

FERNANDO AUGUSTO LAVEZZO DIAS

**PAPEL DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL NO
DESENVOLVIMENTO DA HIPERTROFIA E DISFUNÇÃO CARDÍACA**

**Tese apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Doutor, pelo
Curso de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular – Área Fisiologia,
do setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Rosalvo T. H.
Fogaça**

CURITIBA

2007

Para Cibele e Bianca.

AGRADECIMENTOS

A

Cibele, minha esposa, pelo companheirismo durante esta jornada, pela compreensão, amor e dedicação, pelo auxílio direto na aquisição de dados e preparo dos experimentos com músculo papilar isolado e pelo auxílio na correção gramatical da tese.

Bianca, minha pequena filha, que nasceu durante os anos em que desenvolvi este trabalho e que irradia amor em seu olhar e em seu sorriso, fazendo com que os dias mais exaustivos fossem esquecidos no momento em que a encontrava no final do dia.

Aos demais familiares, que mesmo de longe, demonstraram preocupação e apoio durante os vários anos que dediquei a minha pós-graduação.

Dra. Beata M. Wolska, pela co-orientação, por abrir as portas de seu laboratório e dar-me liberdade para conduzir os experimentos, pelos ensinamentos e pelo auxílio pessoal durante os anos de realização deste trabalho.

Dr. Rosalvo T. H. Fogaça, pela orientação, pelo apoio e ensinamentos oferecidos desde o início da minha pós-graduação.

Dr. David L. Geenen, pelo auxílio na realização dos experimentos envolvendo a cirurgia de coarctação de aorta e mensurações de volume e pressão do ventrículo esquerdo.

Dra. Dalia Urboniene, pela realização das ecocardiografias e pela análise e cálculo dos dados obtidos nestes experimentos.

Dr. Paul H. Goldspink, pelo auxílio na realização e análise dos dados dos experimentos de RT-PCR.

Ma. Milana A. Yuzhakova, pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos e nas mensurações da função cardíaca *in situ*.

Profa. Solange A. Gizzi, pelo auxílio na correção ortográfica e gramatical deste trabalho.

Aos demais companheiros de trabalho, em especial Me. James R. Peña, pela realização de experimentos preliminares de mensuração da pressão do ventrículo esquerdo *in situ* e Dra. Lori Walker, por ser sempre prestativa no esclarecimento de experimentos de bioquímica.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 PROPRIEDADES QUÍMICA DO ÓXIDO NÍTRICO E DERIVADOS	6
2.1.1 Efeitos diretos do óxido nítrico	7
2.1.2 Efeitos indiretos do óxido nítrico	8
2.2 ENZIMAS SINTETIZADORAS DE ÓXIDO NÍTRICO.....	10
2.2.1 Óxido nítrico sintase neuronal.....	14
2.2.2 Óxido nítrico sintase induzível.....	15
2.2.3 Óxido nítrico sintase endotelial	16
2.3 EFEITOS BIOLÓGICOS DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR	18
2.3.1 Processos envolvidos na regulação da contração do músculo liso vascular	18
2.3.2 Efeitos do NO sobre o relaxamento vascular	21
2.3.3 Processos envolvidos na regulação da contratilidade cardíaca	28
2.3.4 Efeitos do NO sobre a contratilidade cardíaca	37
2.3.4.1 Expressão e localização das enzimas sintetizadoras de NO na célula cardíaca	37
2.3.4.2 Efeitos do NO na função do coração no estado basal	40
2.3.4.3 Efeitos do NO sobre a resposta β -adrenérgica	45
2.3.4.4 Mecanismos de ação do NO na célula cardíaca	49
2.3.4.5 Modelos animais com manipulação genética da NOS	51
3 METODOLOGIA.....	57
3.1 ANIMAIS	57
3.2 CIRURGIA PARA DIMINUIÇÃO DO DIÂMETRO DA ARTÉRIA AORTA TORÁCICA.....	57
3.3 ECOCARDIOGRAFIA TRANSTORÁCICA	60

3.4 EXPERIMENTOS UTILIZANDO MÚSCULO PAPILAR ISOLADO DO VENTRÍCULO ESQUERDO E CÁLCULO DO ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA	61
3.5 MENSURAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA <i>IN SITU</i>	64
3.6 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA ATRAVÉS DE REAÇÃO DE CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR)	66
3.7 IMMUNOBLOTTING PARA INOS, ENOS, FOSFO-ENOS, SERCA2 E FOSFOLAMBANO	67
3.8 HISTOLOGIA E IMUNOFLUORESCÊNCIA	69
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71
4 ANÁLISE DOS RESULTADOS	72
4.1 EXPRESSÃO DE INOS APÓS A COARCTAÇÃO DA AORTA	72
4.2 ECOCARDIOGRAFIA TRANSTORÁCICA E ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA	77
4.3 HISTOLOGIA.....	83
4.4 EXPERIMENTOS UTILIZANDO MÚSCULO PAPILAR ISOLADO DO VENTRÍCULO ESQUERDO	85
4.5 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA	95
4.6 EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA E FOSFORILAÇÃO DE ENOS	98
5 DISCUSSÃO	105
5.1 A ENZIMA INOS É EXPRESSA NO CORAÇÃO DURANTE A SOBRECARGA POR PRESSÃO.....	105
5.2 A ABLAÇÃO DE INOS NÃO EVITA O DESENVOLVIMENTO DE HIPERTROFIA CARDÍACA NEM ALTERA A TAXA DE MORTALIDADE EM ANIMAIS SUBMETIDOS À COARCTAÇÃO DA AORTA	108
5.3 A ABLAÇÃO DE INOS PREVINE A DETERIORIZAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA DURANTE A SOBRECARGA POR PRESSÃO.....	110
5.4 A ABLAÇÃO DE INOS ESTÁ ASSOCIADA COM A HIPERSENSIBILIDADE β -ADRENÉRGICA.....	117

5.5 ANIMAIS INOSKO SUJEITOS À SOBRECARGA CARDÍACA POR AUMENTO DE PRESSÃO NÃO APRESENTARAM EXPRESSÃO GÊNICA RELACIONADA À INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	121
6 CONCLUSÃO.....	123
7 REFERÊNCIAS	124

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - REPRESENTAÇÃO ILUSTRATIVA DA ENZIMA NOS	12
FIGURA 02 - SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO À PARTIR DA L-ARGININA CATALISADA PELA NOS	13
FIGURA 03 - MECANISMO DE RELAXAMENTO DA CÉLULA MUSCULAR LISA MEDIADO PELO ÓXIDO NÍTRICO	27
FIGURA 04 - CONSEQUÊNCIA DA MUTAÇÃO DA CADEIA LEVE REGULADORA DA MIOSINA TORNANDO-A NÃO FOSFORILÁVEL.....	36
FIGURA 05 - EFEITOS DA INFUSÃO DE NO NA CONTRATILIDADE CARDÍACA, EM CORAÇÃO ISOLADO PERFUNDIDO RETROGRADAMENTE, PROVENIENTE DE CAMUNDONGO	43
FIGURA 06 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICO DO MECANISMO DE AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA CÉLULA MUSCULAR CARDÍACA.....	52
FIGURA 07 - ILUSTRAÇÃO DA COARCTAÇÃO DA ARTÉRIA AORTA – AORTIC BANDING (AOB).....	58
FIGURA 08 - IMMUNOBLOTTING PARA DETECÇÃO DE INOS	73
FIGURA 09 - IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DE INOS	75
FIGURA 10 - ECOCARDIOGRAMAS DE VENTRÍCULO ESQUERDO DE ANIMAIS WT AOB E INOSKO AOB ANTES E APÓS A CIRURGIA.	78
FIGURA 11 - CORTES HISTOLÓGICOS CORADOS COM HEMATOXILINA-EOSINA.....	83
FIGURA 12 - CORTES HISTOLÓGICOS CORADOS COM TRICRÔMIO DE MASSON	84
FIGURA 13 - DOSE-RESPOSTA AO ISOPROTERENOL EM MÚSCULO PAPILAR DE VENTRÍCULO ESQUERDO PROVENIENTE DE ANIMAIS AOB SACRIFICADOS A CURTO PRAZO E DE ANIMAIS-CONTROLE.....	87
FIGURA 14 - DOSE-RESPOSTA AO ISOPROTERENOL EM MÚSCULO PAPILAR DE VENTRÍCULO ESQUERDO PROVENIENTE DE ANIMAIS AOB SACRIFICADOS A LONGO PRAZO E DE ANIMAIS-CONTROLE	92
FIGURA 15 - DOSE-RESPOSTA AO ISOPROTERENOL, NA PRESENÇA DE 1400W, EM MÚSCULO PAPILAR DE VENTRÍCULO ESQUERDO PROVENIENTE DE ANIMAIS AOB SACRIFICADOS A LONGO PRAZO	94
FIGURA 16 - CURVAS DE VOLUME-PRESSÃO OBTIDAS DO VENTRÍCULO ESQUERDO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À COARCTAÇÃO DA AORTA	96
FIGURA 17 - PSVE, PRSW E DP/DT EM ANIMAIS AOB E ANIMAIS CONTROLE	97
FIGURA 18 - EXPRESSÃO GÊNICA EM VENTRÍCULOS CARDÍACO DE ANIMAIS AOB SACRIFICADOS A CURTO E A LONGO PRAZO E DE ANIMAIS-CONTROLE	99
FIGURA 19 - EXPRESSÃO E FOSFORILAÇÃO DE ENOS.....	102
FIGURA 20 - EXPRESSÃO DE PLB E SERCA2 EM ANIMAIS AOB E ANIMAIS-CONTROLE	103

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 01 - SEQUÊNCIA GÊNICA DO PRIMERS UTILIZADOS PARA RT-PCR.....	67
TABELA 01 - MEDIDAS ECOCARDIOGRÁFICAS E ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA EM ANIMAIS AOB AVALIADOS A CURTO PRAZO APÓS A COARCTAÇÃO DA AORTA.....	82
TABELA 02 - MEDIDAS ECOCARDIOGRÁFICAS E ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA EM ANIMAIS AOB AVALIADOS A LONGO PRAZO APÓS A COARCTAÇÃO DA AORTA.....	82
TABELA 03 - FORÇA DESENVOLVIDA PELOS MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A CURTO PRAZO	85
TABELA 04 - TR ₅₀ EM MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A CURTO PRAZO.....	86
TABELA 05 - TP EM MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A CURTO PRAZO.....	86
TABELA 06 - FORÇA DESENVOLVIDA POR MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A LONGO PRAZO.....	89
TABELA 07 - TR ₅₀ EM MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A LONGO PRAZO	90
TABELA 08 - TP EM MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A LONGO PRAZO	90
TABELA 09 - FORÇA DESENVOLVIDA POR MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A LONGO PRAZO NA PRESENÇA DE 1400W.....	91
TABELA 10 - TR ₅₀ E TP EM MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A LONGO PRAZO NA PRESENÇA DE 1400W	91
TABELA 11 - MEDIDAS HEMODINÂMICAS <i>IN SITU</i> EM VENTRÍCULO ESQUERDO DE ANIMAIS AOB E DE ANIMAIS CONTROLE	98
TABELA 12 - EXPRESSÃO GÊNICA EM ANIMAIS SUBMETIDOS À COARCTAÇÃO DE AORTA E CONTROLES PAREADOS POR IDADE.....	100
TABELA 13 - EXPRESSÃO PROTÉICA E FOSFORILAÇÃO DE ENOS EM ANIMAIS SUBMETIDOS À COARCTAÇÃO DA AORTA E EM ANIMAIS- CONTROLE PAREADOS POR IDADE	104

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPc	- monofosfato de adenosina cíclica
AoB	- cirurgia para coarctação da aorta (aortic banding)
ATP	- trifosfato de adenosina
bpm	- batimentos por minuto
CaM	- calmodulina
CMH	- cardiomiopatia hipertrófica familiar
cTnI	- troponina I cardíaca
cTnT	- troponina T cardíaca
DDVE	- diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DG	- diacilglicerol
DNA	- Ácido desoxiribonucleico
DSVE	- diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
ELC	- cadeia leve essencial da miosina
E _{max}	- relação volume-pressão diastólica final
eNOS	- óxido nítrico sintase endotelial
ESPVR	- relação volume-pressão sistólica final
FAD	- flavina-adenina dinucleotídeo
FC	- frequência cardíaca
FE	- fração de encurtamento
FMN	- flavina mononucleotídeo
g	- gramas
GADPH	- gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GCs	- guanilato ciclase solúvel
GMPc	- monofosfato de guanosina cíclica
GTP	- trifosfato de guanosina
Hz	- Hertz (unidade de frequência)
IC	- insuficiência cardíaca
IFN- γ	- interferon- γ
IH	- índice de hipertrofia
IL-1	- interleucina-1
IM	- infarto do miocárdio
INOSKO	- animais nocaute para o gene determinante da expressão de iNOS
iNOS	- óxido nítrico sintase induzível
IP ₃	- trifosfato de inositol
IVRT	- tempo de relaxamento isovolumétrico
kDa	- quilodaltons
LPS	- lipopolissacarídeo
MHC	- cadeia pesada da miosina
min	- minutos
MLC	- cadeia leve da miosina (Myosin Light Chain)
MLCK	- quinase da cadeia leve da miosina (Myosin Light Chain Kinase)

MLCP	- fosfatase da cadeia leve da miosina
mmHg	- milímetros de mercúrio
mRNA	- ácido ribonucléico mensageiro
MyBP-C	- proteína C ligante da miosina
NADPH	- nicotinamida-adenina dinucleotídeo
NF- κ B	- fator nuclear- κ B
nM	- nanomolar
NMDA	- N-metil-D-aspartato
nNOS	- óxido nítrico sintase neuronal
NOS	- óxido nítrico sintase
PCR	- reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
PDE	- fosfodiesterase
PDVE	- pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
PKA	- proteína quinase dependente de AMPc, proteína quinase A
PKC	- proteína quinase C
PKG	- proteína quinase dependente de GMPc, proteína quinase G
PLB	- fosfolambano
PPVE	- parede posterior do ventrículo esquerdo
PRSW	- trabalho cardíaco pré-carga
PSVE	- pressão sistólica do ventrículo esquerdo
RLC	- cadeia leve reguladora da miosina (Regulatory Light Chain)
RLC2v(P-)	- animais transgênicos com a cadeia leve reguladora da miosina não-fosforilável
rpm	- rotações por minuto
RS	- retículo sarcoplasmático
RyR	- canais rionidínicos
S-1	- subfragmento - 1 da miosina
S-2	- subfragmento-2 da miosina
SDS-PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
SERCA	- bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático
SIV	- septo interventricular
SOD	- superóxido desmutase
ssTnI	- troponina I músculo-esquelética
TGF- β	- fator de crescimento tumoral- β
TM	- tropomiosina
TnC	- troponina C
TNF- α	- fator de necrose tumoral- α
TnI	- troponina I
TP	- tempo de ativação até o pico de contração
Vcf	- velocidade média de encurtamento circunferencial
VE	- ventrículo esquerdo
WT	- animais-controle (wild-type)

RESUMO

PAPEL DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL NO DESENVOLVIMENTO DA HIPERTROFIA E DISFUNÇÃO CARDÍACA.

