mercer R. W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal Physiology* 275: 633-50, 1998.

Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological Reviews*. 79: 763–854, 1999.

Blaustein MP. Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 232: 165-73, 1977.

Blaustein, MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. *American Journal Physiology* 264: 1367-87, 1993.

Blondeau N, Pétrault O, Manta S, Giordanengo V, Gounon P, Bordet R, Lazdunski M, Heurteaux C. Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel. *Circ Res* 101 (2): 176-84, 2007.

Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Ayub-Ferreira SM, Rohde LE, Oliveira WA, Almeida DR, e cols. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *Arq Bras Cardiol* 93 (1 supl.1): 1-71, 2009.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368 (6474): 850-3, 1994.

Bonaventura D, de Lima RG, da Silva RS, Bendhack LM. NO donors-relaxation is impaired in aorta from hypertensive rats due to a reduced involvement of K^{+} channels and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Life Sci* Aug 3, 2011. [Epub ahead of print].

Borin ML. cAMP evokes a rise in intracellular Na^{+} mediated by Na^{+} pump inhibition in rat aortic smooth muscle cells. *American Journal Physiology* 269 (38): 884-91, 1995.

Bouloumié A, Bauersachs J, Linz W, Schölkens BA, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension* 30 (4): 934-41, 1997.

Bova S, Blaustein MP, Ludens JH, Harris DW, DuCharme DW, Hamlyn JM. Related effects of an endogenous ouabainlike compound on heart and aorta. *Hypertension* 17: 944-50, 1991.

Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Félétou M, Gödecke A, Huang PL, Vanhoutte PM, Fleming I, Busse R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(17): 9747-52, 2000.

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

Brayden JE. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29 (4): 312-6, 2002.

Brezis M, Rosen S. Hypoxia of the renal medulla—its implications for disease. *The New England Journal of Medicine* 332: 647–55, 1995.

Briones AM, Padilha AS, Cogolludo AL, Alonso MJ, Vassallo DV, Pérez-Vizcaino F, Salaices M. Activation of BK_{Ca} channels by nitric oxide prevents coronary artery endothelial dysfunction in ouabain-induced hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 27 (1): 83-91, 2009.

Brock T A, Lewis LJ, Smith JB. Angiotensin increases Na⁺ entry and Na⁺/K⁺ pump activity in cultures of smooth muscle from rat aorta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América* 79 (5): 1438-42, 1982.

Brotherus JR, Jacobsen L, Jorgensen PL. Soluble and enzymatically stable (Na+K⁺)-ATPase from mammalian kidney consisting predominantly of protomer -units. *Biochimica et biophysica acta* 731: 290–303, 1983.

Bryan RM Jr, Joseph BK, Lloyd E, Rusch NJ. Starring TREK-1: the next generation of vascular K⁺ channels. *Circ Res* 101 (2): 119-21, 2007.

Bryan RM Jr, You J, Phillips SC, Andresen JJ, Lloyd EE, Rogers PA, Dryer SE, Marrelli SP. Evidence for two-pore domain potassium channels in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291 (2): H770-80, 2006.

Buckalew VMJ, Martinez FJ, Green WE. The effect of dialysates and ultrafiltrates of plasma of saline-loaded dogs on toad bladder sodium transport. *The Journal of Clinical Investigation* 49 (5): 926-35, 1970.

Callera GE, Yogi A, Tostes RC, Rossoni LV, Bendhack LM. Ca²⁺-activated K⁺ channels underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilation in 2K-1C hypertensive rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 309 (3): 1036-42, 2004.

Carabello BA. Concentric versus eccentric remodeling. *Journal of Cardiac Failure* 8 (6): 258-63, 2002.

- Celotto AC, Restini CB, Capellini VK, Bendhack LM, Evora PR. Acidosis induces relaxation mediated by nitric oxide and potassium channels in rat thoracic aorta. *Eur J Pharmacol* 10; 656 (1-3): 88-93, 2011.
- Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, Hobbs AJ. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci* 100 (3): 1426-31, 2003.
- Chen GF, Cheung DW. Characterization of acetylcholine-induced membrane hyperpolarization in endothelial cells. *Circulation Research* 70 (2): 257-63, 1992.
- Chen KH, Chen SJ, Wu CC. Regulation of Na⁺-K⁺-ATPase in rat aortas: pharmacological and functional evidence. *The Chinese Journal of Physiology* 48 (2): 86-92, 2005.
- Chow DC, Browning CM, Forte JG. Gastric H⁺-K⁺-ATPase activity is inhibited by reduction of disulfide bonds in beta-subunit. *American Journal Physiology* 263: 39-46, 1992.
- Chow DC, Forte JG. Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. *The Journal of Experimental Biology* 198: 1-17, 1995.
- Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* 35: 569-82, 2000.
- Comini L, Bachetti T, Gaia G, Pasini E, Agnoletti L, Pepi P, Ceconi C, Curello S, Ferrari R. Aorta and skeletal muscle NO synthase expression in experimental heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 28 (11): 2241-8, 1996.
- Cortes VF, Veiga-Lopes FE, Barrabin H, Alves-Ferreira M, Fontes CF. The gamma subunit of Na⁺,K⁺-ATPase: role on ATPase activity and regulatory phosphorylation by PKA. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 (11): 1901-13, 2006.
- Cox RH, Folander K, Swanson R. Differential expression of voltage-gated K⁺ channel genes in arteries from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* 37 (5): 1315-22, 2001.
- Cox RH. Moleculares determinantes de correntes de potássio dependentes da voltagem no músculo liso vascular. *Biophys Biochem Cell* 42 (2): 167-95, 2005.
- Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *The Journal of Clinical Investigation* 86: 228-34, 1990.
- Da Cunha V, Rossoni LV, Oliveira PA, Poton S, Pretti SC, Vassallo DV, Stefanon I. Cyclooxygenase inhibition reduces blood pressure elevation and vascular reactivity dysfunction caused by inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Clinical and Experimental Hypertension* 22 (2): 203-15, 2000.
- Da Cunha V, Stefanon I, Mill JG. Role of nitric oxide in mediating cardiovascular alterations accompanying heart failure in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 82 (6): 372-9, 2004.
- DATASUS [Internet]. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. Cadernos de Informações de Saúde - Versão de maio/2010. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/cadernos/cadernosmap.htm?saude=http%3A%2F%2Ft>

abnet.datasus.gov.br%2Ftabdata%2Fcadernos%2Fcadernosmap.htm&botaoook=OK&obj=htp%3A%2F%2Ftabnet.datasus.gov.br%2Ftabdata%2Fcadernos%2Fcadernosmap.htm>. Acesso em: 24 de abr. 2011a.

