GISELE KRUGER COUTO

**Estudo da Função em
Artérias de Resistência de Ratos
Pós-infarto do Miocárdio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

GISELE KRUGER COUTO

**Estudo da Função em
Artérias de Resistência de Ratos
Pós-infarto do Miocárdio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Couto, Gisele Kruger.

Estudo da função em artérias de resistência de ratos pós-infarto do miocárdio / Gisele Kruger Couto. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Luciana Venturini Rossoni.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Biologia vascular

Versão do título para o inglês: Vascular resistance function in myocardial infarction rats.

Descritores: 1. Artéria coronária 2. Artéria de resistência do músculo esquelético 3. Reatividade vascular 4. Infarto do miocárdio 5. Óxido nítrico I. Rossoni, Luciana Venturini II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB026/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gisele Kruger Couto.

Título da Tese: Estudo da função em artérias de resistência de ratos pós-
infarto do miocárdio.

Orientador(a): Luciana Venturini Rossoni.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **114** nas fls. **51** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Luciana Venturini Rossoni** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Estudo comparativo da função vascular em artérias de resistência dos leitos mesentérico, muscular esquelético e coronariano de ratos em uma fase aguda e crônica pós-infarto do miocárdio**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Gisele Kruger Couto**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa) em **22.11.2007**.

São Paulo, 23 de novembro de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEa - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEa - ICB/USP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Tadeu e Edilene, por acalantar meus sonhos e esperanças em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Washington e Lívia, por compartilharem comigo todos os momentos de alegria e dificuldade.

Ao José Edgar, pelos conselhos, incentivo e amor.

Agradecimento especial.....

*A Profa. Dra. Luciana Venturini
Rossi, pela confiança na minha capacidade;
por fazer-se sempre presente, mesmo estando tão
longe, como durante o seu pós-doutoramento; e
pelos estímulos incondicionais que muito
contribuíram e continuarão contribuindo para a
minha formação científica.*

Avocê, deixo aqui toda a minha gratidão!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Geraldo Mill (Centro de Ciências da Saúde, UFES), pelas discussões na origem deste trabalho, e aos seus alunos, em especial ao Marcelo Baldo, por ter me ensinado a técnica de indução de infarto do miocárdio em ratos.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto (Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP), por me ensinar as técnicas de fluorescência em cortes arteriais e pela atenção durante as análises.

À Profa. Dra. Maria H. Catelli de Carvalho (Departamento de Farmacologia, ICB-USP), por ter se responsabilizado por mim perante à FAPESP durante o pós-doutoramento da Profa. Dra. Luciana V. Rossoni, e à pós-doutoranda do seu laboratório, Graziela Ceravolo, por me ensinar os experimentos de imunohistoquímica e pela amizade.

À minha grande amiga Camilla Wenceslau, por todo apoio nos momentos difíceis, pelas discussões científicas, por estar sempre pronta para ajudar e, é claro, pelos deliciosos cafés!

Aos queridos amigos do Laboratório de Fisiologia Vascular, Ângelo, Rafa, Laís, Ivana, Carol, Cristina, e a turma “importada” do Ceará (Karilane, Neto, Suliana e Dieniffer), que decorrer do meu doutorado demonstraram seu apoio e amizade. Agradecimento especial às minhas amigas Emília Peres e Helane Tito por tornarem a convivência no laboratório tão divertida.

Às minhas amigas Ana Paula Davel, Eliana Akamine e Karla Paresque pelo carinho, apoio e por tornarem a nossa casa tão agradável.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica ICB-USP, em especial aos funcionários do biotério e ao José Maria Rodrigues Júnior (Secretário de pós-graduação do Departamento de Fisiologia e Biofísica ICB-USP), pela ajuda nos assuntos burocráticos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Couto GK. Estudo da função em artérias de resistência de ratos pós-infarto do miocárdio. [Tese (doutorado em ciências)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

Esta tese avaliou a função vascular em artérias de resistência do músculo esquelético (ARME) e coronárias (AC) septais de ratos com disfunção ventricular esquerda leve (LDV) e severa (SDV) pós-infarto do miocárdio (INF). Ratos Wistar foram submetidos à ligadura da AC descendente anterior, para indução do INF, ou à cirurgia fictícia (SHAM). Após 4 semanas, o grupo INF foi subdividido, baseado nas medidas hemodinâmicas, em: INF LDV e INF SDV. Em seguida, as ARME e as AC septais foram montadas em miógrafo de arame. O relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina (ACh) foi reduzido em ARME dos INF SDV e preservado nos INF LDV. Na AC septal dos INF SDV a resposta à ACh foi reduzida; enquanto que esta foi aumentada nos INF LDV. Por sua vez, o doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio, teve seu relaxamento preservado em todas as artérias estudadas. Utilizando-se a sonda DAF-2 em cortes de AC septais, antes e após estimulação com ACh, detectou-se menor produção de óxido nítrico (NO) nos INF SDV; ao passo que nos INF LDV observou-se maior produção de NO. Na AC observou-se aumento das espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs, utilizando-se a dihidroetidina) nos INF SDV e redução destas nos INF LDV. A incubação com os inibidores: L-NAME (inibidor da sintase de NO (NOS)); 7-NI (inibidor seletivo da NOS neuronal (nNOS)); ou LY294002 (inibidor da PI3-quinase); aboliu as diferenças no relaxamento à ACh entre as AC dos INF LDV e SHAM. Detectou-se maior expressão protéica da nNOS, da eNOS (NOS endotelial), e das isoformas da superóxido dismutase (SOD) na AC dos INF LDV em relação ao SHAM. Dessa forma, na AC dos INF SDV observa-se disfunção endotelial caracterizada pela redução da modulação nitrérgica associada ao estresse oxidativo; porém de forma inédita a AC dos INF LDV apresentaram ajustes compensatórios que levaram ao aumento da função endotelial devido à maior modulação nitrérgica, a qual decorreu de maior síntese (ativação da nNOS e da via PI3-quinase/Akt/eNOS) e biodisponibilidade de NO (redução das EROs e aumento da defesa antioxidante mediada pela SOD). Perifericamente, somente observou-se disfunção endotelial na ARME dos INF SDV. Assim, pode-se concluir que a função nas ARME e nas AC é diferentemente modulada na dependência do estado da função cardíaca pós-infarto do miocárdio.

Palavras-chaves: Artéria coronária. Artéria de resistência do músculo esquelético. Reatividade vascular. Infarto do miocárdio. Óxido nítrico.

ABSTRACT

Couto GK. Vascular resistance function in myocardial infarction rats. [PhD thesis (Science)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

This study assessed the reactivity in skeletal muscle resistance arteries (SMRA) and in septal coronary arteries (CA) from rats with slight (sliLVD) and severe (sevLVD) left ventricular dysfunction after myocardial infarction (MI). Male Wistar rats were submitted to CA ligation to produce MI or sham operation (SHAM). After 4 weeks, MI animals were subdivided according to hemodynamic parameters in: MI sliLVD and MI sevLVD. Afterwards, SMRA and the septal CA were mounted on a wire myograph. Acetylcholine (ACh)-induced endothelium-dependent relaxation was reduced in SMRA from MI sevLVD; but it was preserved in MI sliLVD. On the other hand, the relaxation to ACh was reduced in CA from MI sevLVD; while it was increased in MI sliLVD. The nitric oxide (NO) donor, sodium nitroprusside, relaxation was unchanged in all studied arteries. The NO production was analyzed by DAF-2 probe in septal CA before and after ACh stimulation. NO production was decreased in CA from MI sevLVD, while it was increased in MI sliLVD. Reactive oxygen species (ROS; measured by dihydroethidine) was increased in septal CA from MI sevLVD and it was reduced in MI sliLVD. The incubation with: L-NAME (NO synthase (NOS) inhibitor); 7-NI (selective neuronal NOS (nNOS) inhibitor); or LY294002 (PI3-kinase inhibitor); abolished the differences in ACh-induced relaxation between septal AC from SHAM and MI sliLVD. nNOS, eNOS (endothelial NOS), and superoxide dismutase (SOD) isoforms protein expression was greater in CA from MI sliLVD as compared to SHAM. The present results suggest that septal CA from MI sevLVD present endothelium dysfunction characterized by reduced nitrergic modulation associated to oxidative stress.; however, for the first time, the present results show compensatory adjustment as increased nitrergic modulation, due to higher NO synthesis (nNOS and PI3-kinase/Akt/eNOS pathway activation) and bioavailability (reduction in ROS and increase in SOD antioxidant defense), in septal CA from MI sliLVD. Moreover, in the peripheral resistance arteries the endothelium dysfunction only was observed in SMRA from MI sevLVD. In conclusion, SMRA and CA function is differentially modulated on the dependency of the cardiac function after myocardial infarction.

Key words: Coronary artery. Skeletal muscle resistance arteries. Vascular reactivity. Myocardial infarction. Nitric oxide.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Animais experimentais	26
3.2 Obtenção dos modelos experimentais	26
3.3 Medidas hemodinâmicas	27
3.4 Avaliação de hipertrofia cardíaca e da área de infarto	28
3.5 Avaliação de congestão pulmonar e de congestão hepática	28
3.6 Metodologia empregada para estudo de reatividade em artérias coronárias septais e em artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos	29
3.6.1 Normalização das artérias coronárias septais e das artérias de músculo esquelético de ratos	29
3.6.2 Protocolo experimental para artérias coronárias septais e artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos	30
3.6.2.1 <i>Avaliação da resposta de relaxamento dependente e independente do endotélio</i>	<i>30</i>
3.6.2.2 <i>Avaliação da resposta de relaxamento induzido pela estimulação dos receptores β-adrenérgicos e pelo ativador da adenilato ciclase</i>	<i>31</i>
3.6.2.3 <i>Efeito do bloqueio da sintase de óxido nítrico sobre a resposta de relaxamento à acetilcolina e ao isoproterenol e do bloqueio da via de ativação da PI3-quinase sobre a resposta de relaxamento à acetilcolina.....</i>	<i>31</i>
3.6.2.4 <i>Avaliação da resposta vasoconstritora</i>	<i>32</i>
3.7 Medida da produção de NO em secções transversais de artérias coronárias septais de ratos antes e após a estimulação com acetilcolina ou isoproterenol	32
3.8 Estudo da geração de espécies reativas de oxigênio em artérias coronárias septais de ratos	34
3.9 Estudo da expressão protéica em artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV por western blot	35
3.10 Determinação da expressão protéica dos receptores β1-, β2- e β3-adrenérgicos nas artérias coronárias dos animais SHAM e INF LDV por imunohistoquímica	36
3.11 Drogas e diluições	38
3.12 Expressão dos dados e análise estatística	38

4 RESULTADOS	40
4.1 Hemodinâmica arterial e ventricular, índice de hipertrofia ventricular e área de infarto	40
4.2 Avaliações de congestão pulmonar e de congestão hepática	43
4.3 Reatividade nas artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos	44
4.3.1 Diâmetro luminal efetivo e tensão vascular ativa nas artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos.....	44
4.3.2 Respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio nas artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos.....	45
4.3.3 Resposta de relaxamento ao isoproterenol nas artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos.....	47
4.3.4 Resposta de contração à noradrenalina em artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos.....	48
4.4 Reatividade nas artérias coronárias septais de ratos.....	50
4.4.1 Diâmetro luminal efetivo e tensão vascular ativa nas artérias coronárias septais de ratos.....	50
4.4.2 Respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio nas artérias coronárias septais de ratos.....	51
4.4.3 Efeito do bloqueio da sintase de óxido nítrico e da via da PI3-quinase sobre a resposta de relaxamento à acetilcolina em artérias coronárias septais de ratos.....	53
4.4.4 Resposta de relaxamento ao isoproterenol nas artérias coronárias septais de ratos.....	56
4.4.5 Efeito do bloqueio da sintase de óxido nítrico sobre a resposta de relaxamento ao isoproterenol em artérias coronárias septais de ratos.....	58
4.4.6 Resposta de contração à serotonina em artérias coronárias septais de ratos.....	59
4.5 Medida da produção de NO em artérias coronárias septais de ratos.....	62
4.6 Avaliação das espécies reativas derivadas do oxigênio nas artérias coronárias septais de ratos.....	65
4.7 Expressão protéica da eNOS, nNOS, Akt1/2/3, AMPKα1/2 e das isoformas da SOD em artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV.....	67
4.8 Localização e quantificação da expressão protéica dos subtipos de receptores β-adrenérgicos nas artérias coronárias dos animais SHAM e INF LDV.....	70
4.9 Sumário dos resultados.....	72

5 DISCUSSÃO.....	73
6 CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

A principal função do sistema cardiovascular é fornecer fluxo sanguíneo para os tecidos de modo a atender as necessidades metabólicas dos mesmos (Opie, 2004a). As pequenas artérias e arteríolas constituem o local do sistema circulatório de maior resistência periférica imposta ao fluxo sanguíneo e, esta maior resistência, em parte, é atribuída ao pequeno diâmetro destas artérias (Mulvany, Aalkjaer, 1990; Opie, 2004a). Esta resistência pode ser alterada, constantemente, pelo tônus do músculo liso vascular, que equivale ao balanço momentâneo entre as forças que induzem vasodilatação e vasoconstrição (Mulvany, Aalkjaer, 1990; Opie, 2004a). Assim, por meio de alterações dinâmicas do tônus do músculo liso vascular, as artérias coronárias e as artérias de resistência da musculatura esquelética ajustam, constantemente, o fluxo sanguíneo direcionado para as musculaturas cardíaca e esquelética, respectivamente.

Vários são os fatores capazes de controlar o tônus vascular e, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo para determinado território. Dentre estes fatores, destacam-se: o tônus miogênico; o controle metabólico; os fatores neurohumorais e o endotélio vascular (Delp, Laughlin, 1998; Feliciano, Henning, 1999; Komaru et al., 2000; Segal, 2005). O endotélio é capaz de regular o tônus da célula de músculo liso vascular por meio da liberação de substâncias vasodilatadoras (EDRF), como óxido nítrico (NO); prostaciclina; e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), e de substâncias vasoconstritoras (EDCF), como endotelina-1; prostaglandinas; angiotensina II; e espécies reativas derivadas do oxigênio (Vanhoutte, 1996; Gryglewski, 2005; Vanhoutte et al., 2009). Portanto, o endotélio contribui para a manutenção da homeostase circulatória por meio de um equilíbrio na liberação de EDRF e EDCF e, qualquer mudança neste equilíbrio, resulta em um processo conhecido como disfunção endotelial (Vanhoutte, 1996; Gryglewski, 2005; Vanhoutte et al., 2009; Davel et al., 2011).

Entre os fatores endoteliais derivados do endotélio, destaca-se o NO, o qual tem um papel crucial na regulação do tônus vascular (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987; Marín, Rodrigues-Martínez, 1995; Vanhoutte, 1996; Vanhoutte et al., 2009). O NO é gerado pela sintase de óxido nítrico (NOS), a qual catalisa a

conversão do aminoácido L-arginina e o oxigênio molecular em NO e L-citrulina (Palmer et al., 1988; Marín, Rodríguez-Martínez, 1995; Alderton et al., 2001; Chatterjee et al., 2008; Fleming 2010; Förstermann, Sessa, 2011). Até o momento, foram descritos na parede vascular 3 isoformas da NOS: sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS ou NOS I); sintase de óxido nítrico induzível (iNOS ou NOS II) e a sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS ou NOS III) (Marín, Rodríguez-Martínez, 1995; Alderton et al., 2001; Chatterjee et al., 2008; Fleming 2010; Förstermann, Sessa, 2011). A nNOS e a eNOS são expressas constitutivamente e a ativação destas enzimas, basicamente, é dependente de Ca^{2+} / calmodulina, assim como por fosforilação dos sítios de ativação (Marín, Rodríguez-Martínez, 1995; Alderton et al., 2001; Chatterjee et al., 2008; Fleming 2010; Förstermann, Sessa, 2011). Já a iNOS, geralmente, não é constitutivamente expressa nas células, no entanto a expressão desta enzima pode ser induzida por citocinas, endotoxinas, lipopolissacarídeos bacterianos e outros agentes. Depois de expressa, a iNOS é constantemente ativa, independente da concentração de cálcio intracelular (Marín, Rodríguez-Martínez, 1995; Alderton et al., 2001; Chatterjee et al., 2008; Fleming 2010; Förstermann, Sessa, 2011).

Em condições fisiológicas, a isoforma com maior atividade funcional nos vasos sanguíneos é a eNOS, a qual é principalmente expressa nas células endoteliais (Fleming 2010; Förstermann, Sessa, 2011); embora alguns trabalhos também atribuam o papel fisiológico da nNOS no controle do tônus vascular (Chen, Popel 2007; Seddon et al., 2009; Capettini et al., 2010). Conforme mencionado acima, com o aumento da concentração de cálcio intracelular, a atividade da eNOS aumenta. Desta forma, a tensão de cisalhamento, hormônios, peptídeos e/ ou neuro-hormônios ligando-se a receptores específicos na membrana da célula endotelial, induzem aumento da concentração de cálcio intracelular, sendo, portanto, capazes de ativar a eNOS e aumentar a produção de NO (Palmer et al., 1988; Marín, Rodríguez-Martínez, 1995; Vanhoutte et al., 2009; Förstermann 2010; Michel, Vanhoutte, 2010).

Estes mesmos estímulos mecânicos e/ou hormonais, nas células endoteliais, também podem regular a atividade da eNOS via fosforilação de resíduos de serina (Ser), treonina (Thr) e tirosina (Tyr) (Chen et al., 1999; Dimmeler et al., 1999; Fulton

et al., 1999; Gallis et al., 1999; Boo et al., 2002; Michell et al., 2001, 2002; Fleming et al., 2001; 2010; Föstermann 2010), tal como demonstrado na figura 1.

Figura 1 - Regulação da eNOS por fosforilação.

Representação esquemática dos sítios de fosforilação da eNOS, assim como as consequências da ativação destes sítios na atividade da eNOS. Setas verdes representam ativação da eNOS; setas vermelhas representam inibição da eNOS; setas cinzas representam nenhum efeito direto sobre a atividade da eNOS. Os números referem-se à sequência humana.

Fonte: modificado de Fleming, 2010.

Existem numerosos sítios de fosforilação da eNOS (figura 1), no entanto, dentre estes sítios, as consequências funcionais da fosforilação dos resíduos de Ser1177 e Thr495 são as mais conhecidas (Chen et al., 1999; Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999; Gallis et al., 1999; Fleming et al., 2001; Michell et al., 2001; Fleming 2010; Föstermann 2010). A fosforilação em Ser1177 aumenta a atividade da eNOS, aumentando, assim, a produção de NO (Chen et al., 1999; Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999; Gallis et al., 1999; Michell et al., 2001; Fleming 2010; Föstermann 2010). Após estímulo mecânico e/ou hormonal nas células endoteliais, várias proteínas quinases estão envolvidas na fosforilação da eNOS em Ser1177, tais como proteína quinase B/ Akt; proteína quinase ativada por AMP (AMPK); proteína quinase A (PKA); e proteína quinase dependente de Ca²⁺/ calmodulina II (CaMKII) (Chen et al., 1999; Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999; Gallis et al.,

1999; Michell et al., 2001; Fleming 2010; Föstermann 2010). Por outro lado, a fosforilação no resíduo Thr495 da eNOS diminui a atividade desta enzima. Este resíduo de Thr495 está fosforilado na ausência de estímulo, provavelmente via proteína quinase C (PKC) (Fleming et al., 2001; Michell et al., 2001; Fleming 2010; Föstermann 2010).

Depois de sintetizado nas células endoteliais, o NO se difunde para as células de músculo liso vascular e induz relaxamento nestas células (Rapoport, Murad, 1983; Marín, Rodrigues-Martízes, 1995; Lincoln et al., 2001; Vanhoutte et al., 2009). A principal ação do NO, nas células de músculo liso vascular, ocorre via ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs), com consequente aumento da concentração intracelular de GMP cíclico (GMPc) (Rapoport, Murad, 1983; Marín, Rodrigues-Martízes, 1995; Lincoln et al., 2001; Vanhoutte et al., 2009). O GMPc, por sua vez, promove redução da concentração intracelular de cálcio, tanto por recapturar cálcio para o retículo sarcoplasmático como via extrusão de cálcio para o meio extracelular (Cornwell et al., 1991; Furukawa et al., 1991; Rembold, 1992; Marín, Rodrigues-Martízes, 1995; Lincoln et al., 2001). Além disso, o GMPc diminui o influxo de cálcio por reduzir a probabilidade de abertura dos canais para cálcio na membrana do músculo liso vascular, assim como reduz a afinidade de proteínas contráteis ao cálcio (Tare et al., 1990; McDaniel et al., 1992; Rembold, 1992; Lincoln et al., 2001). Por outro lado, o NO, via ação direta ou via ativação de GMPc, também é capaz de induzir hiperpolarização do músculo liso vascular, tanto por aumentar a probabilidade de abertura de canais para potássio sensível ao cálcio, como por ativar a Na^+/K^+ ATPase (Tare et al., 1990; Bolotina et al., 1994; Gupta et al., 1994; Lincoln et al., 2001).

Além da importante ação vasodilatadora, o NO previne a adesão e agregação plaquetária; inibe a adesão e migração de leucócitos; inibe a proliferação das células de músculo liso vascular; limita a oxidação do LDL; estimula a angiogênese; e diminui a expressão de genes pró-inflamatórios, os quais estão aumentados na aterosclerose (Marín, Rodrigues-Martízes, 1995; Moncada, Higgs, 2006; Vanhoutte et al., 2009; Michel, Vanhoutte, 2010). Sendo assim, o NO endotelial é fisiologicamente importante na manutenção da homeostase vascular.

Pesquisas realizadas demonstram a presença de disfunção endotelial, caracterizada por redução da modulação nitrérgica, em artérias de pacientes com doenças cardiovasculares, tais como hipertensão; diabetes; infarto do miocárdio; e insuficiência cardíaca (Kubo et al., 1991; Panza et al., 1993; Cosentino, Lüscher, 1998; Guazzi et al., 2009; Vanhoutte et al., 2009; Davel et al., 2011).

No Brasil, a taxa de mortalidade devido às doenças do sistema cardiovascular corresponde a 30% da mortalidade geral e, dentre as doenças cardiovasculares, o infarto do miocárdio é responsável por 24% da mortalidade (Sistema de informação de mortalidade, DATASUS do Ministério da Saúde, 2008). De acordo com o estudo “*Heart Disease and Stroke Statistics-2010 update*” realizado nos Estados Unidos e coordenado pela *American Heart Association*, 33% dos homens e 43% das mulheres, com idade acima de 40 anos e que sobreviveram após um infarto do miocárdio, irão morrer dentro de 5 anos. Além disso, também foi estimado que 7% dos homens e 12% das mulheres desenvolverão sinais e sintomas de insuficiência cardíaca.

O infarto do miocárdio ocorre quando uma isquemia prolongada leva a um dano irreversível na célula miocárdica com consequente necrose (Opie, 2004b; Antman, Braunwald, 2005; Amin, 2006; Gheorghiade, Forarow, 2007; White, Chew, 2008). Na maioria dos casos, o infarto do miocárdio é resultante de processo aterosclerótico (Burke et al., 1997; Opie, 2004b; Antman, Braunwald, 2005; Amin, 2006; White, Chew 2008); porém, também pode ser decorrente de outros processos patológicos não-aterogênicos que acometem as artérias coronárias e resultam em infarto, tais como a arterite e a trombose coronariana; oclusão coronariana por êmbolo; anomalias congênitas da artéria coronária; espasmo coronariano; além de causas hematológicas como trombocitose; coagulação intravascular disseminada; hipercoagulabilidade; complicações do cateterismo cardíaco; e o abuso de cocaína (Tun, Khan, 2001; Opie 2004b; Antman, Braunwald, 2005; White, Chew 2008).

