

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Luiz Fernando Rodrigues Junior

**Enalapril Aumenta a Corrente Transitória de Efluxo de K^+
(I_{to}) em Ambos os Ventrículos de Ratos Espontaneamente
Hipertensos**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS



Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Rio de Janeiro, 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUIZ FERNANDO RODRIGUES JUNIOR

**Enalapril Aumenta a Corrente Transitória de Efluxo de K^+
(I_{to}) em Ambos os Ventrículos de Ratos Espontaneamente
Hipertensos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Fisiologia).

Orientador:
José Hamilton Matheus Nascimento
Professor adjunto do Instituto de biofísica carlos chagas filho

Rio de Janeiro,
2006

Rodrigues Jr, Luiz Fernando.

Enalapril Aumenta a Corrente Transitória de Efluxo de K^+ (I_{to}) em Ambos os Ventrículos de Ratos Espontaneamente Hipertensos/ Luiz Fernando Rodrigues Junior. Rio de Janeiro, 2006.

106p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas -Fisiologia)
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Orientador: José Hamilton Matheus Nascimento

1. Corrente transitória de efluxo de potássio. 2. Hipertrofia
ventricular. 3. Hipertensão arterial sistêmica.
Organizacional. 3.Administração – Teses.

I. José Hamilton Matheus Nascimento. II.Universidade
Federal do Rio de Janeiro. , Instituto de Biofísica Carlos
Chagas Filho. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luiz Fernando Rodrigues Junior

Enalapril Aumenta a Corrente Transitória de Efluxo de K^+ (I_{to}) em Ambos os Ventrículos de Ratos Espontaneamente Hipertensos

Rio de Janeiro, de de 2....

Orientador: Dr. José Hamilton Matheus Nascimento
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dr. José Geraldo Mill
Departamento de Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo

Dr. Gisele Zapata Sudo
Departamento de Farmacologia Básica e Clínica
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Márcia Alves Marques Capella
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedicatória

Especialmente à minha família e amigos por aceitarem a minha ausência, e a Cássia, meu amor.

Agradecimentos

Ao professor José Hamilton Matheus Nascimento, por sua dedicação constante, seu empenho como eletrofisiologista e principalmente por sua amizade.

Ao professor Antônio Carlos Campos de Carvalho pelas discussões científicas e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

À Daisy Avansi, por estar sempre presente, nos ajudando em todos os momentos necessários, mesmo quando não é de sua obrigação. E por sempre organizar as festinhas do laboratório.

Ao professor José Geraldo Mill pelo esforço em nos fornecer os animais SHR.

A Fredson Serejo, exemplo de cientista, meu mestre, que acredita em todos os que iniciam esta jornada.

Aos meus companheiros de trabalho, e mais do que isso, meus amigos, Fabrício Passos, Ana Carolina Azevedo (companheira no sofrimento), Pedro Paulo Pereira Júnior, Elen Chavez, Amarildo Miranda, Fábio Fortes. E a Emiliano Medei (saudades do Emiliano).

Epígrafe

*“O MARCIANO encontrou-me na rua
e teve medo de minha impossibilidade humana.
Como pode existir, pensou consigo, um ser
que no existir põe tamanha anulação de existência?”*

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

RODRIGUES JR, Luiz Fernando. Enalapril Aumenta a Corrente Transitória de Efluxo de K^+ (I_{to}) em Ambos os Ventrículos de Ratos Espontaneamente Hipertensos. Rio de Janeiro, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia)- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

A hipertrofia ventricular ocasiona remodelamento eletrofisiológico cardíaco, e está associada à elevada incidência de morte súbita em seus portadores. A redução na corrente transitória de efluxo de K^+ (I_{to} - Transient outward potassium current), já descrita em animais hipertensos, pode retardar a repolarização ventricular, aumentando a duração do potencial de ação cardíaco, propiciando o aparecimento de eventos arrítmicos complexos. Trabalhos em modelos animais e em humanos indicam que o tratamento crônico com inibidores da enzima conversor de Angiotensina é capaz de reduzir a ocorrência desses eventos reduzindo assim a incidência de morte súbita em pacientes com hipertrofia cardíaca.

Avaliamos então, se o tratamento anti-hipertensivo, com Enalapril e/ou Hidralazina, em ratos hipertensos, recupera a amplitude normal de I_{to} no ventrículo esquerdo (VE), e se há influência de algum dos tratamentos sobre I_{to} no ventrículo direito (VD).

Para realização do estudo foram utilizados quatro grupos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR – spontaneously hypertensive rats): 1) controle (SHR); 2) tratados com Enalapril (SHRE) (10 mg/kg/dia); 3) tratados com Hidralazina (SHRH) (20 mg/kg/dia), e 4) tratados com as mesmas doses acima descritas de Enalapril e Hidralazina (E+H) e um grupo com ratos não hipertensos: 5) Wistar Kyoto sem tratamento (WK). O tratamento teve duração de 6 semanas. I_{to} foi avaliada pela técnica de Whole-Cell Patch Clamp.

RESULTADOS (média±SEM): No VE, o pico de I_{to} para o grupo SHR foi de $8,2\pm 0,8$ pA/pF (N=8), estatisticamente diferente dos outros quatro grupos: SHRE= $24,1\pm 2,7$ pA/pF (N=8), SHRH= $23,3\pm 4,4$ (N=7), E+H= $18,7\pm 3,3$ pA/pF (N=6) e WK= $20,4\pm 2,7$ pA/pF (N=8). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo de animais WK. Sugerindo uma recuperação de I_{to} com todos os tratamentos. No VD, não há diferença entre o pico de I_{to} no grupo WK, $19,6\pm 2,4$ pA/pF, e SHR, $18,5\pm 2,8$ pA/pF. Os grupos SHRE e E+H apresentaram aumento de I_{to} , $32,3\pm 3,1$ pA/pF e $29,1\pm 3,6$ pA/pF respectivamente, em relação ao grupo SHR.

ABSTRACT

RODRIGUES JR, Luiz Fernando. Enalapril Aumenta a Corrente Transitória de Efluxo de K^+ (I_{to}) em Ambos os Ventrículos de Ratos Espontaneamente Hipertensos. Rio de Janeiro, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia)- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

The cardiac ventricular hypertrophy leads to cardiac electrophysiological remodeling, and is associated to an increased incidence of cardiac sudden death on its owners. The reduction of transient outward potassium current (I_{to}) described in hypertensive animals, could delay the ventricular repolarization by increasing the cardiac action potential duration, leading to the occurrence of complex ventricular arrhythmias. It had been shown, in human and in animal model, that treatment with Angiotensin converting enzyme inhibitors can reduce the incidence of arrhythmic events and by consequence the incidence of sudden death.

We studied if the anti-hypertensive treatment with Enalapril and/or Hydralazine is able to recuperate the normal amplitude of I_{to} in the left ventricle (LV), and if these treatments affect I_{to} in the right ventricle (RV).

Four groups of spontaneously hypertensive rats (SHR) were utilized in the study, 1)Control (SHR), 2) SHR treated with Enalapril (10mg/Kg/day) (SHRE), 3) SHR treated with Hydralazine (20mg/Kg/day) (SHRH) and 4) treated with Enalapril (10mg/Kg/day) and Hydralazine (20mg/Kg/day) (E+H). Another group, with normotensive Wistar Kyoto (WK) rats without treatment was utilized as control. Treatment had 6 weeks of duration. I_{to} was assessed by Whole-Cell Patch Clamp.

RESULTS (mean \pm SEM): In LV, peak of I_{to} was $8,2\pm 0,8$ pA/pF (N=8) in SHR, statistically different from the other four groups: SHRE= $24,1\pm 2,7$ pA/pF (N=8), SHRH= $23,3\pm 4,4$ (N=7), E+H= $18,6\pm 3,3$ pA/pF (N=6) e WK= $20,4\pm 2,7$ pA/pF (N=8). There was no difference between the treated groups and WK, suggesting that all treatments were able to bring I_{to} to a normal level. In RV, there was no difference in I_{to} peak between WK and SHR, $19,6\pm 2,4$ pA/pF and $18,5\pm 2,8$ pA/pF, respectively. The SHRE and E+H groups presented increase in I_{to} peak, $32,3\pm 3,1$ pA/pF and $29,1\pm 3,6$ pA/pF, respectively, in relationship to SHR group.

LISTA DE ABREVIÇÕES

τ_r	Constante de tempo de reativação
ANOVA	(Analysis of Variance) Análise de variância
C_m	Capacitância da membrana plasmática
DPA	Duração do potencial de ação
E+H	Ratos espontaneamente hipertensos tratados com Enalapril e Hidralazina
ECA	Enzima conversora de Angiotensina
ECM	(extracellular matrix) Matriz extracelular
G	Condutância
G/Gmax	Condutância normalizada pela condutância máxima
Gmax	Condutância máxima
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
I	Corrente iônica
I/I _{max}	Corrente normalizada pela corrente máxima
I_K	Corrente de potássio retificador retardado
I_{Kr}	Corrente de potássio retificador retardado, componente rápido
I_{Ks}	Corrente de potássio retificador retardado, componente lento
I_{Kur}	Corrente de potássio retificador retardado, componente ultra-rápido
I _{max}	Corrente máxima
I_{to}	Corrente de efluxo transitório de potássio
I_{tof}	Corrente de efluxo transitório de potássio, componente rápido
I_{tos}	Corrente de efluxo transitório de potássio, componente lento
I-V	Relação corrente voltagem
KChAP	Proteínas associadas a canais de potássio
KChIP	Proteínas integradas a canais de potássio
RVP	Resistência vascular periférica
SHR	(Spontaneously hypertensive rats) Ratos espontaneamente hipertensos
SHRE	Ratos espontaneamente hipertensos tratados com Enalapril
SHRH	Ratos espontaneamente hipertensos tratados com Hidralazina
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
WK	Kistar Kyoto

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01	Relação entre o potencial de ação e correntes de potássio do coração----- 23
Figura 02	Relação entre o potencial de ação e I_{to} ----- 24
Figura 03A	Estrutura molecular das subunidades-a----- 26
Figura 03B	Formação do tetrâmro pelas subunidades-a----- 26
Figura 04	Relação Peso do Coração/Peso Corporal (HW/BW)----- 43
Figura 05	Capacitância da membrana de cardiomiócitos do VE----- 44
Figura 06	Capacitância da membrana de cardiomiócitos no VD----- 45
Figura 07A	Protocolo de pulsos para construção da curva I-V de I_{to} ----- 47
Figura 07B	Traçado representativo de I_{to} obtido de cardiomiócito do VE de rato WK----- 47
Figura 07C	Traçado representativo de I_{to} obtido de cardiomiócito do VE de rato SHR----- 47
Figura 07D	Relação I-V de I_{to} no VE para WK e SHR----- 47
Figura 8A	Traçado representativo de I_{to} obtido de cardiomiócito do VD de rato WK----- 49
Figura 8B	Traçado representativo de I_{to} obtido de cardiomiócito do VD de rato SHR----- 49
Figura 8C	Relação I-V de I_{to} no VD para WK e SHR----- 49
Figura 9	Curva de ativação de I_{to} de cardiomiócitos do VE para WK e SHR----- 52
Figura 10	Curva de ativação de I_{to} de cardiomiócitos do VD para WK e SHR----- 53
Figura 11A	Protocolo de pulsos utilizado para obtenção da curva de inativação----- 56
Figura 11B	Traçado representativo da inativação de I_{to} em cardiomiócito do VE de rato WK----- 56
Figura 11C	Traçado representativo da inativação de I_{to} em cardiomiócito do VE de rato SHR----- 56
Figura 11D	Inativação de I_{to} no VE para WK e SHR----- 56
Figura 12A	Traçado representativo da inativação de I_{to} em cardiomiócito do VD de rato WK----- 58
Figura 12B	Traçado representativo da inativação de I_{to} em cardiomiócito do VE de rato SHR----- 58
Figura 12C	Inativação de I_{to} em cardiomiócitos do VD para WK e SHR----- 58
Figura 13A	Protocolo de voltagem utilizado para obtenção da curva de reativação de I_{to} ----- 61
Figura 13B	Traçado representativo da reativação de I_{to} no VE para WK----- 61
Figura 13C	Traçado representativo da reativação de I_{to} no VD para SHR--- 61
Figura 13D	Reativação de I_{to} no VE para WK e SHR----- 61
Figura 14A	Traçado representativo da reativação de I_{to} no VD para WK----- 63
Figura 14B	Traçado representativo da reativação de I_{to} no VD para SHR--- 63
Figura 14C	Reativação de I_{to} no VD para WK e SHR----- 63
Figura 15	Capacitância da membrana em cardiomiócitos do VE após tratamento----- 65
Figura 16	Capacitância da membrana em cardiomiócitos do VD após tratamento----- 67

Figura 17A	Traçado representativo de I_{to} obtido de cardiomiócito do VE de rato SHR-----	69
Figura 17B	Traçado representativo de I_{to} obtidos de cardiomiócito do VE de rato SHR tratado com Enalapril-----	69
Figura 17C	Traçado representativo de I_{to} obtido de cardiomiócito do VE de rato SHR tratado com Hidralazina-----	69
Figura 17D	Traçado representativo de I_{to} obtido de cardiomiócito do VE de rato SHR tratado com Enalapril e Hidralazina-----	69
Figura 17E	Relação I-V de I_{to} no VE para SHR após tratamento-----	69
Figura 18A	Traçado representativo de I_{to} obtido de cardiomiócito do VD de rato SHR-----	71
Figura 18B	Traçado representativo de I_{to} obtido de cardiomiócito do VD de rato SHR tratado com Enalapril-----	71
Figura 18C	Traçado representativo de I_{to} obtido de cardiomiócito do VD de rato SHR tratado com Hidralazina-----	71
Figura 18D	Traçado representativo de I_{to} obtido de cardiomiócito do VD de rato SHR tratado com Enalapril e Hidralazina-----	71
Figura 18E	Relação I-V de I_{to} no VD para SHR após tratamento-----	71
Figura 19A	Curvas de Ativação de I_{to} em cardiomiócitos do VE após o tratamento-----	74
Figura 19B	$V_{1/2}$ de ativação em cardiomiócitos do VE após o tratamento----	74
Figura 20A	Curvas de Ativação de I_{to} em cardiomiócitos do VD após o tratamento-----	76
Figura 20B	$V_{1/2}$ de ativação em cardiomiócitos do VD após o tratamento---	76
Figura 21A	Curvas de Inativação de I_{to} em cardiomiócitos do VE após o tratamento-----	79
Figura 21B	$V_{1/2}$ de inativação no VE após o tratamento-----	79
Figura 22A	Curvas de Inativação de I_{to} em cardiomiócitos do VD após o tratamento-----	81
Figura 22B	$V_{1/2}$ de inativação em cardiomiócitos do VD após o tratamento	81
Figura 23A	Curva de reativação de I_{to} em cardiomiócitos do VE após tratamento-----	84
Figura 23B	Constante de tempo de reativação (τ_R) de I_{to} no VE após o tratamento-----	84
Figura 24A	Curva de reativação de I_{to} em cardiomiócitos do VD após tratamento-----	86
Figura 24B	Constante de tempo de reativação (τ_R) de I_{to} no VD após o tratamento-----	86

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Densidade de I_{to} em +60mV-----	50
Tabela 2 Parâmetros da Ativação de I_{to} -----	54
Tabela 3 Parâmetros de Inativação de I_{to} -----	59
Tabela 4 Constante de recuperação de inativação de I_{to} no VE-----	64
Tabela 5 Densidade de I_{to} em +60mV após o tratamento-----	72
Tabela 6 Parâmetros de ativação de I_{to} após o tratamento-----	77
Tabela 7 Parâmetros de Inativação de I_{to} no VD-----	82
Tabela 8 Constante de reativação de I_{to} no VD-----	87

SUMÁRIO

	Pág.
1-INTRODUÇÃO	16
1.1-Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS).....	16
1.2-Hipertrofia Ventricular.....	18
1.3-Remodelamento Iônico.....	21
1.4.-Corrente Transitória de Efluxo de Potássio (I_{to}).....	22
1.4.1-Aspectos Gerais.....	22
1.4.2-Propriedades Moleculares de I_{to}	26
1.4.3- I_{to} na Hipertrofia Cardíaca.....	29
1.5-Ratos SHR como Modelo de Hipertensão Arterial Sistêmica.....	30
2-OBJETIVOS	33
3-MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1-Desenho Experimental.....	34
3.2-Isolamento dos Cardiomiócitos.....	35
3.3-Drogas e Soluções.....	36
3.4-Registros de Corrente no Patch Clamp.....	36
3.4.1-Preparação Inicial.....	36
3.4.2-Protocolos Eletrofisiológicos.....	38
3.4.2.1-Capacitância celular.....	38
3.4.2.2-Relação Corrente-Voltagem.....	38
3.4.2.3-Inativação Estacionária.....	40
3.4.2.4-Recuperação da Inativação (Reativação)	40

3.5-Análise Estatística-----	41
4-RESULTADOS-----	42
4.1-Relação Peso do Coração/Peso corporal (HW/BW) -----	42
4.2-Comparação entre Wistar Kyoto e SHR-----	44
4.2.1-Capacitância da Membrana de Cardiomiócitos do VE-----	44
4.2.2-Capacitância da Membrana de Cardiomiócitos do VD-----	45
4.2.3-Relação Corrente-Voltagem de I_{to} em Cardiomiócitos do VE-----	46
4.2.4-Relação Corrente-Voltagem de I_{to} em Cardiomiócitos do VD-----	48
4.2.5-Ativação Estacionária de I_{to} em Cardiomiócitos do VE-----	51
4.2.6-Ativação Estacionária de I_{to} em Cardiomiócitos do VD-----	53
4.2.7-Inativação Estacionária de I_{to} em Cardiomiócitos do VE-----	55
4.2.8-Inativação Estacionária de I_{to} em Cardiomiócitos do VD-----	57
4.2.9-Reativação de I_{to} em Cardiomiócitos do VE -----	60
4.2.10-Reativação de I_{to} em Cardiomiócitos do VD-----	62
4.3-Efeitos após Tratamento com Drogas Anti-Hipertensivas -----	65
4.3.1-Capacitância da Membrana de Cardiomiócitos do VE-----	65
4.3.2-Capacitância da Membrana de Cardiomiócitos do VD -----	66
4.3.3-Relação Corrente-Voltagem de I_{to} no VE -----	68
4.3.4-Relação Corrente Voltagem de I_{to} no VD-----	70
4.3.5-Ativação Estacionária de I_{to} no VE-----	73
4.3.6-Ativação Estacionária de I_{to} no VD-----	75
4.3.7-Inativação Estacionária de I_{to} em Cardiomiócitos do VE-----	78
4.3.8-Inativação Estacionária de I_{to} em Cardiomiócitos do VD-----	80
4.3.9-Reativação de I_{to} em Cardiomiócitos do VE -----	83
4.3.10- Reativação de I_{to} em Cardiomiócitos do VD-----	85

5-DISCUSSÃO -----	88
5.1-Relação Peso do Coração/Peso Corporal (HW/BW)-----	88
5.2-Capacitância da Membrana Celular-----	89
5.3-Densidade de I_{to} -----	91
5.4-Ativação e Inativação de I_{to} -----	93
5.5-Reativação de I_{to} -----	94
6-CONCLUSÕES	97
7-PERSPECTIVAS DE CONTINUAÇÃO DO ESTUDO NO DOUTORADO -----	98
8-REFERÊNCIAS -----	99

1-Introdução

1.1-Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um problema mundial de saúde pública, sendo considerada o maior fator de risco para distúrbios cardiovasculares (doença arterial coronariana, acidente vascular encefálico e insuficiência cardíaca), e a maior causa de morbidade e mortalidade em humanos (Kannel, 2000).

Humanos são considerados hipertensos quando apresentam pressão arterial sistólica igual ou maior que 140mmHg ou diastólica igual ou maior que 90mmHg (European Society of Hypertension, 2003). As causas da HAS são diversas. Pode ter relação com fatores comportamentais, como ingestão excessiva de sal, ou falta de atividade física. Pode ter caráter genético, ou estar relacionada a outros fatores de risco como, por exemplo, a obesidade e o estresse. Mas na maioria dos casos é composta pela associação dos inúmeros fatores (Swales, 1994).

A hipertensão pode ser classificada como primária ou secundária. O primeiro tipo envolve a grande maioria dos casos, podendo ser explicada pela falência de diversos mecanismos regulatórios, como controle nervoso do débito cardíaco e resistência vascular periférica, controle renal do volume e complacência dos vasos, e controle local da resistência vascular periférica pelo endotélio. O aumento na pressão arterial no caso da hipertensão primária é, em geral, insidioso e sem apresentação sintomática. No caso da hipertensão secundária, o aumento na pressão arterial em geral tem início súbito por comprometimentos nos níveis renal, endócrino e vascular (Stokes, 1989).

A pressão arterial de um indivíduo é o resultado das propriedades hemodinâmicas do sistema circulatório (coração e vasos sanguíneos), que têm

como objetivo manter o fornecimento adequado de nutrientes e oxigênio para todas as regiões do corpo, e remover as escórias e produtos do catabolismo. Assim sendo, a tensão na parede das artérias depende da força de batimento do coração, da volemia, do formato, estrutura e distensibilidade dos vasos sanguíneos e de fatores humorais.

Independentemente da causa inicial, na HAS ocorre redução progressiva na elasticidade da parede da artéria. O aumento da tensão na parede dos vasos eleva o cisalhamento, que então lesiona o endotélio da parede arterial. Essas áreas lesionadas liberam mediadores inflamatórios criando um processo inflamatório local, que leva a deposição de colesterol nas paredes das artérias afetadas, ocorrendo formação de placas ateroscleróticas, que por sua vez reduzem a luz arterial, podendo chegar a obstruir completamente o vaso. Esta é uma forma de lesão de órgãos-alvo causada pela hipertensão. Esta forma de lesão normalmente evolui ao longo de anos, gerando hipertrofia e remodelamento dos vasos de resistência, principalmente arteríolas retinianas, renais e do sistema nervoso central (Safar, 1994).

Outra forma de lesão ocorre com o coração, quando o aumento da resistência vascular periférica (RVP) ocasiona sobrecarga de pressão, aumentando o trabalho cardíaco. Como consequência ocorre um remodelamento cardíaco, com aumento da massa muscular, espessamento das paredes do ventrículo esquerdo (hipertrofia concêntrica), fibrose intersticial e remodelamento iônico. Pode-se chamar de remodelamento iônico cardíaco o conjunto de alterações do transporte iônico que ocorrem após um estímulo inicial, afetando principalmente os canais iônicos, seja diretamente, como alteração da condutância iônica ou alteração da ativação, inativação e reativação, ou simplesmente alteração nas proporções normais entre as

populações dos diferentes tipos de canais nas diversas regiões do coração (Nattel, 2000).

Das inúmeras drogas utilizadas no tratamento da HAS, os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) vêm se destacando por apresentarem efeitos que não se correlacionam tão somente com a redução da sobrecarga de pressão ventricular, mas também com efeitos farmacológicos recentemente relatados, como redução da deposição de colágeno na meio extracelular, redução na incidência de eventos arrítmicos e redução de morte súbita.

1.2-Hipertrofia Ventricular

Independentemente da HAS, a hipertrofia um fator de risco para doenças cardiovasculares, estando relacionada a um elevado risco de morte súbita devido a arritmias ventriculares complexas (Messerli, 1984; Kannel, 1988).