O óxido nítrico (NO) é um composto envolvido em diversas funções fisiológicas como, por exemplo, o vasodilatação e a transmissão nervosa. Nos tecidos biológicos, esta molécula é sintetizada pela família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS). A expressão da isoforma induzível desta enzima (iNOS), capaz de produzir alta concentração de NO, tem correlação com a disfunção cardíaca. Neste trabalho, hipotetizou-se que a ablação do gene responsável pela expressão de iNOS preveniria ou atenuaria desenvolvimento da disfunção cardíaca. Para avaliar esta hipótese, foi utilizado o modelo animal de camundongo nocaute para o gene da iNOS (iNOSKO). Estes animais e animais-controle, sem manipulação genética (WT), foram submetidos à cirurgia para a geração de sobrecarga de pressão imposta ao coração (AoB). A função cardíaca foi avaliada após 2,5 e 6,0 meses, através de ecocardiografia e mensurações de volume e pressão cardíaca *in situ*. Os resultados demonstraram que tanto animais-controle quanto animais iNOSKO, desenvolveram o mesmo grau de hipertrofia cardíaca após AoB, no entanto, animais iNOSKO AoB apresentaram melhores índices de contratilidade cardíaca, comparados a animais WT AoB, representado por maiores valores de pressão desenvolvida pelo VE, dP/dt, e trabalho cardíaco pré-carga. Foi comprovado, através de experimentos de imunofluorescência e immunoblotting, que iNOS é expressa no miocárdio durante o desenvolvimento de hipertrofia e disfunção cardíaca em animais WT AoB. Além disso, os cortes histológicos provenientes de animais WT AoB demonstraram presença de tecido cicatricial no miocárdio. A contratilidade e a sensibilidade β -adrenérgica do miocárdio foram avaliadas em músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo (VE). Nestes experimentos, a ablação de iNOS estava associada com o aumento da resposta ao agonista β -adrenérgico isoproterenol (ISO), sendo a força máxima desenvolvida (% da força basal) em resposta ao ISO (1 μ M) de 343,9% \pm 45,7 (n=6) no grupo iNOSKO AoB e 216,8% \pm 26,5 (n=6) no grupo WT AoB. Músculos que foram pré-incubados com o bloqueador de iNOS, 1400W, apresentaram valores similares de força desenvolvida, reforçando a teoria de que iNOS é responsável pela diminuição na β -adrenérgica. A ablação de iNOS, também preveniu o aumento na expressão de genes relacionados à insuficiência cardíaca, como o do fator natriurético atrial e o da cadeia pesada da miosina- β . A expressão protéica da isoforma da NOS endotelial (eNOS) não diferiu entre os grupos. Concluiu-se que a expressão de iNOS ocorreu durante o desenvolvimento de hipertrofia e disfunção e que a ablação do gene determinante de iNOS, embora não alterasse o grau de hipertrofia, retardou a disfunção cardíaca e potencializou a resposta β -adrenérgica do miocárdio. As evidências sugerem que a prevenção da expressão ou atividade de iNOS poderiam servir como ferramenta terapêutica no tratamento da insuficiência cardíaca. **Palavras-chave:** óxido nítrico, óxido nítrico sintase induzível, hipertrofia, insuficiência cardíaca

ABSTRACT

THE ROLE OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE ON THE DEVELOPMENT OF CARDIAC HYPERTROPHY AND DYSFUNCTION

The nitric oxide (NO) participates in several physiologic reactions as during the vasorelaxation and synaptic transmission. In biologic tissues, NO is produced by the nitric oxide synthase (NOS) family. Expression of the inducible isoform (iNOS) that produces high concentration of NO is correlated with cardiac dysfunction. Here, it is hypothesized that the ablation of iNOS gene could prevent or attenuate the development of cardiac dysfunction. To test this hypothesis, the knockout mice for iNOS were used (iNOSKO). These animals and also control animals, without genetic manipulation

(WT), were subjected to aortic banding (AoB) to generate pressure-overload against the heart. The cardiac function was assessed after 2.5 and 6.0 months using echocardiography and in situ measurements of pressure-volume loops. Both iNOSKO and WT groups developed the same level of hypertrophy after AoB, however, iNOSKO animals had better contractility compared to WT AoB, represented by higher left ventricular developed pressure, dP/dt and pre-recruitable stroke work. Using immunoblotting and immunofluorescence techniques, the expression of iNOS was confirmed in the myocardium of WT AoB mice during the development of hypertrophy and cardiac dysfunction. Furthermore, histological sections of WT AoB animals presented scar tissue in the myocardium. The contractility and β -adrenergic sensitivity were assessed in papillary muscle isolated from the left ventricle (LV). In this experiments, the ablation of iNOS was associated with increased β -adrenergic response to isoproterenol (ISO). The maximal response to ISO (1 μ M) normalized to baseline was $343.9\% \pm 45.7$ (n=6) in iNOSKO AoB compared to $216.8\% \pm 26.5$ (n=6) in WT AoB. Muscles pre-incubated with the iNOS blocker 1400W showed the same response to ISO, supporting the idea that iNOS is responsible for the decreased response to ISO in WT AoB. The iNOS ablation also prevented the expression of genes related to heart failure as the atrial natriuretic factor and β -myosin heavy chain. The eNOS protein expression was unaltered among groups. It is possible to conclude that the expression of iNOS occurs during the cardiac hypertrophy due to AoB and the ablation of iNOS delayed the cardiac dysfunction and improved the myocardium β -adrenergic response, even though it did not change the degree of hypertrophy. The data suggests that the prevention of iNOS expression or activity may be a valuable tool to treat the heart failure.

Keywords: nitric oxide, inducible nitric oxide synthase, hypertrophy, heart failure.

1 INTRODUÇÃO

Apesar de avanços na pesquisa e no tratamento das doenças cardiovasculares, estas ainda permanecem sendo uma das principais causas de mortes em muitos países como os Estados Unidos da América e o Brasil (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Além disso, as doenças cardiovasculares causam alta morbidade e são onerosas para os sistemas públicos de saúde.

A busca de explicações sobre os processos envolvidos na patofisiologia das doenças cardiovasculares tem revelado fatores surpreendentes que participam na prevenção e desenvolvimento destas doenças. Um grande exemplo é o óxido nítrico.

O óxido nítrico (NO) é um gás, que apresenta um elétron desemparelhado na sua estrutura, portanto, é um radical livre. O NO foi inicialmente identificado como um dos poluentes atmosféricos antes de ser implicado em funções biológicas nos mamíferos. Isto levou inclusive ao desenvolvimento dos catalisadores nos escapamentos dos carros, para prevenir a liberação do gás para a atmosfera (BUTLER e NICHOLSON, 2003). Posteriormente, o NO foi identificado como sendo a molécula sinalizadora, proveniente do endotélio vascular, responsável pela dilatação dos vasos sanguíneos (PALMER et al., 1987; IGNARRO et al., 1987a); desvendando a dúvida que existia sobre o composto que era anteriormente denominado de fator de relaxamento derivado do endotélio (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980). Há mais de um século, a nitroglicerina vinha sendo utilizada como droga no tratamento da *angina pectoris*, mas o mecanismo de ação da droga era desconhecido. Hoje, sabe-se que a ação dessa droga deve-se à formação do óxido nítrico, que conseqüentemente ativa a guanilato ciclase solúvel na célula muscular lisa, induzindo a produção de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc).

Os experimentos que levaram à descoberta do NO como sinalizador no

relaxamento vascular renderam aos pesquisadores Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro e Ferid Murad o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 1998. Ao longo dos anos, outros pesquisadores trouxeram importantes contribuições para o conhecimento do papel do NO no sistema cardiovascular, dentre eles, deve-se destacar Salvador Moncada.

Desde a comprovação de que o NO exerce o papel de molécula sinalizadora no relaxamento vascular, iniciou-se uma grande onda de publicações investigando o papel deste gás nos diversos sistemas biológicos humanos. Várias informações foram obtidas sobre sua biosíntese e degradação. Foram também identificadas as enzimas responsáveis pela síntese de NO e a localização preferencial destas enzimas nos tecidos.

A identificação das enzimas produtoras de NO foi um passo importante para a comprovação dos efeitos biológicos deste composto. Confirmou-se assim, que não apenas o uso de fármacos doadores de NO causavam os efeitos biológicos mas, que os tecidos biológicos são também capazes de sintetizar o óxido nítrico que, portanto, estava envolvido na fisiologia animal. As enzimas sintetizadoras de óxido nítrico (nitric oxide synthases – NOS) convertem o aminoácido L-arginina em L-citrulina com conseqüente produção de óxido nítrico. Existem três isoformas da NOS: a neuronal (nNOS ou NOS1), a endotelial (eNOS ou NOS3) e a induzível (iNOS ou NOS2); sendo a função das duas primeiras dependentes da concentração de cálcio. Devido ao fato de iNOS ser independente das concentrações de cálcio, a produção de NO derivado desta isoforma é determinada, principalmente, pela expressão da enzima. Alguns autores sugerem a existência de uma quarta isoforma de NOS, exclusivamente presente nas mitocôndrias, denominada de isoforma mitocondrial (mtNOS) (GHAFOURIFAR e RICHTER, 1997; LACZA et al., 2003), no entanto, a sua existência como uma isoforma diferente de eNOS ou iNOS ainda é controversa (ZANELLA et al., 2004; LOPEZ et al., 2006).

Ao longo dos anos, demonstrou-se que além da função do óxido nítrico no sistema cardiovascular como sinalizador na vasodilatação, este composto influencia: a agregação plaquetária (LOSCALZO, 2001); a incidência de apoptose (NISHIO et al., 1996; SAM et al., 2001; WOLLERT e DREXLER, 2002; PATTEN et al., 2005; RAZAVI et al., 2005; DAS et al., 2005), a proliferação celular (WOLLERT e DREXLER, 2002); a sensibilidade β -adrenérgica do coração (HARE et al., 1998; ADAM et al., 1999; STOJANOVIC et al., 2001; ZIOLO et al., 2001b; FUNAKOSHI et al., 2002; GEALEKMAN et al., 2002; ASHLEY et al., 2002; ZIOLO et al., 2004; MASSION et al., 2004; BENDALL et al., 2004; DANSON et al., 2005), o controle das concentrações de cálcio transiente nos cardiomiócitos (STOJANOVIC et al., 2001; ZIOLO et al., 2001c; ZIOLO et al., 2004), dentre outras funções.

Em outros sistemas biológicos, os efeitos fisiológicos e patológicos do NO também têm sido identificados. Não cabe aqui neste trabalho, uma revisão abrangente dos efeitos biológicos do NO nos seres vivos, o que pode ser encontrado em outras fontes (IGNARRO, 2000; MAYER, 2007). Nas secções subsequentes, será dado enfoque ao papel do NO e derivados na fisiologia e patofisiologia das doenças cardiovasculares. Contudo, é preciso citar que o NO tem papel importante em funções biológicas como: no sistema imunológico, onde a alta produção de NO e derivados tem papel fundamental na destruição de agentes patológicos (MACMICKING et al., 1995; WEI et al., 1995; HUANG et al., 1999); no sistema nervoso, onde o NO serve como neurotransmissor participando, por exemplo, na plasticidade sináptica, no entanto, também estando aparentemente envolvido no estresse oxidativo durante condições patológicas, como a isquemia e a doença de Parkinson (GUIX et al., 2005); no músculo estriado esquelético, estando envolvido no acoplamento excitação-contracção, metabolismo energético e controle local do fluxo sanguíneo (STAMLER e MEISSNER, 2001) e no sistema respiratório, participando do controle da perfusão pulmonar e da broncodilatação (RICCIARDOLO et al., 2004).

Embora a participação do óxido nítrico nas funções fisiológicas dos mamíferos seja reconhecida, a produção de alta concentração de NO, como a que se segue após a expressão da iNOS, pode influenciar negativamente na função cardíaca (BALLIGAND et al., 1994; JOE et al., 1998; FENG et al., 2001; SAM et al., 2001; GEALEKMAN et al., 2002; MUNGRUE et al., 2002a; BARTH et al., 2006).

A ambiguidade na função do NO no sistema cardiovascular está relacionada com o tipo de isoforma expressa, com a quantidade de expressão das enzimas produtoras de NO, com a compartimentalização destas enzimas, com a disponibilidade de substrato e co-fatores para a produção de NO e ultimamente, relacionada com a concentração de NO produzido. Além disso, compostos químicos gerados em decorrência da reatividade química do NO com outras moléculas, por exemplo as espécies reativas de oxigênio, podem gerar efeitos biológicos indiretos.

Tem sido demonstrado que altas concentrações de NO determinam efeito inotrópico negativo em músculo cardíaco isolado e em cardiomiócitos isolados (ADAM et al., 1999; STOJANOVIC et al., 2001; ZIOLO et al., 2001b; GEALEKMAN et al., 2002; ZIOLO et al., 2004). No tecido cardíaco humano, existe correlação entre o aumento na expressão de iNOS e a insuficiência cardíaca (HAYWOOD et al., 1996; VEJLSTRUP et al., 1998; HARE et al., 1998; FUKUCHI et al., 1998). Demonstrou-se também, que a expressão de mRNA para iNOS estava inversamente relacionada com a performance ventricular em corações transplantados (LEWIS et al., 1996). A expressão desta enzima em cardiomiócitos, também foi encontrada em corações de ratos transplantados que apresentaram rejeição (ZIOLO et al., 2001a).

Baseado na associação entre a expressão de iNOS e a disfunção cardíaca, hipotetizou-se neste trabalho, que a prevenção da expressão de iNOS poderia alterar o processo de desenvolvimento da doença. Embora esta associação tenha sido demonstrada em amostras de tecido cardíaco humano e de modelos animais sujeitos a

procedimentos para a indução de insuficiência cardíaca, nenhum outro trabalho havia dado ênfase à inibição da função de iNOS durante o desenvolvimento da hipertrofia e disfunção cardíaca consequentes à sobrecarga por aumento de pressão. Para avaliar esta hipótese, utilizou-se como modelo animal, camundongos com ablação do gene que determina a expressão de iNOS. Estes animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico para criação de sobrecarga cardíaca por aumento de pressão (coarctação da artéria aorta). Foram então, realizadas análises da função cardíaca *in vivo* e *in situ*, análise da contratilidade de músculo isolado do ventrículo esquerdo, análises histológicas, além da análise da expressão gênica e protéica nos grupos experimentais.

Os resultados deste trabalho, produziram dados importantes para o esclarecimento do papel da enzima óxido nítrico sintase induzível no desenvolvimento de hipertrofia e disfunção cardíaca, no controle da resposta β -adrenérgica do músculo estriado cardíaco, além de gerar a perspectiva de uma possível intervenção terapêutica para o tratamento da insuficiência cardíaca.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROPRIEDADES QUÍMICA DO ÓXIDO NÍTRICO E DERIVADOS

O óxido nítrico é um gás inorgânico que apresenta um elétron desemparelhado, portanto, é um radical livre. Na temperatura e pressão ambiente é um gás incolor, com solubilidade máxima em água de aproximadamente 2mM e apresentando solubilidade de 6 a 8 vezes maior em solventes apolares (FUKUTO et al., 2000). Por essa razão, o NO tende a se concentrar em membranas lipídicas e domínios hidrofóbicos de proteínas em sistemas biológicos.

O papel biológico do NO foi demonstrado, inicialmente, no mecanismo de relaxamento vascular. Neste processo, este gás atua como molécula sinalizadora ativando a guanilato ciclase sensível ao óxido nítrico, induzindo assim a produção de GMPc e ativação da proteína quinase G (PKG). A ativação da PKG determina alterações na concentração de cálcio intracelular e também na sensibilidade dos filamentos contráteis da célula muscular lisa (como será detalhado no item 2.3.2) o que provoca o relaxamento da musculatura vascular.

Desde então, o NO ou os produtos da reação do NO com outros radicais foram implicados em diversos outros processos biológicos.

Os efeitos do NO podem ser categorizados como efeitos diretos e indiretos (WINK e MITCHELL, 1998). Os efeitos diretos do NO envolvem a interação direta deste radical livre com outros ligantes, como complexos metálicos, sendo o maior exemplo o grupamento heme. Esta reação geralmente requer baixas concentrações de NO e sugere-se que seja responsável pelos efeitos fisiológicos deste composto. Efeitos indiretos, decorrem da produção de compostos intermediários, geralmente derivados da interação de altas concentrações de NO com oxigênio (O_2) e superóxido (O_2^-). Os

efeitos indiretos são consequência do estresse nitrosativo e estresse oxidativo causados por estes compostos intermediários, sendo considerados como sendo os responsáveis pelos efeitos patológicos do NO (MIRANDA et al., 2000; WINK et al., 2000).

Dessa forma, dependendo da concentração e do local de produção do NO, efeitos ambíguos podem ocorrer. Por exemplo, o NO liga-se diretamente ao grupo heme da guanilato ciclase ativando esta enzima. Através de um processo similar o NO pode se ligar ao citocromo P450 e quando em alta concentração, como ocorre na septicemia, inibe a enzima (WINK et al., 1993). O NO pode também competir de maneira reversível com o oxigênio pelo sítio de ligação da citocromo c oxidase durante a respiração celular possivelmente controlando a enzima, no entanto, altas concentrações de NO combinadas com alta concentração de superóxido podem gerar espécies reativas do oxigênio que estão implicadas na toxicidade mitocondrial e na morte celular (CLEETER et al., 1994; MONCADA e ERUSALIMSKY, 2002).

2.1.1 Efeitos diretos do óxido nítrico

a) Reação do NO com complexos metálicos:

A reação mais importante que representa o efeito direto do NO é a ligação com grupamentos heme, formando um complexo nitrosil-metálico (nitrosilação). Como citado anteriormente, este é o processo pelo qual a guanilato ciclase é ativada.