Após a oclusão da artéria coronária, os miócitos supridos por esta artéria imediatamente perdem a capacidade contrátil, podendo apresentar áreas de dissincronismo, hipocinesia, acinesia e discinesia (Opie, 2004b; Antman, Braunwald, 2005). Já o miocárdio não-infartado apresenta uma hipercinesia como resultado de mecanismos agudos de compensação, tais como ativação do sistema nervoso

simpático e do mecanismo de Frank-Starling (McAlpine et al., 1988; Cleland et al., 1996; Schrier, Abraham, 1999; Francis et al., 2001; Gaballa, Goldman, 2002; Opie, 2004b; Antman, Braunwald, 2005; Babick, Dhalla, 2007). Além do mais, em decorrência do infarto do miocárdio, também se observa remodelamento cardíaco caracterizado por hipertrofia do miocárdio não-infartado (Cleland et al., 1996; Opie, 2004b; Antman, Braunwald, 2005; Babick, Dhalla, 2007). No entanto, estes mecanismos de compensação possuem uma finita capacidade de sustentar a função cardíaca e, se o miocárdio remanescente não sustentar a hemodinâmica dentro de limites normais, os pacientes podem desenvolver insuficiência cardíaca (Opie, 2004b; Antman, Braunwald, 2005; Babick, Dhalla, 2007).

O prognóstico de pacientes infartados depende de diversos fatores, dentre estes, pode-se citar a presença de circulação coronariana colateral e o tamanho da área infartada, assim como da presença de fatores de risco, tais como, envelhecimento, hipertensão arterial e diabetes (Amir et al., 2006; White, Chew, 2008; Guazzi et al., 2009). Além disso, a presença de disfunção endotelial também pode ser considerada um importante fator envolvido no agravamento do prognóstico após o infarto do miocárdio (Amir et al., 2006; Guazzi et al., 2009). Neste sentido, foi observado que, após o infarto do miocárdio, alguns pacientes apresentavam disfunção endotelial, caracterizada pela redução da dilatação mediada pelo fluxo na artéria braquial; enquanto que, em outros pacientes infartados, este relaxamento era preservado (Amir et al., 2006; Guazzi et al., 2009). Nestes trabalhos, a presença de disfunção endotelial nos pacientes infartados estava associada a um pior prognóstico, como infarto do miocárdio recorrente e insuficiência cardíaca (Amir et al., 2006; Guazzi et al., 2009). Baseados em tais fatos expostos acima, torna-se de fundamental importância o melhor entendimento dos ajustes da função vascular e os possíveis mecanismos envolvidos nas alterações vasculares observadas após o infarto do miocárdio.

Experimentalmente, as repercussões cardíacas e vasculares decorrentes do infarto do miocárdio podem ser estudadas no modelo de oclusão cirúrgica permanente de ramos da artéria coronária em ratos (Pfeffer et al., 1979; Mill et al., 1990; Francis et al., 2001; Gaballa, Goldman, 2002; dos Santos et al., 2010). Pfeffer e colaboradores (1979) foram os primeiros pesquisadores a caracterizar a função

cardíaca neste modelo experimental. Estes pesquisadores observaram que o desempenho cardíaco após o infarto do miocárdio em ratos está na dependência do tamanho da área de infartada, e somente os animais com grandes áreas de infarto (45-59% da circunferência do ventrículo esquerdo) apresentaram hipertrofia ventricular direita; aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; e redução do débito cardíaco, características estas presentes na insuficiência cardíaca. Um aspecto importante deste modelo experimental é que quaisquer que sejam as disfunções que surjam após o infarto, elas serão sempre reflexo da oclusão aguda da artéria coronariana, sem qualquer interferência de outros fatores de risco associados, como aterosclerose, hipercolesterolemia, diabetes ou hipertensão arterial.

Neste modelo experimental, a maioria dos estudos avalia a função vascular após a instalação da insuficiência cardíaca e, nestes trabalhos, o que se observa é a presença de disfunção endotelial, caracterizada por redução da modulação nitrérgica, em vasos de condutância, como a aorta (Teerlink et al., 1993; Bauersaches et al., 1999; 2001; 2002; Indik et al., 2001; Gschwend et al., 2003; Schäfer et al., 2003; 2004; Thai et al., 2007; Fraccarollo et al., 2008). Esta redução da modulação nitrérgica está associada à menor síntese de NO, em decorrência da redução da expressão e/ou atividade da eNOS (Schäfer et al., 2004; Fraccarollo et al., 2008). Além disso, pesquisas realizadas demonstram que, neste mesmo modelo experimental, a redução da modulação nitrérgica também pode ser decorrente de redução da biodisponibilidade do NO, devido ao aumento da produção e/ ou menor degradação de espécies reativas derivadas do oxigênio, principalmente o ânion superóxido (Bauersaches et al., 1999; 2001; 2002; Indik et al., 2001; Schäfer et al., 2004; Fraccarollo et al., 2008).

O ânion superóxido reage rapidamente com o NO levando a formação de um potente oxidante, o peróxido nitrito, e, deste modo, reduz a biodisponibilidade do NO (Rubany, Vanhoutte, 1986; Beckman et al., 1990; Padmaja, Huie, 1993; Marín, Rodrigues-Martízes, 1995; Thomas et al., 2008; Föstermann 2010). Várias enzimas são capazes de liberar elétrons, os quais podem reduzir o oxigênio molecular, levando a formação do ânion superóxido, tais como: NAD(P)H oxidase; xantina oxidase; enzimas da cadeia respiratória da mitocôndria; e eNOS desacoplada

(Thomas et al., 2008; Förstermann 2010). Por outro lado, a inativação dos radicais livres é feita por sistemas enzimáticos eficientes, tais como: glutathione peroxidase; catalase; e superóxido dismutase (SOD) (Thomas et al., 2008; Förstermann 2010; Fukai, Ushio-Fukai et al., 2011). Dentre estas enzimas antioxidantes, a SOD tem um papel crucial na defesa antioxidante, uma vez que esta enzima cataliza a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, sendo assim, o maior sistema de defesa antioxidante contra o ânion superóxido (Thomas et al., 2008; Förstermann, 2010; Fukai, Ushio-Fukai et al., 2011). A SOD consiste em 3 isoformas: 1) Cu/Zn-SOD ou SOD-1, a qual está presente no citosol; 2) Mn-SOD ou SOD-2, a qual está presente nas mitocôndrias; e 3) SOD extracelular (EC-SOD) ou SOD-3 (Thomas et al., 2008; Förstermann, 2010; Fukai, Ushio-Fukai et al., 2011).

Na aorta de ratos infartados por oclusão permanente da artéria coronária, há relatos de que o aumento da geração de ânion superóxido é proveniente da NAD(P)H oxidase (Bauersachs et al., 1999; 2002) e/ ou devido à redução da defesa antioxidante, por exemplo, por redução da atividade da SOD (Indik et al., 2001).

Um fato interessante é que a presença de disfunção endotelial na aorta de ratos infartados parece depender do tempo após o infarto do miocárdio (Teerlink et al., 1993). Neste sentido, Teerlink e colaboradores (1993) observaram que, após 1 semana do infarto, os anéis de aorta não demonstraram evidências de disfunção endotelial, apesar dos animais já apresentarem hemodinâmica ventricular comprometida; entretanto progressiva disfunção endotelial foi observada após 4 e 16 semanas de infarto quando comparado aos ratos controle (Teerlink et al., 1993). Estes pesquisadores concluíram que a disfunção endotelial é um processo progressivo e dependente do tempo, apresentando menor papel em estágios iniciais após o infarto e que, na aorta, a disfunção endotelial não é resultado direto de disfunção na hemodinâmica ventricular (Teerlink et al., 1993).

Por outro lado, existem relatos na literatura de que, após o infarto do miocárdio em ratos, as artérias apresentam ajustes vasculares diferentes na dependência da área de infarto, assim como do estado da função cardíaca pós-infarto (Thomas et al., 1998; Gschwend et al., 2003; Pereira et al., 2005).

Gschwend e colaboradores (2003) demonstraram que a disfunção endotelial na aorta de ratos infartados somente esteve presente nos animais com grandes

áreas de infarto e, portanto, com sinais de falência cardíaca. Ao passo que, na aorta dos animais com pequenas áreas de infarto e com hemodinâmica ventricular similar aos controles, o relaxamento dependente do endotélio estava aumentado quando comparado às artérias dos animais controles (Gschwend et al., 2003). Este trabalho sugere que a presença de disfunção endotelial na aorta de ratos infartados está na dependência da área de infarto e, portanto, da severidade da doença após o infarto do miocárdio.

Além disso, Pereira e colaboradores (2005) observaram que função no leito arterial caudal de ratos estava diferentemente modulada nos animais infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca e, portanto, com diferentes estágios de disfunção ventricular pós-infarto. Neste trabalho, estes pesquisadores demonstraram que, 4 semanas após o infarto do miocárdio em ratos, alguns animais apresentavam sinais de insuficiência cardíaca enquanto que outros não, apesar de apresentarem a mesma área de infarto (Pereira et al., 2005). Estes autores, por sua vez, observaram a presença de disfunção endotelial somente no leito arterial caudal de ratos infartados sem sinais de insuficiência cardíaca (Pereira et al., 2005). Já no leito caudal dos animais infartados com sinais de insuficiência cardíaca, a modulação endotelial estava aumentada, o que sugere a possível presença de mecanismos compensatórios para a redução do débito cardíaco e da perfusão tecidual na insuficiência cardíaca (Pereira et al., 2005). A presença de disfunção endotelial em animais infartados, sem sinais de insuficiência cardíaca, também foi observada em artérias do músculo esquelético de ratos infartados, com pequenas e médias áreas de infarto (Thomas et al., 1998).

Baseado no exposto acima, conclui-se que a função vascular pode estar diferentemente modulada de acordo com o tempo, a área de infarto e a severidade da doença após o infarto do miocárdio. No entanto, ainda há muito a ser esclarecido sobre as repercussões vasculares pós-infarto e as possíveis implicações destas alterações no desenvolvimento e/ou manutenção da falência cardíaca após o infarto do miocárdio.

Dentre os vasos sanguíneos, o estudo das alterações funcionais em artérias de resistência após o infarto do miocárdio é imprescindível, uma vez que estas artérias são responsáveis pelo controle do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente,

pela redistribuição do débito cardíaco, o qual pode estar reduzido após o infarto do miocárdio. No entanto, diferente do observado na aorta de ratos infartados, ainda não é consenso na literatura a presença de disfunção endotelial em vasos de resistência após o infarto do miocárdio. Neste sentido, tem-se demonstrado que o relaxamento dependente do endotélio pode estar reduzido (Thuillez et al., 1995; Mulder et al., 1995; 1996; Didion, Mayham, 1997; Gaballa, Goldman, 1999; Varin et al., 1999; 2000; Wang et al., 2010) ou inalterado (Baggia et al., 1997; Prior et al., 1998; Trautner et al., 2006; Xu et al., 2007) em artérias de resistência do leito mesentérico e muscular esquelético. Essa discrepância de relatos da literatura pode ser devido às distintas fases da disfunção cardíaca pós-infarto do miocárdio em ratos.

Em meio às artérias de resistência, o estudo da função vascular em artérias de resistência da musculatura esquelética após o infarto do miocárdio merece atenção, pois um aumento do tônus destas artérias poderia contribuir para o aumento da resistência periférica total e, assim, aumentar a pós-carga contra a qual o coração, previamente prejudicado em decorrência do infarto, terá que ejetar sangue. Além disso, já é bem descrito que os pacientes com insuficiência cardíaca apresentam fadiga muscular esquelética nos membros, a qual é mais claramente demonstrada em resposta ao aumento dos níveis de esforço, como durante uma atividade física. Esta fadiga, em parte, é atribuída à redução do fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética durante o exercício (Wilson et al., 1984; Minotti et al., 1991; Duscha et al., 2008; Negrão, Middlekauff, 2008). Sendo assim, um aumento no tônus das artérias que irrigam a musculatura esquelética pode prejudicar o fluxo para a região esquelética agravando a fadiga muscular observada após a falência cardíaca.

Até o presente momento, existe um número limitado de trabalhos que avaliam a função endotelial em arteríolas do leito muscular esquelético de ratos infartados após oclusão permanente da artéria coronária e, nestes trabalhos, foi observado que o relaxamento dependente do endotélio está reduzido (Mulder et al., 1996; Didion, Mayham, 1997; Gaballa, Goldman, 1999; Varin et al., 1999; 2000).

Além das artérias de resistência do leito muscular esquelético, o estudo das artérias coronárias após o infarto do miocárdio também merece atenção, uma vez

que estas artérias são as responsáveis pela nutrição dos miócitos não-infartados, os quais se encontram hipertrofiados após o infarto. Deste modo, o aumento no tônus das artérias coronárias que irrigam os miócitos não-infartados poderia contribuir para a redução do fluxo sanguíneo coronariano e, conseqüentemente, reduzir a demanda de nutrientes para o miocárdio, o que poderia agravar o estado contrátil dos miócitos remanescentes e, portanto, agravar, ainda mais, o desempenho cardíaco após o infarto do miocárdio.

Atualmente os relatos sobre a função coronariana após o infarto do miocárdio em ratos ainda são escassos e imprecisos (Berges et al., 2005; Ueda et al., 2005). Segundo Ueda e colaboradores (2005), o relaxamento mediado pelo fluxo nas artérias coronárias não está alterado; porém, estes autores observaram que, enquanto no animal controle este relaxamento era principalmente mediado pelo NO, nos animais infartados este relaxamento era principalmente mediado pelo EDHF. Estes resultados sugerem que, em arteríolas coronárias de ratos com infarto do miocárdio, o EDHF pode compensar a perda de NO mediando o relaxamento quando estimulado via estresse de cisalhamento (Ueda et al., 2005). Já Berges e colaboradores (2005), através da perfusão do coração pela técnica de Langerdoff, descreveram a presença de disfunção endotelial nas artérias coronárias de ratos, uma semana após o infarto do miocárdio.

Com base no exposto acima, pode-se inferir que ainda há muito a ser esclarecido sobre as repercussões vasculares pós-infarto, principalmente em artérias de resistência do leio muscular esquelético e coronariano, e as possíveis implicações destas alterações vasculares no desenvolvimento e/ ou manutenção da falência cardíaca pós-infarto do miocárdio.

Sabendo que, após o infarto do miocárdio em ratos induzido por oclusão da artéria coronária, observam-se animais com disfunção ventricular em distintos graus de severidade, a hipótese da presente tese é que a função vascular nas artérias de resistência do leito muscular esquelético e coronariano está diferentemente alterada na dependência da severidade da doença após o infarto do miocárdio.

2 OBJETIVO

A presente tese tem como **objetivo geral** avaliar a função vascular em artérias de resistência do leito muscular esquelético e em artérias coronárias septais de ratos com disfunção ventricular esquerda leve e severa após o infarto do miocárdio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar com idade entre 2 e 3 meses, pesando 280 ± 20 g, provenientes do biotério de criação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/ USP, os quais foram mantidos no biotério de manutenção do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/ USP, em gaiolas, sob condições controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à alimentação.

Os presentes protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (Protocolo registrado sob nº 114 nas fls. 51 do livro 2).

3.2 Obtenção dos modelos experimentais

Para a indução do infarto, os ratos foram anestesiados com solução contendo quetamina e xilazina (50 e 10 mg/ Kg, respectivamente; *i.p.*). Em seguida, foi feita toracotomia do lado esquerdo, entre o terceiro e quarto espaço intercostal. O músculo peitoral foi separado e as costelas expostas. O coração foi gentilmente exteriorizado e a artéria coronariana descendente anterior foi ligada, aproximadamente, a 3 mm distal à sua origem através do uso do fio mononylon 6.0 (Pfeffer et al., 1979). Por meio de tal procedimento, obtiveram-se infartos transmuralis, caracterizados por necrose isquêmica envolvendo toda, ou quase toda, a espessura da parede ventricular na distribuição de uma única artéria coronária (Antman, Braunwald, 2005). Posteriormente, o coração foi recolocado no lugar de origem e o tórax foi rapidamente fechado. O grupo sham passou pelas mesmas etapas descritas acima, com exceção da ligadura da artéria coronariana.

Quatro semanas após a cirurgia, os ratos foram divididos em 3 grupos. Baseado no procedimento cirúrgico, os animais foram classificados em grupo sham (SHAM) ou grupo infarto (INF), e, de acordo com as medidas hemodinâmicas, o grupo INF foi classificado em grupo INF com leve disfunção ventricular esquerda (INF LDV) e grupo INF com severa disfunção ventricular esquerda (INF SDV). Os

animais foram classificados no grupo INF SDV quando apresentaram pressão diastólica final do ventrículo esquerdo superior ou igual a 20 mmHg; derivada de pressão pelo tempo positiva ($dP/dt +$) inferior ou igual a 5000 mmHg/ s e derivada de pressão pelo tempo negativa ($dP/dt -$) superior ou igual a -4000 mmHg/ s.

3.3 Medidas hemodinâmicas

Os animais foram anestesiados com uretana (1,6 mg/ Kg; *i.p.*) e submetidos à canulação da artéria carótida direita para realização das medidas hemodinâmicas do ventrículo esquerdo. Para tal, foi utilizado cateter de polietileno (PE-50) preenchido com solução salina heparinizada a temperatura ambiente (100U/ mL), o qual, após canulação da artéria, foi conectado ao transdutor de pressão (TRA 021, PanLab, Espanha), ligado, por sua vez, ao amplificador (ML224 Quad Bridge Amp, ADInstruments, New South Wales, Austrália), o qual estava acoplado ao sistema de aquisição de dados digital (PowerLab, ADInstruments, New South Wales, Austrália) para aquisição dos registros hemodinâmicos. A frequência de amostragem utilizada para aquisição dos registros foi de 1K/ s.

A frequência cardíaca (FC) foi calculada a partir do registro da pressão arterial pulsátil. Os valores de pressão sistólica e diastólica final do ventrículo esquerdo, assim como a $dP/dt +$ e $dP/dt -$ foram coletados após estabilização do cateter dentro do ventrículo esquerdo. A análise destes parâmetros foi realizada utilizando um programa para análise de medidas hemodinâmicas (Blood Pressure Module, Chart 5 for Windons, ADInstruments, New South Wales, Austrália).

Após as medidas hemodinâmicas, os animais foram mortos e o coração retirado para remoção e isolamento da artéria coronária septal. Além disso, as artérias de resistência do leito muscular esquelético foram isoladas da pata traseira. Os pulmões e o fígado também foram retirados para avaliação de congestão pulmonar e hepática, respectivamente.

3.4 Avaliação de hipertrofia cardíaca e da área de infarto

Os índices de hipertrofia dos ventrículos direito e esquerdo foram inferidos a partir da razão entre os pesos úmidos dos respectivos ventrículos sobre o comprimento da tibia. Assim, após a retirada do coração da cavidade torácica, o mesmo foi lavado em solução de Krebs-Henseleit. Em seguida, os átrios foram separados dos ventrículos e a parede livre do ventrículo direito foi separada do ventrículo esquerdo e do septo interventricular. Os ventrículos foram pesados na balança analítica (BEL Equipamentos Analíticos Ltda., São Paulo, Brasil) para posteriormente calcular o índice de hipertrofia cardíaca. Cabe ressaltar que, o valor do peso do septo interventricular foi adicionado ao valor do ventrículo esquerdo.

Após o isolamento da artéria coronária septal e a avaliação da hipertrofia cardíaca, foi feita a quantificação da área de infarto. Para tal, a área infartada do ventrículo esquerdo foi separada do restante do coração e, posteriormente, ambas as fatias foram escaneadas e quantificadas utilizando o programa *Image J 1,4g* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). A área de infarto foi expressa como porcentagem da área total do ventrículo esquerdo e septo interventricular (Mill et al., 1990). Os corações com área de infarto inferior a 20% ou superior a 50% foram descartados da presente tese.

3.5 Avaliação de congestão pulmonar e de congestão hepática

Uma das características clínicas que marca a insuficiência cardíaca congestiva é a retenção de líquidos no pulmão e no fígado (Givertz et al., 2005). Na presente tese, a presença de congestão pulmonar e hepática foi inferida pelo teor de água (% água) presente nestes órgãos (Flumignan et al., 2006).

Para tal, após o sacrifício dos animais, o pulmão e o fígado foram coletados, lavados em salina e pesados em balança analítica (BEL Equipamentos Analíticos Ltda, São Paulo, Brasil). Este valor corresponde ao peso úmido (PU) do órgão. Em seguida, estes órgãos foram colocados em estufa (modelo EL 1,0, Marte, São Paulo, Brasil) a 50 °C por 48 horas. Posteriormente, estes órgãos foram novamente pesados para obtenção do peso seco (PS). Cabe ressaltar que, após as 48 horas,

estes tecidos eram novamente pesados, diariamente, até que não houvesse variação nos valores do peso seco. De posse dos valores de PU e PS, foi possível calcular o teor de água (% água) presente nestes órgãos, utilizando a seguinte fórmula (Flumignan et al., 2006):

$$\% \text{ água: } [(PU - PS)/PU] \times 100$$

3.6 Metodologia empregada para estudo de reatividade em artérias coronárias septais e em artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos

Para o estudo da reatividade nas artérias propostas na presente tese, foi utilizado o método descrito inicialmente por Mulvany e Halpern (1977). Primeiramente, a artéria coronária localizada no septo interventricular (Lynch et al., 2006) e os terceiros ramos da artéria femoral (Sun et al., 1994; Trautner et al., 2006) foram dissecados e isolados com auxílio de lupa (Nikon SMZ 645, Melville, New York, EUA). Após estarem livres do tecido conectivo, os mesmos foram colocados em uma placa de petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4° C (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂.2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; EDTA 0,01 e glicose 11). Posteriormente, as artérias foram cortadas em segmentos de 1,5 - 2,0 mm de comprimento com o auxílio de lupa. Dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias e montados em miógrafo para estudos de tensão isométrica (Danish Myo Tech, Modelo 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca). Este miógrafo, por sua vez, estava conectado ao sistema para aquisição de dados (PowerLab/ 8SP, ADInstruments, Austrália) e este, ao computador (PC Pentium).

3.6.1 Normalização das artérias coronárias septais e das artérias de músculo esquelético de ratos

Após um período de estabilização de 15 minutos em solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4, a 37° C), as artérias foram estiradas a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial a relação tensão: diâmetro interno foi calculada e foi determinada

a circunferência interna correspondente a uma pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado *in situ* (L_{100}) (Mulvany, Halpern, 1977). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna L_1 , calculada por meio da fórmula $L_1 = 0,90 \times L_{100}$, na qual o desenvolvimento de força é máximo, como previamente descrito por Mulvany e Halpern (1977). O diâmetro luminal efetivo (l_1) foi determinado de acordo com a equação $l_1 = L_1/\pi$, utilizando o programa específico para normalização de artérias de resistência (DMT Normalization Module, ADInstruments, Austrália).