DATASUS [Internet]. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. Informações em Saúde – Epidemiológicas e Morbidade. Epidemiológicas e Morbidade Geral, por local de internação - de 1984 a 2007. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>. Acesso em: 24 de abr. 2011b.

Davel AP, Rossoni LV, Vassallo DV. Effects of ouabain on the pressor response to phenylephrine and on the sodium pump activity in diabetic rats. *European Journal of Pharmacology* 406 (3): 419-427, 2000.

Davidoff AW, Boyden PA, Schwartz K, Michel JB, Zhang YM, Obayashi M, Crabbe D, Ter Keus HEDJ. Congestive heart failure after myocardial infarction in the rat: cardiac force and spontaneous sarcomere activity. *New York Academy of Sciences* 1015: 84-95, 2004.

De Angelis K, Santos, MSB, Irigoyen, MC. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul* 3: 1-7, 2004.

De Souza JAM. Avaliação de Dois métodos experimentais de indução ao infarto do miocárdio. Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Dissertação de Mestrado). 2005.

Dias FMV, Capatto PP, Davel APC, Vassallo DV, Vassallo DV, Rossoni LV, Stefanon I. Avaliação da expressão protéica das isoformas α -1 e α -2 da Na^+K^+ -ATPase e da sintase do óxido nítrico endotelial em aorta de animais infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca In: Fesbe, 2009, Águas de Lindóia. **Programa XXIV Reunião Anual das Federações de Sociedades de Biologia Experimental**. Águas de Lindóia: 2009.

Dias FMV, Capatto PP, Davel APC, Vassallo DV, Vassallo DV, Rossoni LV, Stefanon I. Participação da Na^+K^+ -ATPase nas mudanças de reatividade vascular após o infarto do miocárdio In: Congresso de Ciências da Saúde, 2007, Vitória. **Congresso de Ciências da Saúde**. Vitória: 2007.

Dias FMV, Ribeiro Junior RF, Fernandes AA, Rossoni LV, Vassallo DV, Stefanon I. Avaliação dos Bloqueadores dos Canais de Potássio na Reatividade Vascular em Aorta de Animais Infartados com e sem Sinais de Insuficiência Cardíaca. In: IV Congresso de Ciências da Saúde, 2010, Vitória. **Anais do IV Congresso de Ciências da Saúde**. Vitória: 2010.

Dick GM, Sanders KM. (Xeno)estrogen sensitivity of smooth muscle BK channels conferred by the regulatory beta1 subunit: a study of beta1 knockout mice. *J Biol Chem* 276 (48): 44835-40, 2001.

Didion SP, Carmines PK, Ikenaga H, Mayhan WG. Enhanced constrictor responses of skeletal muscle arterioles during chronic myocardial infarction. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 273: 1502–08, 1997.

Dimitropoulou C, Han G, Miller AW, Molero M, Fuchs LC, White RE, Carrier GO. Potassium (BK_{Ca}) currents are reduced in microvascular smooth muscle cells from insulin-resistant rats. *American Journal Physiology Heart Circulatin Physiology* 282 (3): 908-17, 2002.

- 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* 399 (6736): 601-5, 1999.
- Dolson GM, Wesson DE, Adroque HJ. Vascular relaxation probably mediates the antihypertensive effect of a high-potassium diet: a role for enhanced vascular Na,K-ATPase activity. *Journal of Hypertension* 13: 1433-9, 1995.
- Dorn GW. Adrenergic pathways and left ventricular remodeling. *Journal of Cardiac Failure* 8 (6): 370-3, 2002.
- Dos Santos L, Xavier FE, Vassallo DV, Rossoni LV. Cyclooxygenase pathway is involved in the vascular reactivity and inhibition of the Na⁺,K⁺-ATPase activity in the tail artery from L-NAME-treated rats. *Life Sciences* 74 (5): 613-27, 2003.
- Dostanic-Larson I, Lorenz JN, Van Huysse JW, Neumann JC, Moseley AE, Lingrel JB. Physiological role of the α 1- and α 2- isoforms of the Na-K-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 290: 524–28, 2006.
- Douglas LM. Mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future inflammatory. *Circulation Research* 91: 988-98, 2002.
- Drexler H, Lu W. Endothelial dysfunction of hindquarter resistance vessels in experimental heart failure. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 31: 1640–45, 1992.
- Drexler H. Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. *European Heart Journal* 26 (1): 65-69, 2005.
- Drexler H. Hypertension, heart failure, and endothelial function. *The American Journal of Cardiology* 82 (10): 20-22, 1998.
- Dudgeon S, Benson DP, MacKenzie A, Paisley-Zyszkiewicz K, Martin W Recovery by ascorbate of impaired nitric oxide-dependent relaxation resulting from oxidant stress in rat aorta. *Br J Pharmacol.*125 (4): 782-6. 1998.
- Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology.* 15 (8): 1983-992, 2004.
- Ewart HS, Klip A. Hormonal regulation of the Na⁺-K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 269 (38): 295–311, 1995.
- Falkenhahn M, Gohlke P, Paul M, Stoll M, Unger T. The renin-angiotensin system in the heart and vascular wall: new therapeutic aspects. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 24 (2): 6-13, 1994.
- Fang ZY, Marwick, TH. Vascular dysfunction and heart failure: epiphenomenon or etiologic agent? *American Heart Journal* 143: 383-90, 2002.
- Faria T de O. Alterações ponderais, hemodinâmicas e da função vascular do leito arterial caudal em ratas sete dias após o infarto do miocárdio. 2009.115f. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.