Quando o coração encontra-se em uma situação em que necessita aumentar a produção de força, existem três mecanismos capazes de responder a esta demanda. O primeiro e mais imediato é o mecanismo de Frank-Starling, que é o fenômeno de aumento da força de contração com o estiramento da fibra muscular miocárdica. O segundo mecanismo é o aumento na quantidade de sarcômeros dentro das células musculares (hipertrofia celular). E por último, o organismo pode liberar uma série de substâncias capazes de aumentar a contratilidade miocárdica.

O mecanismo de Frank-Starling é limitado, pois quando o estiramento ótimo da fibra muscular é ultrapassado começa a ocorrer redução na força gerada. Já a liberação de substâncias inotrópicas pode ser deletéria com o tempo. Assim, o aumento da massa muscular tem um papel fundamental quando ocorre um aumento na sobrecarga hemodinâmica (Lorell, 2000).

A hipertrofia cardíaca, em humanos, pode ser considerada patológica ou não. Ela não é considerada deletéria em três casos específicos, no crescimento da criança e do adolescente, na gravidez e nos atletas. No primeiro caso, é natural que com o crescimento, e aumento da massa corporal, o coração de crianças e adolescentes aumente sua massa muscular. Na gravidez, é necessário um aumento no débito cardíaco, que é acompanhado por um importante aumento na massa ventricular esquerda (Mesa AM, 1999). E por último, atletas podem apresentar hipertrofia ventricular esquerda, que é uma adaptação natural à necessidade de aumento no débito cardíaco (Colan SD, 1997). Essas situações são interpretadas no contexto clínico, não sendo consideradas disfunção cardíaca.

A hipertrofia é considerada deletéria quando é desencadeada em resposta a algum mecanismo patológico como, por exemplo, doenças valvares, hipertensão arterial, infarto agudo do miocárdio e cardiomiopatias. Ela é a resposta inicial do coração na tentativa de compensar um aumento no trabalho cardíaco. O prolongamento desta condição leva à falência cardíaca, arritmias (Aronson, 1991), podendo chegar à morte súbita (Akazawa, 2003).

Ao nível celular ocorrem além do aumento do volume celular e da síntese protéica, também ocorre expressão de genes fetais (Sadoshima, 1997). A forma pela qual o estresse mecânico é traduzido em remodelamento cardíaco ainda é bastante controversa, sendo a hipótese mais aceita a da existência de uma ligação entre a matriz extracelular (extracelullar matrix – ECM, é a região que envolve e da suporte às células teciduais) e o núcleo da célula. Provavelmente, essa ligação é feita através das Integrinas, que, são proteínas que possuem ligação com a ECM e com o citoesqueleto celular (que se liga ao núcleo). Assim estímulos mecânicos externos poderiam ser transformados em alterações bioquímicas dentro da célula, levando a hipertrofia (Terracio, 1991).

Na hipertrofia por sobrecarga de pressão, como na hipertensão arterial sistêmica, ocorre também um aumento na deposição de colágeno na ECM, caracterizando-se por fibrose intersticial e perivascular. Além disso, fatores liberados na circulação sangüínea, como Angiotensina II e Aldosterona e catecolaminas, podem não só estimular a deposição, mas também reduzir a quebra do colágeno na ECM pelas colagenases cardíacas, causando acúmulo de colágeno no interstício (Weber, 1994).

Atualmente diversas drogas são utilizadas no tratamento da HAS, em geral ocorre uma associação de beta-bloqueadores, bloqueadores de canais de cálcio, nitratos, diuréticos e inibidores da ECA.

Os inibidores de ECA revertem a hipertrofia cardíaca. Liu e cols mostraram em 1998 que cardiomiócitos em cultura quando tratados com angiotensina II sofrem hipertrofia. A Angiotensina II, assim como Aldosterona, esta ligada ao aumento na deposição de tecido fibroso no coração. A angiotensina II ainda inibe a atividade da colagenase cardíaca (MMP1), o que leva ao acúmulo de colágeno no coração (Brilla, 1990 e 1994; Villareal, 1993). Inibidores da ECA também estão associados com a regressão da fibrose tecidual encontrada em pacientes com hipertrofia cardíaca (Brilla, 2000).

Os inibidores da ECA, possuem forma de atuação similar, diferindo apenas no que diz respeito à sua biodisponibilidade, os mais conhecidos são o Captopril, e o Enalapril, esta última é uma pró-droga que, após absorvida pelo intestino, é rapidamente hidrolisada no fígado em seu metabólito ativo, o Enalaprilato. Em aproximadamente 4 horas não se detecta mais Enalapril na corrente sangüínea de humanos, pois o que não é quebrado em Enalaprilato é rapidamente excretado, principalmente pelos rins. O Enalaprilato é detectado no sangue mesmo após 96 horas da administração do Enalapril (Tabacova, 2001).

1.3-Alterações Eletrofisiológicas

A hipertrofia cardíaca está associada a alterações eletrocardiográficas, muitos trabalhos têm descrito um aumento no tempo de duração do potencial de ação (DPA) de cardiomiócitos ventriculares em diversos modelos de hipertrofia cardíaca (Aronson, 1980; MacIntosh, 1998; Montaz, 1996), e também alteração na heterogeneidade dessa DPA entre as diversas regiões do miocárdio (Shypsey, 1997), o que poderia explicar, junto com as outras modificações do tecido cardíaco, a ocorrência de morte súbita em pacientes com hipertrofia cardíaca (Aronson, 1991; Hart, 1994). A morte súbita é a principal complicação relacionada à hipertrofia cardíaca. A literatura aponta a modificação de I_{to} como uma das responsáveis pelas alterações do potencial de ação no coração e, por conseguinte, pela ocorrência de morte súbita em portadores de hipertrofia ventricular.

1.4.-Corrente Transitória de Efluxo de Potássio (I_{to})

1.4.1-Aspectos Gerais

Podemos classificar as correntes de potássio dependentes de voltagem, nos mamíferos, em dois grupos de acordo com a biofísica de ativação e inativação da corrente. O primeiro é conhecido como retificador retardado (I_K), assim chamada devido a sua ativação ser muito mais lenta que a ativação da corrente de sódio, tendo como características principais uma ativação lenta e uma inativação inexistente ou extremamente lenta (Oudit, 2001). Inicialmente foi observado que havia dois grupos dentro de I_K , que diferiam entre si pela velocidade de ativação, um com ativação mais rápida (I_{Kr} - corrente de potássio retificador retardado, componente rápido, com constante de tempo de ativação da ordem de alguns milissegundos) e outro com ativação mais lenta (I_{Ks} - corrente de potássio retificador retardado, componente lento, com constante de tempo de ativação por volta de 500 a 2000 milissegundos). Um terceiro componente foi identificado posteriormente, com ativação mais veloz do que I_{Kr} , sendo chamada de ultra-rápida (I_{Kur} - corrente de potássio retificador retardado, componente ultra-rápido) (Tristani-Firouze, 2001). O segundo grupo compreende as correntes de potássio transientes de efluxo independentes de cálcio, ou simplesmente I_{to} . Como característica em comum este grupo possui uma ativação e inativação rápidas (Giles, 1988; Campbell, 1993; Barry, 1996; Snyders, 1999; Nerbonne, 2000). Ver figura 1.

Em humanos, é na fase 1 do potencial de ação cardíaco que I_{to} é mais importante, já em roedores, esta é a principal corrente repolarizante, devido ao fato de o potencial de ação ser comparativamente mais rápido, pois estes animais apresentam frequência cardíaca muito elevada (Sanguinetti, 2002). Por essa

contribuição, I_{to} tem grande influência sobre a amplitude da corrente de cálcio tipo-L, modulando assim o acoplamento excitação-contração no coração (Sah, 2002).

Originalmente foram descritos dois componentes de I_{to} : I_{to1} e I_{to2} . Este segundo componente não se trata de uma corrente de potássio, mas sim de uma corrente de cloreto, sendo apenas I_{to1} uma corrente de potássio (Campbell, 1995).

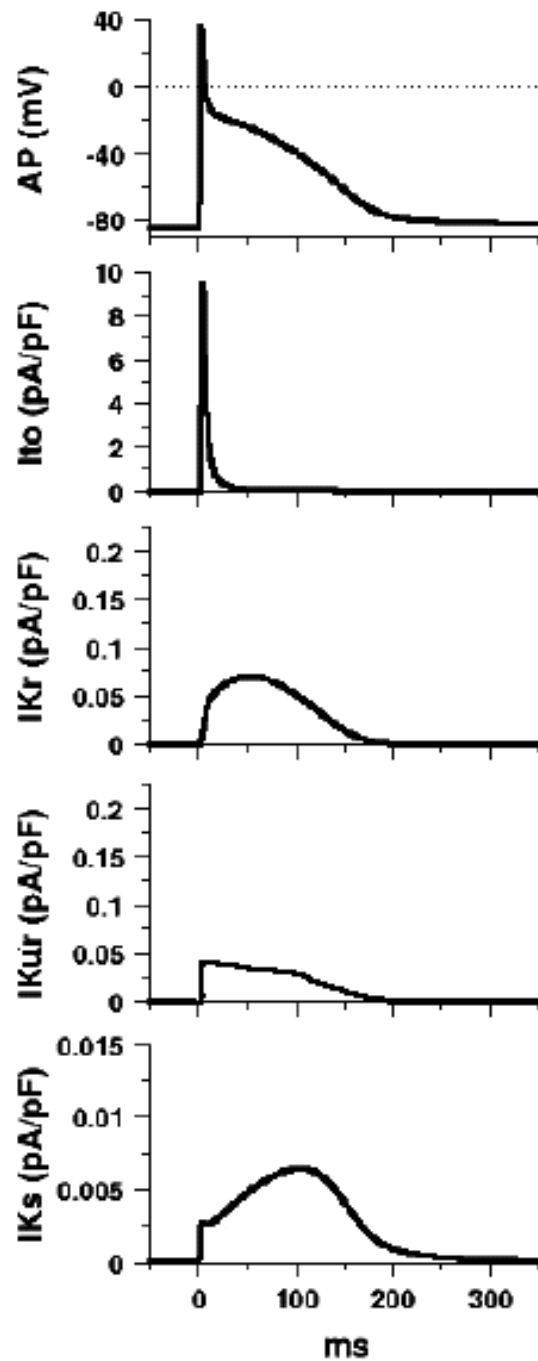


Figura 1: Relação entre o potencial de ação (AP- action potential) e as correntes de potássio do coração. Destacando-se a velocidade de ativação e inativação extremamente rápidas de I_{to} , e a ativação com velocidades diferentes dependendo do componente da corrente e potássio retificador retardado (I_K), ultra rápido (I_{Kur}), rápido (I_{Kr}) e lento (I_{Ks}). Modificado de Oudit, 2001.

I_{to1} , ou simplesmente I_{to} , também pode ser dividida em dois componentes, de acordo com a inativação, I_{tof} com inativação rápida e I_{tos} com inativação lenta. (Sanguinetti, 2002), ver figura 2.

As correntes classificadas como I_{tof} já foram descritas nos cardiomiócitos ventriculares em diversas espécies de animais, como gato (Furukawa, 1990), cão (Litovisk, 1988), furão (Campbell, 1993), humanos (Nabauer, 1996) camundongos (Xu, 1999) e ratos (Apkon, 1991), e também em cardiomiócitos atriais em cão (Yue, 1996), rato (Boyle, 1991), humano (escande, 1987) e camundongo (Xu, 1999).

As propriedades biofísicas e farmacológicas (bloqueio por heteropodatixina-2 e 3) das correntes classificadas como I_{tof} são muito similares nos diversos modelos.

Com a inativação muito mais lenta do que a de I_{tof} , I_{tos} já foi descrita em células ventriculares de camundongo, coelho, furão e rato, e também em átrio de coelho (Nerbonne, 2000). Apresentam além da velocidade de inativação outra diferença importante de I_{tof} , a heteropodatixina não tem ação farmacológica sobre esta corrente.

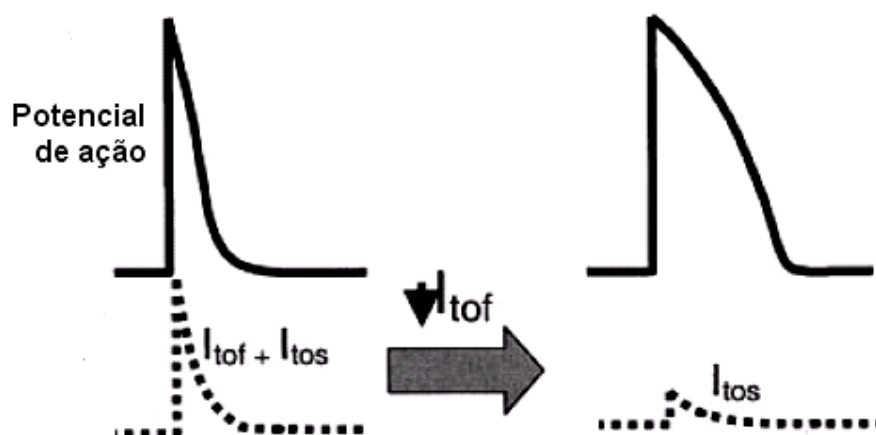


Figura 2: Desenho ilustrativo da relação da corrente de efluxo transitório de potássio (I_{to}) com o potencial de ação. Note o componente rápido (I_{tof}) possui maior amplitude que o componente lento (I_{tos}), e a redução na sua amplitude aumenta a duração do potencial de ação. Modificado de Sanguinetti, 2002.

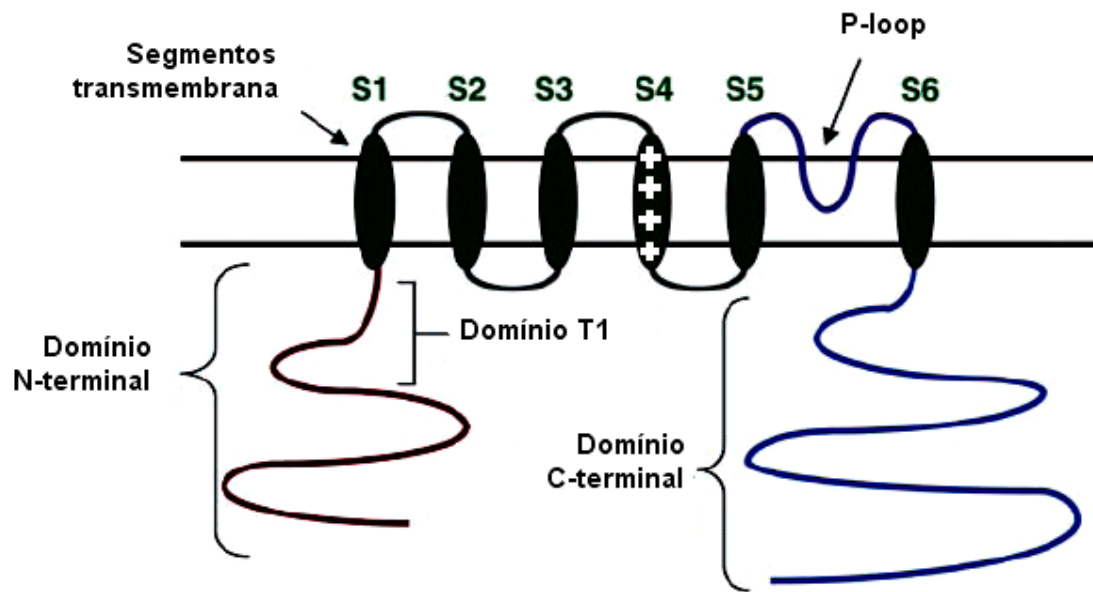
1.4.2-Propriedades Moleculares de I_{to}

Os canais de potássio dependentes de voltagem são classificados de acordo com a nomenclatura $Kv_{x,y}$. Kv indica que é um canal de potássio dependente de voltagem, x indica a subfamília e, y o número do gene dentro da subfamília (Barry, 1996).

Três grupos de canais de potássio são identificados de acordo com suas subunidades principais (α). Em todos os casos para formar um poro funcional é necessária a formação de um tetrâmero (Coetzee, 1999). O primeiro grupo é formado por seis segmentos transmembrana, o segundo grupo apresenta quatro segmentos transmembrana e o último apenas dois destes segmentos.

O canal funcional de I_{to} é formado por uma associação de quatro subunidades Kv_{α} (LY, 1992). Cada subunidade- α é formada por seis segmentos transmembrana (S1-S6) com grande homologia. Esses segmentos são ligados por alças de aminoácidos. Na região intracelular ligado a domínio transmembrana S1 encontra-se o N-terminal, onde existe uma região altamente conservada, conhecido como domínio-T, que é responsável pela associação entre as subunidades- α . Também no citoplasma, ligado ao segmento S-6 encontra-se o C-terminal. O quarto domínio (S4) possui grande número de resíduos positivos, o que sugere sua ação como sensor de voltagem. Entre os domínios S-5 e S-6 a alça extracelular (P-loop) projeta-se centralmente e confere seletividade para o potássio (Pongs, 1992). Esta estrutura é apresentada na figura 3.

A



B

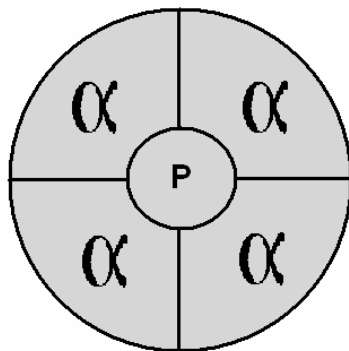


Figura 3: Estrutura molecular dos canais iônicos dependentes de voltagem responsáveis pela corrente de efluxo transitório de potássio (I_{to}). Em A, estrutura básica da subunidade-a, apresentando os seis segmentos transmembrana, com o sensor de voltagem no segmento S4. O P-loop, é a estrutura que confere seletividade ao potássio. Os segmentos N-terminal, C-terminal e o domínio-T são segmentos intracelulares. Em B, a organização tetramérica das subunidades-a, note-se a disposição dos segmentos P-loop no centro da estrutura. Modificado de Shieh, 2000 e de Birnbaum, 2004.

Com relação à expressão de I_{to} no coração, estudos em sistemas heterólogos sugerem que as subunidades α das famílias $Kv_{4,2}$, $Kv_{4,3}$ e $Kv_{1,4}$ seriam responsáveis pela formação do canal, pois todos apresentam características semelhantes à de I_{to} , como ativação e inativação rápidas e sensibilidade a 4-Aminopiridina. De fato, $Kv_{4,2}$ e $Kv_{4,3}$ apresentam cinética de ativação e inativação muito semelhantes à de I_{tof} , enquanto $Kv_{1,4}$ aproxima-se de I_{tos} (Nerbonne, 2000).

As subunidades α podem estar ligadas a moléculas regulatórias, como subunidades β , Frequenina, e KChAP. Cada subunidade β possui um sítio altamente conservado e um N-terminal muito variável, voltado para o sensor de voltagem da subunidade α . Estão classificadas três famílias de subunidades β ($Kv_{\beta 1}$, $Kv_{\beta 2}$ e $Kv_{\beta 3}$), que podem se associar com as subunidades α $Kv_{1,4}$ e $Kv_{4,3}$ alterando as propriedades biofísicas da corrente (Pongs, 1999).

Outro tipo de moléculas regulatórias são as *proteínas associadas aos canais de potássio dependentes de voltagem* ou KChAP. Elas aumentam a expressão de certas subunidades nas membranas celulares, aumentando assim a amplitude de corrente sem afetar a cinética de ativação e inativação do canal. No caso de I_{to} , estão relacionadas com $Kv_{4,3}$ (Wible, 1998).

As *proteínas de interação com canais de potássio dependentes de voltagem* (KCHIP1, 2 e 3 e Frequenina) são outra classe de substâncias regulatórias, sua ligação ocorre com as subunidades α de Kv_4 , aumentando sua amplitude modificando parâmetros biofísicos. Em ratos, a corrente que permeia $Kv_{4,2}$ pode ser ampliada por ação das KCHIP (An, 2000)

1.4.3- I_{to} na Hipertrofia Cardíaca

Poltreu e cols em 1995, observaram redução na amplitude de I_{to} em ventrículo direito de furões, utilizando um modelo de hipertrofia ventricular direita causada por hipertensão pulmonar. Momtaz e cols (1996) não observaram mudanças nas amplitudes de correntes como $I_{Ca,L}$, I_{Na-Ca} e de I_{sus} em ratos com hipertensão arterial sistêmica (HAS), mas sim uma íntima relação da amplitude de I_{to1} com o grau de hipertrofia encontrada nos ventrículos e com a duração do potencial de ação (DPA). Assim animais classificados como tendo hipertrofia moderada apresentaram uma amplitude de I_{to1} equivalente a 50% da amplitude encontrada nos animais controle e a DPA encontrava-se moderadamente aumentada. Quando a hipertrofia foi classificada como severa, a redução na amplitude de I_{to} foi ainda maior, chegando a 95% da amplitude dos animais controle, acompanhada por um grande aumento na DPA. Em 1998, McIntosh e cols relataram alterações muito semelhantes às encontradas por Momtaz, desta vez em coelhos uninefrectomizados, que desenvolveram HAS, sendo observada hipertrofia ventricular esquerda acompanhada por uma importante redução de I_{to} nesses animais em relação a animais controle.

No modelo de hipertrofia ventricular direita em ratos, induzida por Monocrotalina, que também apresenta redução da densidade de I_{to} , das três subunidades-a que podem formar o canal funcional de I_{to} ($Kv_{1.4}$, $Kv_{4.2}$, $Kv_{4.3}$), duas encontram-se com a expressão gênica reduzida, $Kv_{4.2}$ e $Kv_{4.3}$ (Zhang, 2004).

Ao contrario das subunidades-a, não há descrição na literatura de alterações das subunidades regulatórias, que podem afetar diretamente a amplitude, densidade de I_{to} e seus parâmetros biofísicos, na hipertrofia cardíaca.

De modo geral, pode-se concluir que I_{to} tem papel fundamental na fisiologia cardíaca, tanto em humanos, quanto em outras espécies de mamíferos, e que pequenas modificações em sua amplitude, densidade e biofísica podem ter conseqüências diretas na contratilidade miocárdica e por seguinte na fisiologia do coração.

1.5-Ratos SHR como Modelo de Hipertensão Arterial Sistêmica

Devido à grande importância epidemiológica, econômica e social da HAS, o seu estudo experimental faz-se extremamente valioso. Alguns modelos animais simulam, em parte, a hipertensão de humanos, sendo úteis nos estudos experimentais dos mecanismos da HAS e avaliação pré-clínica de drogas antihipertensivas. Entretanto, eles têm limitações, pois não apresentam o componente multifatorial como nos humanos.