Depois do processo de normalização, foram aguardados 30 minutos e, em seguida, as artérias foram contraídas com cloreto de potássio (KCl, 120 mM), para avaliação da integridade funcional das mesmas. A administração de KCl repetiu-se por mais duas vezes, com intervalo de 15 minutos entre cada administração, até alcançar uma estabilidade na resposta de despolarização do músculo liso ao KCl.

Em ambas as artérias, a média dos dois últimos valores de contração mediado por 120 mM de KCl foi utilizado para avaliar a integridade da maquinaria contrátil. Cabe ressaltar que as artérias, cujas contrações ao KCl foram menores do que 1 mN/mm, foram excluídas dos estudos de reatividade vascular.

3.6.2 Protocolo experimental para artérias coronárias septais e artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos

3.6.2.1 Avaliação da resposta de relaxamento dependente e independente do endotélio

Após 30 minutos da última contração induzida pelo KCl (120 mM), foram avaliadas as respostas de relaxamento e, para isso, inicialmente os anéis arteriais foram pré-contraídos com um mimético do tromboxano A_2 (Tx A_2), o U46619, em uma concentração capaz de induzir entre 80 a 120% da resposta contrátil induzida pelo KCl (120 mM).

Para avaliar o relaxamento dependente do endotélio, foram realizadas curvas concentração-resposta, cumulativas, ao agonista muscarínico acetilcolina (ACh;

10^{-10} a 10^{-4} M). Já o relaxamento independente do endotélio foi avaliado pelo relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS; 10^{-10} a 10^{-4} M).

Cabe ressaltar que as artérias coronárias com relaxamento à acetilcolina inferior a 50% e as artérias de resistência do músculo esquelético com relaxamento inferior a 80% foram excluídas dos estudos de reatividade vascular. Desta forma, todas as artérias utilizadas nos experimentos de reatividade vascular apresentaram endotélio intacto.

3.6.2.2 Avaliação da resposta de relaxamento induzido pela estimulação dos receptores β -adrenérgicos e pelo ativador da adenilato ciclase

Em outro grupo de anéis arteriais, após avaliação da integridade endotelial seguida de uma estabilização de 30 minutos em solução de Krebs, foi avaliado o relaxamento induzido pela estimulação dos receptores β -adrenérgicos, por meio de uma curva concentração-resposta, cumulativa, ao isoproterenol (10^{-10} a 3×10^{-5} M) em anéis previamente contraídos com U46619.

Cabe ressaltar que, para avaliar a resposta vasodilatadora mediada pelo isoproterenol, os anéis arteriais foram previamente incubados com fentolamina (10^{-5} M), um antagonista dos receptores α_1 - e α_2 -adrenérgicos, por 30 minutos. Este bloqueio dos receptores α -adrenérgicos foi necessário, pois, segundo Rascado e Bendhack (2005) e Rascado (2007), o isoproterenol, por ser uma catecolamina, poderia ativar, além dos receptores β -adrenérgicos, os receptores α -adrenérgicos.

Em outro grupo de anéis de artérias coronárias septais dos animais SHAM e INF LDV, também foi avaliado o relaxamento mediado pelo ativador da adenilato ciclase, o forskolin (10^{-8} a 3×10^{-5} M), em anéis pré-contraídos com U46619.

3.6.2.3 Efeito do bloqueio da sintase de óxido nítrico sobre a resposta de relaxamento à acetilcolina e ao isoproterenol e do bloqueio da via de ativação da PI3-quinase sobre a resposta de relaxamento à acetilcolina

Após avaliação da integridade endotelial seguida de uma estabilização de 30 minutos em solução de Krebs, foi avaliada a modulação nitrérgica sobre a resposta

de relaxamento à acetilcolina e ao isoproterenol nas artérias coronárias dos animais do grupo SHAM e INF LDV. Para tal, os anéis de artérias coronárias foram pré-incubados com N^G-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 10^{-4} M), um inibidor não seletivo da sintase de óxido nítrico, durante 30 minutos e, em seguida, na presença deste inibidor, foram realizadas curvas concentração-resposta à acetilcolina (10^{-10} a 10^{-4} M) ou ao isoproterenol (10^{-10} a 3×10^{-5} M), em anéis previamente contraídos com U46619. Cabe ressaltar que, para avaliar a modulação nitrérgica sobre a resposta ao isoproterenol, os anéis de artérias coronárias também foram pré-incubados com fentolamina (10^{-5} M) por 30 minutos.

Para avaliar a participação da via PI3-quinase/ Akt/ eNOS e a participação do NO proveniente da nNOS na resposta de relaxamento à acetilcolina nas artérias coronárias dos animais SHAM e INF LDV, outro grupo de anéis foram pré-incubados com o inibidor da PI3-quinase, o LY 294002 (5×10^{-5} M), ou com o inibidor seletivo da nNOS, o 7-Nitroindazole (7-NI, 10^{-4} M), respectivamente, durante 30 minutos. Em seguida, na presença destes inibidores, foi realizada curva concentração-resposta à acetilcolina (10^{-10} a 10^{-4} M) nos anéis de artérias coronária previamente contraídos com U46619.

3.6.2.4 Avaliação da resposta vasoconstritora

Após 60 minutos da curva de relaxamento à acetilcolina, em alguns anéis de artéria coronária septal, foi realizada curva concentração-resposta à serotonina (10^{-8} a 10^{-4} M). Por sua vez, nos anéis provenientes das artérias de resistência do leito muscular esquelético, foi realizada curva concentração-resposta ao agonista adrenérgico noradrenalina (10^{-8} a 3×10^{-4} M).

3.7 Medida da produção de NO em secções transversais de artérias coronárias septais de ratos antes e após a estimulação com acetilcolina ou isoproterenol

A produção de NO pelas artérias coronárias septais após estimulação com acetilcolina ou isoproterenol foi medida utilizando-se diacetato de 4,5-

diaminofluoresceína (DAF-2; Sigma-Aldrich, EUA), um marcador fluorescente sensível ao NO (Kojima et al., 1998; Akamine et al., 2006). Para tal, imediatamente após a morte do animal, as artérias coronárias septais foram rapidamente isoladas, cobertas com meio de congelamento (Tissue Freezing Medium, EUA) e congeladas. Utilizando-se um criostato (Leica, Alemanha), cortes transversais (10 μ m) das artérias coronárias septais dos ratos foram obtidos, coletados em lâminas de vidro (Star Frost, Alemanha), circulados com caneta hidrofóbica (ImmEdge, EUA) e incubados, a 37°C, com DAF-2 (8 μ M) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) contendo CaCl_2 (0,45 mM), por 25 minutos. Na sequência, os cortes foram estimulados com acetilcolina ou isoproterenol.

A concentração de acetilcolina ou isoproterenol utilizada para estimular os cortes foi baseada nos experimentos de reatividade vascular, de modo que foram escolhidas as concentrações nas quais se observam as maiores diferenças nas respostas de relaxamento entre as coronárias dos animais infartados e SHAM. Assim, a concentração de acetilcolina utilizada para avaliar a produção de NO, entre as artérias coronárias dos animais SHAM e INF LDV, corresponde à EC50 obtida nos anéis de artéria coronária dos animais SHAM (10^{-6} M); enquanto que, para as coronárias dos animais SHAM e INF SDV, esta concentração corresponde à concentração capaz de induzir uma resposta máxima de relaxamento (E_{max} ; 10^{-4} M) nas coronárias do grupo SHAM. Já a concentração de isoproterenol utilizada para determinar a produção de NO, entre as coronárias dos animais SHAM e INF LDV, corresponde à concentração capaz de induzir uma resposta máxima de relaxamento (E_{max}) na artéria coronária dos ratos SHAM (10^{-5} M).

Cabe ressaltar que, os cortes controles receberam o mesmo volume de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) contendo CaCl_2 sem a adição dos agonistas. Após 15 minutos da estimulação, as imagens foram capturadas em microscópio (Nikon E1000, Japão) equipado com filtro padrão de fluoresceína. A análise das imagens foi feita no programa *Image J 1,4 g* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA), medindo-se densidade óptica média da fluorescência observada no endotélio em relação à marcação do fundo (intensidade de fluorescência relativa). Esta razão de fluorescência foi avaliada em pelo menos três locais em cada imagem.

Para confirmar a viabilidade da técnica em detectar a produção de NO, alguns cortes de artérias coronárias septais dos animais SHAM foram pré-incubados com L-NAME (10^{-3} M), um inibidor não seletivo da sintase de óxido nítrico, assim como com nitroprussiato de sódio (3×10^{-6} M), um doador de óxido nítrico.

3.8 Estudo da geração de espécies reativas derivadas do oxigênio em artérias coronárias septais de ratos

A geração de espécies reativas derivadas do oxigênio nas artérias coronárias septais de ratos foi determinada utilizando-se a dihidroetidina (DHE) em cortes arteriais transversais (Davel et al., 2006; Wenceslau et al., 2011). A DHE, na presença de espécies reativas derivadas do oxigênio, é oxidada dando origem a produtos fluorescentes, os quais têm afinidade pelo DNA nuclear.

Imediatamente após a morte do animal, as artérias coronárias septais foram rapidamente isoladas, cobertas com meio de congelamento (Tissue Freezing Medium, EUA) e congeladas. Utilizando-se um criostato (Leica, Alemanha), cortes transversais (10 μ m) das artérias coronárias septais dos ratos foram obtidos, coletados em lâminas de vidro (Star Frost, Alemanha), circulados com caneta hidrofóbica (ImmEdge, EUA) e incubados, por 10 minutos, com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) contendo ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA; 100 μ M), a 37 °C em câmara úmida protegida da luz. Na sequência, estes cortes foram incubados com novo tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) contendo DTPA (100 μ M) e DHE (2 μ M), por 30 minutos, a 37 °C em câmara úmida, protegidos da luz.

Após este período, as imagens foram capturadas em microscópio (Nikon E1000, Japão) equipado com filtro para rodamina e, posteriormente, as imagens foram analisadas com o programa *Image J 1,4g* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA), medindo-se a densidade de núcleos corados com os produtos fluorescentes da oxidação da DHE.

3.9 Estudo da expressão protéica em artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV por *Western Blot*

Após a morte dos animais SHAM e INF LDV, as artérias coronárias septais foram rapidamente isoladas e congeladas. Posteriormente, as artérias foram homogeneizadas com tampão de extração (tampão para lise celular (RIPA, Milipore, EUA) 1:10; fenilmetil sulfonil fluorida (PMSF) 1 mM; ortovanadato de sódio 1 mM; coquetel de inibidor de protease 2 µL/mL (Sigma, EUA); fluoreto de sódio 100 mM; pirofosfato de sódio 10 mM). Em seguida, este homogeneizado foi centrifugado (3000 rpm, 4°C, 15 minutos) e o sobrenadante foi utilizado para determinação do conteúdo protéico utilizando o método de *Bicinchoninic Acid* (BCA protein assay kit, Thermo Scientific, EUA).

Quantidades iguais de proteínas (35 µg) provenientes da artéria coronária septal de cada animal; o peso molecular (Precision Plus Protein, Kaleidoscope, Bio-Rad, EUA); e os controles positivos (para nNOS: 35 µg encéfalo; para Akt1/2/3: 50 µg fígado) foram submetidos à separação eletroforética em gel de poliacrilamida 7,5% com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em aparelho para minigel (Mini Protean III, Bio-Rad, EUA). Após a separação eletroforética no gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana Hybond-P PVDF (Amersham-GE Healthcare, Reino Unido) durante toda a noite a 4°C.

As membranas foram incubadas com solução bloqueadora contendo 5% de leite em pó desnatado em solução de lavagem (NaCl 100 mM; TRIS-HCl 10 mM; Tween-20 0,1%; pH 7,4), por 90 minutos, a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas, durante toda a noite a 4°C, com solução bloqueadora contendo os seguintes anticorpos: anti-eNOS (1:1.000; BD Transduction, EUA), anti-nNOS (1:1.000; BD Transduction, EUA), anti-iNOS (1:600; Santa Cruz Biotechnology, EUA); anti-Akt1/2/3 (25:10.000; Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-AMPKα1/2 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-EC-SOD (1:1.000; Stressgen, EUA), anti-Cu/Zn-SOD (1:1.500; Sigma, EUA) e Mn-SOD (1:2.000; Stressgen, EUA). Após marcação com anticorpo primário, as membranas foram incubadas, por 90 minutos, com solução de bloqueio contendo anticorpo secundário apropriado conjugado à peroxidase (anti-camundongo (Bio-

Rad, EUA): 1:1.500 para eNOS, nNOS e Cu/Zn-SOD; anti-coelho (Amersham-GE Healthcare, Reino Unido): 1:8000 para EC-SOD e Mn-SOD; 1:2.500 para Akt1/2/3; 1:1500 para iNOS; anti-cabra (Jackson Immuno Research, EUA): 1:4.000 para AMPK α 1/2). Após as lavagens das membranas, foram adicionados os reagentes de detecção do kit de fluorescência (ECL, Amersham-GE Healthcare, Reino Unido). Em seguida, as membranas foram expostas, durante tempos variados, a filmes de raio-X. Depois de revelados, estes filmes foram submetidos à análise de densitometria óptica pelo *software Scion Image* (Scioncorp, NIH, EUA).

As mesmas membranas também foram usadas para determinar a expressão protéica da α -actina como controle interno, utilizando o anticorpo anti- α -actina (1:30.000, Sigma-Aldrich, EUA) e como anticorpo secundário, o anti-camundongo (1:10.000, Bio-Rad, EUA).

3.10 Determinação da expressão protéica dos receptores β 1-, β 2- e β 3-adrenérgicos nas artérias coronárias dos animais SHAM e INF LDV por imunohistoquímica

A localização e a expressão protéica dos subtipos de receptores β -adrenérgicos foram realizadas pela técnica de imunohistoquímica em cortes arteriais (Ceravolo et al., 2007).

Após a morte dos animais SHAM e INF LDV, as artérias coronárias septais foram isoladas e imersas na solução fixadora de paraformaldeído (PFA; 4%), por 6 horas. Após a fixação, as coronárias foram mantidas em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4), a 4 °C.

Posteriormente, as artérias foram desidratadas em banhos de concentrações crescentes de etanol, passadas por banhos de xilol e emblocadas em parafina. Na sequência, com auxílio do micrótomo (Leica Microsystems Micrótomo, Alemanha), foram realizados cortes transversais (10 μ m) nas artérias coronárias, os quais foram coletados em lâminas de vidro (Star Frost, Alemanha) com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, EUA). Em seguida, as lâminas foram imersas em banhos de xilol, para remover a parafina dos cortes, e foram hidratadas, por meio de banhos de concentrações decrescentes de etanol, até serem banhadas em água. A

recuperação antigênica foi realizada pela imersão das lâminas em tampão citrato (10 mM, pH 6,0), aquecido no microondas em potência máxima por 2-3 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por meio da incubação das lâminas com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 3%).

Os anticorpos primários anti-receptor β 1-adrenérgico (1:50; Santa Cruz Biotechnology, EUA) e anti-receptor β 2-adrenérgico (1:25; Santa Cruz Biotechnology, EUA) foram diluídos em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) contendo Tween (0,3 %), albumina de soro bovino (BSA, 3 %) e soro normal de cabra (5 %). Já o anticorpo primários anti-receptor β 3-adrenérgico (1:25; Santa Cruz Biotechnology, EUA) foram diluídos em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) contendo Tween (0,3 %), BSA (3 %) e soro normal de coelho (5 %). Os cortes de artérias coronárias foram incubados com estas soluções, contendo os anticorpos primários, durante uma noite, a 4 °C. Paralelamente, foram realizadas reações controles substituindo o anticorpo primário por tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) contendo Tween (0,3 %), BSA (3 %) e soro normal de coelho (5 %), para as lâminas controles das incubadas com anti-receptor β 3-adrenérgico, ou cabra (5 %), para as lâminas controles das incubadas com anti-receptores β 1- e β 2-adrenérgicos.

Após o período de incubação com os anticorpos primários, os cortes foram lavados em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) e incubados com os anticorpos secundários conjugados a biotina (1:1000; Vector Laboratories, USA), por 1 hora, em câmara úmida e à temperatura ambiente. Os anticorpos secundários foram diluídos em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) contendo Tween (0,3 %).

Após a incubação com os anticorpos secundários, os cortes de artéria coronária foram novamente lavados em tampão fosfato e incubados, em câmara úmida, com solução do *kit ABC Vectastain* (Vector Laboratories, USA), por 1 hora, à temperatura ambiente.

A revelação da imunoreatividade foi realizada com diaminobenzidina (DAB, 0,5 mg/ 1mL, Sigma Aldrich) e H₂O₂ (0,03 %). Os cortes foram lavados com tampão fosfato e água destilada e, após os cortes estarem secos, as lâminas foram montadas com *Entellan* (Sigma-Aldrich, EUA).

3.11 Drogas e diluições

Todos os sais utilizados no preparo da solução de Krebs-Henseleit e no preparo do tampão fosfato contendo CaCl_2 foram comprados da Synth (Brasil). As drogas: acetilcolina (cód. A6625); nitroprussiato de sódio (cód. S0501); isoproterenol (cód. I6504); forskolin (cód. F6886); fentolamina (cód. P7547); L-NAME (cód. N5751); 7-NI (cód. N7778); serotonina (cód. H9523); noradrenalina (cód. A7256); U46619 (cód. D8174); DAF-2 (cód. D225); e DTPA (cód. D6518); utilizadas no presente estudo, foram compradas da Sigma-Aldrich (EUA). A Dihidroetidina (cód. D23107) foi comprada da Invitrogen (EUA) e o LY 294002 (cód. 9901) foi comprado da Cell Signalling (EUA). Todas as drogas foram diluídas em água destilada, exceto para o U46619 e para o forskolin, os quais foram diluídos em etanol; e para o LY 294002, o qual foi diluído em DMSO. As soluções-estoque foram mantidas a -20°C e as diluições a serem utilizadas foram preparadas antes de cada lote de experimentos.

3.12 Expressão dos dados e análise estatística

Nos anéis arteriais dos grupos SHAM, INF LDV e INF SDV, a resposta vascular de contração ao KCl (120 mM), assim como os resultados das curvas concentração-resposta aos agonistas contráteis (serotonina e noradrenalina) foram calculados como tensão vascular ativa (aumento da força a partir da tensão basal dividida por duas vezes o comprimento de cada segmento arterial, mN/ mm) (Mulvany, Halpern, 1977). Os resultados das curvas concentração-resposta aos agentes vasodilatadores (acetilcolina, nitroprussiato de sódio, isoproterenol, forskolin) foram expressos como porcentagem de contração residual em relação ao valor da pré-contração com U46619. Para determinação da pD_2 (logarítmo negativo da concentração do fármaco capaz de induzir 50 % da resposta máxima) foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta utilizando o programa *GraphPad Prism Software* (San Diego, CA, E.U.A.).

Os resultados da fluorescência emitida pelo DAF-2 são expressos como porcentagem da intensidade de fluorescência relativa observada nas coronárias dos animais SHAM. Já os resultados da oxidação da DHE são expressos como porcentagem da densidade de núcleos corados com os produtos fluorescentes provenientes da oxidação da DHE observados nas coronárias dos animais SHAM.

Os resultados de expressão protéica analisados pela técnica de *Western Blot* são expressos como razão entre o sinal obtido para a proteína (eNOS, nNOS, Akt1/2/3, AMPK α 1/2, EC-SOD, Mn-SOD e Cu/Zn-SOD) pela banda correspondente de α -actina na mesma amostra. Enquanto que, os resultados da expressão protéica dos receptores β 1-, β 2- e β 3-adrenérgicos são expressos como densidade óptica média.

Os resultados dos animais dos grupos SHAM, INF LDV e INF SDV são expressos como média $\pm$ EPM. A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t* de *Student* não-pareado para comparação entre dois grupos, ou por análise de variância (ANOVA), uma ou duas vias, completamente randomizada. Quando a ANOVA apresentou significância estatística, o teste *post-hoc* de Bonferroni foi aplicado (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Hemodinâmica arterial e ventricular, índice de hipertrofia ventricular e área de infarto

A área de infarto foi estatisticamente maior nos animais INF SDF quando comparado aos animais do grupo INF LDV (tabela 1). Cabe ressaltar que todos os animais submetidos à cirurgia de ligadura da artéria coronária apresentaram uma área necrosada tanto no epicárdio como no endocárdio, o que caracteriza os infartos como transmurais, onde a área de necrose isquêmica envolve toda ou quase toda a espessura da parede ventricular (Antman, Braunwald, 2005).

O peso corporal (PC) foi reduzido nos animais do grupo INF LDV quando comparado ao peso dos animais SHAM, assim como foi reduzido nos INF SDV tanto em relação aos SHAM quanto em relação aos INF LDV (tabela 1). O comprimento da tíbia não foi alterado entre os grupos estudados (tabela 1). Os animais do grupo INF LDV e INF SDV apresentaram aumento da razão peso do ventrículo direito pelo comprimento da tíbia (VD/T) em relação ao grupo SHAM (tabela 1), o que sugere a presença de hipertrofia ventricular direita após o infarto do miocárdio; no entanto esta razão foi de maior magnitude nos animais INF SDV (tabela 1). Já a razão peso do ventrículo esquerdo pelo comprimento da tíbia (VE/T) foi reduzida nos animais INF LDV e INF SDV quando comparado ao SHAM (tabela 1).

A figura 2 representa um registro típico da hemodinâmica arterial e ventricular nos animais SHAM, INF LDV e INF SDV. A pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) foram reduzidas nos animais INF LDV e INF SDV quando comparado ao grupo SHAM (tabela 1). Já a pressão arterial diastólica (PAD) não foi alterada entre os grupos estudados (tabela 1). A pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDfVE) foi aumentada nos animais INF LDV e INF SDV quando comparado ao SHAM, no entanto este aumento foi maior nos animais INF SDV (tabela 1). A frequência cardíaca (FC) não foi alterada entre os animais SHAM, INF LDV e INF SDV (tabela 1). A contratilidade cardíaca, avaliada pela $dP/dt +$, foi reduzida em ambos os grupos infartados (INF LDV e INF SDV) quando comparado ao SHAM, no entanto esta redução foi maior no grupo INF SDV

(tabela 1). Já o índice de relaxamento cardíaco, a dP/dt -, não foi alterado nos animais do grupo INF LDV, mas foi reduzido nos animais do grupo INF SDV (tabela 1).

Figura 2 - Registro típico da hemodinâmica arterial (painel superior) e ventricular (painel inferior) dos animais SHAM, INF LDV e INF SDV.

Pressão arterial, PA; pressão ventricular, PV; derivada de pressão pelo tempo, dP/dt .
Fonte: Couto (2012).

Tabela 1 - Avaliação da área de infarto; peso corporal; comprimento da tíbia; índices de hipertrofia cardíaca; e parâmetros hemodinâmicos arterial e ventricular avaliados nos ratos dos grupos SHAM, INF LDV e INF SDV.