- Faria Tde O, Baldo MP, Simões MR, Pereira RB, Mill JG, Vassallo DV, Stefanon I. Body weight loss after myocardial infarction in rats as a marker of early heart failure development. *Archives of Internal Medicine* 42 (4): 274-80, 2011.
- Faria T de O, Targueta GP, Angeli JK, Almeida EA, Stefanon I, Vassallo DV, Lizardo JH. Acute resistance exercise reduces blood pressure and vascular reactivity, and increases endothelium-dependent relaxation in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Applied Physiology* 110 (2): 359-66, 2010.
- Farley RA, Miller RP, Kudrow A. Orientation of the beta subunit polypeptide of (Na⁺⁺K⁺) ATPase in the cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 873: 136-42, 1986.
- Fedorova OV, Bagrov AY. Inhibition of Na/KATPase from rat aorta by two Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin: evidence of interaction with different alpha-subunit isoforms. *American Journal of Hypertension* 10 (8): 929-35, 1997.
- Féléto M, Vanhoutte PM. EDHF an update. *Clinical Science* 117: 139–155, 2009.
- Féléto M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26: 1215–1225, 2006.
- Féléto M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *British Journal of Pharmacology* 156: 545-62, 2009.
- Fernandes, AA. Avaliação da atividade contrátil in vitro do ventrículo direito em ratos nas fases inicial (1 semana) e tardia (8 semanas) após infarto agudo do miocárdio, em animais que apresentem ou não sinais de insuficiência cardíaca e mesma área de cicatriz de infarto. 2010. 140f. Tese de doutorado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.
- Fischer D, Rossa S, Landmesser U, Spiekermann S, Engberding N, Hornig B, Drexler H. Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. *European Heart Journal* 26 (1): 65-9, 2004.
- Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 284 (1): 1-12, 2003.
- Forbush B, Kaplan JH, Hoffman JF. Characterization of new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na,K-ATPase. *Biochemistry* 17: 3667-76, 1978.
- Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 459: 923–939, 2010.
- Forstermann V, Mulsch A, Bohme E, Busse R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circulation Research* 58: 531-8, 1986.
- Francis GS, Benedict C, Johnstone, DE, Kirlin PC, Nicklas J, Liang CS, Kubo SH, Rudin-Toretzky E, Yusuf S. Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation* 82 (5): 1724-29, 1990.

- Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *American Journal of Medicine* 110: 37-46, 2001.
- Francis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Felder RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281 (5): 1734-45, 2001.
- Francis, GS, Cohn JN, Johnson G, Rector TS, Goldman S, Simon, A. Plasma norepinephrine, plasma renin activity, and congestive heart failure: relations to survival and the effects of Therapy in V-HeFT II. *Circulation* 87: 140-48, 1993.
- Frasen P. Phospholemman, a chaperone of Na⁺K⁺-ATPase? *Cardiovascular Research* 65: 13-15, 2005.
- Ferrer M, Encabo A, Conde MV, Marin J, and Balfagon G. Heterogeneity of endothelium-dependent mechanisms in different rabbit arteries. *Journal of Vascular Research*. 32: 339-46, 1995.
- Fukuda S, Morioka M, Tanaka T, Shimoji K. Prostaglandin E1-induced vasorelaxation in porcine coronary arteries. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 260 (3): 1128-32, 1992.
- Funder JW, Pearce PT, Smith R, Campbell J. Vascular type I aldosterone binding sites are physiological mineralocorticoid receptors. *Endocrinology*.125: 2224-6, 1989.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 (5789): 373-76, 1980.
- Gaballa MA, Goldman S. Overexpression of endothelium nitric oxide synthase reverses the diminished vasorelaxation in the hindlimb vasculature in ischemic heart failure in vivo. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 31, 1243-52, 1999.
- Gaballa MA, Goldman S. Ventricular remodeling in the heart. *Journal Cardiac Failure* 8 (6): 476-85, 2002.
- Gaballa MA, Raya TE, Hoover CA, Goldman S. Effects of endothelial and inducible nitric oxide synthases inhibition on circulatory function in rats after myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 42 (3): 627-35, 1999.
- Gallo LC, Davel AP, Xavier FE, Rossoni LV. Time-dependent increases in ouabain-sensitive Na⁺, K⁺ -ATPase activity in aortas from diabetic rats: The role of prostanoids and protein kinase C. *Life Science* 87 (9-10): 302-8, 2010.
- Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction: potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 87: 755-63, 1993.
- Geering, K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 290: 241-250, 2006.
- Gerdes AM. Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failures. *Journal of Cardiac Failures* 8 (6): 264-68, 2002.

Gick GG, Hatala MA, Chon D, Ismail-Beigi F. Na,K-ATPase in several tissues of the rat: tissue-specific expression of subunit mRNAs and enzyme activity. *The Journal of Membrane Biology* 131 (3): 229-36, 1993.

Goldsmith SR, Gheorghade M. Vasopressin antagonism in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 46 (10): 1785-91, 2005.

Goldstein SA, Bayliss DA, Kim D, Lesage F, Plant LD, Rajan S. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev* 57 (4): 527-40, 2005.

Gottlieb SS, Rogowski AC, Weinberg M, Krichthen CM, Hamilton BP, Hamlyn JM. Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation* 86 (2): 420-25, 1992.

Grassi G, Seravalle G, Cattaneo BM, Lanfranchi A, Vailati S, Giannattasio C, Del Bo A, Sala C, Bolla G. B, Pozzi, M. Sympathetic activation and loss of reflex sympathetic control in mild congestive heart failure. *Circulation* 92: 3206-11, 1995.

Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* 29: 366-73, 1997.

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320 (6061): 454-6, 1986.

Gschwend S, Henning RH, Pinto YM, de Zeeuw W, Van Glist WH, Buikema H. Myogenic constriction is increased in mesenteric resistance arteries from rats with chronic heart failure: instantaneous counteraction by acute AT1 receptor blockade. *British Journal of Pharmacology* 139: 1313-25, 2003.

Gupta S, McArthur C, Grady C, Ruderman NB. Stimulation of vascular Na(+)-K(+)-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *American Journal Physiology* 266: 2146-51, 1994.

Gupta S, Phipps K, Ruderman NB. Differential stimulation of Na⁺ pump activity by insulin and nitric oxide in rabbit aorta. *American Journal Physiology* 270: 1287-93, 1996.

Gupta S, Ruderman NB, Cragoe EJJ, Sussman I. Endothelin stimulates Na⁺-K⁺-ATPase activity by a protein kinase C-dependent pathway in rabbit aorta. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 261 (30): 38-45, 1991.

Gurney AM, Osipenko ON, MacMillan D, McFarlane KM, Tate RJ, Kempson FE. Two-pore domain K channel, TASK-1, in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 93 (10): 957-64, 2003.

Haddy FJ, Vanhoutte PM, Feletou M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 290 (3): 546-52, 2006.

Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR, Ludens JH. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (14): 6259-63, 1991.