Como será descrito adiante, as enzimas sintetizadoras de NO possuem na sua estrutura um grupamento heme ligante de O₂. Existe um mecanismo de feedback negativo pelo qual o NO pode competir com este sítio de ligação, controlando a atividade da enzima, sendo que eNOS e nNOS são mais susceptíveis a esta inibição do que iNOS (GRISCAVAGE et al., 1995). Nos pulmões, a competição por este sítio de ligação entre o O₂ e o NO é importante para o controle da perfusão do tecido pulmonar em função da tensão de O₂ (WINK et al., 2000).

b) Interação de NO com complexos metal-oxigênio

O NO pode interagir com complexos metal-oxigênio como a oxihemoglobina dando origem à metoxihemoglobina com consequente formação de nitrato (NO_3^-). Este é considerado um dos mecanismos de controle das concentrações de NO (LANCASTER, JR., 1994). A oximioglobina pode interagir com o NO de maneira similar à oxihemoglobina. Publicações recentes tem sugerido que este é um dos principais mecanismos de neutralização do NO no músculo cardíaco, podendo servir como um mecanismo protetor contra os efeitos deletérios consequentes da alta produção de NO (WUNDERLICH et al., 2003; GODECKE et al., 2003).

O óxido nítrico também pode servir como antioxidante quando interage com complexos metálicos de valência alta, consequentes de oxidação ou peroxidação, por exemplo, causada pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A interação do NO com estes complexos causa a redução da valência dos metais (WINK et al., 2000).

c) Interação de NO com outros radicais

O óxido nítrico pode interagir com radicais lipídicos consequentes do estresse oxidativo, podendo prevenir a peroxidação de lipídios de duas formas: através da interação com oxiradicais que determinam a oxidação de lipídios; causando a terminação da reação em cadeia de peroxidação de lipídios, por ligar-se a um radical lipídico previamente oxidado (MIRANDA et al., 2000).

2.1.2 Efeitos indiretos do óxido nítrico

Embora efeitos diretos do NO não possam ser ignorados como causadores de situações patológicas, o mecanismo de ação mais aceito é a ação indireta do NO, através da interação deste com espécies reativas de oxigênio, causando a formação de compostos intermediários que possuem atividade patológica.

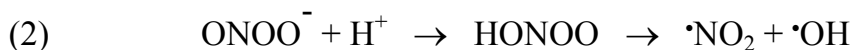
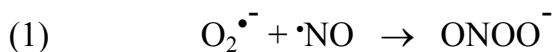
As reações mais comuns que ocorrem *in vivo*, parecem ser entre o NO e O_2

ou entre o NO e o superóxido, causando os seguintes efeitos:

a) Estresse oxidativo

Reações de oxidação ocorrem normalmente nos tecidos biológicos, no entanto, são diferentes das que ocorrem durante o estresse oxidativo, onde espécies altamente reativas são formadas em abundância, causando lesão tecidual como, por exemplo: a oxidação de ácidos nucleicos, determinando a quebra da fita de DNA; a peroxidação de lipídeos; a oxidação de proteínas, impedindo processos enzimáticos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984).

O óxido nítrico interage com o superóxido formando o peroxinitrito (ONOO^-) que é altamente reativo (Equação 1). Além disso, o peroxinitrito dá origem ao ácido peroxinitroso (HONOO) quando protonado. O HONOO decompõe-se facilmente em hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e dióxido de nitrogênio ($\cdot\text{NO}_2$), espécies que também são altamente reativas (Equação 2). Outra via de decomposição do ácido peroxinitroso é através da formação de nitrato (Equação 3)

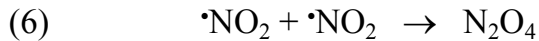
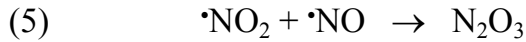


O superóxido pode ser neutralizado pela superóxido desmutase (SOD) dando origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta reação evita a formação de peroxinitrito, devido ao fato da SOD e do NO competirem pelo O_2^- (MIRANDA et al., 2000).

b) Estresse nitrosativo

O óxido nítrico reage com o O_2 formando o dióxido de nitrogênio (NO_2) (Equação 4).

Uma vez formado, o NO₂ pode reagir com o NO formando o trióxido de dinitrogênio (N₂O₃) ou então sofrer dimerização formando o tetróxido de dinitrogênio (N₂O₄) (Equações 5 e 6).



O trióxido de dinitrogênio sofre hidrólise e gera nitrito, enquanto a hidrólise do tetróxido de dinitrogênio gera nitrato.

No entanto, estas moléculas e em especial o N₂O₃, são doadoras de nitrosônio (NO⁺), que pode ser transferido para outras moléculas (como hidroxilas, aminas e tióis) levando a formação de nitrito, N-nitrosaminas e S-nitrosotióis, mediando dessa forma os efeitos indiretos do NO (WINK et al., 2000). Por exemplo, doadores de NO ativam os canais de cálcio rionidínicos do retículo sarcoplasmático de músculo estriado cardíaco através da S-nitrosilação destes canais (XU et al., 1998).

Existe evidência recente da ocorrência de nitrosilação de proteínas *in situ* em situações fisiológicas e patológicas, em experimentos onde diversos tecido e células isoladas foram estudados por técnicas de imunohistoquímica (GOW et al., 2002).

Existe ainda a possibilidade de que os efeitos do NO possam ser mediados pela nitroxila (HNO, NO⁻). No entanto, a produção deste radical e as vias bioquímicas pela qual ele pode agir ainda não estão esclarecidas. Reconhece-se no entanto, o potencial citotóxico da nitroxila devido à ação do doador desta molécula, o Sal de Angeli (Na₂N₂O₃) (MIRANDA et al., 2000).

2.2 ENZIMAS SINTETIZADORAS DE ÓXIDO NÍTRICO

Um passo importante para o estudo dos efeitos do NO nos sistemas biológicos foi a identificação de enzimas, presentes nos seres vivos, capazes de

sintetizá-lo.

Sabia-se dos efeitos do NO exógeno mas, a afirmação deste como sendo um mensageiro químico nos sistemas biológicos, ficou clara após a identificação das enzimas sintetizadoras de óxido nítrico (NOS, nitric oxide synthase).

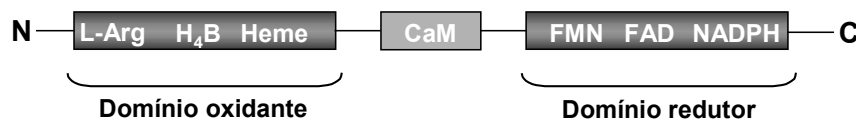
As enzimas sintetizadoras de NO receberam originalmente nomes derivados do local onde foram identificadas. Existem três isoformas conhecidas: a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (FORSTERMANN et al., 1994). Existe ainda a sugestão da existência de uma quarta isoforma de NOS exclusivamente presente nas mitocôndrias denominada de mitocondrial (mtNOS) (GHAFOURIFAR e RICHTER, 1997; LACZA et al., 2003), no entanto, a sua existência como uma isoforma diferente de eNOS, iNOS (ZANELLA et al., 2004; LOPEZ et al., 2006) ou nNOS (GUIX et al., 2005) ainda é controversa

As isoformas endotelial e neuronal são consideradas constitutivas, por serem expressas em condições basais nos tecidos. A atividade enzimática destas duas isoformas é dependente de cálcio/calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$), portanto controlada pelas variações da concentração de cálcio intracelular. A isoforma induzível de NOS é assim chamada por ser expressa quando as células são estimuladas por fatores específicos, como certas citocinas. No entanto, no tecido pulmonar, iNOS foi descrita como uma proteína constitutiva (DWEIK et al., 1998). Diferente de eNOS e nNOS, iNOS é independente, ou ao menos, pouco dependente (GELLER et al., 1993) das concentrações de cálcio intracelular, sendo a sua atividade enzimática controlada principalmente pela expressão da enzima.

Outras nomenclaturas para as enzimas sintetizadoras de NO são: NOS1, NOSI, ncNOS e bNOS para a isoforma neuronal; NOS2, NOSII e macNOS para a isoforma induzível e; NOS3, NOSIII e ecNOS para a isoforma endotelial (FÖRSTERMANN, 2000).

Em sua estrutura, as enzimas NOS apresentam um domínio C-terminal transportador de elétrons denominado domínio redutor, um domínio ligante da calmodulina e um domínio oxidante que forma o sítio catalítico da molécula (FÖRSTERMANN, 2000). No domínio redutor, encontram-se os sítios de ligação para o co-substrato fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADPH) e para os cofatores flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN). No domínio oxidante, encontram-se os sítios de ligação para os cofatores ferroprotoporfirina IV (Heme), tetraidrobiopterina (H₄B), para o co-substrato O₂ e para o substrato L-arginina (STUEHR e GHOSH, 2000) (Figura 01).

FIGURA 01 - REPRESENTAÇÃO ILUSTRATIVA DA ENZIMA NOS

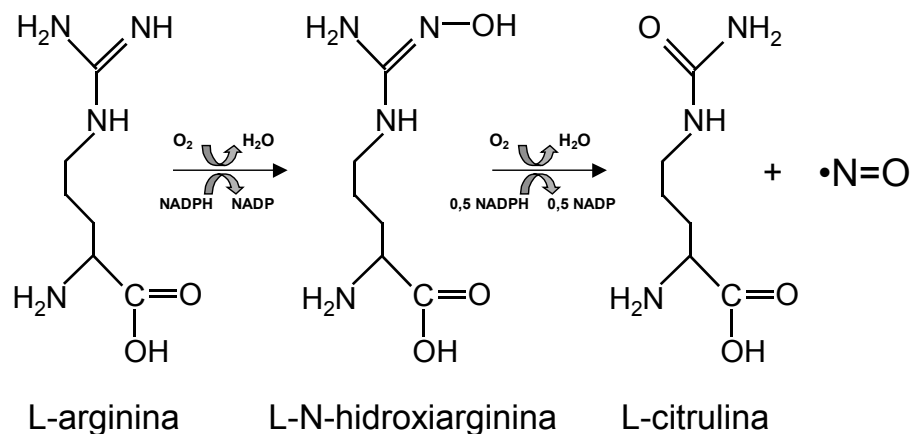


Entre os domínios redutor e oxidante, encontra-se o domínio de ligação da calmodulina. Próximo à porção de ligação da FMN, existe uma sequência (alça) de auto-inibição que controla a ligação da calmodulina. Durante a síntese de NO as flavinas adquirem elétrons do NADPH e transferem estes para o ferro do grupamento heme, permitindo a ligação do oxigênio e catalisando a produção do NO a parti da L-arginina (STUEHR, 1997). Em nNOs e eNOS, esta transferência de elétrons é induzida pela ligação da CaM, diferente de iNOS, onde a ligação da calmodulina se dá de maneira quase que irreversível (CHO et al., 1992). Além disso, iNOS não apresenta o segmento de auto-inibição do sítio de ligação da calmodulina (SALERNO et al., 1997). Estas observações são consistentes com o fato de que iNOS produz altas

doses de NO uma vez que seja expressa.

A síntese de NO pela família da NOS, dá-se através da oxidação da L-arginina formando L-citrulina. O processo pode ser descrito da seguinte forma: A L-arginina é inicialmente hidroxilada ao intermediário L-N-hidroxiarginina, em seguida ocorre a oxidação da L-N-hidroxiarginina formando L-citrulina com geração concomitante de óxido nítrico, como demonstrado na figura 02.

FIGURA 02 - SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO À PARTIR DA L-ARGININA CATALISADA PELA NOS



Nota: Representação da reação de síntese de NO à partir da L-arginina. Inicialmente, ocorre a hidroxilação da L-arginina a L-hidroxiarginina, seguida de oxidação da L-hidroxiarginina formando L-citrulina e NO. Os co-substratos NADPH e O₂ também estão representados na figura.

Todas as isoformas da NOS só são ativas quando formam homodímeros, sendo que, a interação entre duas moléculas de NOS ocorre primariamente entre os domínios oxidantes (STUEHR, 1997). Em um modelo proposto por Siddhanta e colaboradores (SIDDHANTA et al., 1998) a transferência de elétrons ocorreu entre o domínio redutor de uma molécula de NOS para o domínio oxidante da molécula da NOS associada ao homodímero.

A função da tetraidrobiopterina está envolvida na manutenção e em parte, na dimerização dos homodímeros de NOS (KLATT et al., 1995; STUEHR, 1997). Além

disso, sugere-se que a tetraidrobiopterina module a atividade do complexo Ferro(I)-O₂ (presente no grupamento heme). Acredita-se que o Ferro(I)-O₂ reage com a L-N-hidroxiarginina, permitindo o correto posicionamento para a oxidação deste composto durante a síntese de NO (BU-SOUD et al., 1997a; BU-SOUD et al., 1997b).

Quanto ao controle da atividade enzimática de NOS, além da dependência das concentrações de cálcio anteriormente citada, a interação do NO com o grupamento heme da própria NOS também é um mecanismo de controle da atividade da enzima. Essa interação, determina que a produção de NO ocorra inicialmente de maneira rápida, seguida de um platô de produção, devido à ligação do NO com a NOS, causando ciclos entre os estados ativo e inativo (ligado ao NO) da enzima (STUEHR e GHOSH, 2000).

Na ausência de substratos para a síntese de NO e aparentemente, na ausência de H₄B, ocorre o desacoplamento entre o consumo de NADPH e a oxidação de arginina, causando a geração de superóxido (STUEHR e GHOSH, 2000). Assim, ao invés da produção de NO pelo homodímero de NOS, os monômeros de NOS passam a produzir superóxido. Esta observação é importante porque estudos recentes têm demonstrado a associação entre o desacoplamento de NOS e o aumento do estresse oxidativo que ocorre durante a insuficiência cardíaca (TAKIMOTO et al., 2005; ZHANG et al., 2007).

2.2.1 Óxido nítrico sintase neuronal

Especificamente quanto às isoformas de NOS, a isoforma neuronal foi a primeira isoforma identificada (BREDT et al., 1990; BREDT e SNYDER, 1990). A NOS neuronal apresenta massa molecular de aproximadamente 160 kDa e apesar de ter sido descrita no tecido nervoso, esta isoforma também pode ser encontrada em diversos outros tecidos, inclusive na célula muscular cardíaca (XU et al., 1999; BURKARD et al., 2007). O gene determinante de nNOS está localizado no

cromossomo 12, incluindo 29 éxons em uma região de 200 kb (FERON e MICHEL, 2002). A regulação da expressão de nNOS parece ser induzida por respostas neuronais à agentes físicos, químicos e biológicos, como o estresse térmico e a transecção axonal (FÖRSTERMANN, 2000).

Sendo esta uma enzima sensível às variações de Ca^{2+} , neurotransmissores ou sinalizadores celulares que determinem alterações na concentração intracelular de cálcio irão regular a atividade de nNOS. A liberação de NO, derivado desta isoforma, parece ocorrer por curto período de tempo e não de forma contínua e prolongada.

A nNOS apresenta uma sequência única de 220 aminoácidos na extremidade N-terminal que contém motivos de ligação PDZ. Isto determina a interação da enzima com ligantes como, por exemplo, as proteínas de densidade pós-sinápticas (PSD, postsynaptic density proteins) PSD-95 e PSD-93 (BRENMAN et al., 1996a; BRENMAN et al., 1996b). Como os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) também se associam à PSD-95, nNOS é provavelmente a enzima ativada primariamente durante o influxo de cálcio mediado pelos receptores NMDA, durante a transmissão sináptica (FÖRSTERMANN, 2000). Outro ligante da porção PDZ da molécula é a sintrofina, um dos componentes do complexo protéico associado à distrofina no músculo esquelético (BRENMAN et al., 1996a). A associação com o complexo distrofina, sugere que a nNOS participa da ativação muscular e que pode ser um dos alvos terapêuticos nas miopatias, como a miopatia degenerativa de Duchenne, no entanto, o seu papel específico e a quantidade de expressão da enzima durante as fases de desenvolvimento da doença ainda necessitam de maiores esclarecimentos (GROZDANOVIC et al., 1996; GUO et al., 2001; PUNKT et al., 2007).