	SHAM (n=53)	INF LDV (n=40)	INF SDV (n=8)
Área infartada (%)	-	32,6 ± 1,1	38,9 ± 1,1 *
PC (g)	390 ± 5	370 ± 6 *	331 ± 12 * #
Tíbia (mm)	39,2 ± 0,2	39,1 ± 0,2	38,3 ± 0,2
VD/Tíbia (mg/mm)	5,4 ± 0,1	8,6 ± 0,4 *	12,4 ± 0,7 * #
VE/Tíbia (mg/mm)	18,1 ± 0,2	17,2 ± 0,3 *	15,5 ± 0,6 *
PAS (mmHg)	121,3 ± 1,6	112,7 ± 1,5 *	108,9 ± 2,2 *
PAD (mmHg)	76,0 ± 1,8	84,4 ± 2,3	83,0 ± 3,5
FC (bpm)	377 ± 5	374 ± 6	357 ± 8
PSVE (mmHg)	127,9 ± 1,9	118,0 ± 1,5 *	113,8 ± 3,3 *
PDfVE (mmHg)	7,2 ± 0,3	11,7 ± 0,4 *	25,3 ± 1,3 * #
dP/dt + (mmHg/s)	7339 ± 194	6095 ± 140 *	4712 ± 162 * #
dP/ dt - (mmHg/s)	-4521 ± 80	-4301 ± 89	-3410 ± 110 * #

O número de animais utilizado em cada grupo experimental (n) está entre parênteses; PC, peso corporal; VD/T, relação entre o peso do ventrículo direito e comprimento da tíbia; VE/T, relação entre o peso do ventrículo esquerdo e comprimento da tíbia; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; FC, frequência cardíaca; PSVE, pressão sistólica no ventrículo esquerdo; PDfVE, pressão diastólica final no ventrículo esquerdo; dP/dt +, derivada de pressão pelo tempo positiva; dP/dt -, derivada de pressão pelo tempo negativa. Os resultados são expressos como média ± EPM. ANOVA (1 via): * p<0,05 vs. SHAM; # p<0,05 vs. INF LDV.

4.2 Avaliações de congestão pulmonar e de congestão hepática

Sabendo que o aumento do teor de água no pulmão e no fígado representa um índice de congestão pulmonar e hepática, respectivamente, estes parâmetros foram avaliados em todos os grupos experimentais estudados (tabela 2).

Como observado na tabela 2, o teor de água no pulmão não foi diferente entre os grupos analisados. Já o teor de água no fígado foi similar entre os animais INF LDV e SHAM e foi aumentado nos animais INF SDV, tanto em relação aos animais SHAM e quanto em relação aos animais INF LDV (tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação de congestão pulmonar e hepática nos ratos dos grupos SHAM, INF LDV e INF SDV.

	SHAM (n= 53)	INF LDV (n=40)	INF SDV (n=8)
Teor de água no pulmão (%)	79,0 ± 0,2	78,4 ± 0,2	78,6 ± 0,4
Teor de água no fígado (%)	68,5 ± 0,1	68,7 ± 0,1	69,7 ± 0,5 * #

O número de animais utilizado em cada grupo experimental (n) está entre parênteses. Os resultados são expressos como média ± EPM. ANOVA (1 via): * p<0,05 vs. SHAM; # p<0,05 vs. INF LDV.

4.3 Reatividade nas artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos

4.3.1 Diâmetro luminal efetivo e tensão vascular ativa nas artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos

O diâmetro luminal efetivo e os valores da tensão vascular ativa das artérias de resistência do leito muscular esquelético, provenientes dos animais dos grupos SHAM, INF LDV e INF SDV estão representados na tabela 3.

Não foram observadas alterações significativas nos valores de diâmetro interno das artérias de resistência do leito muscular esquelético dos animais utilizados na presente tese (tabela 3).

A tensão vascular ativa foi reduzida em ambos os grupos infartados (INF LDV e INF SDV) quando comparada à tensão das artérias dos animais SHAM (tabela 3).

Tabela 3 - Valores do diâmetro interno (μm) e da tensão ativa (mN/mm) dos anéis vasculares de artérias de resistência do músculo esquelético dos ratos dos grupos SHAM, INF LDV e INF SDV.

	SHAM (n=18)	INF LDV (n=11)	INF SDV (n=8)
Diâmetro	209,2 $\pm$ 9,0	240,3 $\pm$ 9,3	232,4 $\pm$ 8,4
Tensão Ativa	2,71 $\pm$ 0,10	2,30 $\pm$ 0,09 *	1,93 $\pm$ 0,13 *

O número de animais utilizados em cada grupo experimental (n) está entre parênteses. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA (1via): * $p < 0,05$ vs. SHAM.

4.3.2 Respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio nas artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos

Nos anéis vasculares de todos os animais, previamente contraídos com U46619, a acetilcolina induziu relaxamento na dependência da concentração utilizada (figuras 3A e 3B). Não foram observadas diferenças significativas entre as curvas concentração-resposta à acetilcolina das artérias dos animais SHAM e INF LDV (figura 3A e tabela 4). Já nas artérias de resistência do leito muscular esquelético dos animais INF SDV, observa-se redução da sensibilidade no relaxamento mediado pela acetilcolina quando comparado ao relaxamento nas artérias dos animais SHAM (figura 3B e tabela 5).

Similar ao observado no relaxamento à acetilcolina, o NPS promoveu relaxamento de modo dependente da concentração utilizada nos anéis de artéria de resistência do leito muscular esquelético de ratos (figuras 3C e 3D). Não foram observadas diferenças significativas no relaxamento induzido pelo NPS nem nas artérias dos animais do grupo SHAM e INF LVD (figura 3C e tabela 4) nem nas artérias dos animais do grupo SHAM e INF SDV (figura 3D e tabela 5).

Figura 3 - Curva concentração-resposta à acetilcolina (A e B) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) (C e D) em artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos dos grupos SHAM, INF LDV e INF SDV.

Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental (n) está entre parênteses. ANOVA (2 vias): * $p < 0,05$ vs. respectivo SHAM. Fonte: Couto (2012).

4.3.3 Resposta de relaxamento ao isoproterenol nas artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos

Para avaliar a resposta de relaxamento induzida pela estimulação dos receptores β -adrenérgicos, foi realizada curva concentração-resposta ao isoproterenol. A figura 4 representa o relaxamento dependente da concentração promovido pelo isoproterenol em artérias de resistência do músculo esquelético de ratos. Não foram observadas diferenças significativas nas curvas concentração-resposta ao isoproterenol nem nas artérias dos animais do grupo SHAM e INF LDV (figura 4A e tabela 4) nem nas artérias dos animais do grupo SHAM e INF SDV (figura 4B e tabela 5).

Figura 4 - Curva concentração-resposta ao isoproterenol (A e B) em artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos dos grupos SHAM, INF LDV e INF SDV.

Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental (n) está entre parênteses. ANOVA (2 vias).

Fonte: Couto (2012).

4.3.4 Resposta de contração à noradrenalina em artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos

A noradrenalina aumentou, de maneira dependente da concentração, o tônus basal dos anéis de artéria de resistência do músculo esquelético de ratos SHAM, INF LDV e INF SDV (figura 5). Não foram observadas diferenças significativas nas curvas concentração-resposta à noradrenalina entre as artérias dos animais do grupo SHAM e INF LDV (figura 5A e tabela 4) nem nas artérias dos animais do grupo SHAM e INF SDV (figura 5B e tabela 5).

Figura 5 - Curva concentração-resposta à noradrenalina (A e B) em artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos dos grupos SHAM, INF LDV e INF SDV.

Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental (n) está entre parênteses. ANOVA (2 vias).
Fonte: Couto (2012).

Tabela 4 - Valores de sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) obtidos por meio de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), ao nitroprussiato de sódio (NPS), ao isoproterenol (ISO) e à noradrenalina (NOR) nas artérias de resistência do leito muscular esquelético dos animais SHAM e INF LDV.

	SHAM		INF LDV	
	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}
ACh	$7,93 \pm 0,06$	$-98,1 \pm 0,2 \%$ (11)	$8,02 \pm 0,06$	$-98,1 \pm 0,3 \%$ (11)
NPS	$7,33 \pm 0,09$	$-95,0 \pm 1,3 \%$ (8)	$7,61 \pm 0,15$	$-95,6 \pm 0,9 \%$ (7)
ISO	$8,05 \pm 0,16$	$-97,4 \pm 0,3 \%$ (5)	$7,94 \pm 0,08$	$-98,2 \pm 0,3 \%$ (9)
NOR	$3,77 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,3$ mN/mm (10)	$4,30 \pm 0,17$	$3,6 \pm 0,2$ mN/mm (10)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. Teste-*t*.

Tabela 5 - Valores de sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) obtidos por meio de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), ao nitroprussiato de sódio (NPS), ao isoproterenol (ISO) e à noradrenalina (NOR) nas artérias de resistência do leito muscular esquelético dos animais SHAM e INF SDV.

	SHAM		INF SDV	
	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}
ACh	$8,00 \pm 0,06$	$-97,8 \pm 0,2 \%$ (7)	$7,64 \pm 0,06$ *	$-97,8 \pm 0,4 \%$ (7)
NPS	$8,08 \pm 0,15$	$-96,8 \pm 0,6 \%$ (5)	$7,93 \pm 0,20$	$-94,7 \pm 2,8 \%$ (5)
ISO	$7,98 \pm 0,15$	$-98,7 \pm 0,2 \%$ (4)	$7,92 \pm 0,11$	$-97,7 \pm 0,6 \%$ (4)
NOR	$4,03 \pm 0,03$	$3,4 \pm 0,4$ mN/mm (4)	$4,16 \pm 0,02$	$3,6 \pm 0,2$ mN/mm (3)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. Teste-*t*. * $p < 0,05$ vs. respectivo SHAM.

4.4 Reatividade nas artérias coronárias septais de ratos

4.4.1 Diâmetro luminal efetivo e tensão vascular ativa nas artérias coronárias septais de ratos

O diâmetro luminal efetivo e os valores da tensão vascular ativa das artérias coronárias septais provenientes dos animais dos grupos SHAM, INF LDV e INF SDV estão representados na tabela 6.

O diâmetro interno das artérias coronárias foi maior nos animais do grupo INF LDV e INF SDV quando comparado ao diâmetro das artérias dos animais SHAM (tabela 6).

Não foram observadas alterações significativas na tensão vascular ativa das artérias coronárias dos animais utilizados no presente estudo (tabela 6).

Tabela 6 - Valores do diâmetro interno (μm) e da tensão ativa (mN/ mm) dos anéis vasculares de artérias coronárias septais dos ratos dos grupos SHAM, INF LDV e INF SDV.

	SHAM (n=37)	INF LDV (n=25)	INF SDV (n=6)
Diâmetro	270,9 $\pm$ 5,6	300,4 $\pm$ 7,5 *	330,2 $\pm$ 27,7 *
Tensão Ativa	1,81 $\pm$ 0,06	1,89 $\pm$ 0,08	1,70 $\pm$ 0,24

O número de animais analisados em casa grupo experimental (n) está entre parênteses. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA (1via): * $p < 0,05$ vs. SHAM.

4.4.2 Respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio nas artérias coronárias septais de ratos

Nos anéis vasculares de todos os animais, previamente contraídos com U46619, a acetilcolina induziu relaxamento na dependência da concentração utilizada (figuras 6A e 6B). Nas artérias coronárias septais dos animais do grupo INF LDV observa-se aumento tanto da sensibilidade quanto da resposta máxima no relaxamento mediado pela acetilcolina quando comparado ao relaxamento observado nas artérias dos animais SHAM (figura 6A e tabela 7). Entretanto, diferente do observado para as artérias coronárias dos animais INF LDV, nas artérias coronárias dos animais do grupo INF SDV observa-se redução da resposta máxima no relaxamento à acetilcolina, sem alteração na sensibilidade a este agonista, quando comparado ao relaxamento nas artérias dos animais SHAM (figura 6B e tabela 8).

O NPS também promoveu relaxamento de modo dependente da concentração utilizada nos anéis de artéria coronária septal de ratos previamente contraídos com U46619 (figuras 6C e 6D). Não foram observadas diferenças significativas entre as curvas concentração-resposta ao NPS nas artérias dos animais do grupo SHAM e INF LDV (figura 6D e tabela 7) e entre as artérias dos grupos SHAM e INF SDV (figura 6B e tabela 8).

Figura 6 - Curva concentração-resposta à acetilcolina (A e B) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) (C e D) em artérias coronárias septais de ratos dos grupos SHAM, INF LDV e INF SDV.

Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental (n) está entre parênteses. ANOVA (2 vias): * $p < 0,05$ vs. respectivo SHAM.

Fonte: Couto (2012).

4.4.3 Efeito do bloqueio da sintase de óxido nítrico e da via da PI3-quinase sobre a resposta de relaxamento à acetilcolina em artérias coronárias septais de ratos

Sabendo que o relaxamento mediado pela acetilcolina foi aumentado nas artérias coronárias dos animais do grupo INF LDV, na sequência, foram avaliados os possíveis mecanismos envolvidos neste aumento da função endotelial.

Assim, para avaliar o papel do óxido nítrico sobre a resposta de relaxamento à acetilcolina em artérias coronárias septais dos ratos SHAM e INF LDV, alguns anéis arteriais, com endotélio intacto, foram previamente incubados, durante 30 minutos, com o inibidor não-seletivo da sintase de óxido nítrico (NOS), o L-NAME (10^{-4} M), ou com o inibidor seletivo da isoforma neuronal de NOS (nNOS), o 7-Nitroindazole (7-NI, 10^{-4} M).

Nos anéis de artéria coronária dos grupos SHAM e INF LDV, a incubação com L-NAME reduziu o relaxamento mediado pela acetilcolina (figuras 7A, 7B e tabela 9), assim como aboliu as diferenças nas respostas de relaxamento à acetilcolina observadas entre as artérias coronárias destes grupos (figuras 7A, 7B e tabela 9).

A incubação com 7-NI não alterou a resposta de relaxamento à acetilcolina observada nas artérias dos animais SHAM (figura 7C e tabela 9). Por outro lado, a incubação com 7-NI reduziu tanto a sensibilidade quanto da resposta máxima de relaxamento à acetilcolina nas artérias coronárias dos animais do grupo INF LDV (figura 7D e tabela 9).

Figura 7 - Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (LN) (A e B) e 7-NI (C e D) sobre a resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina em artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV.

Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental (n) está entre parênteses. ANOVA (2 vias): * $p < 0,05$ vs. SHAM; # $p < 0,05$ vs. INF LDV. Fonte: Couto (2012).

Para avaliar o envolvimento da via PI3-quinase/ Akt/ eNOS no relaxamento à acetilcolina em artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV, anéis arteriais, com endotélio intacto, foram previamente incubados, durante 30 minutos, com o inibidor da PI3-quinase, o LY 294002 (5×10^{-5} M).

A incubação com LY 294002 reduziu a resposta máxima de relaxamento à acetilcolina nas artérias coronárias dos animais SHAM (figuras 8A e tabela 9) e reduziu tanto a sensibilidade quanto a resposta máxima de relaxamento à acetilcolina nas coronárias dos animais INF LDV (figuras 8B e tabela 9). Além disso, após a incubação com LY 294002, a resposta máxima de relaxamento à acetilcolina foi menor nas coronárias dos animais INF LDV (tabela 9).

Figura 8 - Efeito do bloqueio da via da PI3-quinase com LY 294002 sobre a resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina em artérias coronárias septais de ratos SHAM (A) e INF LDV (B).

Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental (n) está entre parênteses. ANOVA (2 vias): * $p < 0,05$ vs. SHAM; # $p < 0,05$ vs. INF LDV. Fonte: Couto (2012).

4.4.4 Resposta de relaxamento ao isoproterenol nas artérias coronárias septais de ratos

A figura 9 representa o relaxamento dependente da concentração promovido pelo isoproterenol em artérias coronárias septais de ratos. As artérias dos animais do grupo INF LDV apresentaram aumento significativo da sensibilidade e da resposta máxima no relaxamento mediado isoproterenol, sem alteração na sensibilidade, quando comparado às artérias dos animais do grupo SHAM (figura 9A e tabela 7). Por sua vez, as artérias coronárias do grupo INF SDV apresentaram redução da resposta máxima do relaxamento mediado pelo isoproterenol quando comparado ao relaxamento observado nas artérias dos animais SHAM (figura 9B e tabela 8).

Nas artérias coronárias septais dos animais INF LDV e SHAM, também foi avaliada a resposta de relaxamento mediado pelo forskolin, um ativador da adenilato ciclase. O forskolin promoveu um relaxamento na dependência da concentração utilizada nas artérias de ambos os grupos, sem alterações significativas entre os grupos (figura 9C e tabela 7).

Figura 9 - Curva concentração-resposta ao isoproterenol (A e B) em artérias coronárias septais de ratos dos grupos SHAM, INF LDV e INF SDV, e ao forskolin (C) em artérias coronárias septais dos animais SHAM e INF LDV.

Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental (n) está entre parênteses. ANOVA (2 vias): * $p < 0,05$ vs. respectivo SHAM. Fonte: Couto (2012).

4.4.5 Efeito do bloqueio da sintase de óxido nítrico sobre a resposta de relaxamento ao isoproterenol em artérias coronárias septais de ratos

Para avaliar o papel do óxido nítrico sobre a resposta de relaxamento ao isoproterenol em artérias coronárias septais dos ratos SHAM e INF LDV, os anéis arteriais, com endotélio intacto, foram previamente incubados, durante 30 minutos, com o inibidor não-seletivo da sintase de óxido nítrico (NOS), o L-NAME (10^{-4} M).

Nos anéis de artéria coronária de ambos os grupos experimentais, a incubação com L-NAME reduziu o relaxamento mediado pelo isoproterenol (figuras 10A e 10B), assim como aboliu as diferenças nas respostas de relaxamento mediado pelo isoproterenol observadas nas artérias coronárias dos animais SHAM e INF LDV (resposta máxima (R_{max} ; % de relaxamento) ao isoproterenol: SHAM: $-82,5 \pm 2,0$; SHAM/ L-NAME: $-40,7 \pm 7,4$ *; INF LDV: $-91,8 \pm 1,4$ *; INF LDV/ L-NAME: $-23,9 \pm 6,8$ #; ANOVA (1 via): * $p < 0,05$ vs. SHAM; # $p < 0,05$ vs. INF LDV).

Figura 10 - Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (LN) sobre a resposta de relaxamento induzida pelo isoproterenol em artérias coronárias septais de ratos SHAM (A) e INF LDV (B).

Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental (n) está entre parênteses. ANOVA (2 vias): * $p < 0,05$ vs. SHAM; # $p < 0,05$ vs. INF LDV. Fonte: Couto (2012).

4.4.6 Resposta de contração à serotonina em artérias coronárias septais de ratos

A resposta vasoconstritora nos anéis de artéria coronária septal de ratos foi avaliada pela contração induzida pela serotonina. A serotonina aumentou, de maneira dependente da concentração, o tônus basal dos anéis de artéria coronária septal de ratos (figura 11). Não foram observadas diferenças significativas na resposta de contração mediada pela serotonina entre as artérias dos animais SHAM e INF LDV (figura 11 e tabela 7).

Figura 11 - Curva concentração-resposta à serotonina em artérias coronárias septais de ratos dos grupos SHAM e INF LDV.

Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental (n) está entre parênteses. ANOVA (2 vias).
Fonte: Couto (2012).

Tabela 7 - Valores de sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) obtidos por meio de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), ao nitroprussiato de sódio (NPS), ao isoproterenol (ISO), ao forskolin (FORS) e à serotonina (SER) nas artérias coronárias septais dos animais SHAM e INF LDV.

	SHAM		INF LDV	
	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}
ACh	$6,14 \pm 0,13$	$-82,8 \pm 1,4 \%$ (11)	$6,65 \pm 0,09^*$	$-90,6 \pm 1,3 \%$ (9) *
NPS	$6,68 \pm 0,17$	$-89,3 \pm 0,6 \%$ (8)	$6,89 \pm 0,15$	$-89,0 \pm 3,7 \%$ (6)
ISO	$7,26 \pm 0,04$	$-82,5 \pm 2,0 \%$ (7)	$7,49 \pm 0,10^*$	$-91,8 \pm 1,4 \%$ (7) *
FORS	$6,21 \pm 0,10$	$-99,8 \pm 1,8 \%$ (8)	$6,13 \pm 0,16$	$-98,9 \pm 0,5 \%$ (7)
SER	$5,45 \pm 0,11$	$1,3 \pm 0,2 \text{ mN/mm}$ (11)	$5,46 \pm 0,15$	$1,5 \pm 0,4 \text{ mN/mm}$ (9)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. Teste-t: * $p < 0,05$ vs. SHAM.

Tabela 8 - Valores de sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) obtidos por meio de curvas concentração-resposta acetilcolina (ACh), ao nitroprussiato de sódio (NPS) e ao isoproterenol (ISO) nas artérias coronárias septais dos animais SHAM e INF SDV.

	SHAM		INF SDV	
	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}
ACh	$6,18 \pm 0,16$	$-80,0 \pm 4,3 \%$ (5)	$6,14 \pm 0,19$	$-53,8 \pm 5,5 \%$ (4) *
NPS	$6,76 \pm 0,15$	$-95,9 \pm 3,7 \%$ (6)	$6,64 \pm 0,08$	$-94,4 \pm 8,9 \%$ (4)
ISO	$7,37 \pm 0,11$	$-89,0 \pm 4,4 \%$ (3)	$7,34 \pm 0,10$	$-62,4 \pm 8,0 \%$ (4) *

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. Teste-t: * $p < 0,05$ vs. SHAM.

Tabela 9 - Valores de sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max} ; %) obtidos por meio de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) na ausência e presença dos inibidores L-NAME (LN), 7-NI ou LY 294002 (LY) nas artérias coronárias septais dos animais SHAM e INF LDV.

	SHAM		INF LDV	
	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}
ACh	$6,14 \pm 0,13$	$-82,8 \pm 1,4 \% (11)$	$6,65 \pm 0,09^*$	$-90,6 \pm 1,3 \% (9)^*$
ACh/ LN	-	$-6,2 \pm 5,8 \% (6)^*$	-	$-11,6 \pm 3,1 \% (5)^{\#}$
ACh/ 7-NI	$5,91 \pm 0,11$	$-75,9 \pm 6,2 \% (9)$	$5,96 \pm 0,10^{\#}$	$-83,8 \pm 2,8 \% (9)^{\#}$
ACh/ LY	$5,83 \pm 0,18$	$-64,3 \pm 5,3 \% (6)^*$	$5,76 \pm 0,17^{\#}$	$-48,8 \pm 6,9 \% (5)^{\#\$}$

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA (1 via): * $p < 0,05$ vs. ACh SHAM; # vs. ACh INF LDV; \$ vs. ACh/ LY SHAM.

4.5 Medida da produção de NO em artérias coronárias septais de ratos

Primeiramente buscou-se avaliar a viabilidade da técnica em detectar a produção de NO em cortes transversais de artérias coronárias septais de ratos SHAM. Como pode ser observada na figura 12A, a fluorescência emitida pelo DAF-2 adicionado aos cortes das artérias coronárias previamente incubadas com L-NAME (10^{-3} M) foi menor quando comparada ao corte controle (Basal), enquanto que, no corte incubado com NPS (3×10^{-6} M), observou-se aumento da fluorescência emitida pelo DAF-2. Assim, este resultado sugere que esta técnica é sensível para determinar a produção de NO.

Na sequência, buscou-se avaliar a produção de NO tanto no basal quanto após a estimulação com acetilcolina nas artérias coronárias dos animais do grupo SHAM, INF LDV e INF SDV. A produção basal de NO não foi alterada nas artérias coronárias septais dos ratos INF LDV quando comparada à produção basal de NO nas coronárias dos ratos SHAM (figura 12B). A estimulação com acetilcolina (10^{-6} M) aumentou a produção de NO nas artérias coronárias do grupo SHAM e INF LDV (figura 12B). No entanto, a magnitude deste aumento foi maior nas artérias coronárias dos animais do grupo INF LDV quando comparada às artérias do grupo SHAM (figuras 12B).