Atualmente estão descritos diversos modelos de hipertensão arterial em animais, como o modelo descrito por Dahl, em 1962, onde uma cepa de rato desenvolveu sensibilidade a uma dieta hiper-sódica; o modelo de hipertensão arterial espontânea em ratos (SHR), descrito por Okamoto em 1963; o modelo de hipertensão neurogênica, por lesão do núcleo do trato solitário ou deafferentação dos barorreceptores aórticos, que em ratos ocasiona uma hipertensão súbita e severa, que leva o animal à morte por edema agudo de pulmão e insuficiência cardíaca (Doba, 1973). Há ainda as formas de hipertensão renal, como a descrita por Goldblatt, em 1932, realizando clampeamento da artéria renal, gerando um aumento da renina plasmática, levando a hipertensão (Carretero, 1974). A reno-privação, por retirada dos dois rins (Muirhead, 1953). A perinefrítica, por resposta inflamatória renal ao contato com celofane (Page, 1939). Há também o modelo de coarctação da

aorta, que reduz a luz arterial e o que utiliza um mineralocorticoide, acetato de desoxicorticosterona, associado à NaCl (DOCA-sal), causando esclerose renal (Selye, 1946).

Dentre todos esses modelos animais, o mais utilizado é o de hipertensão arterial espontânea em ratos (SHR). Este é o modelo que mais se assemelha a hipertensão arterial primária humana. Os animais começam a apresentar aumento da pressão arterial espontaneamente, a partir de 5 semanas de nascimento, e por volta da 7^a e a 15^a de vida já são classificados como hipertensos, atingindo o platô entre a 20^a e a 28^a semana. A causa da hipertensão nesses animais não está elucidada, há, no entanto, evidências de um aumento no tônus simpático, que justificaria o aumento nos níveis pressóricos.

Em 1995, Chavelier e cols mostraram que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados com Trandolopril, um inibidor da ECA, apresentavam menor atividade elétrica ectópica ventricular. Yokosshiki e cols em 1996, e Rials e cols em 1998 demonstraram em ratos SHR e coelhos hipertensos, respectivamente, que a regressão da hipertrofia ventricular esquerda por tratamento com captopril foi capaz de restituir o padrão eletrofisiológico normal dos cardiomiócitos.

Como mencionado anteriormente, diversos trabalhos apontam a corrente de potássio transiente de efluxo (I_{to}), como sendo uma das responsáveis pelo aumento na DPA observado na hipertrofia cardíaca (Sanguineti, 2002; Rials, 1998; Poltreu, 1995; Momtaz, 1996). Em roedores, esta é a principal corrente repolarizante do coração. Sua redução aumenta a duração do platô do potencial de ação, e indiretamente o influxo de cálcio para o interior das células (Kassiri, 2002).

Em 2000, Cerbai e cols demonstraram que ratos SHR tratados com Losartan, um bloqueador dos receptores de angiotensina, em doses que não levaram a redução importante da pressão sanguínea, tiveram uma redução da DPA, assim

como um aumento na densidade de I_{to} , sugerindo que a recuperação de I_{to} observada com a regressão da hipertrofia deve-se aos inibidores da ECA, e não a redução da sobrecarga de pressão.

Portanto, neste estudo avaliamos se o tratamento com Enalapril, um inibidor da ECA amplamente utilizado, em comparação com Hidralazina, um potente vasodilatador, que atua diretamente no músculo liso arteriolar, com mecanismo de ação ainda desconhecido (Brosnan, 1999), é capaz de aumentar a densidade de I_{to} em ambos os ventrículos de ratos SHR, na tentativa de avaliar um possível efeito direto do enalapril sobre I_{to} .

2-Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral investigar as alterações na corrente transitória de efluxo de potássio, em um modelo experimental de hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga de pressão (ratos SHR).

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar a densidade de I_{to} em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais SHR, e no ventrículo direito;
2. Avaliar a densidade de I_{to} em cardiomiócitos isolados de ambos os ventrículos de animais SHR, após o tratamento com drogas anti-hipertensivas: Enalapril, Hidralazina ou a associação de Enalapril e Hidralazina;
3. Avaliar os efeitos das drogas anti-hipertensivas (Enalapril, Hidralazina ou a associação de Enalapril e Hidralazina) sobre os parâmetros de ativação, inativação e reativação de I_{to} em cardiomiócitos isolados de ambos os ventrículos dos animais SHR.

3-Materiais e Métodos

3.1-Desenho Experimental

Como modelo de hipertrofia ventricular foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Como controles normotensos foram utilizados ratos Wistar Kyoto (WK), pois estes animais são originários da mesma cepa que gerou os animais SHR, com a diferença de não apresentarem alterações da pressão arterial (Fazan-Jr, 2001).

Os animais, com 8 semanas de nascimento, foram organizados em cinco grupos experimentais. 1) grupo controle com 6 animais WK, que não receberam qualquer tipo de tratamento medicamentoso (WK). 2) grupo controle com 6 SHR, também sem qualquer tratamento medicamentoso (SHR). 3) grupo formado por 6 animais SHR tratados com 10 mg/kg/dia de Enalapril (SHRE). 4) grupo de 6 animais tratados com 20mg/kg/dia de Hidralazina (SHRH). 5) grupo de 6 animais tratados com a associação de Enalapril e Hidralazina (10 e 20 mg/Kg/dia respectivamente) (E+H). O tratamento foi realizado por um período de seis semanas, e foi eficaz na redução da pressão arterial sistêmica medida, por pletismografia (Modelo 29 SSPII - TC Life Science Instruments), na cauda dos animais. A pressão arterial nos grupos tratados com Enalapril (138 ± 6 mmHg), Hidralazina (130 ± 5 mmHg) e com a associação de Enalapril e Hidralazina (130 ± 7 mmHg) foi menor ($p < 0,001$) em relação ao grupo SHR sem tratamento (204 ± 5 mmHg).

Durante todo o período de tratamento os animais tiveram acesso à comida e água *ad libidum*. A administração das drogas foi realizada por infusão intraesofasiana, com a técnica de gavage, onde uma agulha com a ponta polida, conectada a uma seringa de 1mL, era inserida no esôfago dos animais através da

boca (Schiffirin, 1984). As drogas foram diluídas em água destilada, de modo que o volume a ser infundido diariamente fosse o mesmo em todos os grupos (0,5mL). Os animais dos grupos WK e SHR, receberam infusão de volume equivalente de água destilada.

3.2-Isolamento dos Cardiomiócitos

Cardiomiócitos ventriculares de ratos foram dissociados por digestão enzimática (Colagenase tipo II. Worthington Biochemical, NJ). Ao término do período de tratamento os animais foram pesados, receberam 500 IU de heparina intraperitoneal, e foram anestesiados com éter. Após sacrificados por deslocamento cervical, tiveram seus corações removidos, pesados e canulados em um aparato de Langendorff modificado, sendo perfundidos retrogradamente pela artéria aorta, com solução Tyrode oxigenada (pH 7,4) aquecida a 37° C, a um fluxo de 10 mL/min.

O protocolo de isolamento consistiu em cinco minutos de perfusão com solução Tyrode contendo 1mM de CaCl₂, para lavagem e estabilização da frequência cardíaca, seguido de 5 minutos de perfusão com solução Tyrode sem CaCl₂, para que o coração parasse de contrair, e então a perfusão com solução Tyrode sem CaCl₂ contendo 0,5 mg/mL de Colagenase II, por cerca de seis a oito minutos. Para finalizar, o coração foi perfundido com solução Tyrode sem CaCl₂, por mais 15 min, para que a colagenase fosse eliminada e o processo de digestão terminado (Masuda, 1987).

Subsequentemente, os ventrículos foram removidos, separadamente, e reduzidos a pequenos pedaços através de dissociação mecânica com uma tesoura, sendo armazenados sob temperatura ambiente em uma cuba contendo solução

Kraft-Brühe (KB) modificada, que permite maior viabilidade dos cardiomiócitos isolados (Isenberg, 1982).

3.3-Drogas e Soluções

A solução Tyrode é composta de (em mM): 140 NaCl; 4 KCl; 1 MgCl₂; 10 HEPES; 10 Glicose e 2 CaCl₂; pH ajustado para 7,4 com NaOH.

A solução interna da pipeta para registro de I_{to} é composta (em mM): 125 KCl; 10 NaCl; 5 MgCl₂, 10 HEPES; 5 EGTA, com pH ajustado para 7,2 com KOH.

A solução KB modificada é composta de (em mM): 30 KCl; 70 Ácido Glutâmico; 10 KH₂PO₄; 1 MgCl₂; 20 Taurina; 10 HEPES; 10 Glicose; 0,3 EGTA; com pH ajustado para 7,3 com KOH.

Foram utilizados Enalapril Maleato (Sigma Chemical Co.) e Hidralazina (Sigma Chemical Co.).

3.4-Registros de Corrente no Patch Clamp

3.4.1-Preparação Inicial

A corrente de potássio transiente de efluxo (I_{to}) foi registrada através da técnica de whole-cell patch clamp (Hamill, 1981), utilizando um amplificador (Axopatch-1D, Axon Instruments), interligado a uma interface análogo-digital (Digidata 1200, Axon Instruments), que permitiu o registro das correntes em um microcomputador (Pentium I, Intel) através de um programa de aquisição e análise de dados (pClamp6, Axon Instruments). A taxa de aquisição de dados foi de 5 kHz e para eliminação de interferências foi utilizado um filtro passa-baixo de 2 kHz.

Primeiramente, micropipetas foram produzidas a partir de capilares de vidro de borosilicato com 1,2mm de diâmetro externo em um estirador horizontal (P-97, Sutter Instruments Co.). As micropipetas apresentavam resistência de ponta entre 3 e 5 MO, quando preenchidas com solução interna. Sendo conectadas ao pré-amplificador (*headstage CV4*, Axon Instruments), que faz contato com a solução no interior da pipeta através de um eletródio de prata cloretado.

Este pré-amplificador está adaptado a uma base, montada sobre um microscópio invertido (Zeiss Axiovert 25), e possui dois sistemas de manipulação espacial em três eixos. O primeiro sistema, macrométrico, permite a fácil localização da ponta da pipeta vista ao microscópio. E o segundo, micrométrico, permite o contato da pipeta com a célula sem lesionar a membrana celular.

Sobre o mesmo microscópio foi montada uma cuba com volume aproximado de 1mL, onde as células são colocadas para visualização. Durante a execução dos estudos eletrofisiológicos as células foram perfundidas continuamente com solução Tyrode oxigenada, contendo 1mM de CaCl_2 , e 100 μM de CdCl_2 para bloquear a corrente de cálcio tipo L.

Células quiescentes, com membranas de aspecto regular, sem grânulos internos ou sinais de lesão, e com estriações bem definidas foram utilizadas para o estudo. As pipetas então foram posicionadas próximas à membrana das células (escolhidas randomicamente) através do micromanipulador. Após o contato da pipeta com a célula foi aplicada uma leve pressão negativa no sistema, através de uma seringa, até que se formasse um selo giga-ohmico, neste momento aplicou-se uma pressão negativa mais intensa por um breve período de tempo, de modo a romper a membrana celular e obter-se acesso ao interior da célula, ficando então a resistência em serie do sistema de aquisição e a célula com resistência entre 200 e 500MO. Neste momento temos a configuração whole-cell patch clamp (Hamil, 1981).

Os protocolos eletrofisiológicos só foram aplicados após um período de estabilização de aproximado de 8 minutos.

3.4.2-Protocolos Eletrofisiológicos

3.4.2.1-Capacitância Celular

A capacitância celular foi estimada aplicando-se pulsos de voltagem de baixa amplitude, que sabidamente não deflagram abertura de canais iônicos dependentes de voltagem, a partir de um potencial de membrana de -70 mV, para -75, -65 e -60 mV respectivamente. As correntes capacitivas foram obtidas sem qualquer forma de compensação. A capacitância de membrana foi calculada como a área sob o transiente capacitivo dividido pela amplitude do pulso aplicado. Fizemos então uma média dos três valores de capacitância obtidos (referentes aos pulsos para -75, -65 e -60 mV), e consideramos esta média como sendo a capacitância da membrana celular.

3.4.2.2-Relação Corrente-Voltagem

Para construção da relação corrente voltagem de I_{to} a capacitância e a resistência em série foram compensadas de modo a reduzir ao máximo o transiente capacitivo. Pulsos despolarizantes de 300 ms de duração foram deflagrados de -50 até +60 mV, a partir de um potencial de repouso de -60 mV. A amplitude de I_{to} foi expressa, para cada potencial, como a diferença entre o pico de corrente observado e a corrente ao término do pulso despolarizante. A amplitude de corrente foi

normalizada pela capacitância de cada célula, para se ter uma noção de corrente por área de superfície celular (densidade de corrente).

A curva de ativação estacionária (Ativação Steady-State) de I_{to} foi obtida a partir da relação $I-V$, calculando-se a condutância (G_K) ao o íon K^+ como

$$G_K = \frac{I_K}{(V - V_R)},$$

onde I_K é a diferença entre o pico de corrente e a corrente ao termino

de cada pulso despolarizante (V), e V_R é o potencial de reversão do íon potássio, calculado a partir das concentrações interna e externa deste íon através da conhecida equação vê Nerst-Plank. A condutância em cada pulso despolarizante V aplicado, foi normalizada pela condutância máxima encontrada (G_{max}) ficando assim o resultado como uma fração de G_{max} (G/G_{max}). Para construção do gráfico de ativação, G/G_{max} foi colocado em função de cada pulso despolarizante deflagrado. Uma curva sigmóide foi ajustada aos pontos, de acordo com descrito por Hamill, em 1981, e amplamente utilizado na literatura, usando a equação descrita por Boltzmann (equação 1), onde $V_{1/2}$ é o potencial onde ocorre 50% da ativação máxima e o fator k representa a inclinação da curva, que está relacionada com o número equivalente de cargas movidas no campo elétrico da membrana durante a ativação dos canais ou, a inclinação da sigmoide.

Equação 1:
$$\frac{G}{G_{max}} = \frac{1}{1 + \exp[(V_{1/2} - V)/k]}$$

3.4.2.3-Inativação Estacionária

Para avaliação da dependência de voltagem da inativação estacionária de I_{to} (Inativação Steady-State), isto é, a curva de inativação de I_{to} , foi utilizado um protocolo de pulso duplo: Pré-pulsos de 300 ms foram deflagrados de -80 mV a +30 mV, em intervalos de 10mV. Cada pré-pulso era seguido por um pulso de 300 ms para +60 mV. A amplitude de I_{to} (I) foi medida em 60mV sendo, normalizada pela amplitude máxima (I_{max}) obtida, ficando então o resultado expresso como uma fração de I_{max} (I/I_{max}).

O gráfico foi construído colocando-se I/I_{max} em função do potencial do pré-pulso e uma curva sigmóide ajustada aos pontos, de acordo com a função descrita por Boltzmann (equação 2), onde $V_{1/2}$ é o potencial do pré-pulso que induz 50% da inativação máxima e o fator K representa o número equivalente de cargas movidas no campo elétrico da membrana durante a inativação dos canais.

Equação 2:
$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{1}{1 + \exp[-(V - V_{1/2})/k]}$$

3.4.2.4-Recuperação da Inativação (Reativação)

A recuperação da inativação foi avaliada por um protocolo de pulso duplo, onde o tempo entre os dois pulsos foi variável. Assim, foram aplicados pulsos despolarizantes, de 300 ms de duração, a partir de um potencial de repouso de -60 mV para +60 mV. O intervalo entre os pulsos (t) variou de 10 ms até 200 ms.

A amplitude de corrente do segundo pulso (I) foi normalizada pela média das amplitudes do primeiro pulso (I_{max}), ficando o resultado expresso em fração do primeiro pulso (I/I_{max}).

Para a construção do gráfico de reativação, I/I_{max} foi colocado em função do intervalo de tempo ente o primeiro e o segundo pulso. Utilizando do programa estatístico (Graph Pad 4, Prism, Co), fez-se o ajuste de uma função amplamente utilizada e que melhor se ajusta aos dados experimentais, uma exponencial de primeira ordem (equação 3), através da qual podemos obter a constante de tempo de recuperação da inativação (τ_r).

Equação 3:
$$\frac{I}{I_{max}} = 1 - \exp(-t/\tau)$$

3.5-Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos em média \pm S.E.M. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Nas comparações iniciais entre o grupo Wistar Kyoto e o SHR todas as análises foram feitas utilizando-se teste T de Student, não pareado.

Após o tratamento todas as análises foram feitas por análise de variância (One-Way ANOVA), com pós teste de Newman-Keuls.

4-Resultados

Inicialmente, foi comparada a relação peso do coração/peso corporal entre todos os grupos. Em uma segunda etapa comparamos os dados eletrofisiológicos entre os grupos controle Wistar Kyoto (normotensos) e SHR (hipertensos). Em uma terceira etapa, avaliamos os efeitos do tratamento com Enalapril, Hidralazina e com associação entre os dois medicamentos. Todos os resultados estão expressos em Média±SEM (N = número de células).

4.1-Relação Peso do Coração/Peso corporal (HW/BW)

Este é um índice que mostra a proporção do peso do coração em relação ao peso total do animal, o seu aumento sugere hipertrofia cardíaca.

Este índice está aumentado, $p < 0,01$, nos ratos SHR ($5,9 \pm 0,3 \text{g/Kg}$), N=4 animais, em relação aos WK ($4,3 \pm 0,2 \text{g/Kg}$), N=4 animais, sugerindo hipertrofia cardíaca nos SHR. Não foi possível o cálculo deste índice para todos os animais devido ao procedimento de isolamento celular, que é bastante sensível, sendo calculado apenas para uma parte de cada grupo experimental.

Interessantemente, nenhum dos tratamentos propostos parece reduzir esta hipertrofia cardíaca nos SHR, SHRE ($5,4 \pm 0,2 \text{g/Kg}$) com N=5 animais, SHRH ($5,9 \pm 0,1 \text{g/Kg}$) com N=5 animais e E+H ($5,2 \pm 0,1 \text{g/Kg}$) com N=5 animais, mantendo-se uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre todos os grupos tratados e o grupo WK. Ver figura 4.

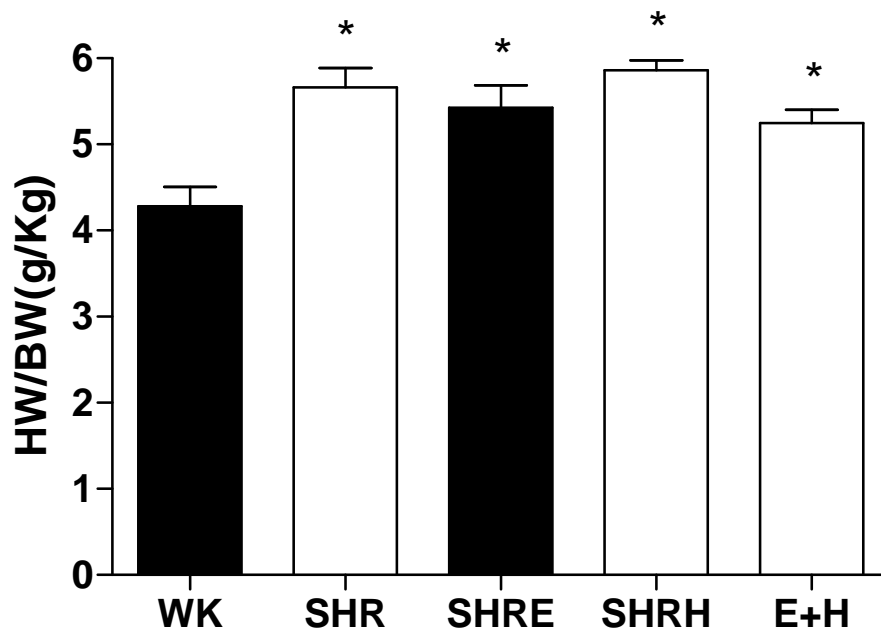


Figura 04: Relação Peso do Coração/Peso Corporal (HW/BW). Comparação que mostra a proporção do peso do coração em relação ao peso total de cada animal nos cinco grupos experimentais, Wistar Kyoro (WK, sem tratamento, N=4 animais), SHR (sem tratamento, N=4 animais), SHR tratados com Enalapril 10mg/Kg/dia (SHRE, N=5 animais), SHR tratado com Hidralazina 20mg/Kg/dia (SHRH, N=5 animais), e SHR tratado com Enalapril 10mg/Kg/dia e Hidralazina 20mg/Kg/dia (E+H, N=5 animais). * $p < 0,001$ em relação ao grupo WK, com One-Way ANOVA, e pós-teste de Newman-Keuls.

4.2-Comparação entre Wistar Kyoto e SHR

4.2.1-Capacitância da Membrana de Cardiomiócitos do VE

A capacitância da membrana foi de 105 ± 12 pF (N=8 células) nos cardiomiócitos do grupo WK, e 124 ± 20 pF (N=8 células) no grupo SHR. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (teste T de Student). Figura 5.

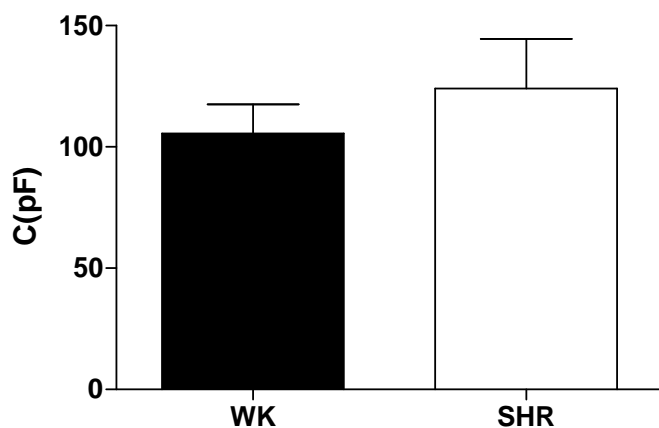


Figura 05: Capacitância da membrana de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo. Comparação entre os grupos controle Wistar Kyoto (sem tratamento, N=8 células) e o SHR (sem tratamento, N=8 células). Análise por teste T de Student não-pareado não evidencia diferença entre os dois grupos.

4.2.2-Capacitância da Membrana de Cardiomiócitos do VD

Interessantemente, no ventrículo direito, os animais SHR apresentaram a capacitância da membrana celular significativamente maior do que a dos animais WK, 121 ± 7 pF (N=11 células) para o grupo SHR contra 89 ± 7 pF (N=8 células) no grupo WK, $p < 0,01$. Figura 6.

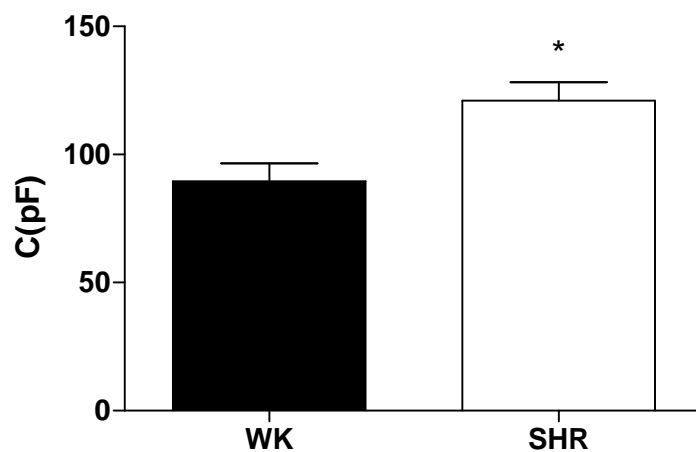


Figura 06: Capacitância celular no Ventrículo Direito. Comparação entre os grupos controle Wistar Kyoto (WK, sem tratamento, N=11 células) e o SHR (sem tratamento, N=8 células). * $p < 0,01$ em relação ao WK. Análise por teste T de Student não-pareado.