2.2.2 Óxido nítrico sintase induzível

A isoforma induzível da óxido nítrico sintase apresenta massa molecular de aproximadamente 130 a 131 kDa. A enzima leva este nome pelo fato de não ser

constitutiva, tendo sua expressão induzida por certos fatores como, por exemplo, o LPS (lipopolissacarídeo) e certas citocinas, dentre elas: a interleucina 1 (IL-1), o interferon- γ (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α). O fator nuclear- κ B (NF- κ B) está envolvido na indução da expressão de iNOS. Contudo, certas citocinas (IL-4, IL-8 e IL-10) e fatores de crescimento tumoral (TGF- β 1, 2 e 3) inibem a expressão de iNOS em macrófagos (referências contidas em (FÖRSTERMANN, 2000)). O gene determinante de iNOS está localizado em uma região de 37kb no cromossomo 17 e contém 26 éxons (FERON e MICHEL, 2002).

A expressão de iNOS é comum em macrófagos em locais onde haja a presença de inflamação ativa, como nos macrófagos alveolares em regiões inflamadas do pulmão (KOBZIK et al., 1993). A combinação de alta concentração de óxido nítrico, associado à outros radicais de oxigênio, podem mediar diretamente a citotoxicidade celular, sendo assim, o NO, um componente crítico da resposta imune (MOILANEN e VAPAATALO, 1995).

Diferente das duas outras enzimas produtoras de NO, os mecanismos que controlam a expressão da enzima iNOS são, na realidade, os mecanismos reguladores de sua atividade. Não existem muitos detalhes sobre a regulação pós-translacional de iNOS. Pan e colaboradores (PAN et al., 1996), demonstraram que existe fosforilação de iNOS por tirosina quinases, no entanto, a importância fisiológica deste achado ainda necessita esclarecimentos. Apesar de haver um sítio para a ligação de calmodulina, na sequência de aminoácidos da iNOS, como anteriormente descrito, a concentração de cálcio pouco influencia na regulação da atividade de iNOS. No entanto, foi descrito que a enzima iNOS de humanos apresenta uma limitada dependência da concentração intracelular de cálcio (GELLER et al., 1993).

2.2.3 Óxido nítrico sintase endotelial

A enzima óxido nítrico sintase endotelial apresenta massa molecular de

aproximadamente 133 kDa e foi inicialmente identificada em células endoteliais (POLLOCK et al., 1991; FORSTERMANN et al., 1991a; FORSTERMANN et al., 1991b). O gene que codifica eNOS está localizado no cromossomo 7, contendo 26 éxons em uma região de 22kb (FERON e MICHEL, 2002). A eNOS tem papel crucial no mecanismo de relaxamento vascular e conseqüentemente, na regulação da pressão sanguínea. Esta enzima também é expressa em outros tipos celulares, inclusive em células musculares cardíacas (FERON et al., 1996).

Vários mecanismos podem modular a expressão de eNOS, sendo um dos principais fatores o estresse de cisalhamento sobre o endotélio vascular, causado pelo fluxo sanguíneo, que causa o aumento na expressão da enzima, enquanto a hipóxia, está relacionada com a redução da expressão de eNOS em células endoteliais pulmonares (FÖRSTERMANN, 2000).

Assim como para a enzima nNOS, o principal mecanismo ativador da eNOS é a variação intracelular da concentração de cálcio. A fosforilação de eNOS tem sido relatada, no entanto, a relevância fisiológica deste evento necessita ser determinada (GARCIA-CARDENA et al., 1996). Dois sítios de fosforilação da eNOS foram identificados, sendo eles a serina de posição 1177 e a treonina de posição 495. Segundo Fleming e colaboradores (FLEMING et al., 2001), a fosforilação de eNOS na serina 1177, no endotélio de aorta de porcos, induziu o aumento da atividade de eNOS independente da concentração de cálcio, enquanto a fosforilação da treonina 495 inibiu a atividade de eNOS.

Os domínios oxidantes de NOS possuem regiões de consenso para a ligação de caveolinas, uma família de proteínas de ligação presente nas cavéolas, que são invaginações da membrana plasmática. A enzima eNOS encontra-se associada à caveolina-1 na célula endotelial (GARCIA-CARDENA et al., 1996; FERON et al., 1996) e caveolina-3 na membrana da célula muscular cardíaca (FERON et al., 1996; BAROUCH et al., 2002). Esta associação posiciona a enzima próxima a complexos

sinalizadores como, por exemplo, o receptor adrenérgico- β_3 . Sugere-se que a estimulação dos receptores adrenérgico- β_3 induza a produção local de NO pela eNOS, o que determina efeitos inotrópicos negativos no coração (GAUTHIER et al., 1998). A associação de eNOS com as caveolinas contribui para a diminuição da sua atividade enzimática. Uma vez que a concentração de cálcio aumente, acarretando na ativação da calmodulina e interação desta com a eNOS, a inibição mediada pela caveolina é revertida (MICHEL et al., 1997).

Outras formas de controle pós-translacional de eNOS descritas são a palmitolação e depalmitolação. A palmitolação parece ser obrigatória para a ligação de eNOS com a caveolina (FERON et al., 1998).

2.3 EFEITOS BIOLÓGICOS DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

2.3.1 Processos envolvidos na regulação da contração do músculo liso vascular

A camada muscular dos vasos sanguíneos é composta por células musculares lisas, de formato fusiforme, que regulam através da sua contração o diâmetro interno e a pressão luminal dos vasos sanguíneos.

A célula muscular lisa é assim chamada por não apresentar padrões repetitivos de organização dos miofilamentos, como ocorre no músculo estriado esquelético e cardíaco. Embora os miofilamentos finos e grossos sejam compostos principalmente por actina e miosina respectivamente, assim como acontece no músculo estriado cardíaco e esquelético, o filamento fino no músculo liso não apresenta o complexo troponina. A troponina C presente no músculo estriado, como será descrito adiante, é uma proteína ligante de cálcio que regula a contração muscular (MURPHY, 2000).

Apesar do músculo liso não expressar troponina, outras proteínas associadas aos filamentos finos como a calponina e caldesmona, parecem estar envolvidas na regulação da contração muscular. Estas proteínas, ligam-se ao filamento fino em baixas concentrações de cálcio impedindo a interação dos miofilamentos. Em altas concentrações de cálcio, calponina e caldesmona, ligam-se preferencialmente à calmodulina, deixando assim de inibir a interação dos miofilamentos (SZYMANSKI, 2004). A fosforilação da caldesmona também parece regular a contração do músculo liso e o remodelamento do citoesqueleto em células não-musculares (KORDOWSKA et al., 2006).

O principal mecanismo de regulação da contração do músculo liso ocorre no filamento grosso. A miosina apresenta uma região terminal em formato globular denominada de cabeça da miosina, que é a região de alta afinidade para a ligação da actina, e uma porção em formato de bastão, que associada a porções semelhantes de outras moléculas de miosina dá formato a longa cauda da molécula. Existe uma região de transição, entre a cabeça e a cauda, onde ficam situadas as cadeias leves da miosina. As cadeias leves da miosina são duas, a cadeia leve essencial (ELC) e a cadeia leve reguladora (RLC). A cadeia leve reguladora é ligante de cálcio e pode ser fosforilada, alterando assim a conformação da molécula de miosina (DILLON et al., 1981; AKSOY et al., 1982).

Durante a contração muscular, a concentração de cálcio livre intracelular aumenta devido a estímulos mecânicos e/ou químicos. O cálcio se liga à calmodulina e ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que fosforila a cadeia leve reguladora da miosina. A fosforilação da RLC determina alterações conformacionais na molécula de miosina, fazendo com que os sítios de ligação para actina, presentes na cabeça da miosina, fiquem disponíveis para ligação. As alterações conformacionais da miosina, decorrentes da fosforilação da cadeia leve reguladora, também permitem que a atividade da ATPase da cabeça da miosina ocorra. Uma vez que haja fosforilação da

RLC e exposição dos sítios de ligação, existe interação de alta afinidade entre miosina e actina filamentar (DILLON et al., 1981; AKSOY et al., 1982; PFITZER, 2001).

A hidrólise de ATP gera energia para a contração muscular. A ligação da molécula de ATP na ATPase presente na miosina, determina o desligamento entre a cabeça da miosina e a actina mas, enquanto houver alta concentração de cálcio citoplasmática, a actina e miosina continuam interagindo de forma cíclica.

A diminuição da concentração de cálcio intracelular faz com que ocorra menor fosforilação da RLC, que associada à desfosforilação da RLC determinada pela fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), fazem com que a miosina adquira a conformação inicial, impossibilitando a interação com a actina e determinando o relaxamento muscular. Para manter baixa a concentração de cálcio intracelular a célula muscular estoca a maior parte do cálcio dentro do retículo sarcoplasmático e transporta o restante para o meio extracelular.

O estímulo para contração do músculo liso pode ser gerado através do estiramento da célula muscular, que resulta em despolarização da membrana e consequente ativação de canais de cálcio voltagem-dependentes, ou através da ligação de agonistas em receptores de membrana associados à proteína G ou aos canais de cálcio. A ligação do agonista aos receptores associados à proteína G determina a ativação da fosfolipase C, que gera os mensageiros trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DG). O IP_3 liga-se a receptores no retículo sarcoplasmático determinando a liberação de cálcio, enquanto o DG ativa a proteína quinase C (PKC), que geralmente induz efeitos promotores da contração muscular como, por exemplo, a fosforilação de canais de cálcio do tipo L (WEBB, 2003).

Além disso, sabe-se hoje que a Rho-quinase tem papel na promoção e manutenção da contração do músculo liso por fosforilar a fosfatase da cadeia leve da miosina, inativando-a (SOMLYO e SOMLYO, 1998; WEBB, 2003).

Dos mecanismos responsáveis pelo relaxamento do músculo liso vascular, a

ativação da proteína quinase dependente do GMPc (PKG) é provavelmente o mecanismo mais importante. Como será detalhado abaixo, o NO derivado do endotélio tem ação sobre o músculo liso, ativando a guanilato ciclase solúvel, o que desencadeia a ativação da PKG. No entanto, este não é o único mecanismo responsável pelo relaxamento vascular. Por exemplo, nas artérias coronárias, a estimulação β -adrenérgica ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que fosforila a MLCK, diminuindo a sua atividade e assim, reduzindo a fosforilação da MLC, o que contribui para o relaxamento muscular.

2.3.2 Efeitos do NO sobre o relaxamento vascular

O envolvimento do fator de relaxamento derivado do endotélio, na sinalização do relaxamento vascular, era evidente antes da sugestão de que este fator pudesse ser o NO. Furchgott e Zawadzki (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980), demonstraram que a integridade do endotélio vascular era necessária para que o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina ocorresse.

A identificação da NO como sendo a molécula derivada do endotélio vascular, responsável pela sinalização para o relaxamento do músculo liso vascular, foi descrita pelos pesquisadores Luis Ignarro (IGNARRO et al., 1987a; IGNARRO et al., 1987b) e Salvador Moncada (PALMER et al., 1987), no ano de 1987, em publicações quase que simultâneas. À partir daí, começou-se a investigar a participação do NO como molécula sinalizadora em diversos tecidos.

Após a descoberta de que o NO era o fator de relaxamento derivado do endotélio, o grupo chefiado por Salvador Moncada, demonstrou através do uso de análogos da L-arginina, a importância da síntese basal de NO na manutenção de valores normais de pressão arterial (REES et al., 1989).

O estímulo para o relaxamento vascular proveniente do endotélio, inicia-se depois que agentes vasodilatadores como a badicininina e prostaglandina E₂, ligam-se a

receptores de membrana, na célula endotelial, ou através do estresse de cisalhamento sobre o endotélio vascular. Ainda está pouco esclarecido como a atividade de NOS aumenta após o estímulo proveniente do estresse de cisalhamento, mas sabe-se que este é um mecanismo importante para a regulação do fluxo sanguíneo durante o controle da pressão arterial e durante o exercício físico. Existe evidência de que o estresse de cisalhamento possa ativar os canais de cálcio da membrana da célula endotelial, e dessa maneira ativar a eNOS, no entanto, o relaxamento mediado pelo estresse de cisalhamento, também pode ocorrer independente de alterações na concentração intracelular de cálcio (IGNARRO, 2002).

Uma vez que os receptores de membrana, associados à proteína G, são ativados pela ligação de agonistas, ocorre a ativação da enzima fosfolipase C e consequente produção de IP_3 . O IP_3 age sobre os receptores presentes no retículo citoplasmático, determinando a liberação de cálcio para o citoplasma. O aumento da concentração de cálcio no citoplasma ativa a calmodulina, que por sua vez, ativa a eNOS, que é a isoforma predominante na célula endotelial.

A enzima eNOS localiza-se na membrana celular e pode estar associada à caveolinas, em especial a caveolina-1 na célula endotelial. As caveolinas são proteínas de ligação presentes nas cavéolas, que são invaginações da membrana celular onde se concentram receptores e grupos de enzimas, que por estarem localizados em proximidade uns aos outros, tornam a sinalização celular mais eficiente (FERON et al., 1996; SBAA et al., 2005). Uma vez ativada, a enzima eNOS sintetiza o NO, que se difunde para a célula muscular lisa presente nos vasos sanguíneos.

A eNOS não é a única enzima responsável pela produção de NO durante a sinalização para o relaxamento do músculo liso. Em situações onde ocorre ativação de macrófagos como, por exemplo, durante o choque séptico, existe alta expressão de iNOS em macrófagos e possivelmente na própria célula endotelial, o que acarreta em grande produção de NO. Isto explica a hipotensão arterial em doentes que apresentam

choque séptico (ANNANE et al., 2000; KADOI e GOTO, 2004; BARTH et al., 2006).

A isoforma neuronal da NOS também parece contribuir diretamente para o relaxamento vascular produzindo NO. A ação da nNOS parece estar restrita a vasos inervados pelos nervos nitrérgicos (NANC, nervos não-adrenérgicos não-colinérgicos), que são nervos parassimpáticos estimulantes de vasos sanguíneos presentes no coração, pulmões, sistema gastrointestinal e urogenital (RAND e LI, 1995). Apesar da atividade de NOS existir na terminação destes nervos, ainda existe controvérsia quanto ao papel exclusivo do NO neste tipo de transmissão nervosa (CORREIA et al., 2000).

O mecanismo de ação do NO na célula muscular lisa, deve-se principalmente à ativação da enzima guanilato ciclase. Uma vez produzido pelo endotélio, o NO se difunde até a célula muscular dos vasos sanguíneos e liga-se à guanilato ciclase sensível ao NO. A guanilato ciclase solúvel (GCs) representa o maior alvo para o NO na célula muscular. O termo guanilato ciclase sensível ao óxido nítrico vem sendo usado pois, além de ativar a GCs, o NO é capaz de ativar um dos dímeros da GC ($\alpha_2\beta_1$) que é encontrado na membrana sináptica (FRIEBE e KOESLING, 2003). No entanto, o NO não é capaz de ativar a GC associada aos receptores de membrana (FRIEBE e KOESLING, 2003).

O NO liga-se ao grupamento heme presente na GCs aumentando a atividade da enzima de 100 a até 400 vezes (STONE et al., 1995; STONE e MARLETTA, 1995a; STONE e MARLETTA, 1995b). Antes da ligação do NO, o ferro do grupo heme se liga à histidina de posição 105 presente na subunidade β_1 do dímero da GC (os dímeros descritos são $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$). Uma vez que o NO se liga ao ferro da GC, ocorre a quebra da ligação com a histidina 105. Este é considerado o fator desencadeador que acarreta no aumento da atividade enzimática da GCs (FRIEBE e KOESLING, 2003). A quebra da ligação entre o ferro e a histidina é importante para a ativação da GCs, como foi demonstrado por Koesling e colaboradores (KOESLING e

FRIEBE, 2000). Os autores constataram que outro ligante da GCs, o monóxido de carbono (CO), aumenta a atividade enzimática da GCs em apenas 4 a 6 vezes, pelo fato de não induzir a quebra da ligação do ferro com a histidina 105 (KOESLING e FRIEBE, 2000).

Outros ativadores da GCs, que têm sido estudados como possíveis drogas de valor terapêutico, são: o YC-1, que potencializa a ativação pelo NO e o composto BAY58-2667, que ativa a GCs independente do NO (KOESLING e FRIEBE, 2000).