Por sua vez, nas artérias coronárias dos animais do grupo INF SDV, a produção de NO no basal foi reduzida quando comparada à produção basal de NO nas coronárias dos animais SHAM (figuras 12C). A estimulação com acetilcolina (10^{-4} M) aumentou a produção de NO tanto nas artérias coronárias dos animais SHAM quanto nas artérias dos animais INF SDV (figuras 12C). No entanto, a magnitude deste aumento foi menor nas artérias dos animais INF SDV quando comparada às artérias dos animais SHAM (figuras 12C).

Figura 12 - A) Imagens representativas do efeito do L-NAME (10^{-3} M) e do nitroprussiato de sódio (NPS, 3×10^{-6} M) na produção de NO indicado por diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) em cortes de artérias coronárias septais de ratos SHAM. B) Imagens representativas (painel superior) e quantificação (painel inferior) da produção de NO indicado por DAF-2 em cortes de artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV no basal e após a estimulação com acetilcolina (ACh). C) Imagens representativas (painel superior) e quantificação (painel inferior) da produção de NO indicado por DAF-2 em cortes de artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF SDV no basal e após a estimulação com ACh.

A barra de escala representa 50µm. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental está indicado dentro das barras. ANOVA (2 vias): * $p < 0,05$ vs. SHAM Basal; # $p < 0,05$ vs. INF LDV Basal ou INF SDV Basal; + $p < 0,05$ vs. SHAM ACh. Fonte: Couto (2012).

Nas artérias coronárias dos animais SHAM e INF LDV, também foi avaliada a produção de NO após a estimulação com isoproterenol (10^{-5} M). A produção basal de NO não foi diferente entre as artérias dos animais do grupo SHAM e INF LDV (figura 13). A estimulação com isoproterenol aumentou a produção de NO nas artérias coronárias de ambos os grupos, no entanto a magnitude deste aumento foi maior nas artérias coronárias dos animais do grupo INF LDV quando comparada às artérias do grupo SHAM (figura 13).

Figura 13 - Imagens representativas (painel superior) e quantificação (painel inferior) da produção de NO indicado por diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) em cortes de artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV no basal e após a estimulação com isoproterenol (ISO).

A barra de escala representa 50µm. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental está indicado dentro das barras. ANOVA (2 vias): * $p < 0,05$ vs. SHAM Basal; # $p < 0,05$ vs. INF LDV Basal; + $p < 0,05$ vs. SHAM ISO. Fonte: Couto (2012).

4.6 Avaliação das espécies reativas derivadas do oxigênio nas artérias coronárias septais de ratos

Para investigar as espécies reativas derivadas do oxigênio, cortes transversais de artérias coronárias septais dos animais SHAM, INF LDV e INF SDV foram incubados com dihidroetidina (DHE). A DHE, quando oxidada pelas espécies reativas derivadas do oxigênio, resulta em produtos fluorescentes, os quais possuem afinidade pelo DNA nuclear. Desta forma, a quantidade de núcleos corados com os derivados da oxidação da DHE é indicativa da produção de espécies reativas derivadas do oxigênio.

A porcentagem de núcleos corados com os produtos da oxidação da DHE é menor nas artérias coronárias do grupo INF LDV quando comparada às artérias dos animais SHAM (figura 14A e 14B). Por outro lado, esta porcentagem de núcleos corados foi maior nas artérias coronárias dos animais INF SDV, tanto quando comparada a porcentagem dos SHAM quanto a porcentagem dos INF LDV (figura 14A e 14B).

Figura 14 – A) Imagens representativas dos cortes das artérias coronárias septais dos animais SHAM, INF LDV e INF SDV captadas na ausência (painel superior) e presença (painel inferior) do filtro de rodamina. B) Quantificação da densidade de núcleos corados com os produtos fluorescentes provenientes da oxidação da dihidroetidina (DHE) em artérias coronárias septais de ratos SHAM, INF LDV e INF SDV.

A)

B)

A barra de escala representa 50µm. A densidade de núcleos corados com os produtos fluorescentes da oxidação da DHE nas artérias coronárias dos animais infartados (INF LDV e INF SDV) foi normalizada pela densidade de núcleos corados nas artérias dos animais SHAM. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental está indicado dentro das barras. ANOVA (1 via): * $p < 0,05$ vs. SHAM; # $p < 0,05$ vs. INF LDV. Fonte: Couto (2012).

4.7 Expressão protéica da eNOS, nNOS, Akt1/2/3, AMPK α 1/2 e das isoformas da SOD em artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV

Como observado na figura 15, a expressão protéica da eNOS (figura 15A) e da nNOS (figura 15B) foi maior nas artérias coronárias septais do grupo INF LDV quando comparada às artérias dos animais SHAM. Já a expressão protéica da iNOS nas coronárias dos animais SHAM e INF LDV não foi detectada pela técnica utilizada (dados não demonstrados).

Figura 15 - O painel superior demonstra blots representativos da expressão protéica da eNOS (A) e nNOS (B) em artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV, assim como o controle positivo para nNOS, encéfalo de rato (B). O painel inferior representa a análise densitométrica da expressão protéica da eNOS (A) e nNOS (B) em artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV.

A expressão protéica da eNOS e nNOS foram normalizadas pela expressão protéica de α -actina. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental está indicado dentro das barras. Teste-t: * $p < 0,05$ vs. SHAM.

Fonte: Couto (2012).

Como observado na figura 16, a expressão protéica da AMPK α 1/2 (figura 16A) não foi diferente entre as artérias coronárias septais dos animais SHAM e INF LDV. Já a expressão protéica da Akt1/2/3 foi maior nas artérias coronárias septais do grupo INF LDV quando comparada às artérias dos animais SHAM (figura 16B).

Figura 16 - O painel superior demonstra blots representativos da expressão protéica da AMPK α 1/2 (A) e Akt1/2/3 (B) em artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV. O painel inferior representa a análise densitométrica da expressão protéica da AMPK α 1/2 (A) e Akt1/2/3 (B) em artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV.

A expressão protéica da AMPK α 1/2 e Akt1/2/3 foi normalizada pela expressão protéica de α -actina. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental está indicado dentro das barras. Teste-t: * $p < 0,05$ vs. SHAM.

Fonte: Couto (2012).

Como observado na figura 17, a expressões protéicas da EC-SOD (figura 17A), da CuZn-SOD (figura 17B) e da Mn-SOD (figura 17C) foram maiores nas artérias coronárias septais dos animais INF LDV quando comparada às artérias dos animais SHAM.

Figura 17 - O painel superior demonstra blots representativos da expressão protéica da EC-SOD (A), Cu/Zn-SOD (B) e Mn-SOD (C) em artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV. O painel inferior representa a análise densitométrica da expressão protéica EC-SOD (A), Cu/Zn-SOD (B) e Mn-SOD (C) em artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV.

A expressão protéica da EC-SOD, Cu/Zn-SOD e Mn-SOD foram normalizadas pela expressão protéica de α -actina. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental está indicado dentro das barras. Teste-*t*. * $p < 0,05$ vs. SHAM. Fonte: Couto (2012).

4.8 Localização e quantificação da expressão protéica dos subtipos de receptores β -adrenérgicos nas artérias coronárias dos animais SHAM e INF LDV

As artérias coronárias septais dos animais SHAM e INF LDV apresentaram imunorreatividade aos anticorpos anti-receptor β 1-adrenérgico (figura 18A), anti-receptor β 2-adrenérgico (figura 18B) e anti-receptor β 3-adrenérgico (figura 18C).

A expressão protéica do receptor β 1-adrenérgico nas coronárias dos grupos SHAM e INF LDV localizou-se tanto no endotélio quanto nas camadas de células de músculo liso (figura 18A). A expressão protéica do receptor β 2-adrenérgico também foi localizada no endotélio e nas camadas de células de músculo liso, no entanto observa-se predomínio desta expressão nas camadas musculares (figura 18B). Já a expressão protéica do receptor β 3-adrenérgico foi localizada no endotélio e nas camadas de músculo liso vascular, porém observa-se uma preponderância na região endotelial (figura 18C). Os controles negativos dos anticorpos anti-receptor β 1-, anti-receptor β 2-, e anti-receptor β 3-adrenérgico não apresentaram nenhum tipo de marcação.

Não foram observadas diferenças na expressão protéica dos receptores β 1-, β 2- e β 3-adrenérgico entre as coronárias dos animais SHAM e INF LDV (figura 18A, 18B e 18C, respectivamente).

Figura 18 – Localização e expressão dos receptores β -adrenérgicos nas artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV. Imagens representativas (painel superior) e quantificação da expressão (painel inferior) da imunoreatividade para os anticorpos: anti-receptor β 1-adrenérgico (A); anti-receptor β 2-adrenérgico (B); e anti-receptor β 3-adrenérgico (C) em cortes de artérias coronárias septais de ratos SHAM e INF LDV.

A barra de escala representa 50 μ m. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais analisados em cada grupo experimental está indicado dentro das barras. Teste-*t*.

Fonte: Couto (2012).

4.9 Sumário dos resultados

Periféricamente, as artérias de resistência do leito muscular esquelético dos animais INF SDV apresentaram disfunção endotelial; enquanto que a função endotelial está preservada nas artérias dos animais INF LDV. Por outro lado, não se observaram modificações significativas no relaxamento mediado pelo isoproterenol nas artérias de resistência do leito muscular esquelético de ambos os animais infartados (INF LDV e INF SDV). A resposta de contração induzida por altas concentrações de potássio (120 mM) foi reduzida nas artérias de resistência do leito muscular esquelético dos animais INF SDV e INF LDV, enquanto que a resposta contrátil à noradrenalina não foi alterada em ambos os grupos infartados.

Por outro lado, enquanto as coronárias dos animais INF SDV apresentaram disfunção endotelial, caracterizada por redução da modulação nitrérgica associada ao estresse oxidativo; as coronárias dos animais INF LDV apresentaram aumento da função endotelial, caracterizada por aumento da modulação nitrérgica. Este aumento da modulação nitrérgica foi associado à maior ativação da nNOS e da via PI3-quinase/ Akt/ eNOS; assim como redução das espécies reativas de oxigênio, provavelmente em decorrência do aumento do sistema de defesa antioxidante mediado pelas isoformas da SOD (EC-SOD; Mn-SOD e Cu/Zn-SOD). Do mesmo modo, utilizando outro agonista vasodilatador, o isoproterenol (agonista dos receptores β -adrenérgicos), foi observado, nas coronárias dos animais INF SDV, redução do relaxamento mediado pelo isoproterenol; ao passo que, nas coronárias dos animais INF LDV, esta resposta de relaxamento estava aumentada. Este aumento do relaxamento ao isoproterenol nas coronárias dos animais INF LDV também está associado à maior modulação nitrérgica, provavelmente em decorrência de maior ativação das isoformas da NOS (eNOS e nNOS), cujas expressões estão aumentadas após o infarto do miocárdio. Uma vez que não foram observadas nem alterações significativas na densidade de receptores β -adrenérgicos e nem na via de sinalização mediada pela adenilato ciclase. Por sua vez, as respostas contráteis nas artérias coronárias de ambos os animais infartados (INF SDV e INF LDV) não foram alteradas.

5 DISCUSSÃO

O achado original da presente tese é que a reatividade nas artérias coronárias septais, assim como nas artérias de resistência do leito muscular esquelético, foi modulada diferentemente na dependência do estado da função cardíaca pós-infarto do miocárdio.

Os pacientes infartados podem apresentar redução do desempenho cardíaco, o qual pode progredir para a insuficiência cardíaca em decorrência de vários fatores, dentre estes, pode-se citar o tamanho da área de infarto (Amir et al., 2006; White, Chew, 2008; Guazzi et al., 2009). Assim como observado em humanos, a oclusão permanente da artéria coronária em ratos promove disfunção cardíaca em decorrência de infarto do miocárdio, a qual pode evoluir para a insuficiência cardíaca (Pfeffer et al., 1979; Thomas et al., 1998; Gschwend et al., 2003; Pereira et al., 2005; dos Santos et al., 2010). Pfeffer e colaboradores (1979) foram os primeiros pesquisadores a caracterizar a função ventricular neste modelo experimental. Desde então, diversos trabalhos utilizam este modelo para avaliar as repercussões cardíacas e vasculares observadas após o infarto do miocárdio e após a sua progressão para a insuficiência cardíaca.

Pfeffer e colaboradores (1979) observaram que, após 4 semanas do infarto do miocárdio em ratos, somente os animais com grandes áreas de infarto (47-59% da circunferência do ventrículo esquerdo) apresentaram hipertrofia ventricular direita, aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e redução do débito cardíaco, características estas presentes na insuficiência cardíaca; enquanto que os animais com pequenas (4-30% da circunferência do ventrículo esquerdo) e médias (31-46% da circunferência do ventrículo esquerdo) áreas de infarto apresentaram hemodinâmica ventricular similar aos animais SHAM. Este mesmo padrão de resposta foi observado por dos Santos e colaboradores (2010), no qual o desempenho cardíaco após o infarto do miocárdio em ratos está na dependência do tamanho da área infartada.

No entanto, neste mesmo modelo experimental, Pereira e colaboradores (2005) descreveram que, 4 semanas após o infarto do miocárdio, os animais infartados se subdividiam naturalmente em dois grupos, apesar de apresentarem a

mesma área de infarto (aproximadamente 30% da área do ventrículo esquerdo). Um grupo de animais apresentava sinais de insuficiência cardíaca como: (1) aumento da relação peso pulmão/ peso corporal e da relação peso do ventrículo direito/ peso corporal; (2) disfunção do ventrículo esquerdo, caracterizada por redução da pressão sistólica do ventrículo esquerdo, da derivada de pressão sobre a derivada de tempo positiva ($dP/dt +$) e negativa ($dP/dt -$), e por aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; e (3) redução da pressão arterial sistólica. No entanto, um segundo grupo de animais, apesar de apresentar a mesma área de infarto, não demonstrava as características de insuficiência cardíaca e eram caracterizados por: (1) valores normais da relação peso pulmão/ peso corporal e da relação peso do ventrículo direito/ peso corporal; (2) função ventricular em níveis normais; e (3) aumento da pressão arterial sistólica e diastólica. Logo, baseado nestes trabalhos, pode-se concluir que, após a oclusão permanente da artéria coronária em ratos, os animais infartados apresentam distintos desempenhos cardíacos e, portanto, uma avaliação criteriosa deve ser abordada ao estudar este modelo experimental (Pfeffer et al., 1979; Thomas et al., 1998; Gschwend et al., 2003; Pereira et al., 2005; dos Santos et al., 2010).

Conforme descrito na introdução da presente tese, o infarto do miocárdio ocorre quando uma isquemia prolongada leva a dano irreversível na célula miocárdica com consequente necrose (Opie, 2004b; Antman, Braunwald, 2005; Amin, 2006; Gheorghiade, Forarow, 2007; White, Chew, 2008). Na presença de um distúrbio primário do desempenho cardíaco, como observado após o infarto do miocárdio, o organismo aciona diversos mecanismos de ajustes de modo a manterem a função de bomba do coração e, conseqüentemente, o débito cardíaco e a perfusão tecidual (McAlpine et al., 1988; Cleland et al., 1996; Schrier, Abraham, 1999; Francis et al., 2001; Opie, 2004b; Antman, Braunwald, 2005). Dentre estes mecanismos, os mais importantes são: mecanismo de Frank-Starling; ativação de sistemas neurohumorais; e o remodelamento do miocárdio (McAlpine et al., 1988; Cleland et al., 1996; Schrier, Abraham, 1999; Francis et al., 2001; Gaballa, Goldman, 2002; Opie, 2004b; Antman, Braunwald, 2005).

O remodelamento após o infarto do miocárdio é caracterizado por hipertrofia ventricular, a qual envolve ambos os ventrículos (Rubin et al., 1983; Anversa et al.,

1985; Francis et al., 2001; Gaballa, Goldman, 2002; Babick, Dhalla, 2007). Deste modo, no modelo experimental de ratos com infarto do miocárdio induzido por oclusão permanente da artéria coronária, tem-se extensivamente demonstrado a presença de hipertrofia ventricular direita por meio da razão peso do ventrículo direito pelo peso corporal (Pfeffer et al., 1979; Litwin et al., 1991; Teerlink et al., 1994; Mill et al., 1994, 1998; Thomas et al., 1998; Pereira et al., 2005; dos Santos et al., 2010). Ao encontro destes trabalhos, na presente tese, tanto os animais INF LDV quanto os animais INF SDV apresentaram hipertrofia do ventrículo direito (avaliada pela razão peso do ventrículo direito pelo comprimento da tíbia), a qual foi de maior magnitude nos animais INF SDV. No entanto, utilizando-se a razão do peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal, a maioria dos trabalhos não detecta a hipertrofia dos miócitos remanescentes no ventrículo esquerdo, provavelmente devido à grande área de necrose observada no ventrículo esquerdo após o infarto do miocárdio (Pfeffer et al., 1979; Litwin et al., 1991; Mill et al., 1994, 1998; Pereira et al., 2005). Na presente tese, a razão peso do ventrículo esquerdo pelo comprimento da tíbia foi reduzida em ambos os animais infartados (INF LDV e INF SDV), possivelmente em decorrência da grande área de necrose no ventrículo esquerdo.

Esta hipertrofia pós-infarto do miocárdio inicialmente parece ser um processo benéfico para compensar a perda dos miócitos ventriculares, assim como um importante mecanismo para a manutenção da força contrátil dos ventrículos e, conseqüentemente, de manutenção do débito cardíaco (Rubin et al., 1983; Anversa et al., 1985; Francis et al., 2001; Gaballa, Goldman, 2002; Babick, Dhalla, 2007). No entanto, a crônica sobrecarga do miocárdio não-infartado e a crônica ativação dos sistemas neurohumorais promovem disfunções contráteis nos miócitos hipertrofiados, as quais, no ventrículo esquerdo, leva à redução dos índices de contratilidade ($dP/dt +$) e relaxamento ($dP/dt -$) ventricular; redução da PSVE; e induz aumento da PDfVE como resultado do aumento do volume diastólico final (Pfeffer et al., 1979; DeFelice et al., 1989; Teerlink et al., 1993; Mill et al., 1994; Bauersachs et al., 1999; Pereira et al., 2005; Antonio et al., 2009; dos Santos et al., 2010). Na presente tese, os animais do grupo INF LDV apresentaram disfunção contrátil avaliada pela redução da $dP/dt +$ e da PSVE, assim como aumento da PDfVE. Já os

animais do grupo INF SDV apresentaram um pior desempenho cardíaco do que o observado nos animais INF LDV, caracterizado por maior redução da $dP/dt +$, pela redução da PSVE e pela redução da $dP/dt -$, assim como pelo maior aumento da PDfVE tanto em relação aos animais SHAM quando em relação aos animais INF LDV.

Sabe-se que a disfunção ventricular severa, tal como a observada na insuficiência cardíaca, pode levar a redução do volume sistólico e do débito cardíaco, assim como ao aumento do volume e da pressão nos átrios, no sistema venoso e nos capilares (Pfeffer et al., 1979; Givertz et al., 2005). O aumento das pressões nos capilares induz aumento da permeabilidade de fluidos dos leitos capilares para o espaço intersticial (Givertz et al., 2005). Este aumento da permeabilidade capilar, no pulmão, gera o edema pulmonar e, no fígado, gera o edema hepático (Givertz et al., 2005).

Na presente tese, os animais do grupo INF LDV não apresentaram vestígios de edema pulmonar ou hepático. Já os animais INF SDV apresentaram edema hepático, no entanto não foi observado alteração no teor de água presente no pulmão. Outros trabalhos na literatura demonstraram a presença de edema pulmonar em ratos com insuficiência cardíaca após o infarto do miocárdio (Francis et al., 2001; Pereira et al., 2005, Fraccarollo et al., 2008; Antonio et al., 2009; dos Santos et al., 2010; Machackova et al., 2010). Observando-se que os animais do grupo INF SDV desenvolveram somente edema hepático, uma possível explicação seria que a ausência de edema pulmonar seja em decorrência de disfunção ventricular direita nestes animais. Deste modo, é provável que a presença de disfunção ventricular direita nos animais INF SDV poderia reduzir a sobrecarga pressórica no leito pulmonar, reduzindo, assim, o extravasamento de fluidos neste leito e, conseqüentemente, o edema pulmonar. No entanto, na presente tese, esta hipótese não pôde ser confirmada, pois não foram avaliadas as medidas hemodinâmicas no ventrículo direito.

Associada às alterações cardíacas, após o infarto do miocárdio e na insuficiência cardíaca, também se observam alterações na função vascular de pacientes. Neste sentido, existem relatos na literatura da presença de disfunção endotelial nas artérias que irrigam a musculatura esquelética e nas artérias coronárias de pacientes infartados e de pacientes com insuficiência cardíaca (Mohri et al., 1997; Fischer et al., 2005; Katz et al., 2005; Poelz et al., 2005; Santos et al., 2005; Amir et al., 2006; Guazzi et al., 2009; Shechter et al., 2009).

Assim como observado em humanos, prévios trabalhos na literatura têm demonstrado a presença de disfunção endotelial em artérias de condutância no modelo de insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio em ratos (Teerlink et al., 1993; Bauersachs et al., 1999; 2001; 2002; Indik et al., 2001; Schäfer et al., 2004; Thai et al., 2007; Fraccarollo et al., 2008). No entanto, diferente do observado para as artérias de condutância, ainda não é consenso na literatura a presença de disfunção endotelial em vasos de resistência após o infarto do miocárdio e na sua progressão para a insuficiência cardíaca. Neste sentido, tem-se demonstrado que, após a instalação da insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio em ratos, o relaxamento dependente do endotélio pode estar reduzido (Thuillez et al., 1995; Mulder et al., 1995; 1996; Didion, Mayham, 1997; Gaballa, Goldman, 1999; Varin et al., 1999; 2000; Wang et al., 2010) ou inalterado (Baggia et al., 1997; Prior et al., 1998; Trautner et al., 2006; Xu et al., 2007) em artérias periféricas de resistência, tais como nas artérias de resistência do leito mesentérico e muscular esquelético. Do mesmo modo, nas artérias coronárias de ratos infartados o relaxamento dependente do endotélio pode estar reduzido (Berges et al., 2005; Mulder et al., 2008) ou inalterado (Ueda et al., 2005). Assim, sugere-se que esta discrepância de relatos da literatura pode ser devido às distintas fases da disfunção cardíaca pós-infarto do miocárdio em ratos. Conforme mencionado anteriormente, após a oclusão permanente da artéria coronária em ratos, observa-se grande variabilidade da área de infarto e, conseqüentemente, da severidade da disfunção cardíaca (Pfeffer et al., 1979; Thomas et al., 1998; Gschwend et al., 2003; Pereira et al., 2005; dos Santos et al., 2010), o que poderia levar a diferentes ajustes vasculares. Portanto, uma avaliação criteriosa deve ser abordada ao se estudar a

função vascular em decorrência do infarto do miocárdio por oclusão da artéria coronária em ratos.

Baseado em tais fatos descritos acima, buscou-se avaliar, na presente tese, a função endotelial em artérias de resistência do leito muscular esquelético e em artérias coronárias septais de ratos com distintos desempenhos cardíacos pós-infarto do miocárdio.