4.2.3-Relação Corrente-Voltagem de I_{to} em Cardiomiócitos do VE

A densidade de I_{to} , isto é, a amplitude da corrente I_{to} normalizada pela capacitância da membrana é apresentada na figura 7 em função do potencial de membrana imposto pelo valor da voltagem do pulso de estímulo.

Podemos observar que os animais Wistar Kyoto apresentam maior densidade de corrente I_{to} , em relação aos animais SHR a partir do potencial de -10 mV, $5,2 \pm 0,6$ pA/pF e $2,1 \pm 0,2$ pA/pF ($p < 0,05$), respectivamente. No potencial de +60mV, os valores de densidade de I_{to} são $20,4 \pm 2,7$ pA/pF e $8,2 \pm 0,8$ pA/pF ($p < 0,01$) para os grupos Wistar Kyoto e SHR, respectivamente. N=8 células no grupo WK e 8 células no grupo SHR.

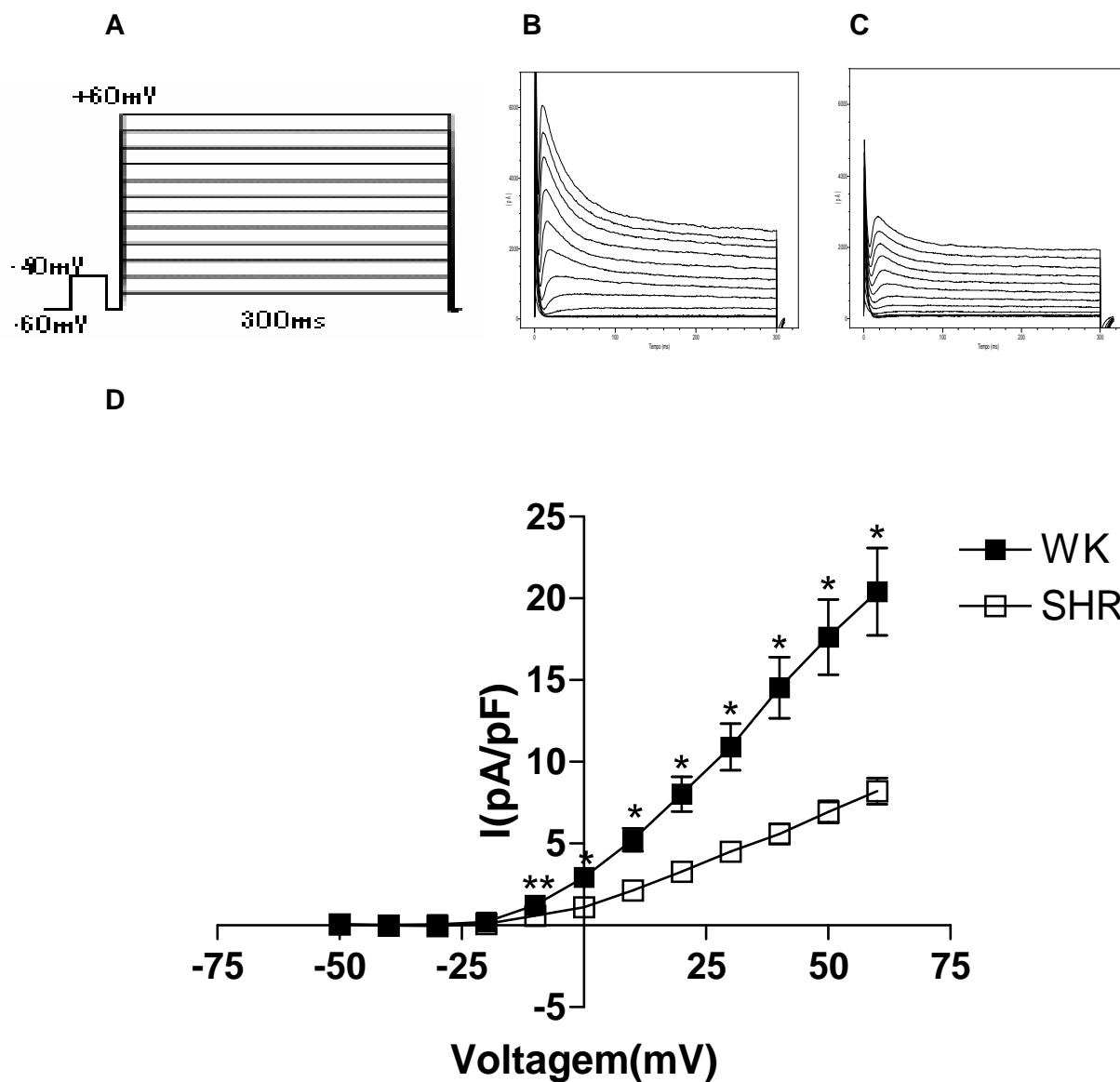


Figura 7: Relação Corrente-Voltagem da corrente transitória de efluxo de K^+ (I_{to}) em cardiomiócitos do VE de ratos Wistar Kyoto (■, N=8 células) e SHR (□, N=8 células). Em A, protocolo de pulsos para construção da curva I-V. Em B e C, traçados representativos de I_{to} obtidos de cardiomiócitos do VE de ratos Wistar Kyoto e SHR, respectivamente. Em D, o valor de amplitude de I_{to} , normalizada pela capacitância de membrana, está grafado em função do potencial teste. I_{to} foi ativada por pulsos despolarizantes de 300 ms, variando de -50 a +60 mV, aplicados em incrementos de 10 mV a partir de um potencial holding de -60 mV. * $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ em relação ao SHR.

4.2.4-Relação Corrente Voltagem de I_{to} em Cardiomiócitos do VD

Podemos observar na figura 8, que a relação corrente-voltagem de I_{to} , em cardiomiócitos isolados do ventrículo direito, é idêntica em todos os potenciais de membrana para os animais WK e SHR. A densidade de I_{to} no potencial de +60 mV foi de $19,6 \pm 2,4$ pA/pF no grupo WK (N= 8 células) e $18,5 \pm 2,8$ pA/pF no grupo SHR (N=11 células).

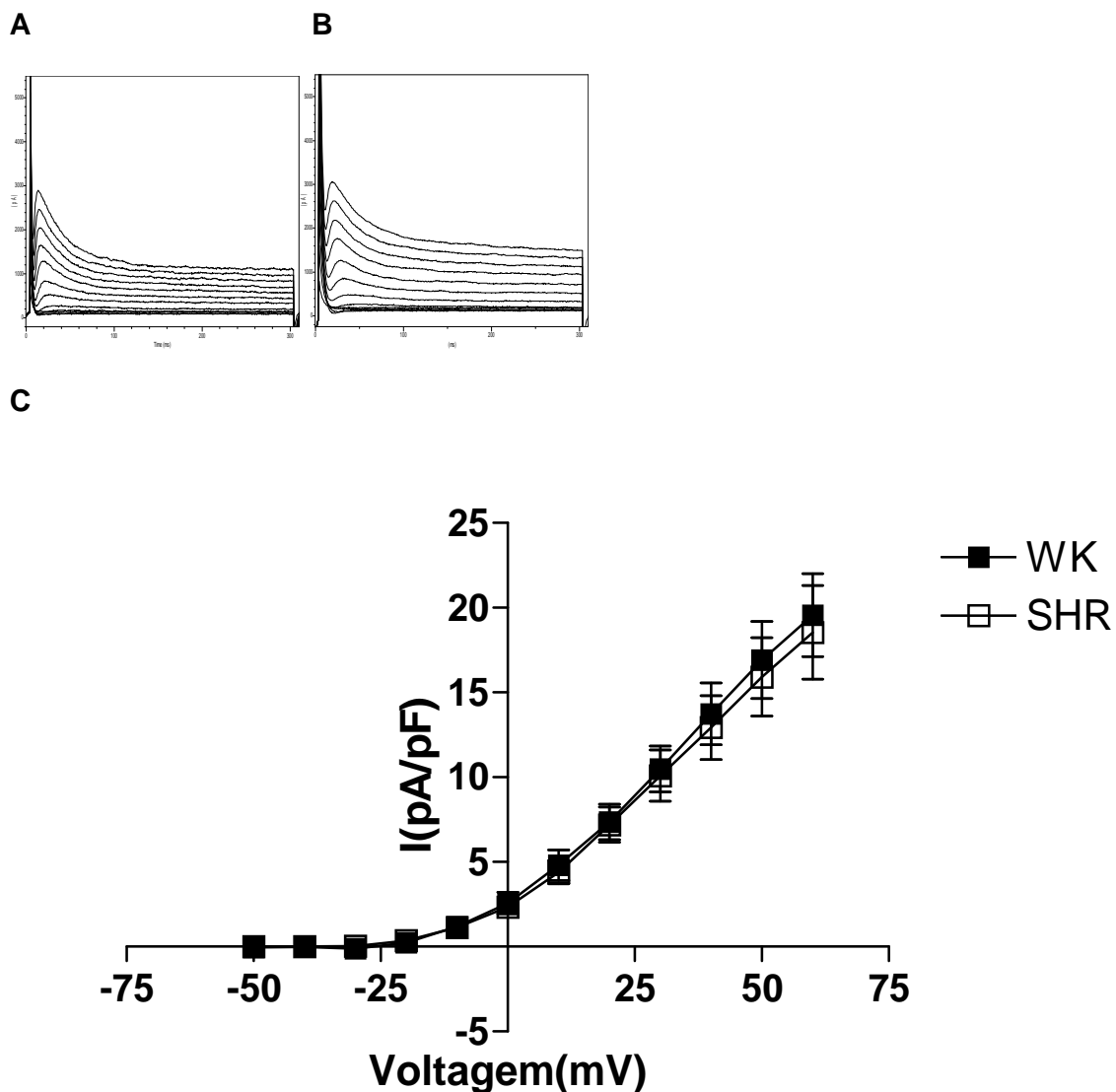


Figura 8: Relação Corrente-Voltagem da corrente transitória de efluxo de K^+ (I_{to}) em cardiomiócitos do VD de ratos Wistar Kyoto (\blacksquare , $N=8$ células) e SHR (\square , $N=11$ células). Em A e B, traçados representativos de I_{to} obtidos de cardiomiócitos do VD de ratos Wistar Kyoto e SHR respectivamente. Em C, o valor de amplitude de I_{to} , normalizado pela capacitância de membrana, está grafado em função do potencial teste. I_{to} foi ativada por pulsos despolarizantes de 300 ms, variando de -50 a +60 mV, aplicados em incrementos de 10 mV a partir de um potencial holding de -60 mV. O protocolo de pulsos é idêntico ao utilizado no VE.

Tabela 1: Densidade de I_{to} em +60mV

	<i>I</i> (pA/pF)
WK VE (n=8 células)	20,4±2,7 pA/pF *
SHR VE (n=8 células)	8,2±0,8 pA/pF
WK VD (n=8 células)	19,6±2,4 pA/pF
SHR VD (n=11 células)	18,5±2,8 pA/pF

* $p < 0,01$ em relação ao SHR VE

4.2.5-Ativação Estacionária de I_{to} em Cardiomiócitos do VE

A figura 9 mostra o gráfico de dependência da voltagem da ativação (Ativação estacionária) de I_{to} em cardiomiócitos do VE de ratos WK e SHR. Neste gráfico, a condutância da membrana para esta corrente, normalizada pelo valor máximo, é expressa em função do potencial de membrana. A curva de ativação tem uma forma característica (sigmóide), que reflete a natureza da ativação do canal pela despolarização da membrana. Esta curva fornece dois parâmetros de avaliação da biofísica de ativação da corrente: a) constante de ativação (K), dado pela inclinação da curva, é um fator que determina o quanto varia a condutância em função do potencial da membrana; e, b) o $V_{1/2}$, que é o potencial de membrana em que se atinge 50% da condutância máxima.

Avaliando-se esses dois parâmetros, no ventrículo esquerdo, não foi encontrada diferença estatística entre o grupo Wistar Kyoto (N= 8 células) e o SHR (8 células) (teste T de student). Os valores acima citados estão descritos na tabela 2.

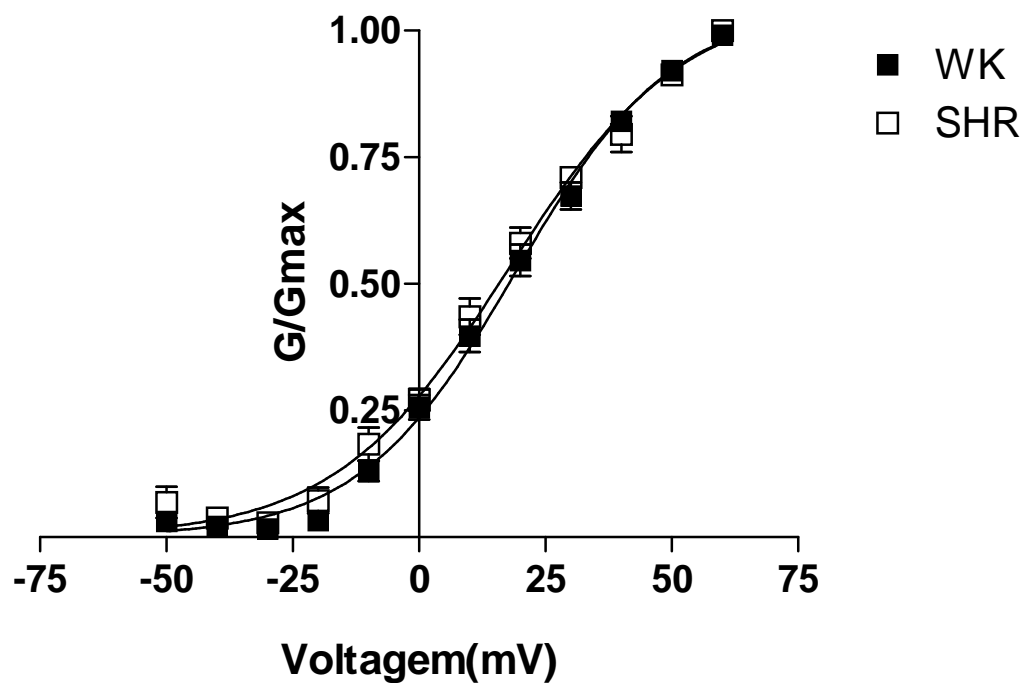


Figura 9: Curva de ativação de I_{to} de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo. O gráfico apresenta a condutância (G), para cada potencial de membrana, normalizada pela condutância máxima encontrada (G_{max}). $N=8$ células para o grupo WK (●) e $N=8$ células para o grupo SHR (□). Para análise estatística foi utilizado teste T de Student não-pareado, o $V_{1/2}$ de ativação e o K de ativação entre os dois grupos experimentais. Não foi encontrada diferença estatística em nenhum dos dois parâmetros.

4.2.6-Ativação Estacionária de I_{to} em Cardiomiócitos do VD

Assim como a relação corrente-voltagem de I_{to} em cardiomiócitos isolados do VD não apresenta diferença significativa entre os grupos WK (N=8 células) e SHR (N= 11 células), a curva de ativação também se mantém com mesmo padrão, Figura 10. A tabela 2 exhibe os valores de $V_{1/2}$ e do K de ativação.

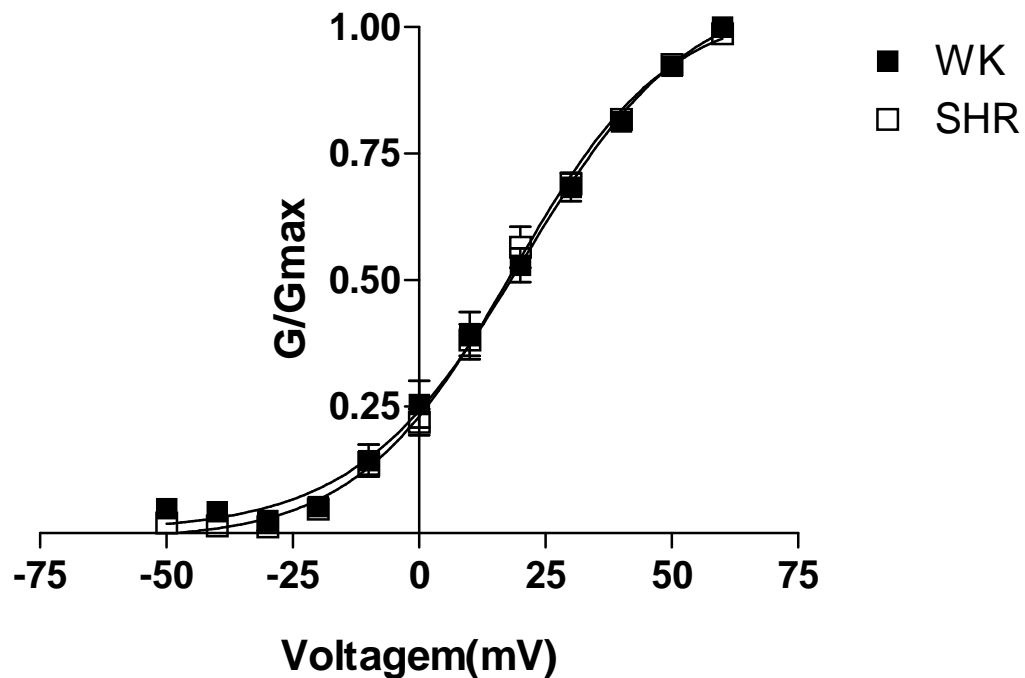


Figura 10: Curva de Ativação de I_{to} no ventrículo direito. O gráfico apresenta a condutância (G), para cada potencial de membrana, normalizada pela condutância máxima encontrada (G_{max}). N= 11 células para o grupo WK (●) e N=8 células para o grupo SHR (□). Para análise estatística foi utilizado teste T de Student não-pareado, o $V_{1/2}$ de ativação e o K de ativação entre os dois grupos experimentais. Não foi encontrada diferença estatística em nenhum dos dois parâmetros.

Tabela 2: Parâmetros da Ativação de I_{to}

	K (mV)	$V_{1/2}$ (mV)
WK VE (N=8 células)	15,6±0,3 mV	18,7±2,3 mV
SHR VE (N=8 células)	19,3±3,6 mV	19,4±2,8 mV
WK VD (N=8 células)	15,1±0,9 mV	19,1±3,6 mV
SHR VD (N=11 células)	15,3±1,0 mV	18,4±1,3 mV

4.2.7-Inativação Estacionária de I_{to} em Cardiomiócitos do VE

Esta curva mostra a dependência de voltagem da inativação estacionária da corrente I_{to} . Ela pode ser descrita pelos parâmetros K , que é a inclinação da curva sigmóide (fator que determina a intensidade da variação da curva de inativação com a voltagem) e o $V_{1/2}$ que é o potencial de membrana onde 50% da população de canais de I_{to} está inativada.

Também, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos Wistar Kyoto (N= 8 células), e SHR (N= 10 células), em relação aos parâmetros de inativação de I_{to} no ventrículo esquerdo, como visualizado na figura 11 (teste T de Student). Os valores de K e $V_{1/2}$ estão expostos na tabela 3.

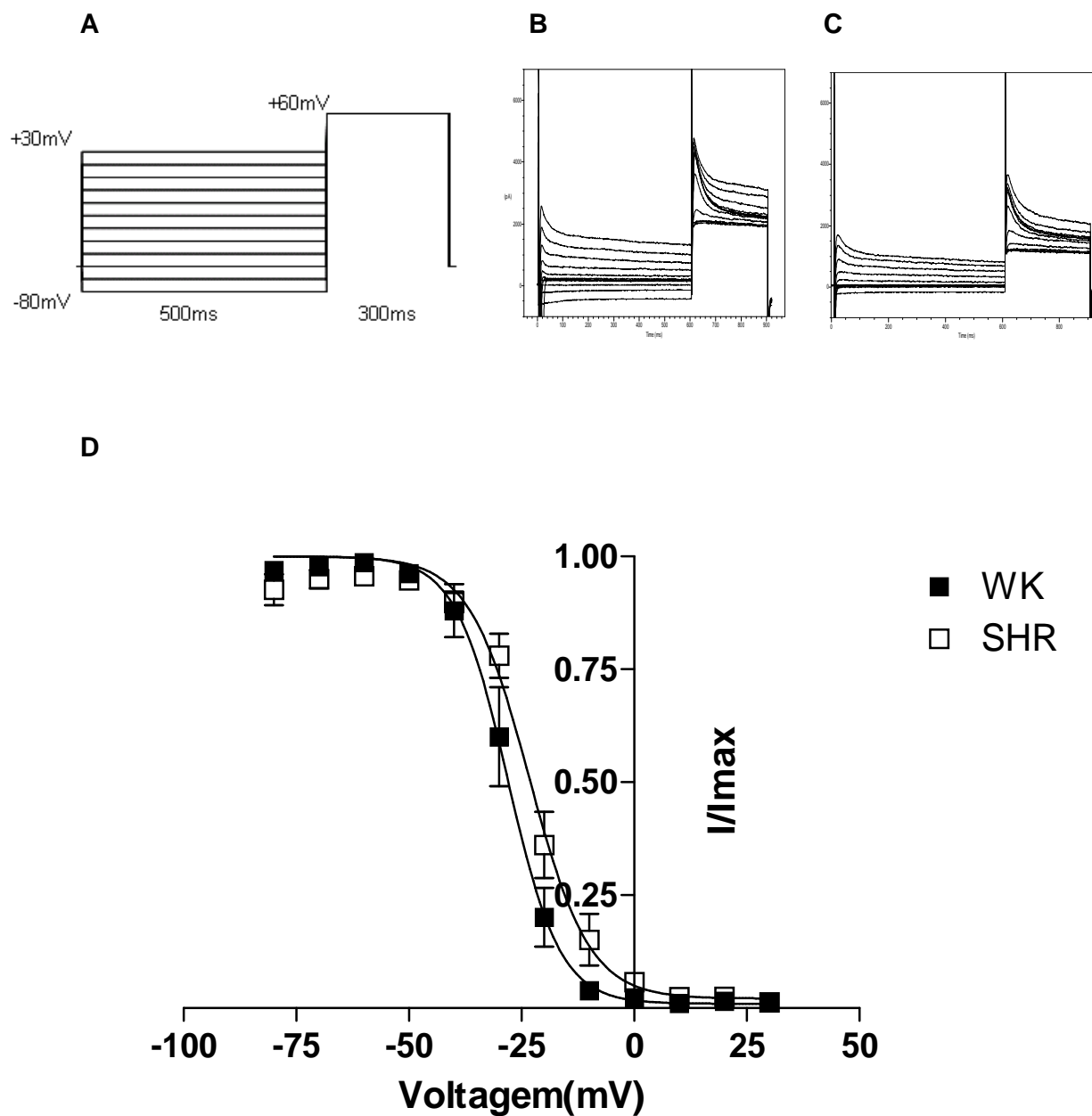


Figura 11: Curva de Inativação de I_{to} em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo. Em A, protocolo de pulsos utilizado para obtenção da curva de Inativação. Em B e C, traçados representativos da dependência de voltagem para inativação de I_{to} em cardiomiócitos isolados do VE de ratos WK e SHR respectivamente. Em D, a fração da corrente máxima (I/I_{max}) está grafada contra o potencial de membrana imediatamente anterior ao potencial teste, variando de -80mV até +30mV, os parâmetros foram ajustados a uma sigmóide. N= 8 células para o grupo WK (■) e N= 10 células para o grupo SHR (□). Análise estatística do $V_{1/2}$ e do K de inativação, com teste T de Student não-pareado, não evidenciou diferença entre os dois grupos.