- Hamlyn JM, Ringel R, Schaeffer J, Levinson PD, Hamilton BP, Kowarski AA, Blaustein MP. A circulating inhibitor of (Na+K+)ATPase associated with essential hypertension. *Nature* 300 (5893): 650-652, 1982.
- Han F, Bossuyt J, Despa S, Tucker AL, Bers DM. Phospholemman phosphorylation mediates the protein kinase C-dependent effects on Na+/K+ pump function in cardiac myocytes. *Circulation Research* 99:1376-83, 2006.
- Haynes W. G, Webb D. J. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *Journal of Hypertension* 16: 1081–1098, 1998.
- Heba G, Krzemiński T, Porc M, Grzyb J, Ratajska A, Dembińska-Kieć A. The time course of tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor expression in an experimental model of chronic myocardial infarction in rats. *Journal of Vascular Research* 38 (3): 288-300, 2001.
- Herrera VL, Chobanian AV, Ruiz-Opazo N. Isoform-specific modulation of Na+, K+-ATPase alpha-subunit gene expression in hypertension. *Science* 241 (4862): 221-3, 1988.
- Hiatt A, McDonough AA, Edelman IS. Assembly of the (Na,K)-adenosine triphosphatase: post translational membrane integration of the alpha-subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 259: 2629-35, 1984.
- Hirsch AT, Talsness CE, Schunkert H, Paul M, Dzau VJ. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circulation Research* 69 (2): 475-82, 1991.
- Honoré E. The neuronal background K_{2P} channels: focus on TREK₁. *Nature Reviews Neuroscience* 8 (4): 251-61, 2007.
- Horisberger JD, Lemas V, Kraehenbuhl JP, Rossier BC. Structure–function relationship of Na,K-ATPase. *Annual Review of Physiology* 53: 565–584, 1991.
- Horisberger JD. Recent insight into structure and mechanism of sodium pump. *Physiology* 19: 377-87, 2004.
- Hundal HS, Marette A, Ramlal T, Lie Z, Klip A. Expression of β -subunit isoforms of the Na,K-ATPase is muscle type-specific. *FEBS letters* 328: 253-8, 1993.
- Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 25:171-91, 1985.
- Indik JH, Goldman S, Gaballa MA. Oxidative stress contributes to vascular endothelial dysfunction in heart failure. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 281: 1767–70, 2001.
- Isenovic ER, Jacobs DB, Kedees MH, Sha Q, Milivojevic N, Kawakami K, Gick G, Sowers JR. Angiotensin II regulation of the Na+ pump involves the phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 145 (3): 1151-60, 2004.
- Jackson WF. Ion Channels and Vascular Tone. *Hypertension* 35 (Pt 2): 173-8, 2000.

- Jackson WF. Potassium Channels in the Peripheral Microcirculation. *Microcirculation* 12 (1): 113-27, 2005.
- Jaggar JH, Stevenson AS, Nelson MT. Voltage dependence of Ca²⁺ sparks in intact cerebral arteries. *Am J Physiol* 274(6 Pt 1): C1755-61, 1998a.
- Jaggar JH, Wellman GC, Heppner TJ, Porter VA, Perez GJ, Gollasch M, Kleppisch T, Rubart M, Stevenson AS, Lederer WJ, Knot HJ, Bonev AD, Nelson MT. Ca²⁺ channels, ryanodine receptors and Ca(2+)-activated K⁺ channels: a functional unit for regulating arterial tone. *Acta Physiol Scand* 164 (4): 577-87, 1998b.
- Jensen JA, Kosek JC, Hunt TK, Goodson WH, Miller DC. Cardiac cryolesions as an experimental model of myocardial wound healing. *Annals Surgery* 206 (6): 798–803, 1987.
- Joiner WJ, Khanna R, Schlichter LC, Kaczmarek LK. Calmodulin regulates assembly and trafficking of SK4/IK1 Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Biol Chem* 276 (41): 37980-5, 2001.
- Juhaszova M, Blaustein MP. Na⁺ pump low and high ouabain affinity a subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94 (5): 1800–05, 1997.
- Kamata K, Miyata N, Kasuya Y. Functional changes in potassium channels in aortas from rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Pharmacol* 166 (2): 319-23, 1989.
- Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, Goldstein SA. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376 (6542): 690-5, 1995.
- Kim, NR, Chung JY, Kim EY, Han J. Changes in the Ca²⁺-activated K⁺ channels of the coronary artery during left ventricular hypertrophy. *Circulation Research* 93: 541–547, 2003.
- Klein MD, Herman MV, Gorlin R. A hemodynamic study of left ventricular aneurysm. *Circulation*. 35(4): 614-30, 1967.
- Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J. smooth Muscle Res* 44 (2): 65-81, 2008.
- Köhler R, Ruth P. Endothelial dysfunction and blood pressure alterations in K⁺-channel transgenic mice. *Pflugers* 459 (6): 969-76, 2010.
- Kourie JI. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *American Journal of Physiology Cellular Physiology* 275 (44): 1–24, 1998.
- Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Williams RE, Heifetz SM. Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation* 84 (4): 1589-96, 1991.
- Kuc RE, Davenport, AP. Endothelin-A-receptors in human aorta and pulmonary arteries are downregulated in patients with cardiovascular disease: an adaptive response to increased levels of endothelin-1? *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 36: 377-9, 2000.
- Lahaye P, Tazi KA, Rona JP, Dellis O, Lebrec D, Moreau R. Effects of protein kinase C modulators on Na⁺/K⁺ adenosine triphosphatase activity and phosphorylation in aortae from rats with cirrhosis. *Hepatology* 28: 663–9, 1998.

- Landry DW, Oliver JA. The ATP-sensitive K⁺ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog. *J Clin Invest* 89 (6): 2071-4, 1992.
- Ledoux J, Gee DM, Leblanc N. Increased peripheral resistance in heart failure: new evidence suggest an alteration in vascular smooth muscle function. *British Journal Pharmacology* 139: 1245-1248, 2003.
- Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. *Physiology* 21: 69-79, 2006.
- Lee YH, Ahn DS, Song HJ, Kim YH, Kim HS, Ahn SH, Kang S. Effects of Na⁺,K⁺ -Pump inhibitors on acetylcholine-induced relaxation in the rabbit aorta. *Yonsei Medical Journal* 33 (1): 8-13, 1992.
- Lee, RT, Schoen FJ, Loree HM, Lark MW, Libby P. Circumferential stress and matrix metalloproteinase 1 in human coronary atherosclerosis. Implications for plaque rupture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 16 (8): 1070-73, 1996.
- Leite CM, Gomes MG, Vassallo DV, Mill JG. Changes in collagen content in the residual myocardium surviving after infarction in rats. Influence of propranolol or hydralazine therapy. *Archives of Medical Research* 26 (1): 79-84, 1995.
- Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *European Molecular Biology Organization* 15 (5): 1004-11, 1996.
- Levi AJ, Boyett MR, Lee CO. The cellular actions of digitalis glycosides on the heart. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 61: 1-54, 1994.
- Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (1): 319-24, 1995.
- Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 111 (25): 3481-8, 2005.
- Liu X, Songu-Mize E. Effect of Na⁺ on Na⁺,K⁺-ATPase alpha-subunit expression and Na⁺ pump activity in aortic smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology* 351 (1): 113-9, 1998.
- Lloyd EE, Marrelli SP, Namiranian K, Bryan Junior RM. Characterization of TWIK-2, a two-pore domain K⁺ channel, cloned from the rat middle cerebral artery. *Exp Biol Med* 234 (12):1493-502.2009.
- Lockette WE, Webb RC, Bohr DF. Prostaglandins and potassium relaxation in vascular smooth muscle of the rat. The role of Na-K ATPase. *Circulation Research* 46 (5): 714-720, 1980.
- Lopez FA, Casado S. Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction. *Hypertension* 38 (6): 1400-05, 2001.
- Lopina OD. Na⁺,K⁺-ATPase: structure, mechanism, and regulation. *Membrane & Cell Biology* 13 (6): 721-44, 2000.