Observou-se, na presente tese, que as artérias de resistência do leito muscular esquelético e as artérias coronárias dos animais INF SDV apresentaram redução do relaxamento dependente do endotélio mediado pela acetilcolina, enquanto que o relaxamento independente do endotélio não foi alterado, o que caracteriza a presença de disfunção endotelial nestas artérias. Estes resultados vão ao encontro de prévios trabalhos na literatura os quais demonstraram a presença de disfunção endotelial em artérias do músculo esquelético (Mulder et al., 1996; Didion, Mayham, 1997; Gaballa, Goldman, 1999; Varin et al., 1999; 2000) e em coronárias (Berges et al., 2005; Mulder et al., 2008) de ratos pós-infarto do miocárdio. Além disso, em outros modelos experimentais de insuficiência cardíaca (Wang et al., 1994; Sun et al., 2000; Grieve et al., 2001; Chen et al., 2005) e em pacientes com insuficiência cardíaca (Treasure et al., 1990; Holdright et al., 1994; Inoue et al., 1994; Mohri et al., 1997; Landmesser et al., 2002; Fischer et al., 2005; Poelz et al., 2005; Santos et al., 2005; Bitar et al., 2006) também se tem observado a presença de disfunção endotelial nas artérias do músculo esquelético e em coronárias.

Sabe-se que o endotélio, por meio de liberação de EDCF e EDRF, é capaz de modular o tônus vascular e, conseqüentemente, a perfusão tecidual (Vanhoutte, 1996; Gryglewski, 2005; Vanhoutte et al., 2009). Assim, como observado na presente tese, a presença de disfunção endotelial nas artérias coronárias dos animais INF SDV poderia prejudicar a perfusão e, conseqüentemente, a nutrição para o tecido cardíaco não-infartado, agravando, ainda mais, o desempenho cardíaco após o infarto do miocárdio. Já nas artérias de resistência da musculatura esquelética, a presença de disfunção endotelial poderia contribuir para o aumento da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, da pós-carga contra a qual o coração, já prejudicado em decorrência do infarto do miocárdio, terá que ejetar sangue. Além disso, a presença de disfunção endotelial nas artérias de resistência

do leito muscular esquelético pode levar à redução da perfusão para a musculatura esquelética, o que poderia estar envolvido na gênese da fadiga muscular esquelética observada em casos de falência cardíaca, tais como na insuficiência cardíaca.

Diferente do observado para as artérias de resistência do músculo esquelético dos animais INF SDV, nos animais INF LSV, a função endotelial nestas artérias foi preservada. Por outro lado, na presente tese, foi observado, pela primeira vez na literatura, que as artérias coronárias dos animais INF LDV apresentaram aumento da função endotelial, caracterizada por aumento no relaxamento dependente do endotélio, enquanto que o relaxamento independente do endotélio foi preservado. Este aumento da função endotelial pode ser um mecanismo de ajuste vascular importante, de modo a favorecer melhor perfusão para o miocárdio remanescente, o qual se encontra hipertrofiado após o infarto do miocárdio. Entretanto, é provável que o acionamento deste mecanismo de compensação seja uma especificidade das artérias coronárias, provavelmente por um mecanismo de ação local, uma vez que a função endotelial não foi modificada nas artérias de resistência do músculo esquelético dos animais INF LDV.

Existem relatos na literatura de que, nas artérias coronárias, a acetilcolina induz relaxamento principalmente por meio da síntese e liberação de NO após ativação dos receptores muscarínicos nas células endoteliais (Amezcueta et al., 1989; Chu et al., 1991; García et al., 1992; Parent et al., 1992, 1996; Smith et al., 1993; Altman et al., 1994; Tschudi et al., 1994; Muramatsu et al., 1994; Fernández et al., 2000; Vásquez-Pérez et al., 2001). Sabendo que as artérias coronárias dos animais INF SDV apresentaram disfunção endotelial, enquanto que as artérias coronárias dos animais INF LDV apresentaram aumento da função endotelial, foi avaliada a produção de NO, antes e após a estimulação com acetilcolina, em cortes transversais de artérias coronárias dos animais SHAM, INF LDV e INF SDV por meio da sonda fluorescente DAF-2.

Nas artérias coronárias dos animais IND SDV a produção de NO foi reduzida, o que sugere que a disfunção endotelial nas coronárias dos animais INF SDV é decorrente de menor modulação nitrérgica. Corroborando o presente resultado, em vasos periféricos deste mesmo modelo experimental, como a aorta, tem-se observado disfunção endotelial, caracterizada por redução da modulação nitrérgica

(Bauersaches et al., 1999; 2001; 2002; Indik et al., 2001; Gschwend et al., 2003; Schäfer et al., 2003; 2004; Thai et al., 2007; Fraccarollo et al., 2008). Nestes trabalhos a redução da modulação nitrérgica foi associada à menor síntese (Schäfer et al., 2004; Fraccarollo et al., 2008) e/ou menor biodisponibilidade de NO, provavelmente devido ao estresse oxidativo observado nestas artérias (Bauersaches et al., 1999; 2001; 2002; Indik et al., 2001; Schäfer et al., 2004; Fraccarollo et al., 2008). De fato, na presente tese, utilizando o método da DHE em cortes transversais de artérias coronárias septais, foi observado aumento das espécies reativas de oxigênio nas artérias coronárias dos animais INF SDV. Assim, nas coronárias dos animais INF SDV a disfunção endotelial, caracterizada por redução da modulação nitrérgica, está associada ao estresse oxidativo.

Por outro lado, na presente tese, foi observada que a produção de NO foi aumentada nas coronárias dos animais INF LDV quando comparada à produção nas coronárias dos SHAM. Assim, pode-se concluir que o aumento da função endotelial nas coronárias dos animais INF LDV é devido à maior modulação nitrérgica (maior síntese e/ou biodisponibilidade de NO). Conforme mencionado anteriormente, o estresse oxidativo tem papel fundamental na disfunção endotelial observada em vasos de condutância após o infarto do miocárdio, uma vez que o ânion superóxido, por reagir rapidamente com o NO, reduz a biodisponibilidade do NO (Bauersaches et al., 1999; 2001; 2002; Indik et al., 2001; Schäfer et al., 2004; Fraccarollo et al., 2008). Porém, outro fato inédito observado na presente tese é que as artérias coronárias dos animais INF LDV, associado ao aumento da modulação nitrérgica, apresentaram redução das espécies reativas de oxigênio pelo método da DHE.

Existem relatos na literatura de que o aumento da defesa antioxidante, com consequente redução das espécies reativas de oxigênio, está envolvido na prevenção da disfunção endotelial após o infarto do miocárdio (Miller et al., 2010; Lida et al., 2005). Neste sentido, Miller e colaboradores (2010) demonstraram que, após o infarto do miocárdio em camundongos fêmeas, observa-se aumento da expressão gênica de todas as isoformas da SOD na aorta, assim como aumento da expressão gênica da eNOS. Como neste trabalho o relaxamento dependente do endotélio na aorta não foi alterado, os autores especularam que o aumento da expressão da eNOS e das isoformas da SOD poderia ter auxiliado na proteção da

disfunção endotelial observada após o infarto do miocárdio em camundongos fêmeas (Miller et al., 2010). Além disso, Lida e colaboradores (2005) demonstraram que o aumento da defesa antioxidante via transferência gênica da EC-SOD reverte a disfunção endotelial e reduz o aumento do ânion superóxido na aorta e na artéria mesentérica superior de ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio. Em conjunto, estes trabalhos demonstram a importante função da defesa antioxidante mediada pela SOD na preservação da função endotelial após o infarto do miocárdio. Por outro lado, a redução da atividade da SOD está envolvida na disfunção endotelial observada na aorta de ratos infartados (Indik et al., 2001) e em artérias de pacientes com insuficiência cardíaca (Landmesser et al., 2002).

Na presente tese, a expressão protéica das isoformas da SOD (EC-SOD, Cu/Zn-SOD e Mn-SOD) foi aumentada nas coronárias dos animais INF LDV. Este resultado sugere o possível envolvimento da defesa antioxidante mediada pelas isoformas da SOD na inibição da oxidação do NO pelo ânion superóxido e, portanto, o possível envolvimento destas isoformas da SOD na maior biodisponibilidade do NO observada nas coronárias dos animais INF LDV.

Baseado nestes resultados, pode-se inferir que o aumento da modulação nitrérgica nas coronárias dos animais INF LDV pode ser um possível mecanismo envolvido na prevenção da instalação de um pior desempenho cardíaco após o infarto do miocárdio. Deste modo, focou-se o presente estudo na elucidação dos mecanismos envolvidos neste aumento da modulação nitrérgica nas coronárias dos animais INF LDV.

Primeiramente, foi demonstrada, funcionalmente, a maior modulação nitrérgica na resposta de relaxamento à acetilcolina nas coronárias dos animais INF LDV por meio da curva concentração-resposta à acetilcolina na presença do inibidor não seletivo da sintase de óxido nítrico (NOS), o L-NAME. A incubação com L-NAME promoveu inibição no relaxamento à acetilcolina de maior magnitude nas coronárias dos animais INF LDV quando comparado à inibição nas coronárias dos animais SHAM. Associado ao aumento da modulação nitrérgica, as artérias coronárias dos animais INF LDV apresentaram aumento da expressão protéica das isoformas endotelial e neuronal da NOS (eNOS e nNOS, respectivamente). Já a expressão

protéica da isoforma induzível da NOS (iNOS) não foi detectada pela técnica utilizada.

A presente tese foi pioneira em demonstrar aumento da expressão protéica da nNOS em artérias de ratos após o infarto do miocárdio e, para avaliar funcionalmente o envolvimento do NO proveniente da nNOS no relaxamento à acetilcolina, foi realizada curva concentração-resposta à acetilcolina na presença do inibidor seletivo da nNOS, o 7-NI. A incubação com 7-NI reduziu a resposta de relaxamento à acetilcolina somente nas coronárias dos animais INF LDV quando comparada às coronárias dos SHAM, o que sugere a presença de maior modulação nitrérgica via ativação da isoforma neuronal da NOS nas coronárias dos animais INF LDV. No entanto, cabe ressaltar que, embora a nNOS esteja envolvida na síntese de NO (Alderton et al., 2001; Chen, Popel, 2007; Zhou, Zhu, 2009; Förstermann, Sessa, 2011), outros trabalhos também relatam a importante contribuição da nNOS na geração de peróxido de hidrogênio (Tsai et al., 2005; Weaver et al., 2005; Capettini et al., 2008; 2010), o qual, nas células de músculo liso vascular das artérias coronárias, induz relaxamento principalmente via abertura de canais para potássio ativados por cálcio e hiperpolarização da musculatura lisa (Barlow, Wite, 1998; Barlow et al., 2000; Yada et al., 2003; Miura et al., 2003; Shimokawa, Matoba, 2004). Logo, não se pode excluir a hipótese de que, nas artérias coronárias dos animais INF LDV, o aumento da função endotelial pode ser, pelo menos em parte, devido à maior síntese de peróxido de hidrogênio proveniente da nNOS.

Por sua vez, existem relatos na literatura de que, enquanto a expressão da iNOS somente é modificada nas artérias em uma fase aguda após o infarto do miocárdio (Bauersachs et al., 1999; Sartório et al., 2005; Berges et al., 2007), a expressão da eNOS, nos vasos arteriais, pode estar reduzida ou até mesmo aumentada (Comini et al., 1996; Smith et al., 1996; Bauersachs et al., 1999; Varin et al., 1999; Gaballa, Goldman, 1999; Berges et al., 2005; Fraccarollo et al., 2008) após o infarto do miocárdio, assim como em outros modelos de cardiomiopatia. Neste sentido, existem relatos de que a expressão protéica da eNOS está reduzida na aorta de cães com insuficiência cardíaca induzida por marcapasso ectópico (Smith et al., 1996), assim como na aorta de ratos com insuficiência cardíaca induzida por monocromalina (Comini et al., 1996). No modelo experimental de ratos com

insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio, também foi observada redução da expressão protéica e gênica da eNOS em artérias da musculatura esquelética (Gaballa, Goldman, 1999; Varin et al., 1999) e na aorta (Fraccarollo et al., 2008). Nestes trabalhos, a redução da expressão da eNOS foi associada à redução do relaxamento dependente do endotélio (Gaballa, Goldman, 1999; Varin et al., 1999; Fraccarollo et al., 2008).

Por outro lado, o aumento da expressão protéica da eNOS e o consequente aumento da síntese de NO, nas células endoteliais, demonstrou exercer efeito cardioprotetor após o infarto do miocárdio em ratos e camundongos, impedindo, assim, o desenvolvimento da falência cardíaca neste modelo experimental (Jones et al., 2003; Fraccarollo et al., 2008). Jones e colaboradores (2003) demonstraram que os camundongos transgênicos que super-expressam eNOS apresentaram menor mortalidade após o infarto do miocárdio, assim como aumento do débito cardíaco e da fração de ejeção quando comparados aos animais controles infartados. Já o aumento da expressão protéica da eNOS por meio do tratamento farmacológico com AVE 9488, um composto que aumenta a expressão da eNOS e, consequentemente, a liberação de NO, foi capaz de restaurar a redução do relaxamento mediado pela acetilcolina, o qual era previamente observado na aorta de ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio, assim como também foi capaz de melhorar a função contrátil e o remodelamento cardíaco nestes animais (Fraccarollo et al., 2008).

Além disso, embora ainda não haja relatos na literatura da expressão da nNOS nos vasos arteriais após o infarto do miocárdio, recentes trabalhos sugerem o efeito cardioprotetor da nNOS após o infarto do miocárdio em camundongos, uma vez que os camundongos com deleção gênica da nNOS apresentaram um pior desempenho cardíaco e aumento da mortalidade após o infarto do miocárdio (Saraiva et al., 2005; Burger et al., 2009).

Assim, com os resultados obtidos na presente tese, pode-se inferir que o aumento da expressão protéica da eNOS e nNOS nas artérias coronárias dos animais INF LDV promove aumento da liberação de NO quando estas artérias são estimuladas, o qual poderia favorecer a perfusão e, consequentemente, manter

adequada nutrição para o miocárdio remanescente hipertrofiado, prevenindo, assim, a instalação de um pior desempenho cardíaco pós-infarto do miocárdio.

Na sequência, buscou-se elucidar os mecanismos intracelulares pelos quais a acetilcolina, via ativação da eNOS, induz aumento da modulação nitrérgica nas artérias coronárias dos animais INF LDV. Para tal, primeiramente, foi avaliada a expressão protéica da AMPK e da Akt, uma vez que, como mencionado na introdução da presente tese, as vias de sinalização destas quinases são capazes de modular a atividade da eNOS por meio da fosforilação dos sítios de ativação da eNOS (Chen et al., 1999; Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999; Michel et al., 2001; Fleming 2010). Na presente tese, enquanto que a expressão protéica da AMPK não foi diferente entre as coronárias dos animais SHAM e INF LDV, a expressão protéica da Akt foi maior nas coronárias dos animais INF LDV quando comparado às coronárias dos animais SHAM.

Sabendo que, nos tecidos vasculares, a ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-quinase) fosforila a Akt, a qual diretamente fosforila a eNOS nos sítios de ativação (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999) e sabendo que a incubação com acetilcolina promove relaxamento por meio da ativação da via PI3-quinase/ Akt/ eNOS em artérias (Kitayama et al., 2000; Zecchin et al., 2007; Wang et al., 2010), na presente tese, buscou-se comprovar funcionalmente o envolvimento da via PI3-quinase/ Akt no relaxamento à acetilcolina nas coronárias dos animais SHAM e INF LDV. Para isto, foi realizada, nas artérias coronárias, uma curva concentração-resposta à acetilcolina na presença do inibidor da PI3-quinase, o LY 294002. A incubação com LY 294002 promoveu inibição no relaxamento à acetilcolina de maior magnitude nas coronárias dos animais INF LDV quando comparado à inibição nas coronárias dos animais SHAM, o que demonstra, pela primeira vez, maior envolvimento desta via no relaxamento à acetilcolina nas coronárias dos animais INF LDV.

De encontro aos resultados obtidos na presente tese, Wang e colaboradores (2010), observaram, na artéria de resistência do leito mesentérico de ratos infartados, que a redução do relaxamento mediado pela acetilcolina foi devido à menor ativação da via PI3-quinase/ Akt/ eNOS. Por outro lado, o exercício físico foi capaz de restaurar a disfunção endotelial nestas artérias por aumentar a ativação da

via PI3-quinase/ Akt/ eNOS, o que sugere o importante envolvimento desta via de sinalização na preservação da função endotelial após o infarto do miocárdio (Wang et al., 2010).

Assim, como conclusão parcial tem-se que as artérias coronárias dos animais INF LDV apresentaram aumento da modulação nitrérgica devido à maior síntese de NO em decorrência de maior ativação da nNOS e da via PI3-quinase/ Akt/ eNOS. Além disso, também foi observado nas coronárias dos animais INF LDV redução das espécies reativas de oxigênio, provavelmente decorrente do aumento da defesa antioxidante mediada pelas isoformas da SOD e, portanto, além da maior síntese de NO, o aumento da modulação nitrérgica também foi decorrente de maior biodisponibilidade de NO.

Conforme descrito anteriormente, é bem demonstrado que após o infarto do miocárdio, observa-se a ativação de sistemas neurohumorais, tais como o sistema nervoso simpático (McAlpine et al., 1988; Cleland et al., 1996; Schrier, Abraham, 1999; Francis et al., 2001; Gaballa, Goldman, 2002; Opie, 2004b; Antman, Braunwald, 2005). O sistema nervoso simpático é capaz de modular o tônus vascular pela ação das catecolaminas nos receptores α - e β -adrenérgicos (Guimarães, Moura 2001; Davis et al., 2008). No entanto, tanto as artérias de resistência do músculo esquelético quanto as artérias coronárias possuem grande densidade de receptores β -adrenérgicos (Komaru et al., 2000; Guimarães, Moura 2001; Davis et al., 2008; Barbato, 2009). Sendo assim, na presente tese, também se buscou avaliar o relaxamento mediado pela ativação dos receptores β -adrenérgicos nas artérias coronárias septais e nas artérias de resistência do músculo esquelético de ratos infartados (grupos INF LDV e INF SDV) e SHAM operados.

Os receptores β -adrenérgicos estão localizados tanto nas células endoteliais quanto nas células de músculo liso vascular (Rubany, Vanhoutte 1986; Kamata et al., 1989; Akimoto et al., 2002; Ferro et al., 2004; Briones et al., 2005; Mallen et al., 2005; Figueroa et al., 2009). Nas células endoteliais, a ativação dos receptores β -adrenérgicos induz vasodilatação mediada, principalmente, pela síntese de NO, via ativação tanto da PKA como da Akt (Blankesteyn, Thien, 1993; Parent et al., 1993; Dawes et al., 1997; Ming et al., 1997; Xu et al., 2000; Akimoto et al., 2002; Ferro et

al., 2004; Fernández et al., 2000; Figueroa et al., 2009). Já nas células de músculo liso vascular, a estimulação do receptor β -adrenérgico promove vasodilatação pela ativação da via adenilato ciclase/ AMPc/ PKA, a qual promove hiperpolarização e diminui a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (Rembold, Chen, 1998; Ferro et al., 2004).

Nas artérias coronárias dos animais INF SDV, foi observada redução do relaxamento mediado pelo isoproterenol. Sabendo que após o infarto do miocárdio observa-se uma hiperatividade simpática, a redução do relaxamento mediado pela ativação dos receptores β -adrenérgicos nas coronárias dos animais INF SDV, associada à presença de disfunção endotelial, pode ser mais um mecanismo vasodilatador prejudicado o que agravaria, ainda mais, a perfusão para o miócito remanescente. No entanto, nas artérias de resistência do leito muscular esquelético destes animais, o relaxamento mediado pelo isoproterenol foi preservado, o que sugere que a disfunção dos receptores β -adrenérgicos vascular nos animais INF SDV está na dependência do leito vascular estudado.

Existem relatos na literatura de que o relaxamento mediado pela ativação dos receptores β -adrenérgicos está preservado nas artérias da musculatura esquelética de ratos com insuficiência cardíaca após o infarto do miocárdio (Mulder et al., 1997) e de cães com insuficiência cardíaca induzida por marcapasso ectópico (Frey et al., 1989). Enquanto que, na aorta e na artéria pulmonar de ratos com insuficiência induzida por infarto do miocárdio (Nasa et al., 1996; Toyoshima et al., 1998; Gaballa et al., 2001; Spooner et al., 2004), assim como, na artéria pulmonar e na artéria coronária de cães com insuficiência cardíaca induzida por marcapasso ectópico (Mathew et al., 1993; Larosa, Foster, 1996), observa-se redução do relaxamento mediado pela ativação dos receptores β -adrenérgicos.

Por outro lado, na presente tese, foi demonstrado pela primeira vez na literatura, que as artérias coronárias dos animais do grupo INF LDV apresentaram aumento do relaxamento mediado pela ativação dos receptores β -adrenérgicos, associado ao aumento da função endotelial. Logo, o aumento do relaxamento mediado pela ativação dos receptores β -adrenérgicos pode ser outro importante mecanismo de ajuste vascular compensatório de modo a aumentar o fluxo coronariano e, assim, manter uma adequada perfusão para o miocárdio não-

infartado. Já nas artérias de resistência do leito muscular esquelético dos animais do grupo INF LDV, não foi observada alteração na resposta de relaxamento mediada pelo isoproterenol, o que reforça a hipótese de que o acionamento dos mecanismos de ajustes vasculares compensatórios, observado nos animais INF LDV, é uma especificidade das artérias coronárias.

Até o presente momento, tem-se descrito que a redução do relaxamento mediada pela ativação dos receptores β -adrenérgicos, observada nas artérias dos modelos experimentais de infarto do miocárdio e de insuficiência cardíaca, está associada a: (1) a redução na densidade de receptores β -adrenérgicos ao mesmo tempo em que há aumento dos níveis da quinase do receptor β -adrenérgico (β ARK), a qual fosforila o receptor β -adrenérgico e, assim, promove desensibilização do mesmo (Kiuchi et al., 1993; Gaballa et al., 2001); (2) a presença de prejuízo na via de sinalização dos receptores β -adrenérgicos, avaliada pela redução do relaxamento ao NKH477 (um análogo do forskolin solúvel em água) (Nasa et al., 1996; Toyoshima et al., 1998); e (3) a menor participação do NO no relaxamento mediado pelo isoproterenol (Nasa et al., 1996; Toyoshima et al., 1998).

Sabendo que, nas coronárias dos animais INF LDV, o aumento do relaxamento mediado isoproterenol pode ser outro importante mecanismo de ajuste compensatório, o qual poderia estar envolvido na prevenção do agravamento do desempenho cardíaco após o infarto do miocárdio, na presente tese, buscou-se avaliar os possíveis mecanismos envolvidos neste aumento da função β -adrenérgica.

Como o relaxamento mediado pelo ativador da adenilato ciclase, o forskolin, não foi diferente entre as coronárias dos animais SHAM e INF LDV, pode-se concluir que este aumento do relaxamento ao isoproterenol, observado nas coronárias dos animais INF LDV, não ocorreu em decorrência da potencialização da cascata de sinalização mediada pela adenilato ciclase. Além disso, por meio da técnica de imunohistoquímica, não foram observadas diferenças na expressão e localização dos receptores β -adrenérgicos entre as artérias coronárias dos animais SHAM e INF LDV. No entanto, foi observada maior modulação nitrérgica na resposta de relaxamento ao isoproterenol nas coronárias dos animais INF LDV, uma vez que a incubação com L-NAME promoveu inibição no relaxamento ao isoproterenol de

maior magnitude nas coronárias dos animais INF LDV quando comparado à inibição nas coronárias dos animais SHAM. Ao encontro dos resultados funcionais, por meio da incubação de cortes transversais de artérias coronárias com a sonda fluorescente DAF-2, foi possível confirmar que o fator de relaxamento envolvido no aumento da vasodilatação ao isoproterenol era o NO, já que, após a estimulação com isoproterenol, a liberação de NO foi maior nas coronárias dos animais INF LDV quando comparada às coronárias dos SHAM.