4.2.8-Inativação Estacionária de I_{to} em Cardiomiócitos do VD

A curva de inativação de I_{to} no ventrículo direito (figura 12) também não apresenta diferença entre os animais WK (N=8 células) e os SHR (N= 10 células). O $V_{1/2}$ de inativação e o K de inativação são expostos na tabela 3.

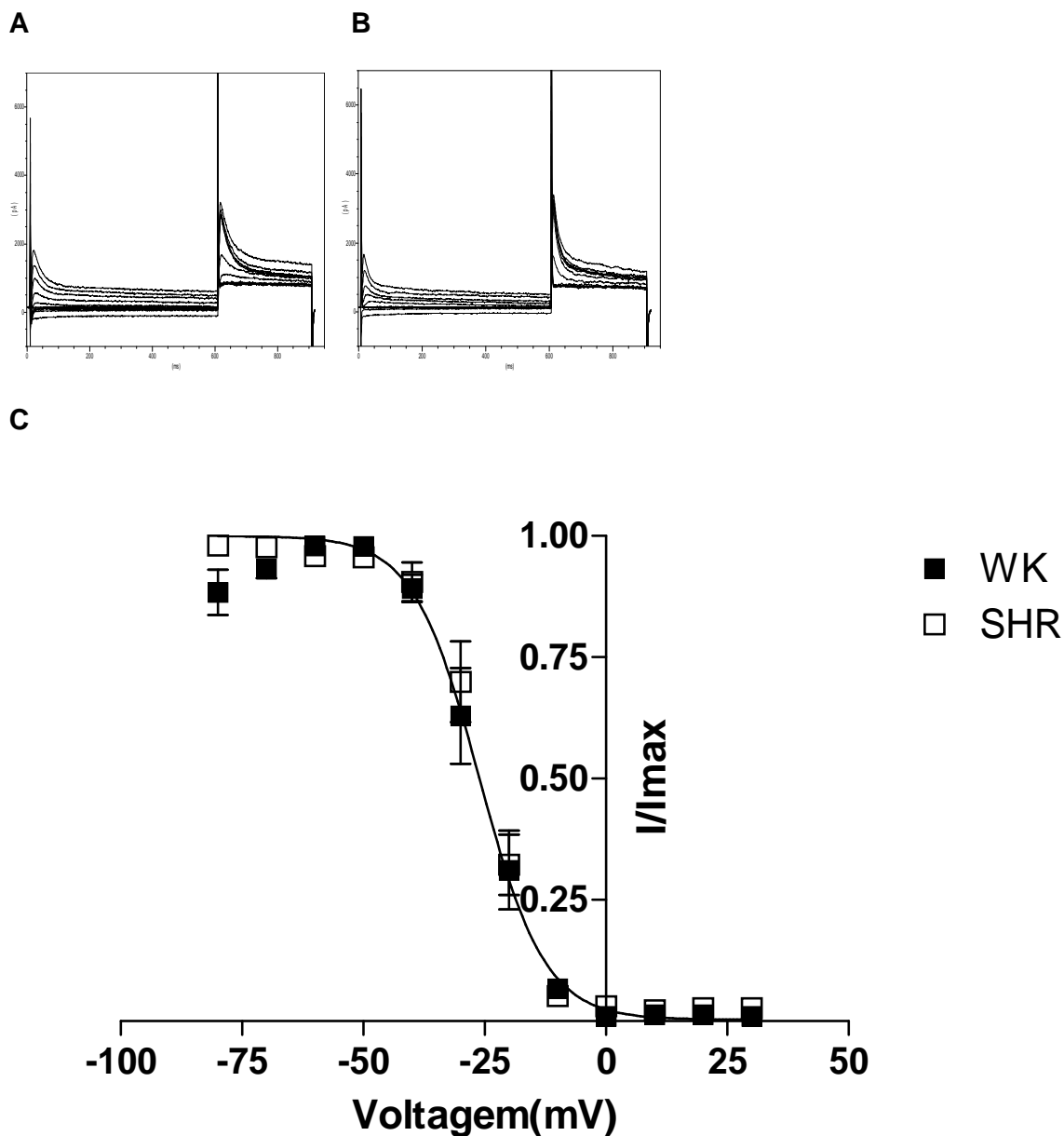


Figura 12: Curva de Inativação de I_{to} em cardiomiócitos do ventrículo direito. Em A e B, traçados representativos da dependência de voltagem para inativação de I_{to} em cardiomiócitos isolados do VD de ratos WK e SHR respectivamente. Em C, a fração da corrente máxima (I/I_{max}) está grafada contra o potencial de membrana imediatamente anterior ao potencial teste, variando de -80mV até +30mV, os parâmetros foram ajustados a uma sigmóide. Grupo WK (■) com N=8 células, e SHR (□) com N=10 células. O protocolo para obtenção da dependência de voltagem para inativação no VD é idêntico ao utilizado no VE. Análise estatística do $V_{1/2}$ e do K de inativação, com teste T de Student não-pareado, não evidenciou diferença entre os dois grupos.

Tabela 3: Parâmetros de Inativação de I_{to}

	K (mV)	$V_{1/2}$ (mV)
WK VE (n=8 células)	1,4±1,6 mV	-28,0±2,5 mV
SHR VE (n=10 células)	2,2±1,2 mV	-23,0±1,8 mV
WK VD (n=8 células)	0,5±1,6 mV	-25,6±2,4 mV
SHR VD (n=10 células)	0,2±1,2 mV	-24,9±2,1 mV

4.2.9-Reativação de I_{to} em Cardiomiócitos do VE

A dependência de tempo para I_{to} recuperar-se da inativação foi avaliada pela sua constante de reativação (τ_R) (ver figura 13), não revelando também diferença entre o grupo Wistar Kyoto e SHR (tabela 4).

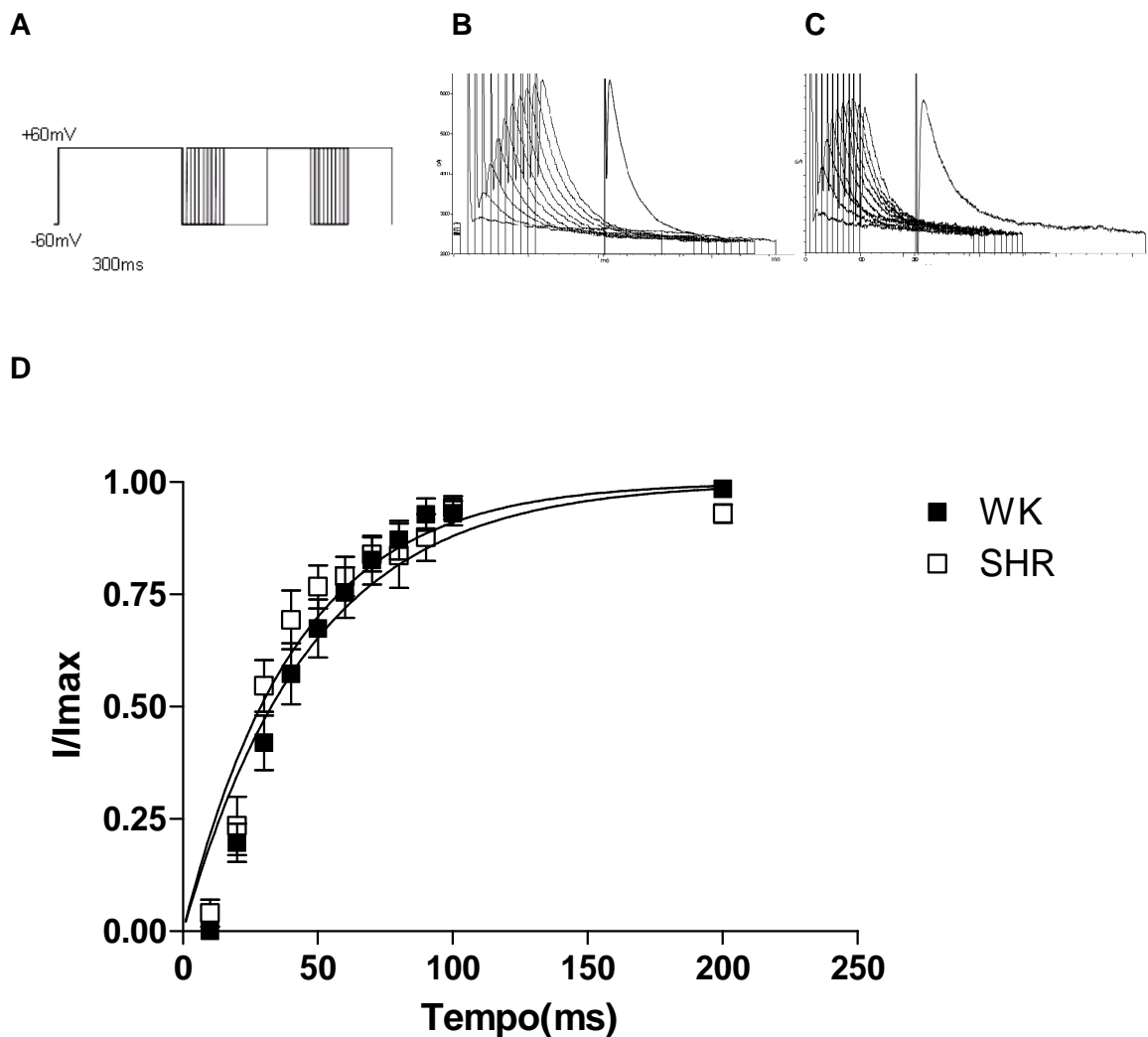


Figura 13: Recuperação de Inativação de I_{to} no ventrículo esquerdo. Em A, protocolo de voltagem utilizado para obtenção da curva de reativação de I_{to} . Em B e C, traçados representativos da reativação de I_{to} nos grupos WK e SHR respectivamente. Em D, a corrente encontrada para cada tempo está normalizada pela corrente obtida no pré-pulso (I/I_{max}). $N=8$ células para o grupo WK (■) e $N=8$ células para o grupo SHR (□). Após ajuste a uma mnoexponencial foi obtido a constnte de tempo de reativação (τ_R). A comparação entre os τ_R dois dois grupos foi feita com teste T de Student não-pareado, e não evidenciou diferença estatística.

4.2.10-Reativação de I_{to} em Cardiomiócitos do VD

A reativação de I_{to} no ventrículo direito também foi avaliada. Na figura 14, observa-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as duas curvas, indicando que nos cardiomiócitos do VD a cinética de reativação de I_{to} dos animais SHR é mais rápida do que nos animais controle WK, devido a uma redução na constante de tempo de reativação dos SHR. A tabela 4 expressa os valores da constante de reativação, τ_R , para ambos os grupos experimentais.

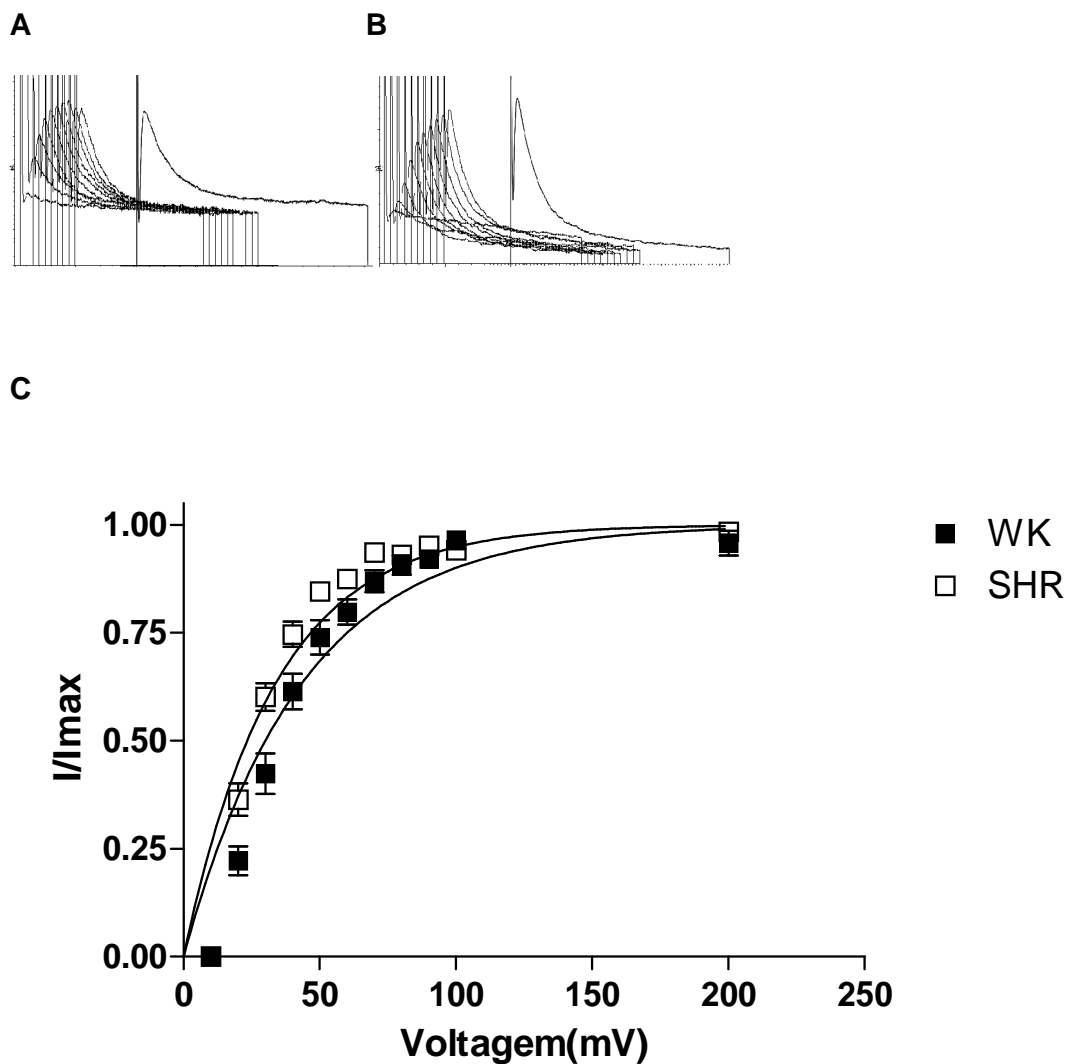


Figura 14: Curva de reativação de I_{to} no ventrículo direito. Em A e B traçados representativos da reativação de I_{to} no VD. Em C, a corrente encontrada para cada tempo está normalizada pela corrente obtida no pré-pulso (I/I_{max}). O protocolo de pulsos pode ser visualizado na figura 10. N=8 células para o grupo WK (■) e N= 9 células para o grupo SHR (□). Após ajuste a uma mnoxponencial foi obtido a constnte de tempo de reativação (τ_R). A comparação entre os τ_R dos dois grupos foi feita com teste T de Student não-pareado, e evidenciou uma menor velocidade de reativação no grupo WK em relação ao SHR ($p<0,05$)

Tabela 4: Constante de recuperação de inativação de I_{to} no VE

	τ_R
WK VE (n=8 células)	35,2±5,6 ms
SHR VE (n=8 células)	32,0±5,0 ms
WK VD (n=8 células)	30,7±2,5 ms*
SHR VD (n=9 células)	22,9±2,3 ms

* $p < 0,05$ em relação ao SHR no VD.

4.3-Efeitos após Tratamento com Drogas Anti-Hipertensivas

4.3.1-Capacitância da Membrana de Cardiomiócitos do VE

A capacitância da membrana do grupo Enalapril foi 113 ± 7 pF (N=8 células), no grupo tratado com Hidralazina atingiu 119 ± 10 pF (N=8 células) e no grupo com a combinação de Enalapril e Hidralazina a capacitância ficou em 83 ± 12 pF (N=6 células), não sendo observada diferença estatística entre as capacitâncias de nenhum dos grupos experimentais e o grupo SHR, 124 ± 20 pF (N=8 células). A análise foi feita por análise de variância (One-Way ANOVA). Figura 15.

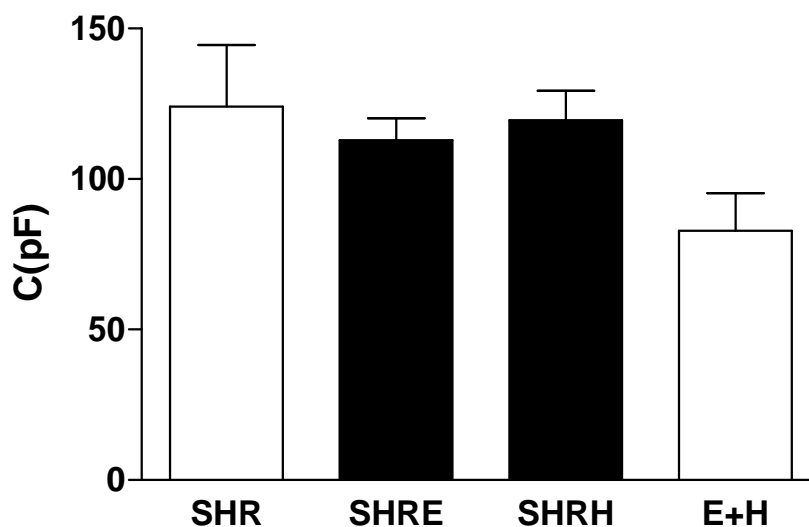


Figura 15: Capacitância da membrana em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo após tratamento. Comparação entre os animais SHR sem tratamento (N=8 células) e os grupos tratados com Enalapril 10mg/Kg/dia (SHRE, N=8 células), Hidralazina 20mg/Kg/dia (SHRH, N=8 células) e com Enalapril 10mg/Kg/dia e Hidralazina 20mg/Kg/dia (E+H, N=6 células). A análise foi feita por análise de variância (One-Way ANOVA), com pós-teste de Newman-Keuls. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

4.3.2-Capacitância da Membrana de Cardiomiócitos do VD

A capacitância da membrana de cardiomiócitos do ventrículo direito dos animais tratados com Enalapril (N=8 células) foi de 94 ± 9 pF, não apresentando diferença significativa em relação aos animais SHR (N=11 células), com 121 ± 7 pF de capacitância.

Já o grupo tratado com Hidralazina (N=9 células) apresentou uma capacitância significativamente menor ($p < 0,01$) do que a capacitância do grupo SHR sem tratamento, 71 ± 6 pF contra 121 ± 7 pF, respectivamente.

Interessantemente, a capacitância da membrana dos cardiomiócitos do ventrículo direito dos animais tratados com a associação das duas drogas (N=7 células) foi de 92 ± 12 pF, não havendo diferença em relação ao grupo SHR. Figura 16.

A

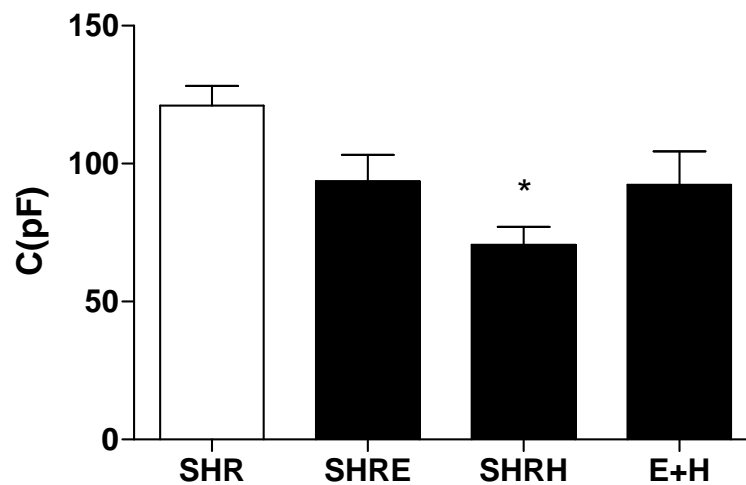


Figura 16: Capacitância da membrana de cardiomiócitos do ventrículo direito de ratos SHR tratados. Comparação entre os animais SHR sem tratamento (N=11 células) e os grupos tratados com Enalapril 10mg/Kg/dia (SHRE, N=8 células), Hidralazina 20mg/Kg/dia (SHRH, N=9 células) e com Enalapril 10mg/Kg/dia e Hidralazina 20mg/Kg/dia (E+H, N=7 células). A análise foi feita por análise de variância (One-Way ANOVA), com pós-teste de Newman-Keuls. * $p < 0,001$ em relação ao grupo SHR.

4.3.3-Relação Corrente-Voltagem de I_{to} no VE

O tratamento com Enalapril, Hidralazina, e a associação dos dois medicamentos foi capaz de restaurar a densidade normal de I_{to} nos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo. Os grupos foram comparados através de análise de variância (One-Way ANOVA), com pós teste de Newman-Keuls.

O aumento na densidade de I_{to} pôde ser evidenciado, no caso do grupo tratado com Enalapril (N=8 células), a partir do potencial de -20 mV, onde a densidade de corrente foi de $0,7 \pm 0,1$ pA/pF contra $0,1 \pm 0,1$ pA/pF do grupo SHR controle ($p < 0,05$). Para o grupo tratado com Hidralazina (N=7 células) esse aumento em relação ao grupo SHR foi significativo a partir do potencial de 0 mV, onde a densidade de I_{to} foi $4,1 \pm 1,0$ pA/pF no grupo Hidralazina e $1,1 \pm 0,1$ pA/pF no grupo SHR ($p < 0,05$). O grupo tratado com a combinação das duas drogas (N=5 células) só apresentou diferença significativa em relação aos animais SHR a partir de +30 mV, onde a densidade de I_{to} foi $10,9 \pm 2,0$ pA/pF, contra $4,5 \pm 0,4$ pA/pF nos animais SHR ($p < 0,05$).

Os grupos tratados se mantiveram com maior densidade de I_{to} até o potencial de +60 mV, onde a densidade de corrente foi $24,1 \pm 2,7$ pA/pF no grupo tratado com Enalapril ($p < 0,01$ em relação ao SHR), $23,3 \pm 4,4$ pA/pF no grupo tratado com Hidralazina ($p < 0,01$ em relação ao SHR), e $18,6 \pm 3,3$ pA/pF no grupo tratado com a associação das duas drogas ($p < 0,05$ em relação ao SHR). Entre o grupo Wistar Kyoto e os tratados não ocorreu diferença significativa (informação apresentada no gráfico da figura 17).