A ativação da GCs gera a produção de GMPc, que consequentemente ativa a PKG. A PKG pode fosforilar canais de cálcio voltagem-dependentes presentes na membrana celular, o que determina a diminuição da entrada de cálcio para a célula (TAGUCHI et al., 1997; HEYDRICK, 2000). Existe evidência de que o NO bloqueie a ação da fosfolipase C, consequentemente inibindo a liberação de cálcio mediada pelo trifosfato de inositol (IP₃) (HIRATA et al., 1990; CLEMENTI et al., 1995). A PKG também inibe a liberação de cálcio do RS, por fosforilar e inibir os receptores de IP₃ presentes em suas membranas (KOMALAVILAS e LINCOLN, 1996). Somado a isto, o NO induz o aumento do transporte de cálcio pela bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA) de maneira independente da GMPc (BUSSE e FLEMING, 2000) e também, parece aumentar a fosforilação da proteína fosfolambano durante o relaxamento vascular (KARCZEWSKI et al., 1998). Todos estes efeitos determinam a diminuição da concentração de cálcio livre no citoplasma e consequentemente contribuem para o relaxamento muscular.

Outra ação da PKG é a fosforilação de canais de potássio (K⁺) na membrana celular, promovendo o aumento do transporte de K⁺ e consequente repolarização da membrana, contribuindo assim, para o relaxamento muscular (BUSSE e FLEMING, 2000). O NO também pode aumentar o fluxo de K⁺ de maneira direta, por nitrosilar os canais de potássio dependentes de cálcio, presentes na membrana celular do músculo liso (BOLOTINA et al., 1994).

Outra maneira pela qual a PKG induz o relaxamento do músculo liso é através da dessensibilização dos filamentos contráteis. A PKG fosforila a MLCK, diminuindo a sua atividade, e conseqüentemente, diminuindo a fosforilação da cadeia leve reguladora da miosina. Aliado a isto, a ativação da PKG aumenta a atividade da MLCP, aparentemente por fosforilação direta desta enzima ou talvez pelo bloqueio da inibição mediada pela Rho-quinase, o que contribui para diminuir a fosforilação da MLC (LINCOLN et al., 2001). Uma terceira possibilidade, é a influência da PKG na regulação da contratilidade do músculo liso exercido pelo filamento fino, no entanto, esta proposição ainda é controversa (LINCOLN et al., 2001).

A figura 03 ilustra os mecanismos de produção do NO pelo endotélio vascular e os mecanismos de ação desta molécula na célula muscular lisa, causando o relaxamento vascular. É importante observar, que o foco deste trabalho não é revisar todos os mecanismos responsáveis pelo relaxamento muscular, mas sim dar ênfase aos mecanismos mediados pelo NO. Deve-se ressaltar, que existem outras substâncias vasoativas, como as prostaciclina, que exercem efeito complementar ao NO no processo de relaxamento vascular .

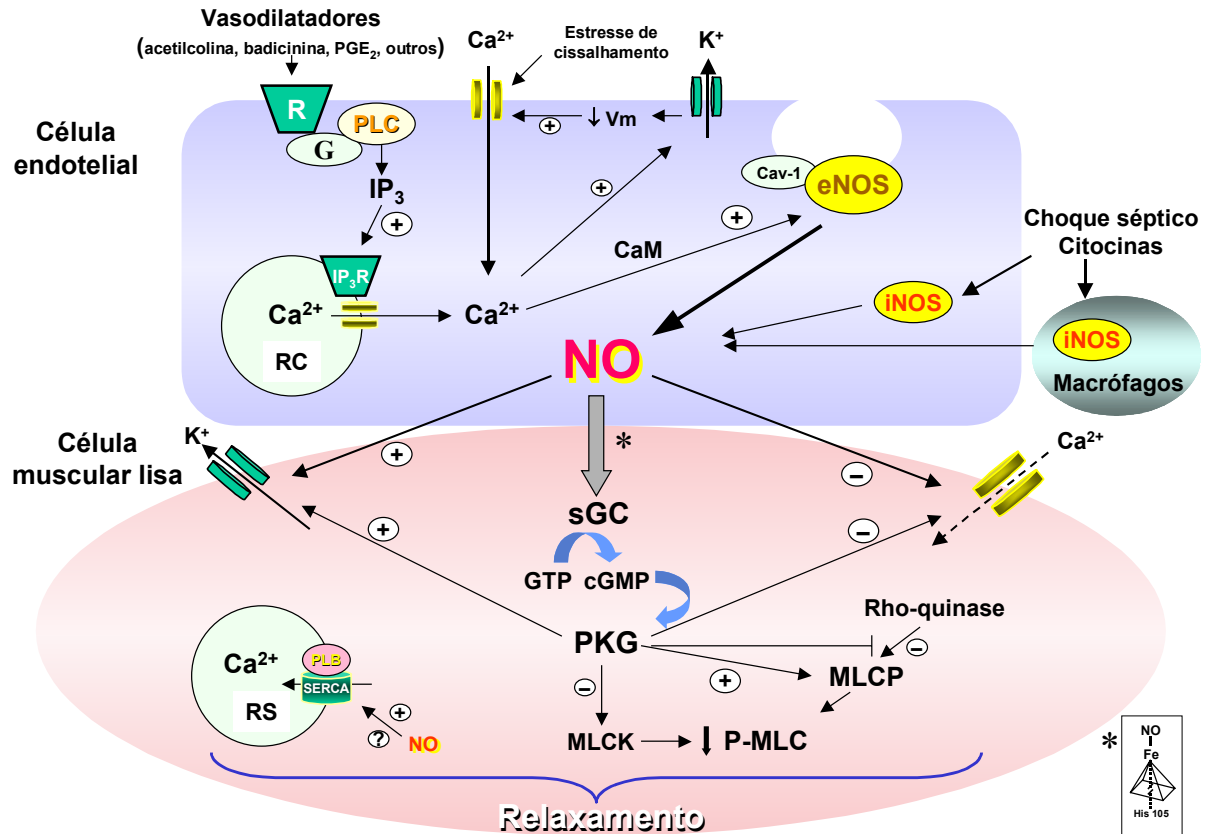
Além do principal efeito do NO sobre os vasos sanguíneos, que é a promoção do relaxamento vascular, citam-se outros efeitos como a inibição do crescimento das células musculares lisas dos vasos sanguíneos e a indução da apoptose da célula muscular lisa (NISHIO et al., 1996) após exposição crônica à altas doses de NO.

Talvez o principal efeito do NO nos vasos sanguíneos, depois do relaxamento da musculatura lisa, seja o controle da adesão e agregação plaquetária. O NO, tanto derivado do endotélio quanto o produzido pelas próprias plaquetas, inibe a adesão plaquetária e conseqüentemente, a ativação e agregação das plaquetas. Este mecanismo é dependente da ativação da GCs, dentro da plaqueta, com conseqüente ativação de PKG, que causa a diminuição do influxo de cálcio para a plaqueta e

estimulação da recaptção de cálcio pelo retículo citoplasmático, limitando dessa forma, a agregação plaquetária (LOSCALZO, 2001). Outros possíveis mecanismos de ação do NO seriam a fosforilação dos receptores de tromboxano A₂, mediada pela PKG, causando a diminuição na ativação destes receptores (WANG et al., 1998) e a diminuição da expressão de algumas proteínas de superfície, como P-selectina e CD63, importantes para a adesão plaquetária (LOSCALZO, 2001).

Quanto à participação do NO ou derivados, como o peroxinitrito, na patofisiologia das doenças vasculares, Ravalli e colaboradores (RAVALLI et al., 1998) constataram a presença de iNOS e proteínas nitrosiladas em artérias de pacientes submetidos ao transplante cardíaco devido à doença coronariana. Demonstraram dessa forma, o possível envolvimento da alta produção de NO e/ou peroxinitrito na patofisiologia da doença arterial coronariana em corações transplantados.

FIGURA 03 - MECANISMO DE RELAXAMENTO DA CÉLULA MUSCULAR LISA MEDIADO PELO ÓXIDO NÍTRICO



Nota: Representação esquemática da produção e dos efeitos do óxido nítrico durante o relaxamento vascular. As abreviações usadas foram : R, receptores; PLC, fosfolipase C; G, proteína G; Vm, potencial de membrana; IP3, trifosfato de inositol; RC, retículo citoplasmático; CaM, calmodulina; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; iNOS, óxido nítrico sintase induzível; NO, óxido nítrico; sGC, guanilato ciclase solúvel; GTP, guanosina trifosfato; cGMP monofosfato cíclico de guanosina; PKG, proteína quinase dependente de cGMP; RS, retículo sarcoplasmático; PLB, fosfolambano; SERCA, bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático; MLCK, quinase da cadeia leve reguladora da miosina, P-MLC, cadeia reguladora da miosina fosforilada; MLCP, fosfatase da cadeia leve reguladora da miosina. Os símbolos + e - indicam estímulo e inibição de função, respectivamente. O quadro inserido no canto inferior direito indica a maneira pela qual a sGC é ativada pelo NO e está indicado pelo símbolo * na figura representativa da célula muscular lisa. A ligação do NO com o ferro do grupo heme causa a quebra da ligação do ferro com a histidina de posição 105, o que induz alterações conformacionais na sGC, aumentando a sua atividade enzimática.

2.3.3 Processos envolvidos na regulação da contratilidade cardíaca

O músculo estriado é assim denominado, devido ao arranjo dos miofilamentos no seu interior. Quando observado no microscópio ótico, o arranjo dos miofilamentos gera difração dos feixes de luz determinando o padrão de estriações.

Os mecanismos de contração e de regulação do músculo estriado diferem daqueles descritos para o músculo liso e por isso estão detalhados nesta secção, que dá enfoque sobretudo, à fisiologia do músculo estriado cardíaco.

No músculo estriado, os filamentos finos são formados pela actina filamentar, pelo complexo troponina e pela tropomiosina. Os filamentos grossos são constituídos principalmente por moléculas de miosina. Estes filamentos estão dispostos de maneira que, um padrão repetitivo de organização pode ser identificado, sendo denominado de sarcômero, que é considerado a estrutura funcional do músculo estriado.

Devido ao padrão de interdigitação entre os filamentos finos e grossos, uma vez que haja a interação entre eles, ocorre a geração de tensão (processo de contração muscular) e conseqüentemente, mas não obrigatoriamente, encurtamento do sarcômero (diferenciando assim as contrações isométricas, onde o comprimento muscular é mantido embora tensão seja gerada, das contrações isotônicas, onde existe geração de tensão acompanhada de variação no comprimento muscular). O encurtamento do sarcômero ocorre quando os filamentos finos deslizam em relação ao filamento grosso em direção ao centro do sarcômero (Linha M).

A teoria dos filamentos deslizantes proposta por H. E. Huxley em 1969 (HUXLEY, 1969), baseada em análises por microscopia eletrônica e difração por raios-x ainda é aceita até os dias de hoje, embora várias contribuições tenham sido adicionadas à ela. Esta teoria prevê que a geração de tensão no músculo ocorre após alterações conformacionais na molécula de miosina, uma vez que esta esteja interagindo com a actina (SPUDICH, 2001). Esta interação ocorre entre uma das

extremidades da miosina onde está presente uma estrutura de formato globular (“cabeça” da miosina) e sítios de ligação para miosina presente na actina, formando o que se chama de pontes transversas (VIBERT et al., 1997; WOLSKA et al., 1999; GORDON et al., 2000; GORDON et al., 2001). Este processo é dependente da utilização do ATP, clivado na ATPase presente na cabeça da miosina (SPUDICH, 2001).

O filamento grosso é uma estrutura bipolar de aproximadamente 1.5 μm de comprimento e composto principalmente da proteína miosina tipo II. Cada filamento grosso é composto de aproximadamente 300 moléculas de miosina (BERS, 2001; LEVINE e KENSLER, 2002). No filamento grosso também estão presentes outras proteínas acessórias dentre elas a proteína-C ligante da miosina (MyBP-C) e a titina. Quanto à função destas proteínas associadas ao filamento grosso, sugere-se que seu principal papel seja a manutenção da estrutura e integridade do sarcômero (BERS, 2001).

A miosina II é composta de duas cadeias pesadas e dois pares de cadeias leves. As duas cadeias pesadas formam as duas cabeças globulares da miosina e a longa cauda da molécula. As cabeças da miosina se dispõem projetadas do eixo da molécula em direção ao filamento fino, sendo esta a região responsável pela interação com a actina e também o local onde se encontra a ATPase. A longa cauda da miosina é formada pela associação em espiral da porção não-globular da miosina. Diferente da miosina presente no músculo liso, a fosforilação da cadeia leve reguladora não é necessária para desencadear o processo de contração. No entanto, como será descrito adiante, a fosforilação da RLC é um mecanismo envolvido na modulação da contração do músculo estriado cardíaco.

Através de clivagem enzimática por tripsina, a miosina pode ser subdividida em meromiosina leve (LMM), que corresponde à cauda da molécula e meromiosina pesada (HMM), que é formada pelas duas cabeças globulares, pelas cadeias leves da

miosina e por uma porção de ligação entre as cabeças globulares e a cauda. A meromiosina pesada pode ainda ser subdividida, através da ação da papaína, em: subfragmento-1 (S1), de aproximadamente 20 ηm , composto pela cabeça globular e pelas cadeias leves essencial e reguladora da miosina; em subfragmento-2 (S2), de aproximadamente 50 ηm , que liga S1 a cauda da miosina. As duas cadeias leves da miosina são denominadas: cadeia leve alcalina ou MLC1 ou ainda cadeia leve essencial da miosina (ELC) e cadeia leve fosforilável da miosina ou MLC2 ou ainda cadeia leve reguladora da miosina (RLC).

O processo de interação molecular que ocorre entre actina e miosina necessita de regulação apurada, para que a contração se adapte às condições requeridas de carga, velocidade, etc.

O principal mecanismo de regulação da contratilidade muscular, presente nos miofilamentos do músculo estriado, é realizado pelo filamento fino. Existe um complexo de proteínas disposto ao redor da actina filamentar que regula, em última análise, a disponibilidade dos sítios de ligação para a miosina, presentes no filamento de actina.

A tropomiosina (TM) é uma proteína filamentar que bloqueia fisicamente os sítios de ligação para a miosina presentes nos monômeros de actina, impedindo assim a interação entre actina e miosina durante o relaxamento muscular. O complexo troponina, composto de três porções denominadas de troponinas C, I e T, está presente a cada sete monômeros de actina e interage com a tropomiosina e com os íons cálcio. Alterações conformacionais do complexo troponina ocorrem quando o cálcio se liga à troponina C. Alterações do complexo troponina são transmitidas para tropomiosina, através da interação desta com a troponina T (TnT). Consequentemente, as alterações na tropomiosina fazem com que a molécula se mova, disponibilizando para ligação os sítios de ligação da miosina presentes na actina, dessa forma, permitindo a contração muscular (GORDON et al., 2000). No complexo troponina existe ainda a troponina I,

que inibe a interação entre alguns monômeros de actina e a miosina, nas concentrações de cálcio diastólicas (LAYLAND et al., 2005).

As alterações da concentração dos íons cálcio no meio intracelular irão determinar a ativação e a inativação do processo contrátil na célula muscular, devido à interação destes íons com a troponina C, presente nos filamentos finos. Sumariamente, uma vez que haja a propagação de um potencial de ação através da membrana da célula muscular cardíaca, ocorre a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem e consequente influxo de cálcio. No músculo cardíaco, ocorre o fenômeno de liberação de cálcio, armazenado no retículo sarcoplasmático (RS), induzido pelo cálcio que entrou na célula em consequência da abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (BERS, 2002). A saída de cálcio do RS ocorre através dos canais rionídnicos (BERS, 2002) e aumenta rapidamente a concentração citoplasmática destes íons.

O aumento da concentração citoplasmática de cálcio, propicia a interação dos íons cálcio com os sítios de ligação, de alta afinidade para este íon, presentes na troponina C (GORDON et al., 2000; GORDON et al., 2001; LEHMAN et al., 2001; CRAIG e LEHMAN, 2001), determinando assim, as alterações conformacionais dos miofilamentos que ocorrem durante a contração muscular.

Para que ocorra o relaxamento muscular, é necessário que a concentração citoplasmática de cálcio diminua. Para isto, existem mecanismos capazes de transportar o cálcio para dentro do RS e para fora da célula. A maior parte do cálcio citoplasmático é recaptada pelo RS através da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2) (BERS, 2001), que tem um papel importante na modulação da contratilidade cardíaca. A atividade de SERCA2 determina a velocidade de recaptação do cálcio do citoplasma para o interior do retículo sarcoplasmático, influenciando, dessa forma, a velocidade de relaxamento muscular; determina também, a quantidade de cálcio “carregada” no RS, que se refere ao estoque de cálcio presente

no RS entre as contrações musculares influenciando, dessa maneira, a amplitude de força muscular desenvolvida (BLUHM et al., 2000; BERS, 2001).