Assim, sabendo da importante função dos receptores β -adrenérgicos na modulação do tônus das artérias coronárias (Komaru et al., 2000; Barbato, 2009), pode-se especular que o aumento da resposta vasodilatadora induzida pela estimulação dos receptores β -adrenérgicos nos animais INF LDV ocorreu devido à maior modulação nitrérgica, provavelmente em decorrência da maior ativação da eNOS e nNOS, uma vez que, como relatado anteriormente, estas isoformas da NOS estão aumentadas nas coronárias dos animais INF LDV. Este aumento do relaxamento mediado pela estimulação dos receptores β -adrenérgicos nas coronárias dos animais INF LDV poderia contribuir para uma maior vasodilatação, principalmente mediada pelas catecolaminas endógenas, e assim levar a uma melhora do fluxo sanguíneo para o miocárdio não-infartado.

A presença de mecanismos de ajustes vasculares compensatórios também foi relatada em coronárias de cobaias com cardiomiopatia induzida por coarctação da aorta, em uma fase da doença que precede a instalação da insuficiência cardíaca neste modelo (Grieve et al., 2001). Grieve e colaboradores (2001) observaram aumento do NO basal nas coronárias de cobaias após 3 semanas da coarctação da aorta, fase na qual os animais apresentaram hipertrofia ventricular esquerda sem disfunção cardíaca. No entanto, este aumento da modulação nitrérgica não foi observado 8-10 semanas após a coarctação da aorta, fase na qual os animais apresentavam, além da hipertrofia cardíaca, sinais de insuficiência cardíaca, tais como edema pulmonar, redução da $dP/dt +$ e do trabalho cardíaco (Grieve et al., 2001). Além disso, enquanto que o relaxamento mediado bradicinina e pelo doador de NO foi preservado nas artérias coronárias de cobaias com 3 semanas após a coarctação da aorta, estas respostas de relaxamento foram reduzidas nas

coronárias dos animais após 8-10 semanas de coarctação da aorta (Grieve et al., 2001). Estas reduções das respostas de relaxamento nos animais com insuficiência cardíaca foi associada à redução da expressão da eNOS (Grieve et al., 2001).

Já na aorta de ratos infartados, Gschwend e colaboradores (2003) também demonstraram a presença de ajustes vasculares compensatórios antes da instalação da insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio. Neste trabalho, foi observado aumento do relaxamento mediado pela acetilcolina, devido ao aumento da modulação nitrérgica, nas aortas dos animais infartados com pequena área de infarto e, portanto, sem sinais de insuficiência cardíaca (Gschwend et al., 2003). No entanto, esta resposta de relaxamento foi reduzida, devido à menor participação do EDHF, nas aortas dos animais infartados com grandes áreas de infarto e com sinais de insuficiência cardíaca (Gschwend et al., 2003).

Assim, baseado nestes trabalhos, é provável que, após uma sobrecarga cardíaca, inicialmente observa-se a ativação de mecanismos de compensação nas artérias, tais como aumento da participação do NO, de modo a manter uma adequada perfusão e nutrição tecidual, assim como reduzir a pós-carga cardíaca. No entanto, posteriormente, é provável que este mecanismo de compensação entre em falência e o que se observa é a redução dos EDRF, o que poderia contribuir para a redução da perfusão tecidual e aumento da pós-carga, auxiliando assim na instalação e/ou manutenção da falência cardíaca.

Por outro lado, a presença dos mecanismos vasculares de compensação, antes da instalação da falência cardíaca, ainda não é consenso na literatura e, nesta fase, alguns autores sugerem que a função arterial pode estar normal (Sun et al., 2000) ou prejudicada (Thomas et al., 1998; Pereira et al., 2005).

Pereira e colaboradores (2005) observaram, no leito arterial caudal de ratos infartados sem sinais de insuficiência cardíaca, redução do relaxamento dependente do endotélio e aumento da resposta contrátil à fenilefrina, mecanismos estes que podem contribuir para a redução da perfusão tecidual e aumentar a pós-carga cardíaca após o infarto do miocárdio. Entretanto, nos animais infartados com sinais de insuficiência cardíaca, o relaxamento mediado pela acetilcolina no leito arterial caudal foi preservado, enquanto que a contração à fenilefrina foi reduzida em decorrência da maior modulação nitrérgica (Pereira et al., 2005). Similar ao

observado para o leito arterial caudal dos animais infartados sem sinais de insuficiência cardíaca, nas artérias de resistência do leito muscular esquelético também foi observado redução do relaxamento mediado pela adenosina em ratos infartados com disfunção cardíaca, porém sem sinais de insuficiência cardíaca (Thomas et al., 1998).

Já Sun e colaboradores (2000) observaram que, após 3 semanas de implantação do marcapasso em cães, os animais apresentaram disfunção cardíaca sem sinais de insuficiência cardíaca, enquanto que os animais com 5 semanas de implantação do marcapasso apresentaram sinais de insuficiência cardíaca, tais como edema, dispnéia, ascite, assim como pressão diastólica final do ventrículo esquerdo superior a 25 mmHg (Sun et al., 2000). Neste estudo, o relaxamento dependente do endotélio foi preservado nas artérias coronárias após 3 semanas de implantação de marcapasso, estágio no qual os animais não apresentaram sinais de insuficiência cardíaca, e foi reduzido, devido à menor modulação nitrérgica, após 5 semanas de implantação de marcapasso, fase na qual os animais desenvolveram insuficiência cardíaca (Sun et al., 2000).

Deste modo, pode-se concluir que o acionamento de mecanismos vasculares de compensação, antes de instalação da falência cardíaca, depende, principalmente, do leito vascular, da severidade da cardiomiopatia, assim como do modelo experimental em estudo.

Além das respostas de relaxamento, após o infarto do miocárdio, também se pode observar alteração na resposta contrátil. Neste sentido, existem relatos na literatura de que a resposta contrátil à noradrenalina ou à fenilefrina em artérias de ratos após o infarto do miocárdio pode estar aumentada (Teerlink et al., 1994; Okumura et al., 1996; Stassen et al., 1997; Miller et al., 2000; Koida et al., 2006), reduzida (Stassen et al., 1997; Trautner et al., 2006) ou até mesmo inalterada (Okumura et al., 1996; Mulder et al., 1997; da Cunha et al., 2004). Assim como observado nas respostas de relaxamento, esta discrepância de resultados pode ser devido aos distintos tempos após o infarto do miocárdio, assim como pode estar relacionada à área de infarto e à severidade da doença após o infarto do miocárdio. Logo, na presente tese, também se buscou avaliar as respostas de contração nas

artérias coronárias septais e nas artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos infartados com disfunção ventricular leve (INF LDV) e severa (INF SDV) após o infarto do miocárdio, assim como nos animais SHAM operados.

A contração mediada por altas concentrações de potássio é amplamente utilizada para avaliar o aparato contrátil das células de músculo liso vascular, uma vez que o aumento da concentração extracelular de potássio induz contração independente da ativação de receptores.

Nas artérias coronárias de ambos os animais infartados (INF LDV e INF SDV) e SHAM, a resposta contrátil foi avaliada tanto pela incubação das artérias com altas concentrações de potássio (KCl, 120 mM) quanto pela contração induzida pela serotonina. A contração mediada por altas concentrações de potássio não foi alterada nas coronárias dos animais INF LDV e INF SDV, o que sugere que o aparato contrátil foi preservado nas coronárias de ratos após o infarto do miocárdio. Do mesmo modo, a contração à serotonina, nas artérias coronárias de ambos os animais infartados, também não foi alterada após o infarto do miocárdio. Desse modo, embora se tenha observado, na presente tese, diferentes ajustes vasculares nas respostas de relaxamento dependente do endotélio e mediado pela ativação dos receptores β -adrenérgicos, as repostas contráteis não foram alteradas nas artérias coronárias dos animais infartados.

Já nas artérias de resistência do leito muscular esquelético dos animais INF LDV e INF SDV, a contração mediada por altas concentrações de potássio foi reduzida, o que sugere a presença de alteração nas proteínas contráteis e/ou sensibilidade ao cálcio nas células de músculo liso das artérias de resistência do leito muscular esquelético após o infarto do miocárdio.

Relatos na literatura também demonstraram a presença de alteração no aparato contrátil das células de músculo liso vascular em artérias de animais infartados (Teerlink et al., 1994; Stassen et al., 1997; Trautner et al., 2006). Trautner e colaboradores (2006) observaram redução da sensibilidade de proteínas contráteis ao cálcio nas artérias de resistência do músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca 5 semanas após o infarto do miocárdio. Além disso, outros trabalhos observaram redução da contração induzida por altas concentrações de potássio em anéis de aorta provenientes de ratos com insuficiência cardíaca após 1

semana do infarto do miocárdio (Teerlink et al., 1994), assim como nas artérias mesentéricas de ratos com insuficiência cardíaca, 5 semanas após o infarto do miocárdio (Stassen et al., 1997). Em conjunto, estes trabalhos descrevem a presença de disfunção no aparato contrátil nas células de músculo liso vascular de ratos após o infarto do miocárdio.

Nas artérias mesentéricas de ratos infartados, associada à redução do aparato contrátil, Stassen e colaboradores (1997) também observaram redução da resposta contrátil a outros agentes, tais como noradrenalina, fenilefrina, serotonina e vasopressina. Cabe ressaltar que esta hiporreatividade observada nas artérias mesentéricas dos animais infartados não foi associada à alteração na estrutura vascular e, portanto, estes resultados confirmam a presença de disfunção no aparato contrátil das células de músculo liso vascular (Stassen et al 1997).

Por outro lado, Teerlink e colaboradores (1994) observaram, na aorta de ratos 1 semana após o infarto do miocárdio, que a contração mediada por altas concentrações de potássio estava reduzida, sugerindo a presença de disfunção no aparato contrátil, ao passo que a contração à noradrenalina estava aumentada na aorta dos animais infartados quando comparada aos animais SHAM. Neste trabalho, o aumento da contração à noradrenalina, nas aortas dos animais infartados, ocorreu devido à menor modulação do NO no basal, embora a liberação de NO estimulada, avaliada pelo relaxamento à acetilcolina, não tenha sido alterada (Teerlink et al., 1994). Assim, 1 semana após o infarto do miocárdio, já se observa modificação da modulação endotelial na aorta, mesmo com inalterado relaxamento à acetilcolina (Teerlink et al., 1994). Como estes pesquisadores observaram que o relaxamento à acetilcolina na aorta de ratos infartados está prejudicado 4 semanas após o infarto do miocárdio, é possível que a disfunção endotelial possa estar presente, em diferentes graus de severidade, dependendo, por exemplo, da fase evolutiva na qual a doença se encontra, e acredita-se que quanto maior o tempo de instalação da doença maior o prejuízo da função endotelial (Teerlink et al., 1993; 1994).

Na presente tese, embora a contratilidade do músculo liso vascular, mediada por altas concentrações de potássio, esteja reduzida nas artérias de resistência do leito muscular esquelético de ambos os ratos infartados, a contração mediada pela noradrenalina permaneceu inalterada. Baseado nestes resultados, uma hipótese

plausível é que, apesar da disfunção do aparato contrátil observada nas artérias de resistência do leito muscular esquelético dos animais infartados, a preservação da contração à noradrenalina pode ser devido à menor modulação endotelial no basal, a qual poderia ocorrer em decorrência de redução da liberação de EDRF e/ou aumento da liberação de EDCF no basal. Cabe ressaltar que, a menor modulação endotelial na resposta contrátil pode ocorrer mesmo diante de função endotelial preservada, avaliada pela acetilcolina (Teerlik et al., 1994). Assim, nas artérias de resistência do leito muscular esquelético dos animais com disfunção ventricular leve (INF LDV), apesar da inalterada resposta vasodilatadora mediada pela acetilcolina, a modulação endotelial no basal poderia estar reduzida. Já nas artérias de resistência do leito muscular esquelético dos animais com disfunção ventricular severa (INF SDV), associada à disfunção endotelial mediada pela acetilcolina, também se poderia observar redução da modulação endotelial. No entanto, o envolvimento da modulação do NO no basal nas artérias de resistência do leito muscular esquelético de ratos infartados será alvo dos próximos estudos.

6 CONCLUSÃO

De posse dos resultados obtidos na presente tese, pode-se concluir que a reatividade nas artérias coronárias septais, assim como nas artérias de resistência do leito muscular esquelético, é modulada diferentemente na dependência do estado da função cardíaca pós-infarto do miocárdio.

Neste sentido, nas artérias coronárias septais dos animais infartados com severa disfunção cardíaca após o infarto do miocárdio (INF SDV) observa-se redução das respostas de relaxamento, as quais podem prejudicar a nutrição do tecido cardíaco agravando, ainda mais, o desempenho cardíaco após o infarto do miocárdio. Já em artérias periféricas, a presença de disfunção endotelial nas artérias de resistência do leito muscular esquelético dos animais INF SDV poderia contribuir para o aumento da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, da pós-carga contra a qual o coração, já prejudicado em decorrência do infarto, terá que ejetar sangue. Além disso, a disfunção endotelial nas artérias de resistência do leito muscular esquelético pode levar à redução da perfusão para a musculatura esquelética, o que poderia estar envolvido na gênese da fadiga muscular esquelética observada na falência cardíaca, tal como na insuficiência cardíaca.

Por outro lado, de forma inédita, as coronárias dos animais com leve disfunção cardíaca pós-infarto do miocárdio (INF LDV) apresentam ajustes vasculares compensatórios, tais como aumento das respostas de relaxamento em decorrência da maior modulação nitrérgica, a qual decorreu de maior síntese e maior biodisponibilidade de óxido nítrico. Estes mecanismos compensatórios, observados nas coronárias dos animais INF LDV, por aumentar o fluxo coronariano e, assim, manter uma adequada perfusão para o miocárdio remanescente, poderiam estar envolvidos na prevenção do agravamento do desempenho cardíaco após o infarto do miocárdio. No entanto, este mecanismo de ajuste vascular é uma especificidade das artérias coronárias, uma vez que, periféricamente, em artérias de resistência do leito muscular esquelético destes animais, as respostas de relaxamento foram preservadas.

REFERÊNCIAS

Akamine EH, Kawamoto EM, Scavone C, Nigro D, Carvalho MH, de Cássia A Tostes R, Britto LR, Fortes ZB. *Journal of Vascular Research*. 2006;43 (4):309-320.

Akimoto Y, Horinouchi T, Shibano M, Matsushita M, Yamashita Y, Okamoto T, Yamaki F, Tanaka Y, Koike K. Nitric oxide (NO) primarily accounts for endothelium-dependent component of β -adrenoceptor-activated smooth muscle relaxation of mouse aorta in response to isoprenaline. *Journal of Smooth Muscle Research*. 2002;38(4,5):87-99.

Alderton WK, Cooper CE, Knoles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal*. 2001;357:593-615.

Altman JD, Kinn J, Duncker DJ, Bache RJ. Effect of inhibition of nitric oxide formation on coronary blood flow during exercise in the dog. *Cardiovascular Research*. 1994;28 (1):119-124.

Amezcu JL, Palmer RMJ, Souza BM, Moncada S. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *British Journal Pharmacology*. 1989;97:1119-1124.

Amin A. Improving the management of patients after myocardial infarction, from admission to discharge. *Clinical Therapeutics*. 2006;28(10):1509-1539.

Amir O, Jaffe R, Shiran A, Flugelman MY, Halon DA, Lewis BS. Brachial reactivity and extent of coronary artery disease in patients with first ST-elevation acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology*. 2006;98(6):754-757.

Antman EM, Braunwald E. ST-elevation myocardial infarction: pathology, pathophysiology, and clinical features. In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. *Braunwald's Heart Disease*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p.1141-1165.

Antonio EL, Dos Santos AA, Araujo SR, Bocalini DS, Dos Santos L, Fenelon G, Franco MF, Tucci PJ. 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. *Journal of Cardiac Failure*. 2009;15(6):540-548.

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

De acordo com:
International Committee of Medical Journal
Editors. Uniform requirements for manuscripts
submitted to Biomedical Journal: sample
references. Available from: [http://www.
icmje.org](http://www.icmje.org) [2007 May 22].

Babick AP, Dhalla NS. Role of subcellular remodeling in cardiac dysfunction due to congestive heart failure. *Medical Principles and Practice*. 2007;16: 81-89.

Baggia S, Perkins K, Greenberg B. Endothelium-dependent relaxation is not uniformly impaired in chronic heart failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1997;29(3):389-396.

Barbato E. Role of adrenergic receptors in human coronary vasomotion. *Heart*. 2009;95(7):603-608.

Barlow RS, White RE. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *American Journal of Physiology*. 1998;275(4 Pt 2):H1283-H1289.

Barlow RS, El-Mowafy AM, White RE. H₂O₂ opens BK(Ca) channels via the PLA(2)-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. *American Journal Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2000;279(2):H475-H483.

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

Bauersachs J, Fleming I, Fraccarollo D, Busse R, Ertl G. Prevention of endothelial dysfunction in heart failure by vitamin E: attenuation of vascular superoxide anion formation and increase in soluble guanylyl cyclase expression. *Cardiovascular Research*. 2001;51(2):344-350.

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 the American College Cardiology*. 2002;39(2):351-358.

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 Science of the United States of America*. 1990;87(4):1620-1624.

Berges A, Van Nassauw L, Timmermans JP, Vrints C. Role of nitric oxide during coronary endothelial dysfunction after myocardial infarction. *European Journal of Pharmacology*. 2005;516:60-70.

Berges A, Van Nassauw L, Timmermans JP, Vrints C. Time-dependent expression pattern of nitric oxide and superoxide after myocardial infarction in rats. *Pharmacological Research*. 2007;55(1):72-9.

Bitar F, Lerman A, Akhter MW, Hatamizadeh P, Janmohamed M, Khan S, Elkayam U. Variable response of conductance and resistance coronary arteries to endothelial stimulation in patients with heart failure due to nonischemic dilated cardiomyopathy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology Therapy*. 2006;11(3):197-202.

Blankesteyn WM, Thien T. Effect of NG-monomethyl-L-arginine on the beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat mesenteric resistance arteries. *Life Science*. 1993;52(16):PL135-PL139.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994;368(6474):850-853.

Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, Jo H. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(5):3388-3396.

Briones AM, Daly CJ, Jimenez-Altayo F, Martinez-Revelles S, Gonzales JM, McGrath JC, Vila E. Direct demonstration of β_1 and evidence against β_2 - and β_3 -adrenoceptors, in smooth muscle cells of rat small mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology*. 2005;146(5):679-691.

Burger DE, Lu X, Lei M, Xiang FL, Hammoud L, Jiang M, Wang H, Jones DL, Sims SM, Feng Q. Neuronal nitric oxide synthase protects against myocardial infarction-induced ventricular arrhythmia and mortality in mice. *Circulation*. 2009;120(14):1345-1354.

Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *New England Journal of Medicine*. 1997;336(18): 1276-1282.

Capettini LS, Cortes SF, Gomes MA, Silva GA, Pesquero JL, Lopes MJ, Teixeira MM, Lemos VS. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *American Journal Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2008;295(6):H2503-H2511.

Capettini LS, Cortes SF, Lemos VS. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *European Journal of Pharmacology*. 2010;643(2-3):260-266.

Ceravolo GS, Fernandes L, Munhoz CD, Fernandes DC, Tostes RC, Laurindo FR, Scavone C, Fortes ZB, Carvalho MH. Angiotensin II chronic infusion induces B1 receptor expression in aorta of rats. *Hypertension*. 2007;50(4):756-61.

Chatterjee A, Black SM, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular Pharmacology*. 2008;49:134-140.

Chen K, Popel AS. Vascular and perivascular nitric oxide release and transport: biochemical pathways of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) and endothelial nitric oxide synthase (NOS3). *Free Radical Biology & Medicine*. 2007;42(6):811-822.

Chen Y, Hou M, Li Y, Traverse JH, Zhang P, Salvemini D, Fukai T, Bache RJ. Increased superoxide production causes coronary endothelial dysfunction and depressed oxygen consumption in the failing heart. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2005;288(1):H133-H141.

Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodrigues-Crespo I, Witters LA, Pwer DA, Montellano PRO; Kemp BE. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Letters*. 1999;443:285-289.

Chu A, Chambers DE, Lin CC, Kuehl WD, Palmer RMJ, Moncada S, Cobb FR. Effects of inhibition of nitric oxide formation on basal vasomotion and endothelium-dependent responses of coronary arteries in awake dogs. *The Journal of Clinical Investigation*. 1991;87:1964-1968.

Cleland JG, Cowburn PJ, Morgan K. Neuroendocrine activation after myocardial infarction: causes and consequences. *Heart*. 1996;76(3 Suppl 3):53-9.

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*. 1996;28:2241-2248.

Cosentino F, Lüscher TF. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1998;32Suppl3:S54-61.

Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology*. 1991;40(6):923-931.

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*. 2004;82:372-379.

Davel AP, Kawamoto EM, Scavone C, Vassallo DV, Rossoni LV. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. *British Journal of Pharmacology*. 2006;148(5):629-39.

Davel AP, Wenceslau CF, Akamine EH, Xavier FE, Couto GK, Oliveira HT, Rossoni LV. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2011;44(9):920-932.

Davis E, Loiacono R, Summers RJ. The rush to adrenaline: drugs in sport acting on the beta-adrenergic system. *British Journal of Pharmacology*. 2008;154(3):584-597.

Dawes M, ChowieniczvkJ, Ritter JM. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway on vasodilation caused by beta-adrenergic agonists in human forearm. *Circulation*. 1997;95(9):2293-2297.

DeFelice A, Frering R, Horan P. Time course of hemodynamic changes in rats with healed severe myocardial infarction. *American Journal of Physiology*. 1989;257(1 Pt 2):H289-H296.

Delp MD, Laughlin MH. Regulation of skeletal muscle perfusion during exercise. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1998;162(3):411-419.

Didion SP, Mayham WG. Effect of chronic myocardial infarction in vivo reactivity of skeletal muscle arterioles. *The American Journal of Physiology*. 1997;272:H2403-H2408.

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

dos Santos L, Antonio EL, Souza AF, Tucci PJ. Use of afterload hemodynamic stress as a practical method for assessing cardiac performance in rats with heart failure. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2010;88(7):724-732.

Duscha BD, Schulze PC, Robbins JL, Forman DE. Implications of chronic heart failure on peripheral vasculature and skeletal muscle before and after exercise training. *Heart Failure Review*. 2008;13(1):21-37.

Feliciano L, Henning RJ. Coronary artery blood flow: physiologic and pathophysiologic regulation. *Clinical Cardiology*. 1999;22(12):775-786.

Fernández N, Sánchez MA, Martínez MA, García-Villalón AL, Monge L, Gómez B, Diéguez G. Role of nitric oxide in vascular tone and in reactivity to isoproterenol and adenosine in the goat coronary circulation. *European Journal of Pharmacology*. 2000;387(1):93-99.