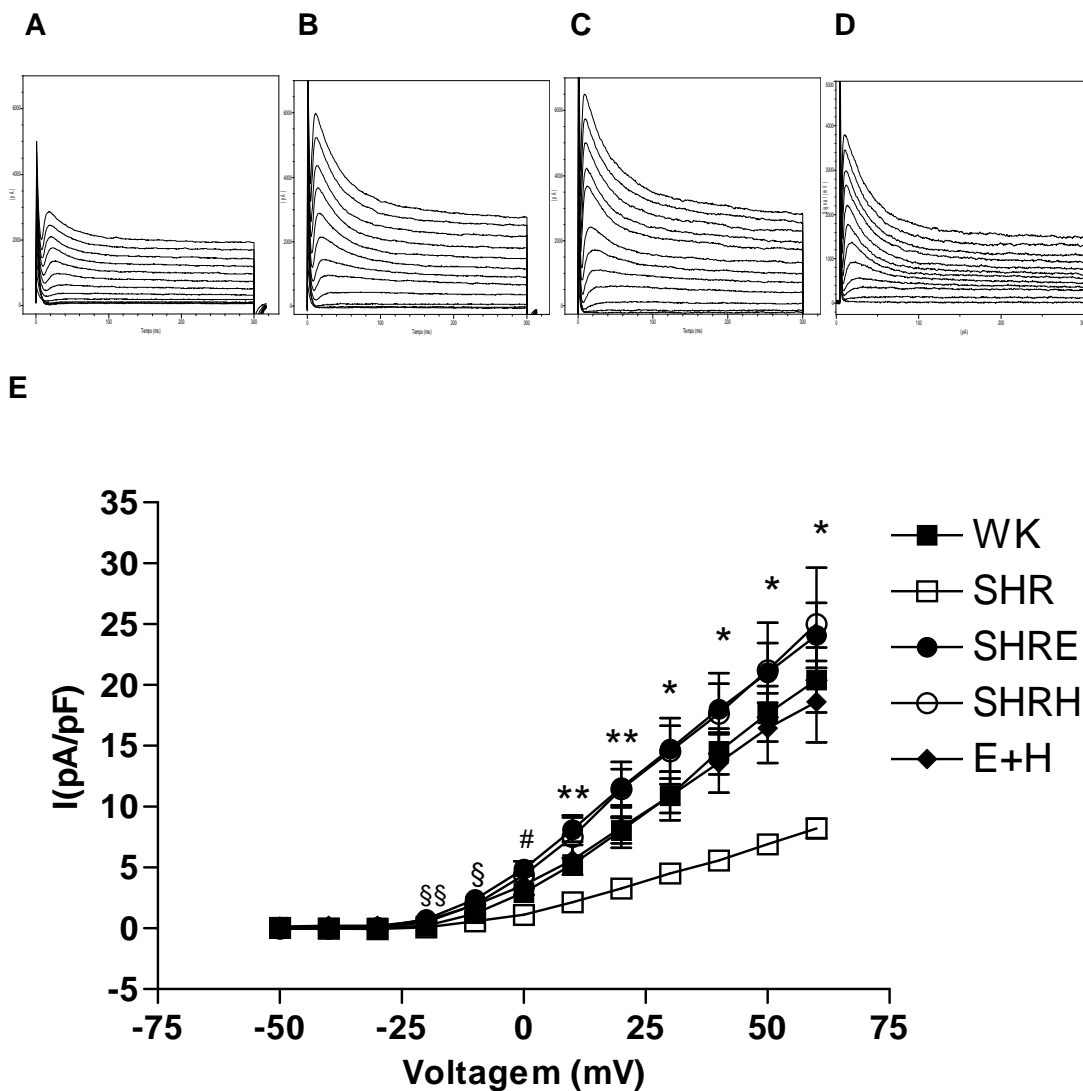


Figura 17: Em **A**, **B**, **C**, e **D**, Traçados representativos de I_{10} registrada em cardiomiócitos do VE para os ratos SHR controle, SHR tratados com Enalapril, SHR tratado com Hidralazina e SHR tratado com Enalapril associado à Hidralazina, respectivamente. Em **E**, Relação Corrente-Voltagem de I_{10} em cardiomiócitos do VE de ratos WK controle e SHR controle e após tratamento com Enalapril e/ou Hidralazina. Os grupos foram comparados através de análise de variância (One-Way ANOVA), com pós teste de Newman-Keuls. (*): $p < 0,01$ entre os SHRH e SHRE e o grupo SHR e $p < 0,05$ entre os grupos WK e E+H e o SHR. (**): $p < 0,01$ entre o grupo SHRE e SHRH, e o grupo SHR. (#): $p < 0,01$ entre SHRE e SHR e $p < 0,05$ entre SHRH e SHR. (§): $p < 0,01$ entre SHRE e SHR. (§§): $p < 0,05$ entre SHRE e SHR.

4.3.4-Relação Corrente Voltagem de I_{to} no VD

Tanto o tratamento com Enalapril quanto a associação de Enalapril e Hidralazina aumentam a densidade de I_{to} em relação ao grupo SHR e ao grupo tratado somente com hidralazina. (Figura 18).

Esse aumento começou a ser evidenciado a partir de +20 mV, quando a densidade de I_{to} nos animais SHR (N=11 células) foi de $7,2 \pm 1,0$ pA/pF, nos animais tratados com Hidralazina (N=8 células) foi $7,6 \pm 0,9$ pA/pF, no grupo tratado com Enalapril (N=9 células) foi de $13,8 \pm 1,71$ pA/pF e no grupo com a associação das duas drogas (N=7 células) foi $13,9 \pm 1,8$ pA/pF. Esta relação se mantém até +60 mV, quando a densidade de I_{to} no grupo de animais SHR foi $18,5 \pm 2,8$ pA/pF, no grupo tratado com hidralazina foi $22,5 \pm 2,3$ pA/pF e nos grupos tratados com Enalapril e com a associação de Enalapril e Hidralazina foi de $32,3 \pm 3,1$ pA/pF e $29,1 \pm 3,6$ pA/pF, respectivamente.

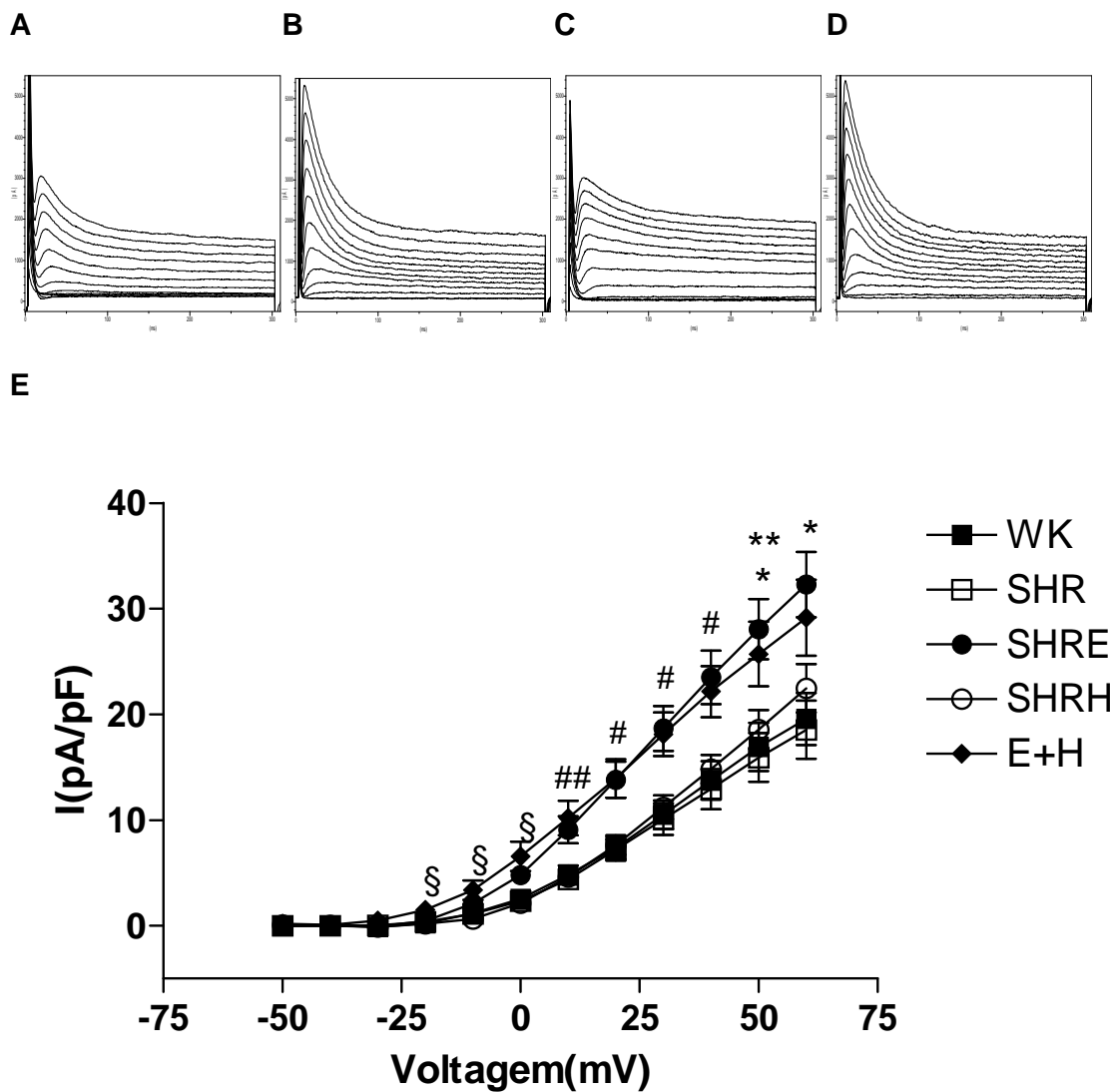


Figura 18: Em A, B, C, e D, Traçados representativos de I_{to} registrada em cardiomiócitos do VD para os ratos SHR controle, e tratados com enalapril, hidralazina, e com a associação dos dois medicamentos, respectivamente. Em E, Relação Corrente-Voltagem de I_{to} no VD após tratamento, SHR (\square , N=11 células), Enalapril (\bullet , N=8 células), Hidralazina (\circ , N=9 células), e Enalapril+Hidralazina (\blacklozenge , N=7 células). Os grupos foram comparados através de análise de variância (One-Way ANOVA), com pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,01$ entre SHR e SHRE e $p < 0,05$ entre SHR e E+H. ** $p < 0,05$ SHRE vs SHRH. # $p < 0,01$ SHR vs SHRE e SHR vs E+H, e $p < 0,05$ SHRE vs SHRH e SHRH vs E+H. ## $p < 0,01$ SHR vs SHRE, SHR vs E+H, SHRE vs SHRH e SHRH vs E+H. § $p < 0,05$ SHRH vs E+H e SHR vs E+H.

Tabela 5: Densidade de I_{to} em +60mV após o tratamento

	$I(pA/pF)$
SHR VE (N=8células)	8,2±0,8 pA/pF
SHRE VE (N=8células)	24,1±2,7 pA/pF *
SHRH VE (N=7células)	23,3±4,4 pA/pF *
E+H VE (N=6células)	18,6±3,3 pA/pF *
SHR VD (N=11células)	18,5± 2,8 pA/pF
SHRE VD (N=8células)	32,3±3,1 pA/pF**
SHRH VD (N=9células)	22,5±2,3 pA/pF
E+H VD (N=7células)	29,1±3,6 pA/pF**

* $p < 0,01$ entre os grupos SHRE e SHRH e o grupo SHR e $p < 0,05$ entre os grupos E+H e o SHR, no VE.

** $p < 0,01$ entre SHRE e SHR, $p < 0,05$ entre E+H e SHR no VD.

Análise com ONE WAY ANOVA e pós teste de Newman-Keuls.

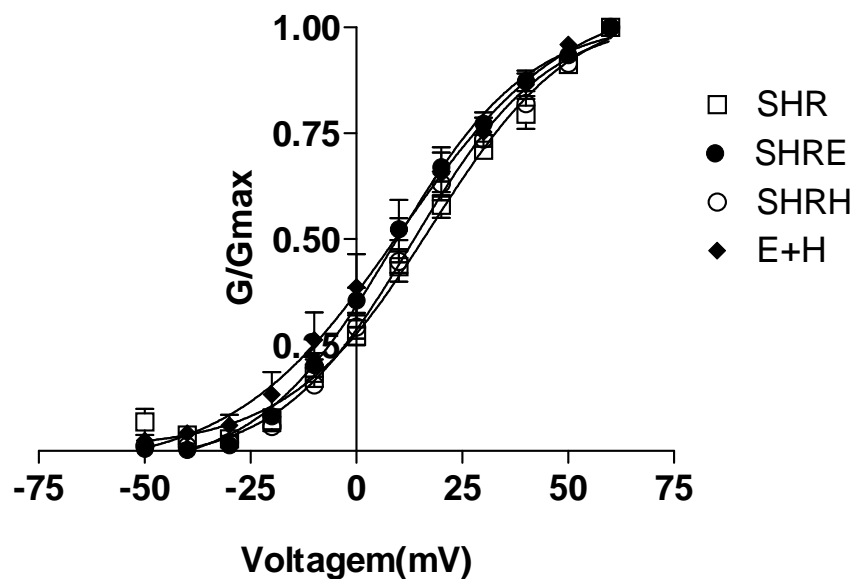
4.3.5-Ativação Estacionária de I_{to} no VE

A curva de ativação de I_{to} está deslocada para esquerda no grupo tratado com a combinação de Enalapril e Hidralazina em relação ao controle SHR, ou seja, neste grupo o $V_{1/2}$ de ativação encontra-se em um potencial menos despolarizado do que os grupos controle ($p < 0,05$) (ver figura 19).

Quanto ao K , não foi encontrada diferença significativa entre nenhum dos grupos experimentais.

Os valores de $V_{1/2}$ e K de ativação encontram-se na tabela 6.

A



B

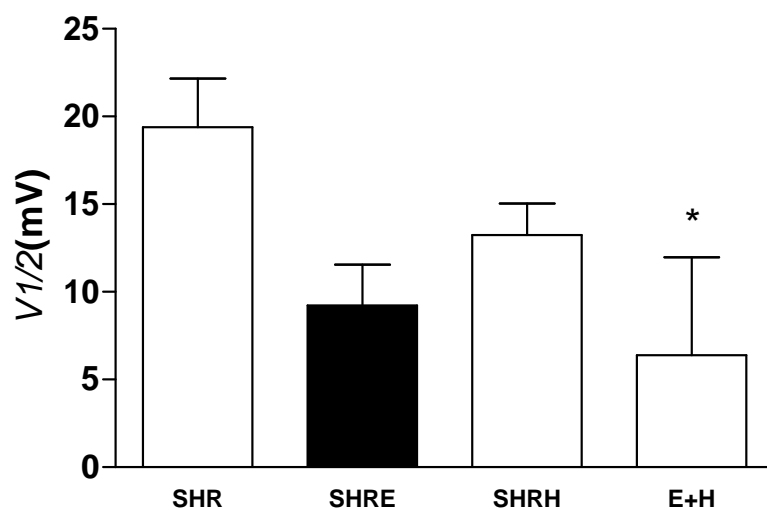


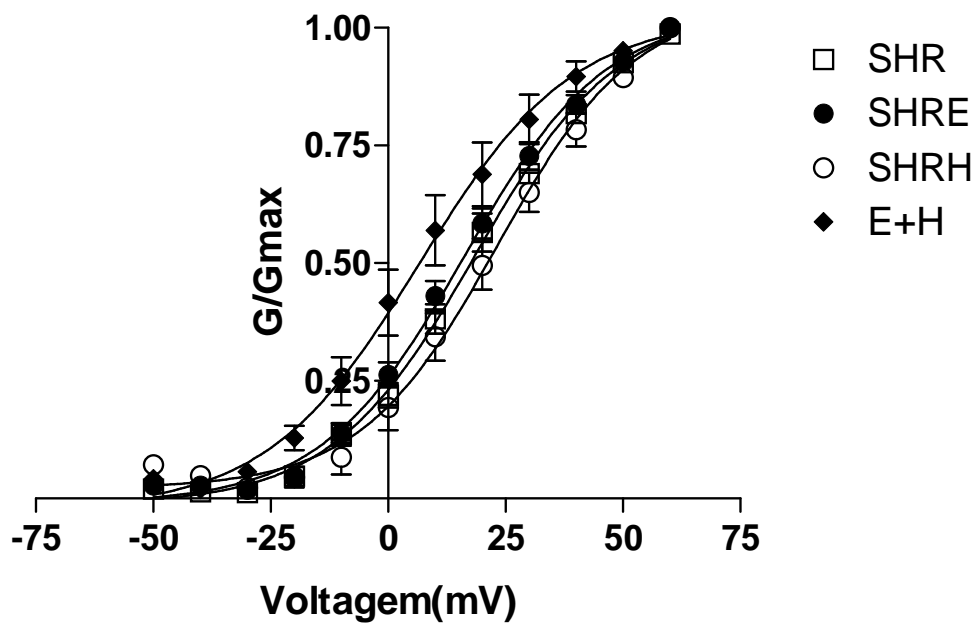
Figura 19: Em A: curvas de Ativação Steady-State de I_{to} em cardiomiócitos do VE após o tratamento com Enalapril e/ou Hidralazina. Em B: $V_{1/2}$ de ativação determinada em cardiomiócitos dos diferentes grupos experimentais. * $p < 0,05$ em relação ao SHR, One-Way ANOVA, com pós teste de Newman-Keuls.

4.3.6- Ativação Estacionária de I_{to} no VD

No que diz respeito ao $V_{1/2}$ de ativação ocorreu um deslocamento da curva de ativação do grupo tratado com Enalapril e Hidralazina para esquerda em relação ao grupo SHR e ao grupo tratado com Hidralazina ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre o grupo tratado com Hidralazina e o grupo SHR controle (figura 20).

Quanto à constante de ativação (K), não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais. (tabela 6).

A



B

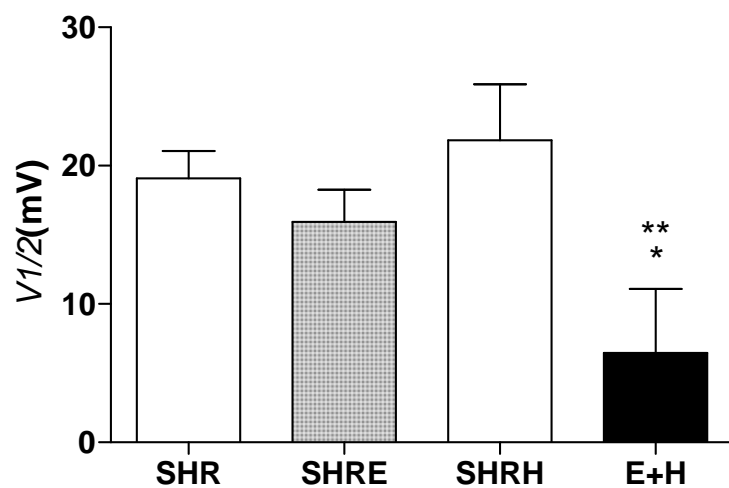


Figura 20: Em A, curvas de ativação de I_{to} em cardiomiócitos do ventrículo direito de ratos SHR tratados. Em B, $V_{1/2}$ de ativação de I_{to} . * $p < 0,05$ em relação ao grupo SHR, e ** $p < 0,05$ em relação ao grupo SHRH, One-Way ANOVA, com pós teste de Newman-Keuls.

Tabela 6: Parâmetros de ativação de I_{to} após o tratamento

	$K(mV)$	$V_{1/2} (mV)$
SHR VE (N=8células)	19,3±3,6 mV	19,4±2,8 mV
SHRE VE (N=8células)	15,8±0,8 mV	9,2±2,3 mV
SHRH VE (N=7células)	15,6±0,5 mV	13,2±1,8 mV
E+H VE (N=6células)	19,7±4,0 mV	10,4±3,4 mV*
SHR VD (N=11células)	13,6±0,9 mV	21,8±4,0 mV
SHRE VD (N=9células)	13,6±0,9 mV	21,8±4,0 mV
SHRH VD (N=8células)	14,1±0,4 mV	15,9±2,3 mV
E+H VD (N=7células)	14,1±0,9 mV	6,5±4,6 mV**

* $p < 0,05$ em relação ao SHR no VE.

** $p < 0,05$ em relação ao SHR no VD.

Análise com ONE WAY ANOVA e pós teste de Newman-Keuls.

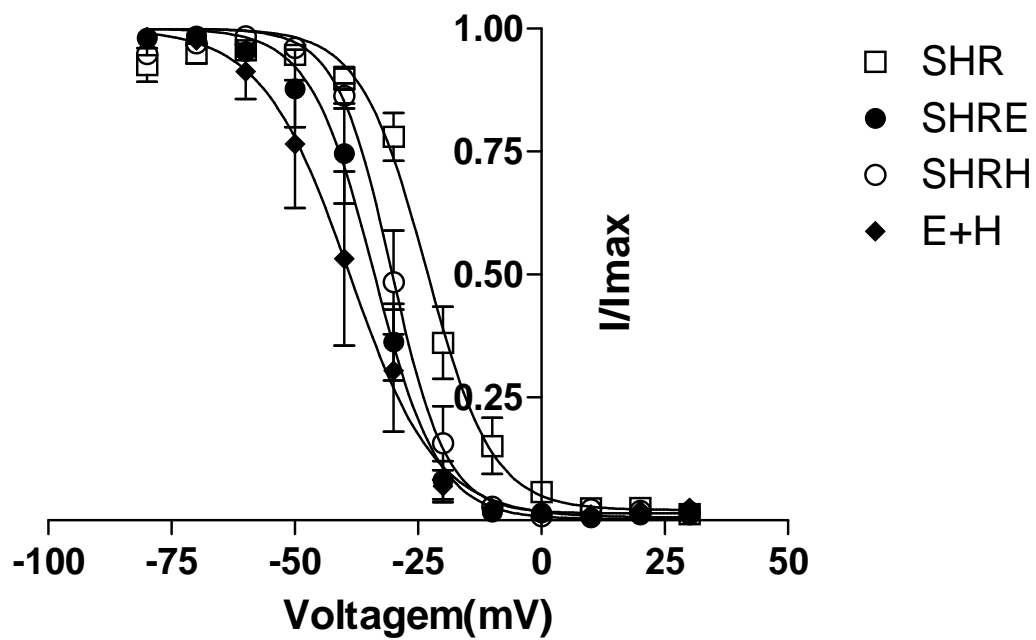
4.3.7-Inativação Estacionária de I_{to} em Cardiomiócitos do VE

Nos animais tratados com Enalapril ou com a associação de Enalapril e Hidralazina foi observada uma redução do $V_{1/2}$ de inativação em relação aos animais SHR controle, ou seja, esses animais têm I_{to} inativando em potenciais menos despolarizados ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente). Não há diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado com hidralazina e o grupo SHR. Ver figura 21.

Não se encontrou alteração do K de inativação de nenhum grupo em relação aos controles SHR .

Os valores de $V_{1/2}$ e K encontram-se na tabela 7.

A



B

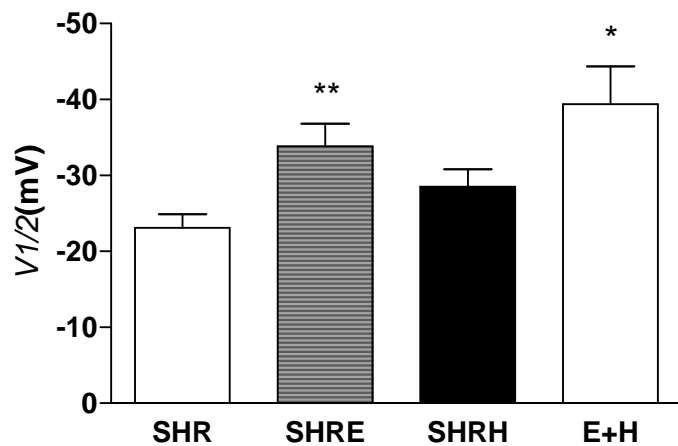


Figura 21: Em A, Curvas de Inativação de I_{to} em cardiomiócitos do VE. Em B, comparação do $V_{1/2}$ de inativação dos animais controles com os grupos tratados. * $p < 0,01$ em relação ao SHR, ** $p < 0,05$ em relação ao SHR, com One-Way ANOVA, com pós teste de Newman-Keuls.