- 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* 17: 923-9, 1991.
- Luykenaar KD, Brett SE, Wu BN, Wiehler WB, Welsh DG. Pyrimidine nucleotides suppress KDR currents and depolarize rat cerebral arteries by activating Rho kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286 (3): H1088-100, 2004.
- Lynch RM, Weber CS, Nullmeyer KD, Moore ED, Paul RJ. Clearance of store-released Ca^{2+} by the Na^+-Ca^{2+} exchanger is diminished in aortic smooth muscle from Na^+-K^+ -ATPase alpha 2-isoform gene-ablated mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 294 (3): 1407-16, 2008.
- Marcus ML, Koyanagi S, Harrison DG, Doty DB, Hiratzka LF, Eastham CL. Abnormalities in the coronary circulation that occur as a consequence of cardiac hypertrophy. *The American Journal of Medicine* 75(3): 62-66, 1983.
- Marín J, Sánchez-Ferrer CF, Salaices M. Effects of ouabain on isolated cerebral and femoral arteries of cat: a functional and biochemical study. *British Journal of Pharmacology* 93: 43-52, 1988.
- Marklund SL. Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (10): 6696-701, 1992.
- Martens JR, Gelband CH. Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K^+ channels in genetic and nongenetic mechanisms. *Circulation Research* 79: 295-301. 1996.
- Masaki T, Vane JR, Vanhoutte PM. International Union of Pharmacology nomenclature for endothelin receptors. *Pharmacological Reviews*. 46: 137, 1994.
- 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* 17: 930-5 1991.
- Matos-Souza J, Franchini KG, Nadruz Junior W. Hipertrofia ventricular esquerda: o caminho para a insuficiência cardíaca. *Revista Brasileira de Hipertensão* 15 (2): 71-4, 2008.
- McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (9): 6123-8, 2000.
- McCarron JG, Halpern W. Impaired potassium-induced dilation in hypertensive rat cerebral arteries does not reflect altered $Na^+,K(+)$ -ATPase dilation. *Circulation Research*, 67 (4): 1035-9, 1990.
- McDonough AA, Geering, K, Farley RA. The sodium pump needs its beta subunit. *The FASEB journal* 4 (6): 1598-1605, 1990.
- Mendes Ribeiro AC, Brunini TM, Ellory JC, Mann GE. Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. *Cardiovascular Research* 49 (4): 697-712, 2001.

- Mercer RW, Biemesderfer D, Bliss DP, Collins JH, Forbush B. Molecular cloning and immunological characterization of the γ -polypeptide, a small protein associated with the Na,K-ATPase. *The Journal of Cell Biology* 121: 579–586, 1993.
- Michea L, Valenzuela V, Bravo I, Schuster A, Marusic ET. Adrenal-dependent modulation of the catalytic subunit isoforms of the Na⁺-K⁺-ATPase in aorta. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 275 (38): 1072–81, 1998.
- Middlekauff HR, Mark AL. The treatment of heart failure: the role of neurohumoral activation. *Internal Medicine* 37 (2): 112-22, 1998.
- Milanez MC, Gomes MG, Vassallo DV, Mill JG. Effects of captopril on interstitial collagen in the myocardium after infarction in rats. *Journal of Cardiac Failure* 3 (3): 189-97, 1997.
- Mill JG, Gomes AP, Carrara AB, Gomes MG, Vassallo DV. Influence of chronic captopril therapy on the mechanical performance of the infarcted rat heart. *Pharmacology Research* 29 (1): 77-88, 1994.
- Mill JG, Leite CM, Vassallo DV. Effects of sympathetic block on post-infarction cardiac hypertrophy and their impact on myocardial contractility *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 57 (6): 435-43, 1991c.
- Mill JG, Leite CM, Vassallo DV. Right ventricular contractility depression in chronically infarcted rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 21 (3): 621-4, 1988.
- Mill JG, Leite DV, Novaes MA, Lima-Pereira FE, Vassallo DV. Propranolol reduces myocardial hypertrophy in the right cardiac chambers after infarction in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 25 (8): 865-9, 1992.
- Mill JG, Novaes MA, Galon M, Nogueira JB, Vassallo DV. Comparison of the contractile performance of the hypertrophied myocardium from spontaneous hypertensive rats and normotensive infarcted rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 76 (4): 387-94, 1998.
- Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovascular Research*. 24 (9): 748-53, 1990.
- Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV. Heterometric regulation and calcium sensitivity of the infarcted rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 24 (4): 429-36, 1991a.
- Mill JG, Vassallo DV, Leite CM. Time course of changes in heart rate and sympathetic tone after coronary artery ligation in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 24 (8): 855–8, 1991b.
- Mill JG, Vassallo DV. Hipertrofia cardíaca. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 8 (1): 63-75, 2001.
- Mill JG, Stefanon I, Dos Santos L, Baldo MP. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure. *Braz J Med Biol Res*. 44(9):890-898, 2011.
- Mobasher A, Avila J, Cózar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJO, Lamb JF, Martín-Vasallo P. Na⁺, K⁺-ATPase Isozyme Diversity; Comparative Biochemistry and Physiological Implications of Novel Functional Interactions. *Bioscience Reports* 20 (2), 2000.

Moncada S, Palmer R. M, Higgs E. A. Nitric oxide: physiology pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 43 (2): 109-42, 1991.

Monnet E, Chachques JC. Animal Models of Heart Failure: What Is New? *The Annals of Thoracic Surgery* 79 (4): 1445-1453, 2005.

Moore AF, Khairallah PA. The role of sodium and potassium ions in the contractile response and development of tachyphylaxis to angiotensin II on vascular smooth muscle. *Blood Vessels* 16 (4): 169-76 1979.