O transporte de cálcio para dentro do RS também é regulado pela fosforilação de SERCA e pela proteína fosfolambano, que interage com SERCA2, inibindo a sua função. A função do fosfolambano pode ser descrita como uma contínua inibição sobre a recaptção de cálcio promovido pela SERCA2, modulando desta forma a velocidade e quantidade de Ca^{2+} recaptada (WOLSKA et al., 1996; BLUHM et al., 2000). Esta inibição é atenuada através da fosforilação do fosfolambano via PKA (proteína quinase A), via proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina ou através da elevação da concentração de cálcio (JAMES et al., 1989; BLUHM et al., 2000). A proteína fosfolambano também pode ser fosforilada pela PKG (COLYER, 1998).

Parte do cálcio citoplasmático é bombeado para fora da célula cardíaca. Isto ocorre principalmente pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ presente na membrana celular. Quando existe alta concentração de cálcio citoplasmática, o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ funciona de maneira reversa, extraíndo cálcio da célula à medida que transporta sódio para seu interior (BERS, 2001; BERS, 2002). Existe um pequeno fluxo de cálcio para a mitocôndria, no entanto, este mecanismo parece não influenciar de maneira significativa as concentrações de cálcio transiente dentro da célula cardíaca (BERS, 2001; BERS, 2002).

Existem ainda, vários outros fatores que participam da regulação da contratilidade cardíaca além dos mecanismos clássicos citados anteriormente. Por exemplo, sugere-se um modelo mais detalhado da interação entre os filamentos finos e grossos onde a ligação do cálcio à troponina C é insuficiente para ativar completamente o filamento fino (LEHMAN et al., 1994; LEHMAN et al., 1995; LEHMAN et al., 2001; CRAIG e LEHMAN, 2001). A interação do subfragmento-1 (S-1) da miosina e a interação entre moléculas contíguas de tropomiosina, são fatores

importantes para a completa ativação do filamento (cooperatividade da ativação) (LEHMAN et al., 1994; LEHMAN et al., 1995; CRAIG e LEHMAN, 2001).

Outro grande exemplo é a fosforilação das proteínas que compõe os miofilamentos. A fosforilação da isoforma cardíaca da TnI (cTnI) durante estimulação β -adrenérgica determina a diminuição da sensibilidade dos miofilamentos aos íons cálcio (FREARSON et al., 1976; SOLARO et al., 1976; KRANIAS e SOLARO, 1982). No coração, a fosforilação da TnI por PKA (ou seguinte à estimulação β -adrenérgica) gera aceleração do relaxamento cardíaco, possivelmente, contribuindo para o efeito inotrópico positivo (LAYLAND et al., 2005). TnI também pode ser fosforilada pela proteína quinase C (PKC) nas serinas 23 e 24, nas serinas de posição 43 e 45 e na treonina de posição 144. A fosforilação da TnI nas serinas 43 e 45 reduz a tensão máxima produzida por fibras cardíacas isoladas (PYLE et al., 2002). A TnI é também fosforilada pela proteína quinase G (PKG) nas serinas 23 e 24 resultando em efeitos similares aqueles induzidos por PKA (LAYLAND et al., 2005). Um agente reconhecido por ativar as cascatas enzimáticas dependentes da proteína-G é o óxido nítrico. O uso de NO ou de doadores de NO no coração resulta em aceleração do relaxamento do miocárdio e redução do tônus diastólico (SHAH et al., 1994; PAULUS et al., 1994; LAYLAND et al., 2002).

A fosforilação da cTnI é importante para o relaxamento normal do músculo cardíaco. De fato, animais transgênicos onde a cTnI foi substituída pela isoforma presente no músculo esquelético (ssTnI), apresentam prolongamento do relaxamento muscular cardíaco (WOLSKA et al., 2001; WOLSKA et al., 2002). A isoforma de TnI presente no músculo estriado esquelético humano (ssTnI) difere da isoforma cardíaca (cTnI), por não apresentar a sequência de aminoácidos onde as serinas fosforiláveis da posição 23 e 24 estariam presentes. Isto porque a cTnI possui 27 a 33 aminoácidos adicionais na porção N-terminal da proteína, quando comparada às sequências de aminoácidos descritas para a ssTnI {Leszyk, 1988 555 /id}. Contudo, animais que

expressam ssTnI no coração são mais resistentes à acidose (WOLSKA et al., 2001; URBONIENE et al., 2005). Isto explica porque durante a fase embrionária e neonatal existe expressão da isoforma esquelética da troponina I no coração, visto que, durante esta fase, o embrião se expõe com mais frequência a situações de hipóxia. Essa resistência à acidose é muito interessante, pois parece ser decorrente de diferenças na sequência de aminoácidos entre as isoformas de TnI, presentes em uma porção diferente daquela onde as serinas fosforiláveis 23 e 24 estariam. Ainda não existe consenso em relação à porção da molécula de ssTnI que determina a resistência à acidose.

Apesar do local primário da regulação da contração no músculo estriado ser o filamento fino, o filamento grosso também exerce efeito modulatório no mecanismo de contração. No músculo estriado, existem várias incertezas quanto à função específica das cadeias leves da miosina e das situações onde a cadeia leve reguladora é fosforilada. Propõe-se um modelo atual de interação entre a miosina e actina, onde o componente elástico que move a cabeça globular da miosina estaria, provavelmente, presente ao nível do braço de alavanca (transição dos segmentos S1 e S2) ao invés de estar presente apenas na cabeça globular da miosina (PIAZZESI e LOMBARDI, 1995; DOBBIE et al., 1997; MORANO, 1999; HOPKINS et al., 2002), envolvendo assim a participação das cadeias leves neste processo.

A fosforilação da cadeia leve reguladora da miosina, está envolvida na regulação da força e velocidade de contração (KAMM e STULL, 2001; DIAS et al., 2006) e na sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (METZGER e MOSS, 1992; SZCZESNA et al., 1996; SZCZESNA et al., 2002).

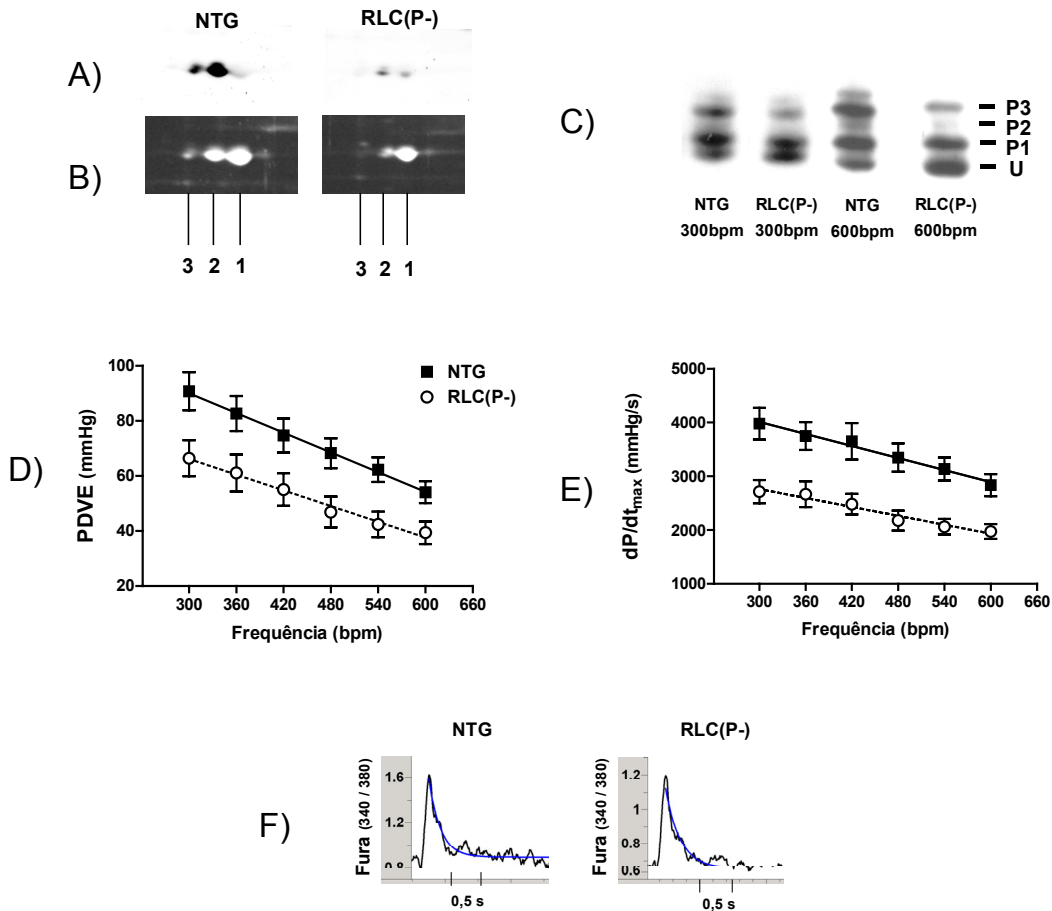
Para avaliar a importância da fosforilação da cadeia leve reguladora da miosina (RLC) no coração, Dias e colaboradores (DIAS et al., 2006) utilizaram uma linhagem de camundongos transgênicos onde a RLC não pode ser fosforilada nas serinas de posição 14, 15 e 19 (animais denominados RLC(P-)) (Figura 04). Os

corações isolados destes animais transgênicos, apresentaram diminuição da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) e da contratilidade cardíaca, representada pela derivada de pressão pelo tempo (dP/dt_{max}) (Figura 04 D-E). Como esperado, a quantidade de RLC fosforilada nos animais RLC(P-) foi praticamente nula, no entanto, observou-se que a fosforilação da cTnI estava reduzida nos corações isolados destes animais (aproximadamente 20% abaixo do valor da fosforilação de cTnI em animais-controle) (figura 04 A-C). A diminuição da fosforilação da cTnI provavelmente representa um mecanismo compensatório para manter a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio em valores compatíveis com o normalidade.

Aparentemente, a redução da contratilidade e da pressão desenvolvida pelo VE nos animais RLC(P-) ocorreu independente de alterações nas concentrações de cálcio transiente (figura 04 E). A concentração de cálcio transiente, em células cardíacas isoladas dos ventrículos, foi avaliada através da fluorescência do corante FURA e os resultados foram similares entre os grupos de animais transgênicos RLC(P-) e não-transgênicos (NTG).

Outros autores também demonstraram associação diretamente proporcional entre a fosforilação de RLC e a pressão desenvolvida pelo VE (FITZSIMONS et al., 1989; FITZSIMONS et al., 1990a; FITZSIMONS et al., 1990b). Baseado nestes e em outros achados (MORANO et al., 1985; MORANO et al., 1986; MORANO e RUEGG, 1986; MORANO et al., 1988; SANBE et al., 1999), postula-se que a fosforilação da cadeia leve reguladora da miosina tenha participação na modulação da contração do músculo estriado cardíaco.

FIGURA 04 - CONSEQUÊNCIA DA MUTAÇÃO DA CADEIA LEVE REGULADORA DA MIOSINA TORNANDO-A NÃO FOSFORILÁVEL



NOTA: (A) e (B) Separação da RLC em gel bi-dimensional. As amostras foram obtidas de animais não-transgênicos (NTG) e de animais transgênicos onde a RLC não pode ser fosforilada nas serinas de posição 14, 15 e 19 (RLC(P-)). Os géis foram corados com ProQ diamond (A) para demonstrar a proteína fosforilada e com Sypro Ruby (B) para demonstrar a quantidade total de proteínas. Pôde-se separar a forma desfosforilada da RLC (1) e duas formas fosforiladas da RLC (2,3). Em (C), as amostras foram separadas pelos pontos isoelétricos, seguido de imunoblotting com o uso de anticorpo contra TnI. As bandas representam a forma desfosforilada (U) e as formas fosforiladas (P1, P2, P3) da TnI, em amostras de corações, eletroestimulados a 300bpm ou 600bpm, provenientes de animais NTG e RLC(P-). Os resultados obtidos em corações perfundidos pela técnica de Langendorff estão apresentados nas imagens (D) e (F), que representam as médias (\pm erro padrão) da pressão desenvolvida pelo VE (PDVE) e da derivada de pressão pelo tempo (dP/dt_{max}), respectivamente. Em (F), estão representadas imagens dos picos de cálcio transiente, medidos pela fluorescência do corante FURA2, em células ventriculares cardíacas isoladas de animais NTG e RLC(P-) e eletroestimuladas à 0,5Hz.

Outro exemplo do papel individual que cada proteína que compõe o filamento fino exerce na regulação da contração muscular, são as situações patológicas decorrentes de mutações na sequência de aminoácidos destas proteínas. Hoje, sabe-se que a cardiomiopatia hipertrófica familiar (CMH), a causa mais comum de morte súbita em indivíduos jovens (TARDIFF, 2005), é consequência de mutações presentes nos miofilamentos, o que deu o apelido à essa doença de “doença do sarcômero” (BONNE et al., 1998). Várias mutações foram identificadas, tanto no filamento fino quanto no grosso. Embora seja difícil prever o fenótipo específico de cada mutação, o fato de uma mutação pontual em certas proteínas presente nos miofilamentos ser capaz de produzir disfunção cardíaca tão acentuada, demonstra como a regulação da contração do músculo cardíaco é apurada e como certos componentes exercem papel crucial neste controle.

Um dos exemplos marcantes é a mutação em camundongos da tropomiosina cardíaca, onde a glutamina da posição 180 foi substituída pela glicina (Glu180Gly), simulando a mutação que ocorre em alguns doentes com diagnóstico de CMH. Estes animais desenvolvem hipertrofia, dilatação e calcificação atrial, apresentam fibrose intersticial e insuficiência cardíaca. Corações isolados destes animais transgênicos apresentam grande incidência de disritmia e distúrbio no relaxamento muscular cardíaco (PRABHAKAR et al., 2001; PRABHAKAR et al., 2003; observações pessoais).

2.3.4 Efeitos do NO sobre a contratilidade cardíaca

2.3.4.1 Expressão e localização das enzimas sintetizadoras de NO na célula cardíaca

Após a descoberta do NO como mediador do relaxamento vascular, muitos pesquisadores começaram a investigar um possível papel do NO no coração.

Vários autores relataram a expressão das enzimas iNOS e eNOS em células cardíacas (BRADY et al., 1992; BALLIGAND et al., 1994; BALLIGAND et al., 1995; HAN et al., 1996; JOE et al., 1998). A isoforma neuronal também foi encontrada na célula muscular cardíaca, estando presente nas membranas do retículo sarcoplasmático (XU et al., 1999; BURKARD et al., 2007).

As isoformas constitutivas de NOS, eNOS e nNOS, são expressas na célula muscular cardíaca em condições normais, enquanto iNOS, tem a expressão induzida em determinadas situações como, por exemplo, durante o choque séptico e durante a insuficiência cardíaca, como será detalhado a seguir.

Um fator importante sobre a biologia celular das NOS no coração é a sua localização dentro da célula cardíaca (CHAMPION et al., 2003; ZIOLO e BERS, 2003). A localização das isoformas de NOS auxilia-nos a identificar as possíveis interações destas enzimas com outras proteínas que participam das cascatas de ativação enzimática e também, os possíveis alvos do NO, produzido após ativação das isoformas da NOS.

A enzima eNOS está localizada nas caveolas da membrana citoplasmática dos cardiomiócitos de camundongos, como demonstrado por Champion e colaboradores (CHAMPION et al., 2004) e por Barouch e colaboradores (BAROUCH et al., 2002) em experimentos de co-imunoprecipitação com a proteína caveolina-3. Hare e colaboradores (HARE et al., 2000), demonstraram a presença de eNOS co-localizada com a proteína caveolina-3 nos túbulos T e na membrana citoplasmática da célula muscular cardíaca. Estes autores também demonstraram, em cardiomiócitos provenientes de cães com insuficiência cardíaca, que a eNOS estava presente nos mesmos locais descritos anteriormente, além de estar presente de maneira difusa no interior da célula. Observações similares a de Hare e colaboradores, quanto à localização da expressão de eNOS, foram feitas por Massion e colaboradores (MASSION et al., 2004) em experimentos de imunofluorescência e microscopia

eletrônica com precipitação de partículas de ouro, utilizando cardiomiócitos de camundongos.