Ferro A, Coash M, Yamamoto T, Rob J, Ji Y, Queen L. Nitric oxide- dependent through activation of both protein kinase A and Akt. *British Journal of Pharmacology*. 2004;143:397-403.

Figuroa XF, Poblete I, Fernández R, Pedemonte C, Cortés V, Huidobro-Toro JP. NO production and eNOS phosphorylation induced by epinephrine through the activation of beta-adrenoceptors. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2009;297(1):H134-H143.

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*. 2005;26(1):65-69.

Fleming I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Archiv: European Journal of physiology*. 2010;459(6):793-806.

Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circulation Research*. 2001;88(11):E68-75.

Flumignan RLG, Kanashiro RM, Saraiva RM, Portes LA, Antonio EL, Ishigai MMS, Tucci PJF. Incidence of heart failure in infarcted rats that die spontaneously. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006;39:1323-1328.

Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Archv: Europaen Journal of Physiology*. 2010;459(6):923-39.

Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2011;[Epub ahead of print].

Fraccarollo D, Widder JD, Galuppo P, Thum T, Tsikas D, Hoffmann M, Ruetten H, Ertl G, Bauersachs J. Improvement in left ventricular remodeling by the endothelial nitric oxide synthase enhancer AVE9488 after experimental myocardial infarction. *Circulation*. 2008;118(8):818-827.

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*. 2001;281(5):R1734- R1745.

Frey MJ, Lanoce V, Molinoff PB, Wilson JR. Skeletal muscle beta-receptors and isoproterenol-stimulated vasodilation in canine heart failure. *Journal of Applied Physiology*. 1989;67(5):2026-2031.

Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidant & Redox Signaling*. 2011;15(6):1583-1606.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999;399: 597-601.

Furukawa K, Ohshima N, Tawada-Iwata Y, Shigekawa M. Cyclic GMP stimulates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(19):12337-41.

Gaballa MA, Eckhart A, Kosh WJ, Goldman S. Vascular β -adrenergic receptor is dysfunctional after myocardial infarction. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2001;280:H1129-H1135.

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*. 1999;31(6):1243-52.

Gaballa MA, Goldman S. Ventricular remodeling in heart failure. *Journal of Cardiac Failure*. 2002; 8(6 Suppl):S476-85.

Gallis B, Corthals GL, Goodlett DR, Ueba H, Kim F, Presnell SR, Figeys D, Harrison DG, Berk BC, Aebersold R, Corson MA. Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(42):30101-30108.

García JL, Fernández N, García-Villalón AL, Monge L, Gómez B, Diéguez G. Effects of nitric oxide synthesis inhibition on the goat coronary circulation under basal conditions and after vasodilator stimulation. *British Journal Pharmacology*. 1992;106: 563-567.

Gheorghiade M, Forarow GC. Management of post-myocardial infarction patients with left ventricular systolic function. *The American Journal of Medicine*. 2007;120: 109-120.

Givertz MM, Colucci WS, Braunwald E. Clinical Aspects of Heart Failure; Pulmonary Edema, High-Output Failure. In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. *Braunwald's Heart Disease*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; p.539-568, 2005.

Grieve DJ, MacCarthy PA, Gall NP, Cave AC, Shah AM. Divergent biological actions of coronary endothelial nitric oxide during progression of cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2001;38(2):267-273.

Gryglewski RJ. Pharmacology of vascular endothelium. Delivered on 27 June 2004 at the 29th FEBS Congress in Warsaw. *FEBS J*. 2005;272(12):2956-67.

Gschwend S, Buikema H, Henning RH, Pinto YM, Zeeuw D, Van Gilst WH. Endothelial dysfunction and infarct-size relate to impaired EDHF response in rat experimental chronic heart failure. *The European Journal of Heart Failure*. 2003;5:147-154.

Guazzi M, Reina G, Gripari P, Tumminello G, Vicenzi M, Arena R. Prognostic value of flow-mediated dilatation following myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*. 2009;132(1):45-50.

Guimarães S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacological Reviews*. 2001;53:319-356.

Gupta S, McArthur C, Grady C, Ruderman NB. Stimulation of vascular Na(+)-K(+)-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *The American Journal of Physiology*. 1994;266(5 Pt 2):H2146-2151.

Holdright DR, Clarke D, Fox K, Poole-Wilson PA, Collins P. The effects of intracoronary substance P and acetylcholine on coronary blood flow in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *European Heart Journal*. 1994;15(11):1537-1544.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987; 84(24):9265-9269.

Indik JH, Goldman S, Gaballa MA. Oxidative stress contributes to vascular endothelial dysfunction in heart failure. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2001;281(4):H1767- H1770.

Inoue T, Sakai Y, Morooka S, Hayashi T, Takayanagi K, Yamaguchi H, Kakoi H, Takabatake Y. Vasodilatory capacity of coronary resistance vessels in dilated cardiomyopathy. *The American Heart Journal*. 1994;127(2):376-381.

Jones SP, Greer JJ, van Haperen R, Duncker DJ, de Crom R, Lefer DJ. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 2003;100(8):4891-6.

Kamata K, Mivata N, Kasuya Y. Involvement of endothelial cells in relaxation and contraction responses of the aorta to isoproterenol in naive and streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1989;249(3):890-894.

Katz SD, Hryniewicz K, Hriljac I, Balidemaj K, Dimayuga C, Hudaihed A, Yasskiy A. Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2005;111(3):310-314.

Kitayama J, Kitazono T, Ibayashi S, Wakisaka M, Watanabe Y, Kamouchi M, Nagao T, Fujishima M. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in acetylcholine-induced dilatation of rat basilar artery. *Stroke*. 2000;31(10):2487-2493.

Kiuchi K, Sato N, Shannon RP, Vatner DE, Morgan K, Vatner SF. Depressed beta-adrenergic receptor- and endothelium-mediated vasodilation in conscious dogs with heart failure. *Circulation Research*. 1993;73(6):1013-1023.

Koida S, Ohyanagi M, Ueda A, Mori Y, Iwasaka T. Mechanism of increased alpha-adrenoceptor-mediated contraction in small resistance arteries of rats with heart failure. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 2006;33(1-2):47-52.

Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry*. 1998;70: 2446-2453.

Komaru T, Kanatsuka H, Shirato K. Coronary microcirculation: physiology and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*. 2000;86: 217-261.

Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Williams RE, Heifetz SM. Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation*. 1991;84(4):1589-1596.

Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*. 2002;106(24):3073-3078.

Larosa G, Forster C. Altered vasodilator response of coronary microvasculature in pacing-induced congestive heart failure. *European Journal of Pharmacology*. 1996;138:387-394.

Lida S, Chu Y, Francis J, Weiss RM, Gunnett CA, Faraci FM, Heistad DD. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase improves endothelial function in rats with heart failure. *American Journal of the Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2005;289(2):H525-32.

Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *Journal of Applied Physiology*. 2001;91(3):1421-1430.

Litwin SE, Litwin CM, Raya TE, Warner AL, Goldman S. Contractility and stiffness of noninfarcted myocardium after coronary ligation in rats. Effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition. *Circulation*. 1991;83(3):1028-37.

Lynch FM, Austin C, Heagerty AM, Izzard AS. Adenosine and hypoxic dilation of rat coronary small arteries: roles of the ATP-sensitive potassium channel, endothelium, and nitric oxide. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2006;290:H1145-H1150.

Machackova J, Sanganalmath SK, Barta J, Dhalla KS, Dhalla NS. Amelioration of cardiac remodeling in congestive heart failure by beta-adrenoceptor blockade is associated with depression in sympathetic activity. *Cardiovascular Toxicology*. 2010;10(1):9-16.

Mallem Y, Holopherne D, Reculeau O, LeCoz O, Dessfontis JC, Gogny M. β -adrenoceptor mediated vascular relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*. 2005;118:61-67.

Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *Journal of Autonomic Pharmacology*. 1995;15: 279-307.

Mathew R, Wang J, Gewitz MH, Hintze TH, Wolin MS. Congestive heart failure alters receptor-dependent cAMP-mediated relaxation of canine pulmonary arteries. *Circulation*. 1993;87(5):1722-1728.

McAlpine HM, Morton JJ, Leckie B, Rumley A, Gillen G, Dargie HJ. Neuroendocrine activation after acute myocardial infarction. *British Heart Journal*. 1988;60(2):117-124.

McDaniel NL, Chen XL, Singer HA, Murphy RA, Rembold CM. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing $[Ca^{2+}]_i$ and uncoupling stress from myosin phosphorylation. *The American Journal of Physiology*. 1992;263(2 Pt 1):C461-467.

Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 2010;459(6):807-816.

Michell BJ, Chen ZP, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Pwer DA, Sim AT, Kemp BE. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(21):17625-17628.

Michell BJ, Harris MB, Chen ZP, Ju H, Venema VJ, Blackstone MA, Huang W, Venema RC, Kemp BE. Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(44):42344-42351.

Mill JG, Stephanon I, Leite CM, Vassallo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovascular Research*. 1990;24(9):748-753.

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*. 1994;29(1):77-88.

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*. 1998;76(4):387-394.

Miller AA, Megson IL, Gray G. Inducible nitric oxide synthase-derived superoxide contributes to hyperactivity in small mesenteric arteries from a rat of chronic heart failure. *British Journal of Pharmacology*. 2000;131(1): 29-36.

Miller JD, Peotta VA, Chu Y, Weiss RM, Zimmerman K, Brooks RM, Heistad DD. MnSOD protects against COX1-mediated endothelial dysfunction in chronic heart failure. *American Journal of the Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2010;298(5):H1600-7.

Ming Z, Parent R, Lavallée M. β 2-adrenergic dilation of resistance coronary involves KATP channels and nitric oxide in conscious dogs. *Circulation*. 1997;95:1568-1576.

Minotti JR, Christoph I, Oka R, Weiner MW, Wells L, Massie BM. Impaired skeletal muscle function in patients with congestive heart failure. Relationship to systemic exercise performance. *The Journal of Clinical Investigation*. 1991;88(6):2077-2082.

Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circulation Research*. 2003;92(2):e31-e40.

Mohri M, Egashira K, Tagawa T, Kuga T, Tagawa H, Harasawa Y, Shimokawa H, Takeshita A. Basal release of nitric oxide is decreased in the coronary circulation in patients with heart failure. *Hypertension*. 1997;30(1pt1):50-56.

Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*. 2006;147 Suppl 1:S193-201.

Mulder P, Devaux B, Fertak LE, Compagnon P, Richard V, Henry JP, Scalbert E, Desché P, Macé B, Thuillez C. Vascular and myocardial protective effects of converting enzyme inhibition in experimental heart failure. *The American Journal of Cardiology*. 1995;76:28E-33E.

Mulder P, Elfertak L, Richard V, Compagnon P, Devaux B, Henry JP, Scalbert E, Desché P, Macé B, Thuillez C. Peripheral artery structure and endothelial function in heart failure: effect of ACE inhibition. *The American Journal of Physiology*. 1996;271: H469-H477.

Mulder P, Compagnon P, Devaux B, Richard V, Henry JP, Elfertak L, Wilmart MC, Thibout E, Comoy E, Macé B, Thuillez C. Response of large and small vessels to alpha and beta adrenoceptor stimulation in heart failure: effect of angiotensin converting enzyme inhibition. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 1997;11(3):221-230.

Mulder P, Mellin V, Favre J, Vercauteren M, Remy-Jouet I, Monteil C, Richard V, Renet S, Henry JP, Jeng AY, Webb RL, Thuillez C. Aldosterone synthase inhibition improves cardiovascular function and structure in rats with heart failure: a comparison with spironolactone. *European Heart Journal*. 2008;29(17):2171-2179.

Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiological Reviews*. 1990; 70: 921-961.

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research*. 1977;41: 19-26. Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiological Reviews*. 1990;70:921-961.

Muramatsu K, Numaguchi K, Egashira K, Takahashi T, Kasuya H, Takeshita A. Effects of N-nitro-L-arginine on coronary artery tone and reactive hyperemia after brief coronary occlusion in conscious dogs. *Coronary Artery Disease*. 1994;5(10):815-820.

Nasa Y, Toyoshima H, Ohaku H, Hashizume Y, Sanbe A, Takeo S. Impairment of cGMP- and cAMP-mediated vasorelaxations in rats with chronic heart failure. *The American Journal of Physiology*. 1996;271(6):H2228-H2237.

Negrao CE, Middlekauff HR. Adaptations in autonomic function during exercise training in heart failure. *Heart Failure Reviews*. 2008;13(1):51-60.

Okumura Y, Nasa Y, Sanbe A, Toga W, Takeo S. Effects of long-term treatment with trandolapril on augmented vasoconstriction in rats with chronic heart failure. *Journal of Cardiac Failure*. 1996;2(4):301-310.

Opie LH. Control of circulation. In: *Heart Physiology: From Cell to Circulation*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 16-41. 2004a.

Opie LH. Acute Coronary Syndromes: Cell Death In: *Heart Physiology: From Cell to Circulation*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 485-524. 2004b

Padmaja S, Huie RE. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1993;195(2):539-544.

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

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333(6174):664-666.

Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*. 1993;87(5):1468-1474.

Parent R, Paré R, Lavallée M. Contribution of nitric oxide to dilation of resistance coronary vessels in conscious dogs. *American Journal of Physiology*. 1992;262 (1 pt2):H10-H16.

Parent R, Al-Obaidi M, Lavalee. Nitric oxide formation contributes to β 3-adrenergic dilation of resistance coronary vessels in conscious dogs. *Circulation Research*. 1993;73:241-251.

Parent R, Hamdad N, Ming Z, Lavallée M. Contrasting effects of blockade of nitric oxide formation on resistance and conductance coronary vessels in conscious dogs. *Cardiovascular Research*. 1996;31:555-567.

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*. 2005;312(3):1321-1325.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circulation Research*. 1979;44(4):503-512.

Poelzl G, Frick M, Huegel H, Lackner B, Alber HF, Mair J, Herold M, Schwarzacher S, Pachinger O, Weidinger F. Chronic heart failure is associated with vascular remodeling of the brachial artery. *European Journal of Heart Failure*. 2005;7(1):43-8.

Prior DL, Jennings GLR, Arnold P, Du XJ, Chin-Dusting JPF. Impaired endothelium-dependent relaxation in large, but not small arteries in rats after coronary ligation. *European Journal of Pharmacology*. 1998;355:167-174.

Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circulation Research*. 1983;52(3):352-357.

Rascado RR, Bendhack LM. Activation of α_2 -adrenoceptors is necessary to induce nitric oxide release in isoprenaline-induced relaxation. *Vascular Pharmacology*. 2005;42:63-68.

Rascado RR. Efeito dos agonistas β -adrenérgicos sobre o relaxamento vascular em aorta de ratos hipertensos renais (2R – 1C). 121f. Tese (doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Rembold CM, Chen X-L. Mechanisms responsible for forskolin-induced relaxation of rat tail artery. *Hypertension*. 1998;31:872-877.

Rembold CM. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension*. 1992;20(2):129-137.

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

Rubin SA, Fishbein MC, Sware HJC. Compensatory hypertrophy in the heart after myocardial infarction in the rat. *Journal of the American College of Cardiology*. 1983;1:1435-1441.

Santos AC, Alves MJ, Rondon MU, Barretto AC, Middlekauff HR, Negrão CE. Sympathetic activation restrains endothelium-mediated muscle vasodilatation in heart failure patients. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2005;289(2):H593-H599.

Saraiva RM, Minhas KM, Raju SV, Barouch LA, Pitz E, Schuleri KH, Vandegaer K, Li D, Hare JM. Deficiency of neuronal nitric oxide synthase increases mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of nitroso-redox equilibrium. *Circulation*. 2005;112(22):3415-3422.

Sartório CL, Pinto VD, Cutini GJS, Vassalo DV, Stefanon I. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition on the rat tail vascular bed reactivity three days after myocardial infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2005;45(4):321-326.

Schäfer A, Fraccarollo D, Hildemann SK, Tas P, Ertl G, Bauersachs J. Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction. *Cardiovascular Research*. 2003;58(3):655-662.

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

Schrier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. *The New England Journal of Medicine*. 1999;341:577-585.

Seddon M, Melikian N, Dworakowski R, Shabeeh H, Jiang B, Byrne J, Casadei B, Chowienczyk P, Shah AM. Effects of neuronal nitric oxide synthase on human coronary artery diameter and blood flow in vivo. *Circulation*. 2009;119(20):2656-2662.

Segal SS. Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation*. 2005;12(1):33-45.

Shechter M, Matetzky S, Arad M, Feinberg MS, Freemark D. Vascular endothelial function predicts mortality risk in patients with advanced ischaemic chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure*. 2009b;11(6):588-593.

Shimokawa H, Matoba T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacological Research*. 2004;49(6):543-549.

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

Smith TP Jr, Canty JM Jr. Modulation of coronary autoregulatory responses by nitric oxide: evidence for flow-dependent resistance adjustments in conscious dogs. *Circulation Research*. 1993;73:232-240.

Spooner PH, Thai HM, Goldman S, Gaballa MA. Thyroid hormone analog, DITPA, improves endothelial nitric oxide and beta-adrenergic mediated vasorelaxation after myocardial infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2004;44(4):453-459.

Stassen FRM, Fazzi GE, Leenders PJA, Smits JFM, De Mey JGR. Coronary arterial hyperreactivity and mesenteric arterial hyporeactivity after myocardial infarction in the rat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1997;29(6):780-788.

Sun D, Kaley G, Koller A. Characteristics and origin of myogenic response in isolated gracilis muscle arterioles. *The American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 1994;266:H1177-H1183.

Sun D, Huang A, Zhao G, Bernstein R, Forfia P, Xu X, Koller A, Kaley G, Hintze TH. Reduced NO-dependent arteriolar dilation during the development of cardiomyopathy. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2000;278(2):H461-H468.

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

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

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

Thai H, Guarraia D, Johnson N, Goldman S, Gaballa MA. Valsartan therapy in heart failure after myocardial infarction: the role of endothelial dependent vasorelaxation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2007;50(6):703-707.

Thomas DP, Hudlika O, Brown MD, Deveci D. Alterations in small arterioles precede changes in limb skeletal muscle after myocardial infarction. *The American Journal of Physiology*. 1998;44:H1032-H1039.

Thomas SR, Witting PK, Drummond GR. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2008;10(10):1713-1765.

Thuillez C, Mulder P, Elfertak L, Blaysat G, Compagnon P, Henry JP, Richard V, Scalbert E, Desche P. Prevention of endothelial dysfunction in small and large arteries in a model of chronic heart failure: Effect of angiotensin converting enzyme inhibition. *The American Journal of Hypertension*. 1995;8:7S-12S.

Toyoshima H, Nasa Y, Kohsaka Y, Isayama Y, Yamaguchi F, Sanbe A, Takeo S. The effect of chronic treatment with trandolapril on cyclic AMP-and cyclic GMP-dependent relaxations in aortic segments of rats with chronic heart failure. *British Journal of Pharmacology*. 1998;123(2):344-352.

Trautner S, Amtorp O, Boesgaard S, Andersen CB, Galbo H, Haunsoe S, Sheykhzade M. Noradrenaline-induced increases in calcium and tension in skeletal muscle conductance and resistance arteries from rats with post-infarction heart failure. *European Journal of Pharmacology*. 2006;537:143-154.

Treasure CB, Vita JA, Cox DA, Fish RD, Gordon JB, Mudge GH, Colucci WS, Sutton MG, Selwyn AP, Alexander RW, et al. Endothelium-dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1990;81(3):772-779.

Tsai P, Weaver J, Cao GL, Pou S, Roman LJ, Starkov AA, Rosen GM. L-arginine regulates neuronal nitric oxide synthase production of superoxide and hydrogen peroxide. *Biochemical Pharmacology*. 2005;69(6):971-979.

Tschudi MR, Criscione L, Novosel D, Pfeiffer K, Lfischer TF. Antihypertensive therapy augments endothelium-dependent relaxations in coronary arteries of spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 1994;89:2212-2218.

Tun A, Khan IA. Myocardial infarction with normal coronary arteries: the pathologic and clinical perspectives. *Angiology*. 2001;52(5):299-304.

Ueda A, Ohyanagi M, Koida S, Iwasaki T. Enhanced release of endothelium-derived hyperpolarizing factor in small congestive heart failure. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2005;32:615-621.

Vanhoutte PM. Endothelium-dependent responses in congestive heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1996;28:2233-2240.

Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica (Oxf)*. 2009;196(2):193-222.

Varin R, Mulder P, Richard V, Tamion F, Devaux C, Henry JP, Lallemand F, Lerebours G, Thuillez C. Exercise improves flow-mediated vasodilatation of skeletal muscle arteries in rats with chronic heart failure. Role of nitric oxide, prostanoids, and oxidant stress. *Circulation*. 1999;99(22):2951-2957.

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*. 2000;102(3):351-6.

Vásquez-Pérez S, Navarro-Cid J, de las Heras N, Cediel E, Sanz-Rosa D, Ruilope LM, Cachafeiro V, Lahera V. Relevance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the effects of hypertension on rat coronary relaxations. *Journal of Hypertension*. 2001;19:539-545.

Wang J, Seyedi N, Xu XB, Wolin MS, Hintze TH. Defective endothelium-mediated control of coronary circulation in conscious dogs after heart failure. *The American Journal of Physiology*. 1994;266(2 Pt 2):H670-H680.

Wang Y, Wang S, Wier WG, Zhang Q, Jiang H, Li Q, Chen S, Tian Z, Li Y, Yu X, Zhao M, Liu J, Yang J, Zhang J, Zang W. Exercise improves the dilatation function of mesenteric arteries in postmyocardial infarction rats via a PI3K/Akt/eNOS pathway-mediated mechanism. *American Journal Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2010;299(6):H2097-H2106.

Weaver J, Porasuphatana S, Tsai P, Pou S, Roman LJ, Rosen GM. A comparative study of neuronal and inducible nitric oxide synthases: generation of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005;1726(3):302-308.

Wenceslau CF, Davel AP, Xavier FE, Rossoni LV. Long-term ouabain treatment impairs vascular function in resistance arteries. *Journal of Vascular Research*. 2011;48(4):316-26.

White HD, Chew DP. Acute myocardial infarction. *Lancet*. 2008; 372(9638):570-84.

Wilson JR, Martin JL, Schwartz D, Ferraro N. Exercise intolerance in patients with chronic heart failure: role of nutritive flow to skeletal muscle. *Circulation*. 1984;69(6):1079-1087.

Xu B, Li J, Gao L, Ferro A. Nitric oxide-dependent vasodilatation of rabbit femoral artery by β_2 adrenergic stimulation or cyclic AMP elevation in vivo. *British Journal of Pharmacology*. 2000;129:969-974.

Xu Y, Henning RH, Lipsic E, Vanbuiten A, Vangilst WH, Buikema H. Acetylcholine stimulated dilatation and stretch induced myogenic constriction in mesenteric artery of rats with chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure*. 2007;9:144-151.

Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F. Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. *Circulation*. 2003;107(7):1040-1045.

Zecchin HG, Priviero FB, Souza CT, Zecchin KG, Prada PO, Carnevalheira JB, Velloso LA, Antunes E, Saad MJ. Defective insulin and acetylcholine induction of endothelial cell-nitric oxide synthase through insulin receptor substrate/Akt signaling pathway in aorta of obese rats. *Diabetes*. 2007;56(4):1014-1024.

Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*. 2009;20(4):223-230.