Morgan K, Lewis MD, Spurlock G, Collins PA, Foord SM, Southgate K, Scanlon MF, Mir MA. Characterization and partial purification of the sodium-potassium-ATPase inhibitor released from cultured rat hypothalamic cells. *The Journal of Biological Chemistry* 260 (25): 13595-600, 1985.

Moura VGC de. Função ventricular direita de coração isolado de ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca após IAM. 2007.122f. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.

Nagao T, Illiano S, Vanhoutte PM. Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *American Journal Physiology* 263 (4 Pt 2): 1090-4, 1992.

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

Nasa Y, Toyoshima H, Ohaku H, Hashizume Y, Sanbe A, Takeo S. Prejuízo do relaxamento vascular mediado pelo GMPc e AMPc em ratos com ICC. *American Journal Physiology*, 271 (6): 2228-37, 1996.

Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *The American Physiological Society* 269 (37): C799-C822, 1995.

Neylon CB, Lang RJ, Fu Y, Bobik A, Reinhart PH. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in vascular smooth muscle: relationship between K(Ca) channel diversity and smooth muscle cell function. *Circ Res* 85 (9): e33-43, 1999.

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and post-myocardial infarction remodeling. *Circ Res*. 94: 1543-53, 2004.

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circulation Research* 94: 1543-53, 2004.

Nishimura J. Topics on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger: involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the vasodilator-induced vasorelaxation. *Journal of Pharmacological Sciences*. 102(1): 27-31 2006.

Novaes MA, Stefanon I, Mill JG, Vassallo DV. Contractility changes of the right and ventricular muscle after chronic myocardial infarction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29 (12): 1683-90, 1996.

O'Donnell ME, Bush EN, Holleman W, and Owen NE. Biologically active atrial natriuretic peptides selectively activate Na/K/Cl cotransport in vascular smooth muscle cells. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy* 243: 822-28, 1987.

Oguchi A, Ikeda U, Kanbe T, Tsuruya Y, Yamamoto K, Kawakami K, Medford RM, Shimada K. Regulation of Na-K-ATPase gene expression by aldosterone in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* . 265: 1167–72, 1993.

Olivetti G, Capasso JM, Meggs LG, Sonnenblick EH, Anversa P. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Circulation Research* 68 (3): 856-69, 1991.

Orlowski J, Lingrel JB. Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic alpha isoform and beta subunit mRNAs. *The Journal of Biological Chemistry* 263 (21): 10436-42, 1988.

Overbeck HW, Pamnani MB, Akera T, Brody TM, Haddy FJ. Depressed function of a ouabain-sensitive sodium-potassium pump in blood vessels from renal hypertensive dogs. *Circulation Research* 38: 48-52, 1976.

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

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333 (6174): 664-6, 1988.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122): 524-6, 1987.

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

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JEJ, Epstein S. E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *The New England Journal of Medicine* 323: 22-7, 1990.

Park WS, Han J, Kim N, Youm JB, Joo H, Kim HK, Ko JH, Earm YE. Endothelin-1 inhibits inward rectifier K⁺ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells through protein kinase C. *J Cardiovasc Pharmacol* 46 (5): 681-9; 2005.

Pereira RB, Sartorio CL, Vassallo DV, Stefanon I. Differences in tail vascular bed reactivity in rats with and without heart failure following myocardial infarction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 312 (3): 1321-5, 2005.

Pesaro AEP, Serrano Junior CV, Nicolau JC. Infarto agudo do miocárdio: síndrome coronariana aguda com supradesnivelamento de ST. *Revista da Associação Médica Brasileira* 50 (2): 214-20, 2004.

Pfeffer JM. Memorial lecture. *Journal of Cardiac Failure* 8: 248-52, 2002.

Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81: 1161-72, 1990.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol*. 260(5 Pt 2):H1406-14, 1991.

Pfeffer MA et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med*. 327(10): 669-77, 1992.

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

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

Prior HM, Webster N, Quinn K, Beech DJ, Yates MS. K(+)-induced dilation of a small renal artery: no role for inward rectifier K⁺ channels. *Cardiovascular Research* 37 (3): 780-90, 1998.

Pritchard TJ, Bowman PS, Jefferson A, Tosun M, Lynch RM, Paul RJ. Na(+)-K(+)-ATPase and Ca(2+) clearance proteins in smooth muscle: a functional unit. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 299 (2): 548-56, 2010.

Quayle JM, Bonev AD, Brayden JE, Nelson MT. Pharmacology of ATP-sensitive K⁺ currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery. *Am J Physiol* 269 (5 Pt 1): C1112-8, 1995.

Quayle JM, Dart C, Standen NB. The properties and distribution of inward rectifier potassium currents in pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol* 494 (Pt 3): 715-26, 1996.

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archive of Biochemic and Biophysis* 288, 481-7, 1991.

Rapaport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 306: 174-6, 1983.

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

Rapaport RM, Schwartz K, Murad F, Effect of sodium-potassium pump inhibitors and membrane-depolarizing agents on sodium nitroprusside-induced relaxation and cyclic guanosine monophosphate accumulation in rat aorta. *Circulation Research* 57 (1): 164-70, 1985.

Rashed S. M, Songu-Mize E. Regulation of Na⁺-pump activity by dopamine in rat tail arteries. *European Journal of Pharmacology* 284: 289-97, 1995.

Rashed SM, Songu-Mize E. Regulation of Na⁺,K⁺-ATPase activity by dopamine in cultured rat aortic smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*. 305: 223-30, 1996.

Rocha ML, Bendhack LM. Effects of K⁺ channel modulators on oscillatory contractions in sinoaortic denervated rat aortas. *Biol Pharm Bull* 30 (11): 2098-104, 2007.