A enzima nNOS localiza-se nas membranas do retículo sarcoplasmático, como demonstrado por Xu e colaboradores (XU et al., 1999). Estes autores reportaram que a produção de NO em vesículas do RS era sensível a bloqueadores de nNOS. Também demonstraram, pela técnica de imunoprecipitação de partículas de ouro seguida de imagem de microscopia eletrônica, que a nNOS estava presente em vesículas do RS. Barouch et colaboradores (BAROUCH et al., 2002), também descreveram a presença de nNOS no RS, demonstrando a co-imunoprecipitação de nNOS e de rionidina. A nNOS foi localizada, em cortes histológicos do coração avaliados pela técnica de microscopia eletrônica, no retículo sarcoplasmático e na membrana citoplasmática de cardiomiócitos, como descrito por Burkard e colaboradores (BURKARD et al., 2007). Os autores utilizaram, para estes experimentos, animais que superexpressavam nNOS no coração.

A presença de eNOS e nNOS em corações humanos, foi demonstrada por Damy e colaboradores (DAMY et al., 2004), em experimentos de imunofluorescência e imunoprecipitação. A enzima eNOS, estava co-localizada com a caveolina-3 e também foi imunoprecipitada com esta proteína. Em corações normais, estes investigadores encontraram nNOS associada à rionidina, nos experimentos de imunoprecipitação. Uma observação interessante, foi o fato destes autores encontrarem associação da isoforma neuronal com a caveolina-3, durante a insuficiência cardíaca, demonstrando um possível translocamento desta isoforma do retículo sarcoplasmático para a membrana celular.

A expressão de iNOS no tecido muscular cardíaco humano é induzida durante o infarto do miocárdio e durante a insuficiência cardíaca (DE BELDER et al., 1993; LEWIS et al., 1996; HAYWOOD et al., 1996; VEJLSTRUP et al., 1998; ZIOLO et al., 2004; PATTEN et al., 2005). A expressão de mRNA para iNOS estava

inversamente relacionada com a performance ventricular em corações transplantados, segundo as observações de Lewis e colaboradores (LEWIS et al., 1996). A expressão de iNOS também foi encontrada em cardiomiócitos provenientes de corações de ratos transplantados que apresentaram rejeição (ZIOLO et al., 2001a).

Alguns estudos onde a sub-localização de iNOS foi investigada, apontaram que a enzima estava expressa no citoplasma celular, nos miofilamentos, na membrana nuclear, no retículo sarcoplasmático (BUCHWALOW et al., 1997; BUCHWALOW et al., 2001) e nas mitocôndrias (BUCHWALOW et al., 1997; BUCHWALOW et al., 2001; ZANELLA et al., 2004).

2.3.4.2 Efeitos do NO na função do coração no estado basal

Os efeitos do NO são dependentes da concentração de NO produzida e também do meio em que a molécula se encontra, por exemplo, caso haja produção excessiva de superóxido, ocorrem efeitos indiretos do NO devido à formação do peroxinitrito.

Efeitos bifásicos do NO sobre a o encurtamento de células cardíacas isoladas e sobre a tensão gerada por músculo cardíaco isolado, foram relatados. Estes efeitos dependiam, na maioria das vezes, da concentração de doadores de NO utilizados nos experimentos.

Em estudos onde foram utilizadas células isoladas, o uso de baixa concentração de doadores de NO (1-100uM SNAP e 2-20 DEA/NO), resultou em moderado efeito inotrópico positivo em cardiomiócitos de ratos (KOJDA et al., 1996) e de cães (PRECKEL et al., 1997). Efeitos similares foram observados em músculo papilar do VE de ratos (PRABHU et al., 1999). Em contraste, outros pesquisadores demonstraram efeito inotrópico negativo, em cardiomiócitos, quando foram utilizados 100uM de SIN-1 (WAHLER e DOLLINGER, 1995) ou 100uM de nitroprussiato de sódio (FLESCH et al., 1997). Além disso, Wahler e colaboradores (WAHLER e

DOLLINGER, 1995), demonstraram que o uso de 100uM de SIN-1 causou inibição da corrente de cálcio através dos canais lentos de cálcio voltagem-dependentes.

Flesch e colaboradores (FLESCH et al., 1997), utilizaram amostras provenientes de tecido cardíaco humano (fibras de miocárdio atrial e ventricular) que foram perfundidas com 100uM de nitroprussiato de sódio e observaram que esta droga induzia efeito inotrópico negativo (aproximadamente 12% de decréscimo na tensão desenvolvida). Os autores também observaram que o uso do composto azul de metileno preveniu a diminuição de força, demonstrando a participação do GMPc nesta inibição.

Em corações isolados perfundidos retrogradamente (técnica de Langendorff), também existem relatos de efeitos inotrópicos positivos e negativos mediados pelo NO. Alguns trabalhos observaram efeito inotrópico positivo, quando doadores de NO foram perfundidos e também observaram efeitos inotrópicos negativos, quando bloqueadores de NOS foram utilizados. Na maioria das vezes, os bloqueadores de NOS não eram específicos para uma das isoformas de NOS, o que torna difícil a proposta de efeitos específicos de cada isoforma de NOS. No entanto, estes experimentos sugerem que o efeito global do bloqueio da NOS no coração determina diminuição nos parâmetros de contratilidade em coração isolado.

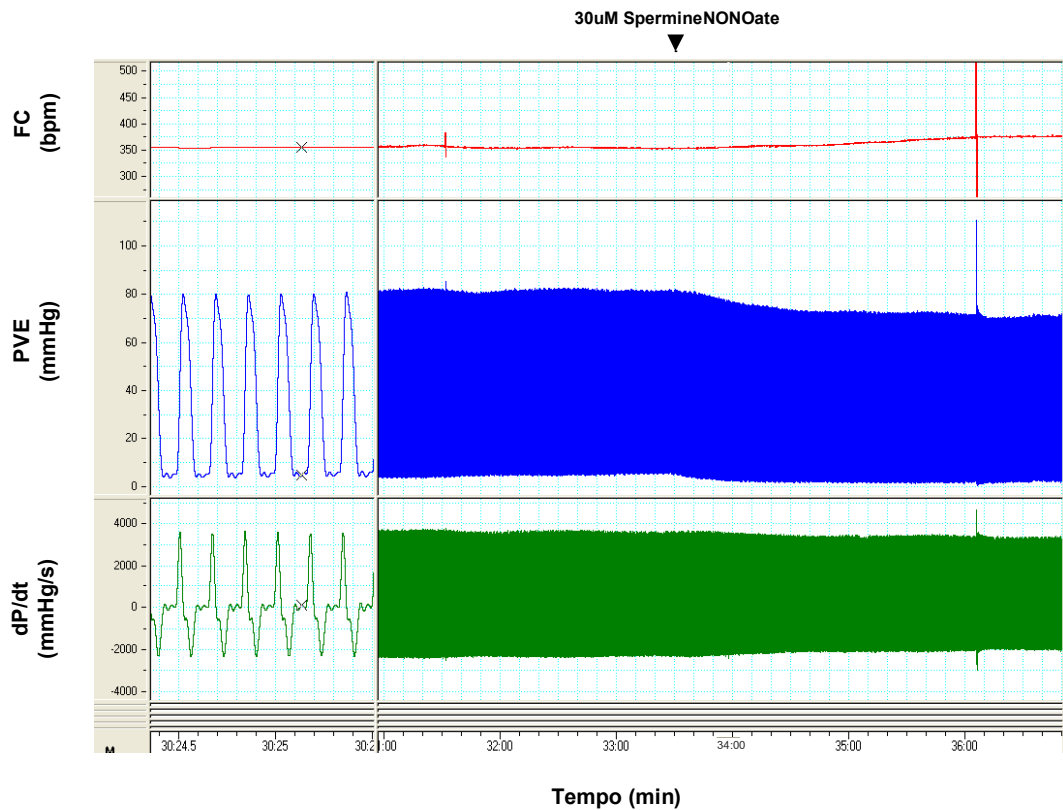
Kojda e colaboradores (KOJDA et al., 1997a), observaram efeitos inotrópicos negativos após a perfusão de corações de ratos com bloqueadores da NOS (L-NOARG e L-NMMA, 0,1 e 1,0mM) enquanto, o uso de doadores de NO, causou um efeito inotrópico positivo. Kojda e colaboradores (KOJDA et al., 1997b), também observaram efeitos inotrópicos positivos após o uso de doadores de NO em uma modelo de ratos que desenvolvem hipertensão espontânea. Estes efeitos foram pequenos, ao redor de 7% em ratos hipertensos e ao redor de 4 a 5 % em animais-controle. É interessante observar, que os efeitos mediados por doses maiores do doador de NO SNAP (10uM comparados a 1uM) foram menos intensos do que os efeitos

mediados por doses menores. Como ocorreu em células isoladas, é provável que doses maiores de doadores de NO, nestes experimentos, pudessem induzir efeito inotrópico negativo.

Um trabalho importante para a elucidação dos efeitos do NO em coração isolado foi realizado por Kelm e colaboradores (KELM et al., 1997). Os autores infundiram o gás óxido nítrico, diretamente na solução de perfusão, em corações isolados de porcos da índia, evitando assim, possíveis efeitos contralaterais dos doadores do NO. Os autores observaram que a perfusão com o NO causou diminuição da pressão desenvolvida pelo VE e da dp/dt_{max} , de maneira dose-dependente, em concentrações maiores do que 10uM. Associado a este efeito inotrópico negativo, os autores observaram diminuição na geração de energia pelas mitocôndrias, representada pela diminuição do ATP, da fosfocreatina intracelular e pela liberação de adenosina no efluente venoso. É importante observar, que estas alterações no metabolismo energético foram observadas durante a máxima inibição da contratilidade (redução de 66% da PDVE) induzida pelo NO (100uM), nestes experimentos. Outros autores também demonstraram que o NO é capaz de inibir a respiração celular (CLEETER et al., 1994; LOPEZ et al., 2006).

Em resultados preliminares (figura 05), o autor do presente trabalho, também observou diminuição da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo e da dp/dt (além do tônus diastólico), em corações de camundongos isolados, durante a perfusão de 30uM do doador de NO spermineNONOate (o que significa a presença de 60uM de NO na solução, já que dois moles de NO são liberados por cada mol de spermineNONOate).

FIGURA 05 - EFEITOS DA INFUSÃO DE NO NA CONTRATILIDADE CARDÍACA, EM CORAÇÃO ISOLADO PERFUNDIDO RETROGRADAMENTE, PROVENIENTE DE CAMUNDONGO



Nota: A figura representa o registro original de um experimento realizado com coração isolado de camundongo perfundido pela técnica de Langendorff. As abreviações utilizadas foram: FC, frequência cardíaca; PVE, pressão no ventrículo esquerdo; dP/dt, derivada da pressão pelo tempo. A ponta de seta indica o momento em que o doador de óxido nítrico SpermineNONOate foi adicionado à solução de perfusão.

Alguns experimentos, utilizando doadores de NO, foram realizados *in vivo*. No entanto, a interpretação dos efeitos destes doadores sobre o coração isoladamente é difícil, devido aos efeitos vasculares mediados por estas drogas. Um pequeno efeito inotrópico positivo foi observado por Preckel e colaboradores (PRECKEL et al., 1997) em coração de cães, após o uso de doadores de NO, sendo o maior efeito causado pelo uso de 20uM de DEA/NO.

Em estudo clínico, Cotton e colaboradores (COTTON et al., 2001) avaliaram

os efeitos da perfusão intracoronariana do bloqueador de NOS, L-NMMA (na dose de aproximadamente 200uM), em corações de pacientes com níveis moderado de insuficiência cardíaca (classes II e III, New York Heart Association) e de pacientes-controle sem patologia cardíaca diagnosticada. Os autores encontraram que a inibição da NOS causou redução da dP/dt_{max} (aproximadamente 13%) nos corações de pacientes-controle, mas não alterou significativamente a dP/dt_{max} em paciente com insuficiência cardíaca (IC). No entanto, o bloqueador de NOS aumentou a constante de relaxamento isovolumétrico, a pressão diastólica do VE e a pressão arterial média. Além disso, os autores não observaram nenhum efeito do bloqueador de NOS na relação força-frequência em corações onde a frequência cardíaca foi controlada. Embora o uso de um bloqueador inespecífico de NOS tenha sido importante para a avaliação dos efeitos da produção basal de NO no coração de pacientes-controles, em pacientes com insuficiência cardíaca, onde a expressão de isoformas de NOS é diferente dos controles (por exemplo iNOS é expressa durante a IC), o uso de um bloqueador inespecífico não esclarece por completo o impacto que cada isoforma tem na doença. No caso do uso de L-NMMA, sabe-se a constante de inibição varia para cada uma das enzimas, sendo de aproximadamente 0,18uM para a nNOS, 0,4uM para a eNOS e 6,0uM para a iNOS (FREY et al., 1994; GARVEY et al., 1994).

Ainda é difícil saber com precisão qual o efeito que cada isoforma tem sobre a contratilidade cardíaca basal, devido aos resultados conflitantes existentes até o momento. No entanto, o uso de um bloqueador inespecífico das NOS, geralmente induz um efeito inotrópico negativo sobre a célula cardíaca e sobre o coração. Isto é, provavelmente, consequência do bloqueio de eNOS e nNOS, já que em condições normais a expressão de iNOS é inexistente ou muito pequena para ser considerada responsável por este efeito. Isto sugere que a produção basal de NO pelas cNOS é importante para manutenção da contratilidade do coração.

Recentemente, Barouch e colaboradores (BAROUCH et al., 2002),

demonstraram efeitos opostos das isoformas endotelial e neuronal, na atividade basal do coração. Os autores sugeriram que este efeito deveu-se à compartimentalização destas enzimas na célula cardíaca. Dessa forma, o uso de um bloqueador inespecífico de NOS, como nos experimentos citados nos parágrafos acima, poderia demonstrar apenas a consequência do bloqueio da isoforma predominante.

2.3.4.3 Efeitos do NO sobre a resposta β -adrenérgica

Com relação aos efeitos do NO na resposta do cardiomiócito à estimulação β -adrenérgica, existem vários relatos onde este composto foi capaz de atenuar o efeito inotrópico determinado pelo uso de agonista β -adrenérgico.

A atenuação na resposta β -adrenérgica foi observada, por exemplo, em camundongos transgênicos com expressão aumentada de fator de necrose tumoral, que expressam iNOS e desenvolvem insuficiência cardíaca (FUNAKOSHI et al., 2002). Ziolo e colaboradores (ZIOLO et al., 2001c), demonstraram através do uso do doador SpermineNONOate (300 μ M), que o NO tem efeito bifásico sobre a resposta do cardiomiócito ao agonista β -adrenérgico isoproterenol. Em baixas concentrações de isoproterenol (0,01 μ M), o NO induziu aumento na incidência da liberação espontânea de cálcio pelos canais rionidínicos (calcium sparks) enquanto, durante o uso de doses maiores de isoproterenol (1 μ M), o NO causou efeito negativo sobre a liberação espontânea de cálcio.

Animais nocaute para a enzima eNOS, apresentam aumento da contratilidade cardíaca durante estimulação induzida pelo uso de agonista β -adrenérgico (BAROUCH et al., 2002), enquanto células isoladas de animais com superexpressão de eNOS apresentam atenuação da resposta ao agonista β -adrenérgico (CAMPBELL et al., 1996; MASSION et al., 2004). Um dos mecanismos que explicaria o efeito inibitório da enzima eNOS sobre a resposta β -adrenérgica, seria a interação entre eNOS e os receptores adrenérgicos do tipo β_3 . Os receptores β_3 exercem efeito

inotrópico negativo no coração devido à ativação de proteína G inibitória ($G_{\alpha i}$) (GAUTHIER et al., 1996). Barouch e colaboradores (BAROUCH et al., 2002), demonstraram que o uso do agonista específico dos receptores β_3 , o composto BRL 37344, não teve efeito em cardiomiócitos isolados de animais eNOS nocaute quando comparados a animais-controle e animais nNOS nocaute, onde efeitos inotrópicos negativos ocorreram. Utilizando células isoladas de miocárdio humano, Gauthier e colaboradores (GAUTHIER et al., 1998) também demonstraram a interação de eNOS com os receptores β_3 . Neste trabalho, o efeito do agonista dos receptores do tipo β_3 (BRL 37344), foi atenuado pela incubação com o composto azul de metileno, um inibidor da ativação da guanilato ciclase solúvel, além dos inibidores da NOS, L-NMMA e L-NAME, demonstrando o papel do NO neste efeito e também demonstrando que a ação do NO era mediada pela GCs.