4.3.8-Inativação Estacionária de I_{to} em Cardiomiócitos do VD

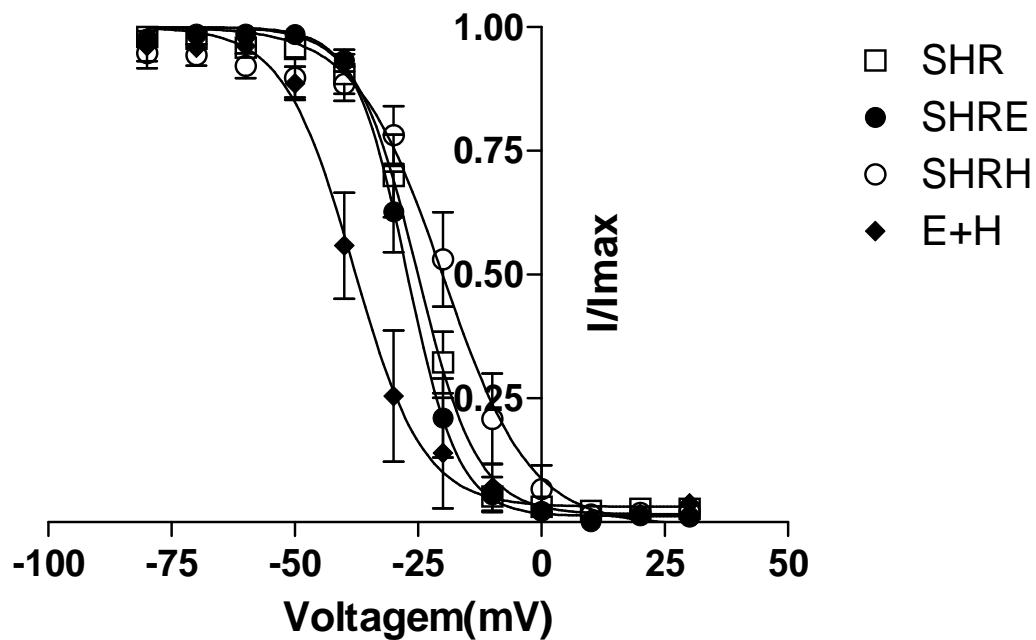
O $V_{1/2}$ de inativação do grupo tratado com Enalapril foi deslocado para esquerda, ou seja, mais negativo, do que o $V_{1/2}$ de inativação do grupo tratado com Hidralazina ($p < 0,05$), embora não se encontre diferença significativa em relação ao grupo SHR.

Quanto ao grupo tratado com a associação das duas drogas foi encontrado um $V_{1/2}$ mais negativo do que nos grupos SHR ($p < 0,001$), Hidralazina ($p < 0,001$) e Enalapril ($p < 0,01$). Ver figura 22.

O parâmetro de inativação K de I_{to} no ventrículo direito de ratos tratados não apresenta diferença estatística entre nenhum dos grupos experimentais.

Os valores dos parâmetros de inativação, $V_{1/2}$ e K , de I_{to} no ventrículo direito de ratos encontram-se na tabela 7.

A



B

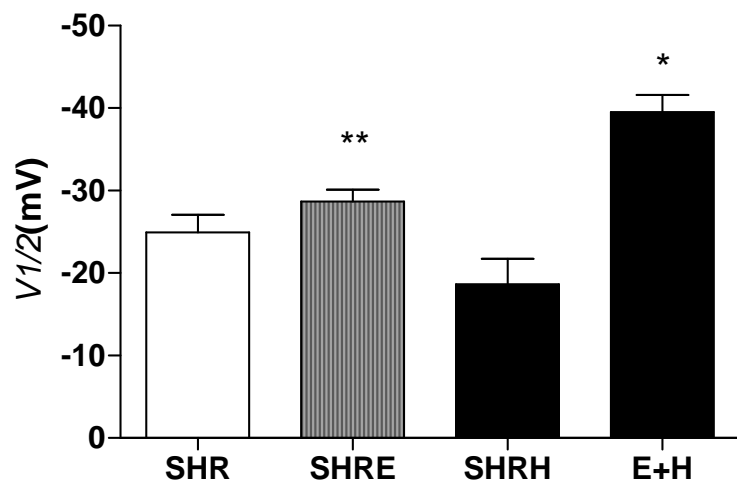


Figura 22: Em A, curvas de inativação de I_{to} em cardiomiócitos do VD de ratos SHR tratados. Em B, $V_{1/2}$ de inativação de I_{to} no VD. * $p < 0,001$ em relação ao SHR. ** $p < 0,01$ em relação ao E+H, com One-Way ANOVA, com pós teste de Newman-Keuls.

Tabela 7: Parâmetros de Inativação de I_{to} no VD

	K(mV)	V½ (mV)
SHR VE (N=8células)	2,2±1,2mV	-23,0±1,8mV
SHRE VE (N=8células)	4,2±0,2mV	-33,8±2,9mV**
SHRH VE (N=7células)	2,1±1,1mV	-28,5±2,3 mV
E+H VE (N=6células)	3,5±0,7mV	-39,4±5,0 mV*
SHR VD (N=10células)	0,2±1,3 mV	-24,7± 2,1 mV
SHRE VD (N=8células)	1,7±1,9 mV	-18,6±3,1mV##
SHRH VD (N=7células)	2,9±0,7 mV	-28,6±1,4 mV
E+H VD (N=6células)	3,4±0,6 mV	-39,5±2,1 mV#

* $p < 0,01$ em relação ao SHR, ** $p < 0,05$ em relação ao SHR no VE.

$p < 0,001$ em relação ao SHR no VD. ## $p < 0,05$ em relação ao E+H no VD.

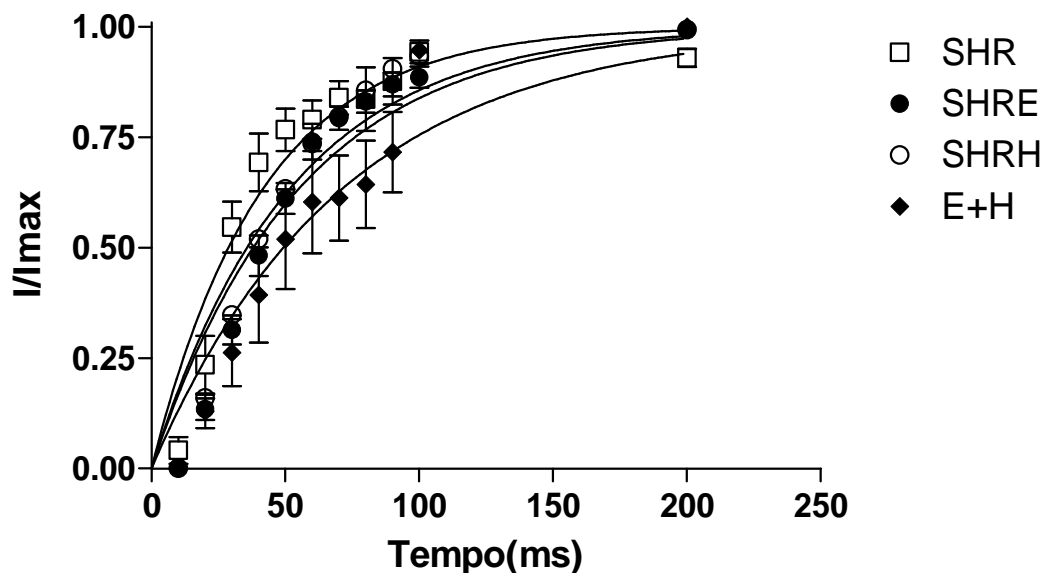
Análise com ONE WAY ANOVA e pós teste de Newman-Keuls.

4.3.9-Reativação de I_{to} em Cardiomiócitos do VE

Ao contrário da ativação e da inativação de I_{to} no VE, não encontramos diferença significativa na recuperação de inativação dos animais tratados Enalapril, Hidralazina, ou com a associação das duas drogas, em relação ao grupo controle SHR. Figura 23.

Os valores da constante de tempo de reativação, τ_R , encontram-se na tabela 8.

A



B

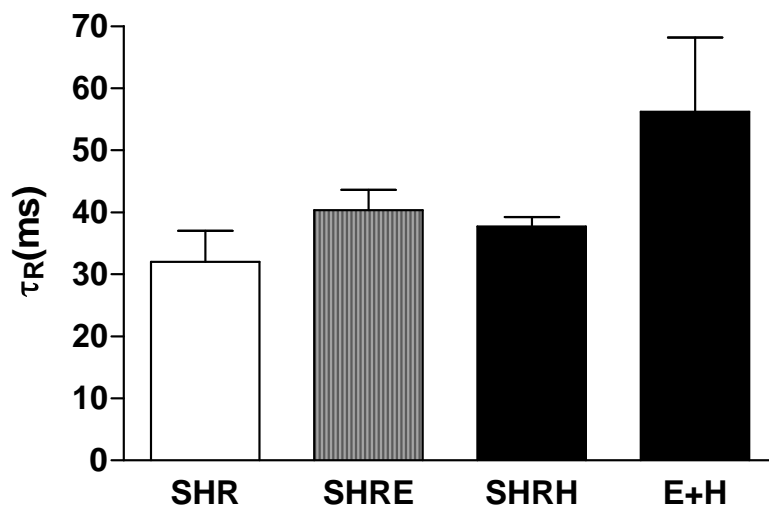


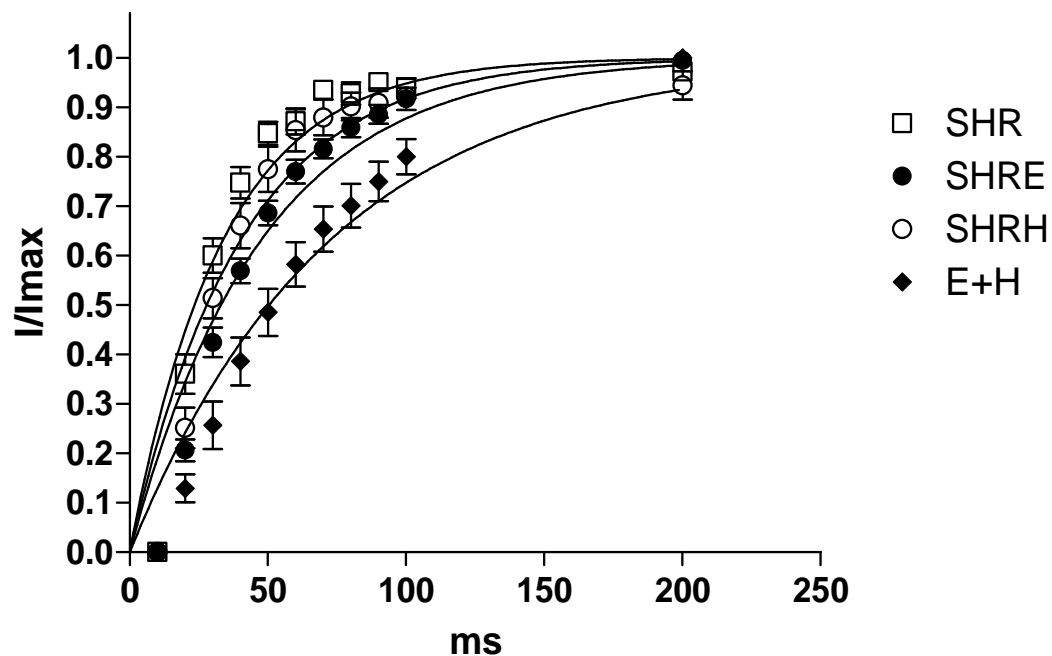
Figura 23: Em A: curva de Recuperação da Inativação de I_{to} em cardiomiócitos do VE após tratamento. A corrente encontrada para cada tempo está normalizada pela corrente obtida no pré-pulso (I/I_{max}). $N=8$ células para o grupo SHR (\square), $N=8$ células no grupo SHRE, $N=7$ células no grupo SHRH e $N=6$ células no grupo E+H. Após ajuste a uma monoexponencial foi obtido a constante de tempo de reativação (τ_R). Em B: constante de tempo de reativação (τ_R) de I_{to} . A comparação entre os τ_R dos quatro grupos foi feita ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls e não evidenciou diferença estatística.

4.3.10-Reativação de I_{to} em Cardiomiócitos do VD

O tratamento com Hidralazina não afetou a recuperação de inativação de I_{to} , pois não houve diferença entre a constante de reativação do grupo SHR e do grupo Hidralazina. Figura 24.

Já o grupo tratado com a associação de Enalapril e Hidralazina apresentou uma recuperação da inativação de I_{to} mais lenta em relação ao grupo SHR, Enalapril, e Hidralazina ($p < 0,001$) (tabela 8).

A



B

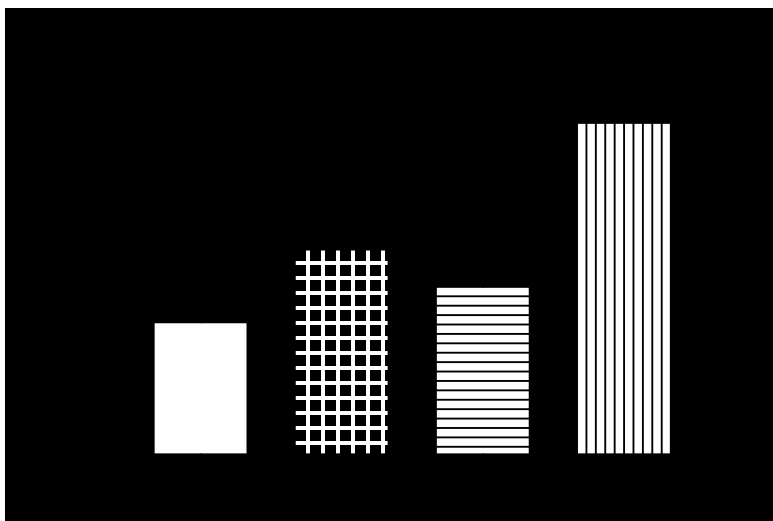


Figura 24: Reativação de I_{to} em cardiomiócitos do VD de ratos SHR tratados e não-tratados. Em A, curvas de recuperação da inativação de I_{to} . A corrente encontrada para cada tempo está normalizada pela corrente obtida no pré-pulso (I/I_{max}). $N=10$ células para o grupo SHR (\square), $N=8$ células no grupo SHRE, $N=7$ células no grupo SHRH e $N=6$ células no grupo E+H. Após ajuste a uma monoexponencial foi obtido a constante de tempo de reativação (τ_R). Em B, constante de reativação de I_{to} (τ_R). $*p<0,001$ em relação ao grupo SHR. A comparação entre os τ_R dos quatro grupos foi feita ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls.

Tabela 8: Constante de reativação de I_{to} no VD

	τ_R (ms)
SHR VE (N=8células)	32,0±5.0 ms
SHRE VE (N=8células)	40.3±3.3 ms
SHRH VE (N=7células)	37.7±1.5 ms
E+H VE (N=6células)	56.2±12,0 ms
SHR VD (N=10células)	22,9±2.3 ms
SHRE VD (N=8células)	34,3±2.4 ms
SHRH VD (N=7células)	25,8±4,3 ms
E+H VD (N=6células)	57.3±6.3 ms*

* $p < 0,001$ em relação ao grupo SHR no VD.

Análise com ONE WAY ANOVA e pós teste de Newman-Keuls

5-Discussão

Tivemos como objetivo geral comparar as alterações na Corrente Transitória de Efluxo de Potássio entre ratos espontaneamente hipertensos e ratos normotensos, e também os efeitos do tratamento de animais SHR com drogas anti-hipertensivas sobre essa corrente em ambos os ventrículos. Também avaliamos índices de hipertrofia cardíaca e celular e parâmetros de ativação, inativação e reativação de I_{to} . Esses resultados serão discutidos à seguir.

5.1-Relação Peso do Coração/Peso Corporal (HW/BW)

A relação Peso do Coração/Peso corporal é um índice bem estabelecido que pode evidenciar hipertrofia cardíaca em modelos animais.

Muitos trabalhos mostram aumento nesta relação em modelos de ratos hipertensos (Montaz, 1995; Yokoshiki, 1997; Shipsey, 1997; Cerbai, 2000), coelhos hipertensos (Rials, 1998, McIntosh, 1997), e furões com hipertensão arterial pulmonar (Poltreu, 1994).

Nossos resultados indicam que os ratos espontaneamente hipertensos possuem uma relação HW/BW maior do que a encontrada nos animais Wistar Kyoto, sugerindo então uma hipertrofia cardíaca nos animais SHR.

O tratamento crônico, por seis semanas, com Enalapril, Hidralazina ou a associação das duas drogas, parece não reduzir a hipertrofia cardíaca, já que o índice HW/BW encontra-se no mesmo nível do índice dos animais SHR. Esta não redução da hipertrofia pode ser consequência do curto período de tratamento utilizado no estudo, já que a maioria dos trabalhos da literatura utiliza-se de tratamentos mais prolongados, de 8 semanas a 3 meses em ratos (Cerbai, 2000;

Rials,1998). Esta não regressão da hipertrofia é interessante para nossa investigação, pois, muitos trabalhos sugerem que as alterações eletrofisiológicas encontradas nos animais hipertensos deve-se a hipertrofia cardíaca, e que somente a redução da hipertrofia seria capaz de restaurar o padrão eletrofisiológico normal do coração (Brilla, 2000).

5.2-Capacitância da Membrana Celular

Inicialmente avaliamos a capacitância da membrana plasmática dos cardiomiócitos isolados. A capacitância celular pode ser um bom indicador da área de superfície celular.

No ventrículo esquerdo não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o grupo Wistar Kyoto e o SHR. Esse resultado discorda da maior parte dos trabalhos na literatura, que descrevem aumento na capacitância da membrana celular em modelos de hipertrofia ventricular. Outro motivo que justificaria a não observação de aumento significativo na capacitância de membrana dos ratos hipertensos em relação aos normotensos pode se dever ao fato de que para realização da técnica de Whole-Cell Patch Clamp é recomendado que se utilize sempre células de mesmo tamanho, aspecto de membrana regular, sem sinais de lesão (Hamill, 1981), gerando então tendenciosidade em relação à população de células utilizadas.

Poltreu, em 1995, demonstrou, em modelo de hipertensão arterial pulmonar em furões por coarctação da artéria pulmonar, um aumento da capacitância da membrana celular em células isoladas do ventrículo direito. Em 1996, utilizando ratos tratados com DOCA-sal, que leva a hipertensão arterial sistêmica, Montaz observou as mesmas alterações descritas anteriormente por Poltreau.

McIntosh, em 1998, utilizando modelo de coelhos hipertensos (por retirada de um rim e lesão do outro) encontrou um aumento na capacitância membrana de células do ventrículo esquerdo. Neste trabalho o comprimento e largura dos cardiomiócitos, analisados por microscopia, também sofreram incremento em relação ao grupo normotenso. No ano de 1997, Yokoshiki havia observado que ratos SHR possuíam capacitância da membrana celular maior do que a de ratos controles Wistar Kyoto, e que o Captopril era capaz de reduzir a capacitância para valores próximos aos do grupo controle.

Em 1998, Rials demonstrou, em coelhos hipertensão induzida pela mesma técnica utilizada por McIntosh (1998), aumento da capacitância da membrana celular de células isoladas do VE dos animais hipertensos em relação às células isoladas dos animais normotensos. Quando ocorreu regressão da hipertensão por tratamento com Captopril (um inibidor da ECA), a hipertrofia também regrediu, havendo normalização da capacitância celular.

A capacitância da membrana nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais tratados, segundo nossos resultados, não é diferente da dos grupos controle.

No ventrículo direito, nota-se segundo nossos resultados, que os animais SHR possuem uma capacitância de membrana maior do a dos animais WK, sugerindo aumento da área de membrana celular, portanto, hipertrofia celular. De fato, não há na literatura trabalho que investigue parâmetros eletrofisiológicos no VD de ratos SHR, tornando difícil a comparação dos dados obtidos, mas pode-se especular uma via indireta de hipertrofia por ação endócrina ou parácrina, possivelmente por circuitos locais de substâncias como Angiotensina II e Aldosterona, já que a que a pressão no VD de ratos SHR é normal comparada com a pressão no VD de animais Wistar Kyoto e, além disso, o tratamento crônico desses

animais, por 12 semanas, com Enalapril não altera a pressão no VD (Nascimento, 2001). Estes hormônios aplicados em cultura de cardiomiócitos, levam à hipertrofia celular e ao aumento na deposição de colágenos pelos fibroblastos (Brilla, 1990 e 1994; Villareal, 1993).

No VD, o grupo tratado com Hidralazina apresentou capacitância da membrana menor do que no grupo controle SHR, sugerindo que o tamanho dos cardiomiócitos estaria reduzido neste grupo. Já foi demonstrado que a Hidralazina é capaz de reduzir a hipertrofia ventricular esquerda em ratos hipertensos (Brosnan, 1999; Pegram, 2000), mas nunca foi relatada alteração do tamanho celular no VD de animais com HAS. Nenhum dos outros tratamentos alterou a capacitância celular no VD.

É importante ressaltarmos que em nosso trabalho o tempo de tratamento foi menor do que o tempo de tratamento de todos os trabalhos supracitados.

5.3-Densidade de I_{to}

Nossos resultados estão de acordo com o encontrado na literatura no que diz respeito à densidade de I_{to} em ventrículos hipertrofiados (Poltreu, 1995; Yokoshiki, 1996; Momtaz, 1996; McIntosh, 1997; Rials, 1998). De fato encontramos menor densidade de I_{to} no ventrículo esquerdo de ratos SHR comparados aos animais controle normotensos. Esta redução na densidade de I_{to} nos animais hipertensos pode estar ligada à redução na expressão gênica dos genes da família $Kv_{4.2}$ e $Kv_{4.3}$ que participam da formação de I_{to} no coração (Zhang, 2004).

Os tratamentos com Enalapril, Hidralazina ou a associação dos dois medicamentos foram capaz de restaurar a densidade normal de I_{to} em VE de ratos hipertensos. Yokoshiki já havia descrito restauração de I_{to} em VE de SHR após o

tratamento com Captopril, um inibidor da ECA. Rials, em 1998, também demonstrou em coelhos hipertensos que o tratamento com Captopril restaura a densidade de I_{to} para níveis de normalidade. Cerbai, em 2000, mostrou um aumento de I_{to} de animais tratados com Losartan, um bloqueador de receptores de Angiotensina II do subtipo AT1. O interessante é que a dose de Losartan utilizada não foi capaz de reduzir a pressão arterial nesses animais, sugerindo assim uma ação farmacológica dessa droga sobre I_{to} .