- Rodrigues GJ, Cicillini SA, Silva RS, Bendhack LM. Mechanisms underlying the vascular relaxation induced by a new nitric oxide generator. *Nitric Oxide* Jun 16, 2011. [Epub ahead of print].
- Rose AM, Valdes RJ. Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clinical Chemistry* 40 (9): 1674-1685, 1994.
- Rossini R, Senni M, Musumeci G, Ferrazzi P, Gavazzi A. Prevention of left ventricular remodelling after acute myocardial infarction: an update. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 5 (3):196-207, 2010.
- 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 of Medical and Biological Research* 34(8): 1065-1077, 2001.
- Rossoni LV, Cunha V, Franca A, Vassallo DV. The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses is modulated by the endothelium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 34 (6): 887-92, 1999.
- 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* 41 (1): 105-116, 2003.
- Rossoni LV, Salaices M, Marin J, Vassallo DV, Alonso MJ. Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na⁺,K⁺-ATPase in ouabain-induced hypertension. *British Journal of Pharmacology* 135 (3): 771-81, 2002a.
- 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 Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 283 (5): 2110-8, 2002b.
- Rouleau JL, Moyé LA, Champlain J, Klein M, Bichet D, Parker M, et al. Activation of neurohumoral systems following acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 68: 80-6, 1991.
- Rundqvist B, Elam M, Bergmann-Sverrisdottir Y, Eisenhofer G, Friberg P. Increased cardiac adrenergic drive precedes generalized sympathetic activation in human heart failure. *Circulation* 95 (1): 169-175, 1997.
- Sahin-Erdemli I, Rashed SM, Songu-Mize E. Rat vascular tissues express all three alpha-isoforms of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase. *American Journal Physiology* 266: 350-3, 1994.
- 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* 50 (5): 919-25, 2007.
- Satoh T, Cohen HT, Katz AI. Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATPase. II. Role of eicosanoids. *The Journal of Clinical Investigation* 91: 409–15, 1993.
- Satoh T, Karaki H. Release of Prostaglandins during the Contraction of Rat Aorta Induced by Ouabain and K⁺-Free Solution. *The Japanese Journal of Pharmacology* 48 (2): 249-255, 1988.

- Schafer A, Fraccarollo D, Tas P, Schmidt I, Ertl G, Bauersachs J. Endothelial dysfunction in congestive heart failure: ACE inhibition vs. angiotensin II antagonism. *European Journal of Heart Failure* 6 (2): 151-59, 2004.
- Schoner W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *European Journal of Biochemistry/FEBS*. 269 (10): 2440-48, 2002.
- Schoner W. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 108(7): 449-54, 2000.
- Schrier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. *The New England Journal of Medicine* 341 (8): 577-85, 1999.
- Schubert R, Krien U, Wulfsen I, Schiemann D, Lehmann G, Ulfing N, Veh RW, Schwarz JR, Gago H. Nitric oxide donor sodium nitroprusside dilates rat small arteries by activation of inward rectifier potassium channels. *Hypertension* 43 (4): 891-6, 2004.
- Selvais PL, Robert A, Ahn S, Van Linden F, Ketelslegers JM, Pouleur H, Rousseau MF. Direct comparison between endothelin-1, N-terminal proatrial natriuretic factor, and brain natriuretic peptide as prognostic markers of survival in congestive heart failure. *Journal of Cardiac Failure* 6 (3): 201-07, 2000.
- Sen AK, Tobin T. A cycle for ouabain inhibition of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* 244 (24): 6596-604, 1969.
- Shamraj OI, Lingrel JB. A putative fourth Na⁺,K⁺-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(26): 12952-6, 1994.
- Sharpe N. Myocardial infarction and heart failure. The common ground. *Circulation* 87 (3): 1037-39, 1993.
- Shubeita HE, McDonough PM, Harris AN, Knowlton KU, Glembotski CC, Brown JH, Chien KR. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (33): 20555-62, 1990.
- Shyjan AW, Gottardi C, Levenson R. The Na,K-ATPase β 2 subunit is expressed in rat brain and copurifies with Na,K-ATPase activity. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 5166-69, 1990.
- Skaug N, Detar R. Steady-state effects of extracellular potassium concentration on vascular smooth muscle reactivity. *American Journal Physiology* 241 (2): 217-23, 1981.
- Skeggs LT, Dorer FE, Kahn JR, Lentz KE, Levine M. A bioquímica do sistema renina-angiotensina e seu papel na hipertensão. *Am J Med*. 60: 737-48, 1976.
- Skou JC, Esmann M. The Na,K-ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 24 (3): 249-61, 1992.
- Skou JC. The Identification of the Sodium-Potassium Pump. *Nobel Lectures, 1997*. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1997/skou-lecture.pdf>. Acesso em: 16 de abr 2010.

- Skou JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerve. *Biochimica et Biophysica Acta* 23: 394–401, 1957.
- Smani T, Calderón-Sanchez E, Gómez-Hurtado N, Fernández-Velasco M, Cachofeiro V, Lahera V, Ordoñez A, Delgado C. Mechanisms underlying the activation of L-type calcium channels by urocortin in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 1, 87 (3): 459-66, 2010.
- 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. *Circulation Research* 78 (1): 58-64, 1996.
- Sobey CG. Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 (1): 28-38, 2001.
- Soltoff SP, Mandel LJ. Active ion transport in the renal proximal tubule. III. The ATP dependence of the Na pump. *J Gen Physiol.* 84(4):643-62, 1984.
- Songu-Mize E, Bealer S. L, Caldwell R. W. Effect of AV3V lesions on development of DOCA-salt hypertension and vascular Na⁺-pump activity. *Hypertension* (5): 575-80, 1982.
- Songu-Mize E, Sevieux N, Liu X, Jacobs M. Effect of short-term cyclic stretch on sodium pump activity in aortic smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 281(5): 2072-2078, 2001.
- Songu-Mize E, Vassallo DV, Rashed SM, Varner KJ. Ouabain amplifies contractile responses to phenylephrine in rat tail arteries in hypertension. *J Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 6 (3-4): 309-19, 1995.
- Spann JF, Buccino RA, Sonnenblick EH, Braunwald E. Contractile state of cardiac muscle obtained from cats with experimentally produced ventricular hypertrophy and heart failure. *Circulation Research* 21: 341-54, 1967.
- Standen NB, Quayle JM. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol. Scand.* 164: 549-557, 1998.
- Stassen FR, Fazzi GE, Leenders PJ, Smits JF, De Mey JG. Coronary arterial hyperreactivity and mesenteric arterial hyporeactivity after myocardial infarction in the rat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 29 (6): 780-788, 1997.
- 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. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 280 (2): 859-67, 2001.
- Stefanon I, Auxiliadora-Martins M, Vassallo DV, Mill JG. Analysis of right and left ventricular performance of the rat heart with chronic myocardial infarction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 27 (11): 2667-79, 1994.
- Stefanon I, Cade JR, Fernandes AA, Ribeiro Junior RF, Targueta GP, Mill JG, Vassallo DV. Ventricular performance and Na⁺-K⁺ATPase activity are reduced early and late after myocardial infarction in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42 (10): 902-11, 2009.
- Stengelin M. K, Hoffman J. F. Na,K-ATPase subunit isoforms in human reticulocytes: evidence from reverse transcription-PCR for the presence of alpha1, alpha3, beta2, beta3,

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

Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *The American Journal of Pathology* 161(5): 1773-81, 2002.