A partir desses achados, propusemo-nos a avaliar se há alteração na densidade de I_{to} nos cardiomiócitos do ventrículo direito dos animais tratados com Enalapril, Hidralazina, ou a associação de Enalapril e Hidralazina. Encontramos que tanto o tratamento com Enalapril, quanto com Enalapril e Hidralazina é capaz de aumentar a densidade de I_{to} no VD de ratos SHR. O tratamento somente com Hidralazina mantém a densidade de I_{to} idêntica a dos animais SHR. Sugerindo então uma possível ação farmacológica do Enalapril sobre I_{to} , independentemente da redução da sobrecarga de pressão. Brosnan, em 1999, já havia demonstrado que o Enalapril e Hidralazina reduzem a hipertrofia ventricular em ratos hipertensos, mas somente o Enalapril foi capaz de reduzir a hipertrofia arterial nesses animais.

Os mecanismos envolvidos nesse aumento da densidade de I_{to} pelo Enalapril, tanto no VE quanto no VD, não foram elucidados até a presente data, entretanto, algumas possibilidades iniciais podem ser sugeridas: primeira, o enalapril pode recuperar a expressão de $Kv_{4.2}$ e $Kv_{4.3}$, recuperando assim a densidade de I_{to} no VE. Segunda, subunidades regulatórias, já mencionadas, podem ser superexpressadas pelo tratamento com enalapril e assim aumentar a densidade de I_{to} (Zhang, 2004), e por fim o enalapril pode atuar diretamente no canal, aumentando a condutância unitária de cada subunidade.

5.4-Ativação e Inativação de I_{to}

Nossos resultados sugerem que não há diferença entre as curvas de ativação de I_{to} dos animais WK e SHR, tanto no VE, quanto no VD. E que, no VE e no VD, somente o tratamento com a associação de Enalapril e Hidralazina altera o $V_{1/2}$ de ativação de I_{to} , embora visualmente o tratamento somente com enalapril pareça reduzir o $V_{1/2}$ de ativação de I_{to} em relação aos animais SHR. No VE, a associação de Enalapril e Hidralazina reduz o $V_{1/2}$ de ativação em relação ao grupo Wistar Kyoto, enquanto no VD esta associação reduz o $V_{1/2}$ de ativação em relação ao grupo tratado com somente Hidralazina. Não encontramos qualquer diferença entre as constantes de tempo de ativação dos diversos grupos experimentais, tanto no VE, quanto no VD.

A maioria dos trabalhos que investiga as relações de I_{to} com a hipertrofia cardíaca não estudou parâmetros biofísicos de I_{to} . Poltreu, em 1995, foi o primeiro a investigar alterações da biofísica de funcionamento de I_{to} na hipertrofia ventricular, não encontrando diferença entre o $V_{1/2}$ de ativação nem do K de animais hipertrofiados em relação a animais sem hipertrofia. Rials, em 1998, também não encontrou alteração destes parâmetros entre o grupo com hipertrofia e o controle, mesmo após o tratamento dos animais hipertensos com Captopril não ocorreu modificação dos parâmetros de ativação de I_{to} .

Quanto à inativação de I_{to} , nossos resultados apresentam um padrão muito parecido com o encontrado na ativação, não havendo diferença entre os grupos WK e SHR no VE, nem no VD.

No VE, o $V_{1/2}$ de inativação está mais negativo no grupo tratado com Enalapril e no grupo tratado com Enalapril e Hidralazina em relação ao grupo SHR. Visualmente há também diferença entre estes dois grupos e o grupo Wistar Kyoto,

mas esta diferença não foi comprovada estatisticamente. No VD, o grupo tratado com a associação de Enalapril e Hidralazina possui um $V_{1/2}$ de inativação mais negativo que todos os outros grupos, enquanto o grupo tratado com Enalapril apresenta $V_{1/2}$ de inativação reduzido em relação ao grupo tratado com Hidralazina.

Poltreau em 1995, McIntosh, em 1997 e Rials em 1998 não encontraram diferença entre os parâmetros de inativação ($V_{1/2}$ e K) de ventrículos de animais hipertrofiados e de animais sem hipertrofia. Rials ainda demonstrou que após a regressão da hipertrofia por tratamento feito com Captopril não houve modificação dos parâmetros de inativação de I_{to} .

Estas alterações na biofísica de ativação e inativação de I_{to} sugerem que o Enalapril sozinho possui efeito sobre I_{to} , mas que a associação desta droga com Hidralazina potencializa seus efeitos. Estas alterações dão suporte à hipótese de um possível mecanismo para a recuperação de densidade de I_{to} em que uma ou mais subunidades regulatórias de I_{to} poderiam estar sendo superexpressadas, como por exemplo, KCHIP1, 2 e 3 e Frequenina, que podem se ligar a subunidades- α $Kv_{4.2}$ e aumentar a densidade de corrente do canal constituído destas subunidades. As subunidades- β ($Kv_{\beta 1}$, $Kv_{\beta 2}$ e $Kv_{\beta 3}$) também podem se associar a subunidades- α $Kv_{4.3}$, podendo alterar a biofísica de ativação destas subunidades e por consequência de I_{to} (Pongs,1999; An, 2000).

5.5-Reativação de I_{to}

Novamente Poltreu, em 1995, demonstrou que a constante de reativação (τ_R) de I_{to} , em cardiomiócitos isolados do VD de coelhos com hipertensão arterial pulmonar e com hipertrofia do VD, é menor do que o τ_R em animais sem hipertensão arterial pulmonar.

Rials, em 1998, mostrou que coelhos hipertensos não possuem diferença entre a τ_R de I_{t0} no ventrículo esquerdo desses animais, após tratamento com Captopril não ocorreu alteração deste parâmetro.

Nossos resultados sugerem que não há diferença na reativação de I_{t0} entre o grupo SHR e o grupo Wistar Kyoto no VE. Quanto ao VD, os animais SHR parecem possuir uma reativação mais lenta do que animais WK, devido ao aumento na constante de tempo de reativação.

Não há relatos na literatura quanto a este parâmetro no VD de ratos SHR, mas é o contrário do que ocorre no VE de coelhos hipertensos, onde nota-se uma redução na constante de tempo de reativação, sugerindo então uma reativação de I_{t0} mais rápida nesses animais.

No VE, nenhum dos tratamentos medicamentosos realizados nos animais SHR modificou a reativação de I_{t0} , dado que está de acordo com o demonstrado por Rials, em 1998.

No VD o tratamento com Enalapril sozinho aparentemente aumenta a constante de reativação, mas estatisticamente, somente a associação de Enalapril e Hidralazina é capaz de aumentar a constante de tempo de reativação de I_{t0} no VD, em relação a todos os outros grupos experimentais, sugerindo então uma lentificação ainda maior no tempo de reativação de I_{t0} no VD.

Em conclusão, nossos resultados demonstram que o tratamento de ratos hipertensos com Enalapril, Hidralazina e a associação dos dois medicamentos recuperam a densidade normal de I_{t0} no VE de ratos hipertensos. Esta maior densidade de I_{t0} nos ratos tratados com Enalapril e/ou Hidralazina explica a redução da duração do potencial de ação no VE de ratos SHR tratados (Nascimento, 2001). O prolongamento da duração do potencial de ação, como ocorre nos ratos SHR, constitui substrato para o desenvolvimento de pós-potenciais e o desencadeamento

de arritmias cardíacas. A redução da incidência de arritmias ventriculares complexas, já descrita em animais e humanos (Chavelier, 1995) tratados com inibidores da ECA, pode então ter relação com nossos achados, de que o Enalapril altera a densidade e os parâmetros biofísicos de I_{to} em ambos os ventrículos.

6-Conclusões

- Os corações dos SHR apresentam-se hipertrofiados em relação ao corações dos WK;
- Nenhum dos tratamentos foi capaz de reduzir a hipertrofia cardíaca nos SHR;
- Cardiomiócitos isolados do VE de SHRs apresentaram menor densidade de Ito em comparação com animais normotensos (WK);
- O tratamento crônico dos animais hipertensos com Enalapril, Hidralazina ou a associação das duas drogas aumentou a amplitude de Ito para níveis normais no VE;
- O tratamento crônico com Enalapril ou com a associação de Enalapril e Hidralazina altera a fisiologia de ativação e inativação de Ito no VE.
- Cardiomiócitos isolados do VD de SHRs não apresentaram diferença na amplitude de Ito em comparação com animais normotensos (WK);
- O tratamento crônico com Enalapril ou a associação de Enalapril e Hidralazina aumenta amplitude de Ito em cardiomiócitos isolados do VD de SHRs;
- O tratamento crônico com Enalapril ou com a associação de Enalapril e Hidralazina altera a fisiologia de ativação, inativação e reativação de Ito no VD.

7-Perspectivas de continuação do estudo no Doutorado

Temos como perspectivas futuras darmos continuidade a este estudo, investigando os mecanismos pelos quais os medicamentos aumentam a densidade de I_{to} e modificam os parâmetros biofísicos desta corrente em ventrículos de ratos hipertensos.

Para tal, temos como objetivos para o doutorado investigar, utilizando PCR e imunohistoquímica, uma possível redução na expressão das subunidades- α que compõe o canal funcional de I_{to} , assim como analisar a expressão destas subunidades após o tratamento com os medicamentos utilizados neste trabalho. Avaliaremos também a expressão gênica das subunidades regulatórias de I_{to} (subunidades- β , KChIP e KChAP), que podem ser responsáveis pelas modificações no padrão da corrente que encontramos em nossa investigação. A condutância unitária de I_{to} também será investigada.

Por fim, avaliar outras correntes iônicas que possam estar envolvidas no já descrito aumento da duração do potencial de ação de ventrículos hipertrofiados.

8-Referências

Akazawa, H. Komuro, I. (2003). "Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy." *Circulation Research* 92 (10): 1079-1088.

An, W.F., Bowlby, M.R., Betty, M., Cao, J., Ling, H.O., Mendoza, G., Hinson, J.W., Mattsson, K.I., Strassle, B.W., Trimmer, J., Rhodes J.K. (2000). "Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors." *Nature* 403: 553-556.

Apkon, M. Nerbonne, J.M. (1991). "Characterization of two distinct depolarization-activated K⁺ currents in isolated adult rat ventricular myocytes." *The Journal of General Physiology* 97: 973-1011.

Aronson, R.S. (1980). "Characteristics of action potentials of hypertrophied myocardium from rats with renal hypertension." *Circulation Research* 47(3): 443-454.

Aronson, R.S. (1991). "Mechanisms of arrhythmias in ventricular hypertrophy." *The Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 2: 249–261.

Barry, D.M. Nerbonne, J.M. (1996). "Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity." *Annual Review of Physiology* 58: 363-394.

Birnbaum, S.G., Varga A.W., Yuan L-L., Anderson, A.E., Sweatt J.D., Schrader, L.A. (2004). "Structure and function of kv4-family transient potassium channels". *Physiological Reviews* 84:803-833.

Boyle, W.A. Nerbonne, J.M. (1991). "A novel type of depolarization-activated K⁺ current in isolated adult rat atrial myocytes." *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 260: 1236-1247.

Brilla, C.G., Funck, R.C. Rupp, H. (2000). "Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease." *Circulation* 102(12): 1388-1393.

Brilla, C.G., Pick, R., Tan, L.B., Janicki, J.S. Weber, K.T. (1990). "Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension." *Circulation Research* 67(6): 1355-1364.

Brilla, C.G., Zhou, G., Matsubara, L. Webwr, K.T. (1994). "Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 26(7): 809-820.

Brosnan, M.J., Devlin, A.M., Clark, J.S., Mullins, J.J., Dominiczak, A.F. (1999). "Different effects of antihypertensive agents on cardiac and vascular hypertrophy in the transgenic rat line TGR(mRen2)27." *American Journal of Hypertension* 12(7): 724-731.

Campbell, D.L., Rasmusson, R.L., Comer, M.B., Strauss, H. (1995). "The cardiac calcium-independent transient outward potassium current: kinetics, molecular properties, and role in ventricular repolarization." *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*, 2nd edn, ed. Zipes, D. P., Jalife, J. 83-96.

Campbell, D.L., Rasmusson, R.L., Qu, Y., Strauss, H.C. (1993). "The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes." *The Journal of General Physiology* 101(4): 603-626.

Carretero, O.A., Oza, B.N., Scicli, A.G., Schork, A. (1974). "Renal tissue kallikrein, plasma renin and plasma aldosterone in renal hypertension." *Acta Physiologica Latinoamericana* 24(5): 448- 452

Cerbai, E., Crucitti, A., Sartiani, L., Paoli, P.D., Pino, R., Rodriguez, M.L., Gensini, G., Mugellia, A. (2000). "Long-term treatment of spontaneously hypertensive rats with losartan and electrophysiological remodeling of cardiac myocytes." *Cardiovascular Research* 45(2): 388–396.

Chevalier, B., Heudes, D., Heymes, C., Basset, A., Dakhli, T., Bansard, Y., Jouquey, S., Hamon, G., Bruneval, P., Swynghedauw, B., Carré F. (1995). "Trandolapril decreases prevalence of ventricular ectopic activity in middle-aged SHR." *Circulation* 92(7): 1947-1953.

Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M.S., Ozaita, A., Pountney, D. (1999). "Molecular diversity of K⁺ channels." *Annual New York Academy of Sciences* 868: 233-285.

Colan, S.D. (1997). "Mechanics of left ventricular systolic and diastolic function in physiologic hypertrophy of the athlete's heart." *Cardiology Clinics* 15(3): 355-372.

Dahl, L.K., Heine, M., Tassinari, L. (1962). "Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion." *Nature* 194: 480-482.

Doba, N., Reis, D.J. (1973). "Acute fulminating neurogenic hypertension produced by brainstem lesions in the rat." *Circulation Research* 32(5): 584-593.

Escande, D., Coulombe, A., Faivre, J.F., Deroubaix, E., Corabouef, E. (1987). "Two types of transient outward currents in adult human atrial cells." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 252: 142-148.

European society of cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. (2003). European society of hypertension. *The Journal of Hypertension* 21: 1011-1053.

Fazan-Jr, R., Silva, V.J.D.d., Salgado, H.C. (2001). "Modelos de hipertensão arterial." *Revista Brasileira de Hipertensão* 8(1): 19-29.

Furukawa, T., Myerburg, R.J., Furukawa, N., Bassett, A.L., Kimura, S. (1990). "Differences in transient outward currents of feline endocardial and epicardial myocytes." *Circulation Research* 67(5):1287-1291.

Giles, W.R., Imaizumi, Y. (1988). "Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells." *The Journal of Physiology* 405(1): 123-145.

Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R.F., Summerville, W.W. (1934). "Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia." *The Journal of Experimental Medicine* 59: 347-349.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflüegers Archives* 391: 85-100.

Hart, G. (1994). "Cellular electrophysiology in cardiac hypertrophy and failure." *Cardiovascular Research* 28(7): 933-956.

Isenberg, G., Klöckner, U. (1982). "Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by pre-incubation in a K-B medium". *Pflüegers Archives*. 424: 431-438.

Kannel, W.B. (2000). "Elevated systolic blood pressure as a cardiovascular risk factor." *The American Journal of Cardiology* 85(2): 251- 255.

Kannel, W.B., Plehn, J.F., Cupples, L.A. (1988). "Cardiac failure and sudden death in the Framingham Study." *American Heart Journal* 115(4): 869-875.

Kassiri, Z., Zobel, C., Nguyen, T.T., Molkentin, J.D., Backx, P.H. (2002). "Reduction of I_{to} causes hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes." *Circulation Research* 90(5): 578-585.

Litovsky, S.H., Antzelevitch, C. (1988). "Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium." *Circulation Research* 62(1): 116-126.

Liu, Y., Leri, A., Li, B., Wang, X., Cheng, W., Kajstura, J., Anversa, P. (1998). "Angiotensin II stimulation in vitro induces hypertrophy of normal and postinfarcted ventricular myocytes." *Circulation Research* 82(11): 1145-1159.

Lorell, B.H., Carabello, B.A. (2000). "Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis." *Circulation* 102(4): 470-479.

Ly, J., Yn, J. (1992). "Structural elements involved in specific K⁺ channel functions." *Annual Review of Physiology* 54: 537-555.

Masuda, M.O., Engel, G., Moreira, A. (1987). Characterization of isolated ventricular myocytes: two levels of resting potential. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 19(9): 831-839.

McIntosh, M.A., Cobbe, S.M., Kane, K.A., Rankin, A.C. (1998). "Action potential prolongation and potassium currents in left-ventricular myocytes isolated from hypertrophied rabbit hearts." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 30(1): 43-53.

Mesa, A.M., Jessurun, C., Hernandez, A. (1999). "Left ventricular diastolic function in normal human pregnancy." *Circulation* 99(4): 511-517.

Messerli, F.H., Ventura, H.O., Elizrdi, D.J., Dunn, F.G., Frohlich, E.D. (1984). "Hypertension and sudden death. Increased ventricular ectopic activity in left ventricular hypertrophy." *The American Journal of Medicine* 77(1): 18-22.

Momtaz, A., Coulombe, A., Richer, P., Mercadier, J.J., Coraboeuf, E. (1996). "Action potential and plateau ionic currents in moderately and severely DOCA-salt hypertrophied rat hearts." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 28(12): 2511-2522.

Muirhead, E.E., Jones, F., Graham, P. (1953). "Hypertension following bilateral nephrectomy of the dog: the influence of dietary protein on its pathogenesis with

emphasis on its development in the absence of "extracellular fluid" expansion." *Circulation Research* 1(5): 439-453.

Näbauer, M., Beuckelmann, D.J., Überführ, P., Steinbeck, G. (1996). "Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle." *Circulation* 93(1): 168-177.

Nascimento, R.A., Mill, J.G. (2001). Uso crônico de inibidores da enzima conversora de angiotensina previne o remodelamento eletrofisiológico no miocárdio de ratos naturalmente hipertensos. Tese de mestrado submetida ao departamento de ciências fisiológicas da UFES.

Nattel S., Li, D. (2000). Ionic remodeling in the heart – pathophysiological significance and new therapeutic opportunities for atrial fibrillation. *Circulation Research* 87(6):440-447

Nerbonne, J.M. (2000). "Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in mammalian myocardium." *The Journal of Physiology* 525(2): 285-298.

Okamoto, K. Aoki, K. (1963). "Development of a strain of spontaneously hypertensive rats." *Japanese Circulatory Journal* 27: 282-298.

Oudit, G.Y., Kassiri, Z., Sah, R., Ramirez, R.J., Zobel, C., Backx, P.H. (2001). "The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in normal and diseased myocardium." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33(5): 851–872.

Page, I.H. (1939). "The production of persistent arterial hypertension by cellophane perinephritis." *The Journal of the American Medical Association* 113: 2046.

Pegram, B.L., Ishize, S., Frohlich, E.D. (2000). "Effect of methyl dopa, clonidine, and hydralazine on cardiac mass and haemodynamics in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats: An historical account and some follow-up." *Cardiovascular Research* 45(1): 79-81.

Pongs, O. (1992). "Structural basis of voltage-gated K⁺ channel pharmacology." *Trends in Pharmacological Sciences* 13(9): 359-365.

Pongs, O., Leicher, T., Berger, M., Roeper, J., Bähring, R., Wray, D., Giese, K.P., Silva, A.J., Storm, J.F. (1999). "Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel beta subunits." *Annual New York Academy Sciences* 868: 344-355.

Potreau, D., Gomez, J.P., Fares, N. (1995). "Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart." *Cardiovascular Research* 30(3): 440-448.

Rials, S.J., Xu, X., Wu, Y., Marinchack, R.A., Kowey, P.R. (1998). "Regression of LV hypertrophy with captopril normalizes membrane currents in rabbits." *American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology* 275(44): H1216-H1224.

Sadoshima, J., Izumo, S. (1997). "The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress." *Annual Review of Physiology* 59: 551-571.

Safar, M., London, G. (1994). "The arterial system in human hypertension." Oxford' Blackwell Scientific Publishers.

Sah, R., Ramirez, R.J., Oudit, G.Y., Gidrewicz, D., Trivieri, M.G., Zobel, C., Backx, P.H. (2003). "Regulation of cardiac excitation-contraction coupling by action potential repolarization: role of the transient outward potassium current (I_{to})." *The Journal of Physiology* 546(1): 5-18.

Sanguinetti, M.C. (2002). "Reduced transient outward K^+ current and cardiac hypertrophy. Causal relationship or epiphenomenon?" *Circulation Research* 90(5): 497-499.

Schiffrin, E.L., Gutkowska, J., Thibault, G., Genest, J. (1984). Effect of enalapril (MK-421), an orally active angiotensin I converting enzyme inhibitor, on blood pressure, active and inactive plasma renin, urinary prostaglandin E2, and kallikrein excretion in conscious rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 62(1):116-123.

Selye, H., Stone, H. (1946). "Pathogenesis of the cardiovascular and renal changes which usually accompany malignant hypertension." *The Journal of Urology* 56: 399.

Shipsey, S.J., Bryant, S.M., Hart, G. (1997). "Effects of hypertrophy on regional action potential characteristics in the rat left ventricle. A cellular basis for T-wave inversion?" *Circulation* 96(6): 2061-2068.

Shieh, C.C., Coghlan, M., Sullivan, J.P., Gopalakrishnan, M. (2000). Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacological Reviews* 52(4):557-94.

Snyders, D.J. (1999). "Structure and function of cardiac potassium channels." *Cardiovascular Research* 42(2): 377-390.

Stokes, J., Kannel, W.B., Wolf, P.A., D'Agostino, R.B., Cupples, L.A. (1989). "Blood pressure as a risk factor for cardiovascular disease: The Framingham study-30 years of follow-up." *Hypertension* 13[supl.5]: 113-118.

Swales, J. (1994). Oxford (Blackwell Scientific Publishers).

Tabacova, S.A. Kimmelb, C.A. (2001). "Enalapril: pharmacokinetic/dynamic inferences for comparative developmental toxicity." *Reproductive toxicology* 15(5): 467-478.

Terracio, L., Rubin, K., Gullberg, D. (1991). "Expression of collagen binding integrins during cardiac development and hypertrophy." *Circulation Research* 68(3): 734-744.

Tristani-Firouzi, M., Chen, J., Mitcheson, J.S., Sangunetti, M.C. (2001). "Molecular biology of K⁺ channels and their role in cardiac arrhythmias." *The American Journal of Medicine* 110(1): 50-59.

Villarreal, F.J., Kim, N.N., Ungab, G.D., Printz, M.P., Dillmann, W.H. (1993). "Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts." *Circulation* 88(6): 2849-2861.

Wible, B.A., Yang, Q., Kuryshev, Y.A., Accili, E.A., Brown, A.M. (1998). "Cloning expression of a novel K⁺ channel regulatory protein, KChAP." *The Journal of Biological Chemistry* 273(19): 11745-11751.

Xu, H., Guo, W., Nerbonne, J.M. (1999). "Four kinetically distinct depolarization activated K⁺ channel currents in mouse ventricular myocytes." *The Journal of General Physiology* 113(5): 661-678.

Yokoshiki, H., Kohya, T., Tomita, F., Tohse, N., Nakaya, H., Kanno, M., Kitabatake, A. (1997). "Restoration of action potential duration and transient outward current by regression of Left ventricular hypertrophy." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29(5): 1331-1339.

Yue, L., Feng, J., R, G.R.L., Nattel, S. (1996). "Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods." *The American Journal of Physiology* 270(6 Pt2): H2157-2168.

Zhang, T.T., Cui, B. and Dai, D.Z. (2004). "Downregulation of Kv4.2 and Kv4.3channel gene expression in right ventricular hypertrophy induced by monocrotalin in rat." *Acta Pharmacologica Sinica* 25(2): 226-230.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)