Sutton MGJ, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction; pathophysiology and therapy. *Circulation* 101: 2981-8, 2000.

Sweadner KJ. Two molecular forms of (Na⁺ + K⁺)-stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. *Journal of Biological Chemistry* 254 (13): 6060-7, 1979.

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

Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Iki K, Hatakeyama H, Blair IA, Hsieh FY, Takeda R. Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension* 25: 170–173, 1995.

Takuwa MK, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T, Yamashita K. Endothelin receptor is coupled to phospholipase C via a pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Investigation* 85: 653-8, 1990.

Tammaro P, Smith AL, Hutchings SR, Smirnov SV. Pharmacological evidence for a key role of voltage-gated K⁺ channels in the function of rat aortic smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology* 143 (2): 303-17, 2004.

Tanaka Y, Koike K, Toro L. MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *J Smooth Muscle Res* 40 (4-5): 125-53, 2004.

Tang XD, Garcia ML, Heinemann SH, Hoshi T. Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing. *Nat Struct Mol Biol* 11 (2): 171-8, 2004.

Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42 (6): 1075-81, 2003.

Teerlink JR, Clozel M, Fischli W, Clozel JP. Temporal evolution of endothelial dysfunction in a rat model of chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 22: 615-20, 1993.

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* 89(1): 393-401, 1994.

Terata K, Miura H, Liu Y, Loberiza F, Gutterman DD. Human coronary arteriolar dilation to adrenomedullin: role of nitric oxide and K(+) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279 (6): H2620-6, 2000.

Therien AG, Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 279 (3): 541-66, 2000.

- Therien AG, Goldshleger R, Karlsh SJ, and Blostein R. Tissuespecific distribution and modulatory role of the α subunit of the Na,KATPase *Journal of Biological Chemistry* 272: 32628–34, 1997.
- Therien AG, Karlsh SJ, and Blostein R. Expression and functional role of the α subunit of the Na,K-ATPase in mammalian cells *Journal of Biological Chemistry* 274: 12252–56, 1999.
- Vallance, P, Calver, A, Collier, J. The vascular endothelium in diabetes and hypertension. *Journal of hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension*. 10(1): 25-29, 1992.
- Van Breemen C, Chen Q, Laher I. Superficial buffer barrier function of smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Trends in Pharmacological Sciences* 16: 98–105, 1995.
- Vanhoutte PM, Lorenz RR. Na⁺,K⁺-ATPase inhibitors and the adrenergic neuroeffector interaction in the blood vessel wall. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 6 (1): 88-94, 1984.
- Varin R, Mulder P, Tamion F, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Lerebours G, Thuillez C. Improvement of endothelial function by chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure : role of nitric oxide, prostanoids, oxidant stress, and bradykinin. *Circulation* 102 (3): 351-6, 2000.
- Vassalle M. Contribution of the Na⁺/K⁺-pump to the membrane potential. *Experientia* 43: 1135-40, 1987.
- Vassallo DV, Songu-Mize E, Rossoni L. V, Amaral SM. Effects of ouabain on vascular reactivity. *Brazilian Journal of Medical And Biological Research* 30 (4): 545-52, 1997.
- Vidal B, Roig E, Perez-Villa F, Orus J, Perez J, Jimenez V, Leivas A, Cuppoletti A, Roque M, Sanz G. Prognostic value of cytokines and neurohormones in severe heart failure. *Revista Española de Cardiología* 55 (5): 481-486, 2002.
- Waldron GJ, Cole WC. Activation of vascular smooth muscle K_p channels by endothelium-derived relaxing factors. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 26: 180–184, 1999.
- Wang L, Wu B, Sun Y, Xu T, Zhang X, Zhou M, Jiang W. Translocation of protein Kinase C isoforms is involved in propofol-induced endothelial nitric oxide syntase activation. *British Journal of Anesthesia* 104 (5): 606-612, 2010.
- Webb RC, Bohr DF. Potassium-induced relaxation as an indicator of Na⁺-K⁺ ATPase activity in vascular smooth muscle. *Blood vessels* 15: 198-207, 1978.
- Wellman GC, Quayle JM, Standen NB. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) activates an ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) current in pig coronary vascular smooth muscle cells via a cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA). *The Journal of Physiology* 507: 117–129. 1998.
- Wendt-Gallitelli MF, Voigt T, Isenberg G. Microheterogeneity of subsarcolemmal sodium gradients. Electron probe microanalysis in guinea-pig ventricular myocytes. *The Journal of Physiology* 472: 33–44, 1993.
- Weston AH, Richards GR, Burnham MP, Félétou M, Vanhoutte PM, Edwards G. K⁺-induced hyperpolarization in rat mesenteric artery: identification, localization and role of Na⁺/K⁺-ATPases. *British Journal of Pharmacology*, 136 (6): 918-26, 2002.

- Woo AL, James PF, Lingrel JB. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (27): 20693–99, 2000.
- Xavier FE, Rossoni LV, Alonso MJ, Balfagon 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. *British Journal of Pharmacology* 143 (1): 215-25, 2004a.
- Xavier FE, Yogi A, Callera GE, Tostes RC, Alvarez Y, Salaices M, Alonso MJ, Rossoni LV. Contribution of the endothelin and renin-angiotensin systems to the vascular changes in rats chronically treated with ouabain. *British Journal of Pharmacology* 143 (6): 794-802, 2004b.
- Xie J, Wang Y, Summer WR, Greenberg SS. Ouabain enhances basal release of nitric oxide from carotid artery. *The American Journal of the Medical Sciences* 305 (3): 157-63, 1993.
- Xie Z, Cai T. Na⁺-K⁺-ATPase-Mediated Signal Transduction: From Protein Interaction to Cellular Function. *Molecular Interventions* 3 (3): 157-68, 2003.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension* 6 (4): 188-191, 1988.
- Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419 (6902): 35-42, 2002.
- Yildiz O. Vasodilating mechanisms of levosimendan: involvement of K⁺ channels. *J Pharmacol Sci* 104 (1): 1-5, 2007.
- Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circulation Research* 73 (1): 205-9, 1993.
- Zdanowicz MM. Congestive Heart failure. *American journal of pharmaceutical education* 66: 180-5, 2002.
- Zornoff LAM, Paiva SAR, Duarte DR, Spadaro J. Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction: Concepts and Clinical Implications *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 92 (2):150-156, 2009.
- Zornoff LAM, Paiva SAR, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental Myocardium Infarction in Rats: Analysis of the Model. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 93 (3): 403-408, 2009.