Além disso, existe a sugestão de que eNOS poderia interagir com receptores muscarínicos no coração (predominantemente M_2), mediando os efeitos da estimulação colinérgica. Feron e colaboradores (FERON et al., 1997), demonstraram que após ativação, os receptores muscarínicos sofriam translocação para as cavéolas, local onde eNOS tem sido localizada associada à caveolina-3. A interação de M_2 com eNOS, poderia induzir o desligamento desta com a caveolina, consequentemente, atenuando a inibição causada pela caveolina sobre a enzima. Han e colaboradores (HAN et al., 1998a), demonstraram em células isoladas do nodo sinoatrial, que o efeito da ativação dos receptores muscarínicos era dependente de NOS. Posteriormente, Han e colaboradores (HAN et al., 1998b) demonstraram que o efeito da estimulação dos receptores muscarínicos sobre a corrente de cálcio através dos canais de membrana, durante a estimulação β -adrenérgica, estava parcialmente abolida em células de animais eNOS nocaute. No entanto, outro grupo de pesquisadores observaram que os efeitos da estimulação dos receptores muscarínicos sobre a corrente de cálcio, era independente da atividade da eNOS (BELEVYCH e HARVEY, 2000).

Diferente da isoforma endotelial da NOS, a isoforma neuronal, localizada no cardiomiócito na membrana do RS (XU et al., 1999), parece determinar efeitos inotrópicos positivos. Barouch e colaboradores (BAROUCH et al., 2002), sugeriram que o NO, produzido pela nNOS, facilitaria a liberação de cálcio do RS pelos receptores rianodínicos (RyR). A explicação para efeitos opostos entre eNOS e nNOS deve-se, provavelmente, à compartimentalização destas enzimas dentro da célula cardíaca. A isoforma neuronal da NOS é expressa nas membranas do RS próxima aos canais rionidínicos enquanto eNOS está localizada nas cavéolas da membrana celular próxima aos receptores β_3 -adrenérgicos e aos canais lentos de cálcio voltagem-dependentes (BAROUCH et al., 2002). Como estas enzimas produzem NO em baixas concentrações e devido ao fato do NO ter meia-vida de apenas alguns segundo, os efeitos deste composto fica restrito aos alvos próximos da sua fonte de produção, isto é, da isoforma da NOS de onde o gás originou-se. No entanto, Ashley e colaboradores (ASHLEY et al., 2002) demonstraram que cardiomiócitos isolados de animais nNOS nocaute ou de animais-controle onde a nNOS foi preferencialmente inibida (L-VNIO, 500uM), apresentaram aumento na contratilidade em resposta à estimulação β -adrenérgica, sugerindo um efeito inibitório de nNOS sobre a contratilidade cardíaca. Além disso, células isoladas de animais nNOS nocaute apresentaram aumento da contratilidade basal, sugerindo que o efeito da produção basal de NO, pela nNOS seria inibitório sobre a recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Baseado nestes resultados, ainda é difícil compreender a influência da nNOS sobre a atividade cardíaca basal e durante a estimulação β -adrenérgica do coração.

A expressão de iNOS, estava associada com a atenuação dos efeitos da estimulação β -adrenérgica no coração em diversos trabalhos (BALLIGAND et al., 1994; ADAM et al., 1999; ZIOLO et al., 2001a; ZIOLO et al., 2001b; FUNAKOSHI et al., 2002; GEALEKMAN et al., 2002; ZIOLO et al., 2004; BARTH et al., 2006).

Ziolo e colaboradores (ZIOLO et al., 2001b), por exemplo, observaram

diminuição na concentração de cálcio liberado do RS, induzido por agonista β -adrenérgico, em células isoladas de ventrículos de ratos que tiveram a expressão de iNOS induzida através do uso de LPS. Os resultados de Yasuda e Lew (YASUDA e LEW, 1997), corroboram parcialmente com estes achados. Os autores, utilizando cardiomiócitos de coelhos estimulados com LPS (1ng/ml) e avaliados após 6 horas (tempo suficiente para expressão de iNOS (BALLIGAND et al., 1994)), observaram diminuição da contratilidade e da sensibilidade e resposta máxima ao isoproterenol. Estes efeitos foram acompanhados de elevação na concentração do GMPc. No entanto, os autores não encontraram diferenças nas concentrações de cálcio transiente, em experimentos utilizando células isoladas. O papel da NOS neste trabalho, foi comprovado pelo uso do inibidor da NOS, L-NMMA, que reverteu os efeitos observados decorrentes da perfusão das células com LPS.

Em trabéculas e cardiomiócitos isolados de miocárdio humano acometido por insuficiência cardíaca, Ziolo e colaboradores (ZIOLO et al., 2004) demonstraram que a hiporesponsividade ao isoproterenol era revertida após inibição seletiva da iNOS. A inibição desta isoforma da enzima, também aumentou os picos de cálcio transiente nas células isoladas.

Em um modelo animal de insuficiência cardíaca, produzido pela sobrecarga por aumento de volume, Gealekman e colaboradores (GEALEKMAN et al., 2002) encontraram que a atenuação da resposta β -adrenérgica apresentada por estes animais, foi revertida após inibição específica da isoforma induzível da NOS (com o uso do bloqueador de iNOS 1400W). Em outro modelo animal onde existe alta expressão de iNOS, o de sepse, o uso do inibidor específico de iNOS, GW274150, também resultou em aumento da inotropia induzida por agonista β -adrenérgico (BARTH et al., 2006). Estes estudos sugerem que a expressão de iNOS no coração, durante situações patológicas como a insuficiência cardíaca, é responsável pela atenuação da resposta β -adrenérgica.

O efeito da inibição das isoformas de NOS em corações de pacientes com insuficiência cardíaca, durante a estimulação β -adrenérgica, foi estudado por Hare e colaboradores (HARE et al., 1998). Os autores encontraram que a inibição das isoformas de NOS utilizando L-NMMA, aumentou a resposta à dobutamina nos corações insuficientes, que estava previamente reduzida antes do bloqueio da NOS. Além disso, não houve diferença significativa na resposta à dobutamina após o bloqueio de NOS em corações de pacientes sem patologia cardíaca. Embora os autores não quantificaram a expressão de iNOS nos indivíduos participantes do estudo, é provável que esta diferença seja consequência do bloqueio da isoforma induzível pois, esta isoforma é expressa durante a insuficiência cardíaca, mas não em condições normais.

2.3.4.4 Mecanismos de ação do NO na célula cardíaca

Os mecanismos que ação do NO na célula cardíaca são mediados pelo aumento da concentração da GMPc, por efeitos direto do NO sobre proteínas alvo ou por efeitos indiretos mediados por derivados do NO.

Assim como ocorre na célula muscular lisa, o NO tem como alvo na célula cardíaca a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). Uma vez ativada, a GCs catalisa a conversão de GTP em GMPc, que conseqüentemente ativa a PKG. A PKG pode inibir o influxo de cálcio para a célula, que ocorre através dos canais de cálcio voltagem-dependentes presentes na membrana celular (HARTZELL e FISCHMEISTER, 1986; MERY et al., 1991) e pode diminuir a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (SHAH et al., 1994; YASUDA e LEW, 1997), provavelmente através da fosforilação da TnI (LAYLAND et al., 2005).

Quanto à interação da via NO/GMPc e das vias de ativação do AMPc, durante a estimulação β -adrenérgica, além dos efeitos geralmente opostos que a ativação da PKG desencadeia quando comparados aos efeitos desencadeados pela

ativação da PKA, existe a possibilidade de que o GMPc atue sobre as fosfodiesterases presentes no coração (BALLIGAND et al., 2007). Balligand e colaboradores, sugerem que baixas doses de NO poderiam ativar a GMPc, que por sua vez inibe a fosfodiesterase III e dessa forma, poderia potencializar a ação do AMPc, especialmente sobre o transporte de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem. No entanto, altas concentrações de NO estimulariam a fosfodiesterase II, reconhecida como a fosfodiesterase dependente de GMPc, reduzindo dessa forma, a quantidade de AMPc e determinando a atenuação dos efeitos da estimulação β -adrenérgica.

É importante observar também, que efeitos diretos mediados pelo NO podem ocorrer. Hu e colaboradores (HU et al., 1997), demonstraram que o NO pode atuar de forma direta diminuindo a corrente de cálcio através dos canais de cálcio voltagem-dependente da membrana. Outro efeito mediados pelo NO, independentes de GMPc, ocorre sobre a respiração celular. Como demonstrado por Kelm e colaboradores (KELM et al., 1997), a depressão na geração de energia pelas mitocôndrias estava associada à inibição da contratilidade cardíaca induzida pelo NO. Xie e colaboradores (XIE et al., 1996), também demonstraram que o doador de NO, SNAP, foi capaz de inibir a respiração celular em ventrículo de cães. Adicionalmente, Cleeter e colaboradores (CLEETER et al., 1994), demonstraram que o NO é capaz de inibir reversivelmente a enzima citocromo c oxidase, *in vitro*.

Além disso, os efeitos da produção de altas doses de NO podem ocorrer de forma indireta, através da formação de derivados do NO. Como discutido na seção 2.1.2, um dos derivados de alta reatividade e efeitos biológicos deletérios é o peroxinitrito. O peroxinitrito é derivado da reação entre o NO e o superóxido. O superóxido pode inclusive ser produzido pelas enzimas produtoras de NOS, quando ocorre o desacoplamento dos homodímeros da NOS. O peroxinitrito pode causar danos celulares por induzir: lesão direta sobre o DNA (BURNEY et al., 1999), peroxidação

de lipídeos (RUBBO et al., 1994), disfunção mitocondrial (CASSINA e RADI, 1996; CASSINA et al., 2000), além de promover estresse oxidativo, tendo como alvo diversas proteínas dentro da célula cardíaca (FUKUTO et al., 2000; WINK et al., 2000).

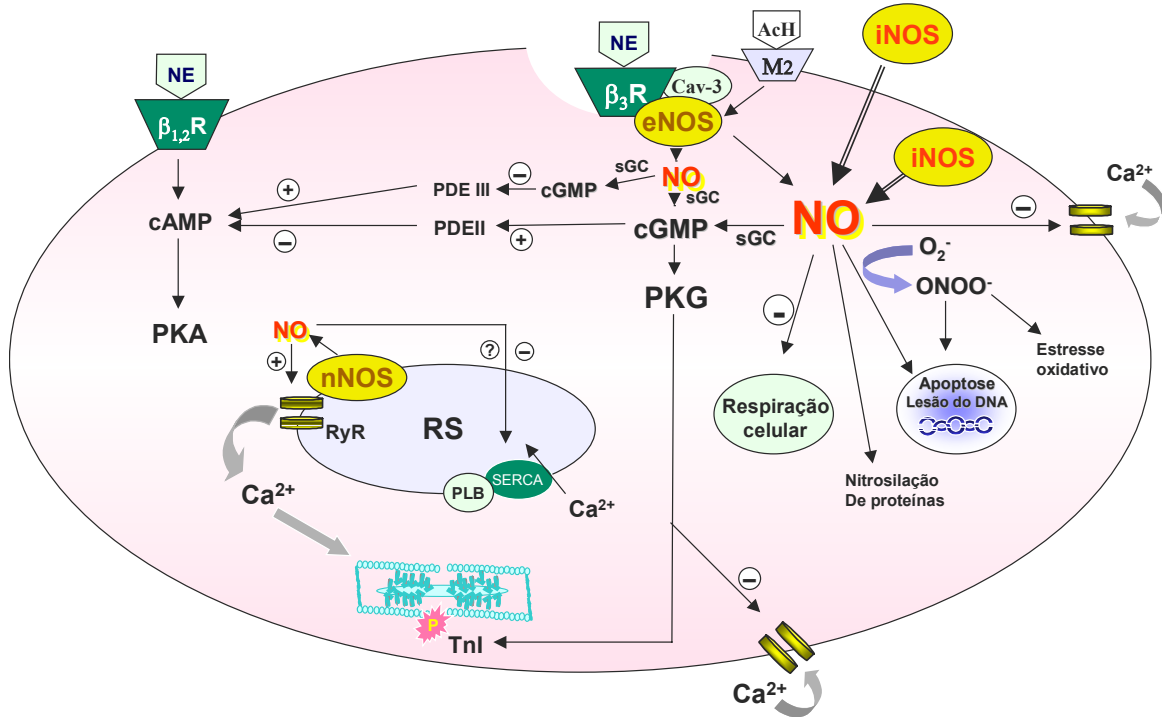
Os efeitos diretos e indiretos do NO estão sumarizados na figura 06. A figura é uma representação esquemática dos efeitos do NO sobre seus principais alvos dentro da célula muscular cardíaca.

2.3.4.5 Modelos animais com manipulação genética da NOS

Uma das formas de se investigar o papel do NO no desenvolvimento de patologia cardiovascular, foi através da criação de modelos animais onde as enzimas de NOS foram superexpressadas ou tiveram o gene determinante da sua expressão deletado. Uma revisão desses modelos foi feita por Mungrue e colaboradores (MUNGRUE et al., 2002b).

O primeiro modelo de animal com ablação gênica foi criado para nNOS por Huang e colaboradores (HUANG et al., 1993). Apesar de ainda haver produção de NO em diferentes áreas cerebrais dos animais nocaute, embora muito menor que em animais controle, a ausência de nNOS não causou alterações morfológicas no cérebro ou outras regiões onde nNOS é comumente expresso, como na retina. Mais tarde, foi constatado que os animais nNOS nocaute apresentavam distúrbios comportamentais, em especial distúrbio no comportamento sexual e agressividade em machos (NELSON et al., 1995). O principal efeito da ablação do gene foi a dilatação do estômago e hipertrofia do esfíncter pilórico. No coração, o efeito foi o aumento na frequência cardíaca (FC) em condições basais, sugerindo uma menor estimulação parassimpática (JUMRUSSIRIKUL et al., 1998).

FIGURA 06 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICO DO MECANISMO DE AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA CÉLULA MUSCULAR CARDÍACA



Nota: As abreviações usadas foram : NE, norepinefrina; β_{1,2}R, receptores β-adrenérgicos do subtipos 1 e 2; AcH, acetilcolina; M₂, receptor muscarínico do tipo 2; Cav-3, caveolina-3; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; iNOS, óxido nítrico sintase induzível; nNOS, óxido nítrico sintase neuronal; NO, óxido nítrico; sGC, guanilato ciclase solúvel; PDE, fosfodiesterases; cAMP, monofosfato cíclico de adenosina; cGMP monofosfato cíclico de guanosina; PKA, proteína quinase A; PKG, proteína quinase dependente de cGMP; RS, retículo sarcoplasmático; PLB, fosfolambano; SERCA, bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático; TnI, troponina I; RyR, canais rionidínicos; O₂⁻, superóxido; ONOO⁻, peroxinitrito. Os canais de cálcio de membrana do tipo L estão representados em amarelo. Os símbolos + e - indicam estímulo e inibição de função, respectivamente.

Uma linhagem de camundongos transgênicos com superexpressão de nNOS, restrita ao coração, foi gerado por Burkard e colaboradores (BURKARD et al., 2007). Os autores reportaram aumento de aproximadamente 6 vezes na expressão de nNOS. O aumento da produção do NO derivado da nNOS estava associado com a diminuição da contratilidade cardíaca, provavelmente, devido à alterações no transporte de cálcio pelas membranas da célula cardíaca, já que nNOS foi co-precipitada com SERCA2. Além disso, o modelo de superexpressão de nNOS apresentou associação da enzima com caveolinas, nos experimentos de co-imunoprecipitação, sugerindo a ação da isoforma neuronal sobre o transporte de cálcio da membrana plasmática.

Três grupos independentes de pesquisadores geraram animais com nocaute do gene promotor da expressão de eNOS e os três grupos encontraram nestes animais hipertensão arterial, demonstrando que a isoforma endotelial de NOS é primordial para a manutenção do controle da resistência vascular (HUANG et al., 1995; SHESELY et al., 1996; GODECKE et al., 1998). Além disso, Shesely e colaboradores (SHESELY et al., 1996) encontraram nestes animais diminuição da frequência cardíaca e diminuição na atividade plasmática de renina. Barouch e colaboradores (BAROUCH et al., 2002), reportaram que os animais eNOS nocaute desenvolveram hipertrofia do ventrículo esquerdo à medida que envelheciam. Além disso, Mungrue e colaboradores (MUNGRUE et al., 2002b) encontraram resistência aumentada à insulina nos animais eNOS nocaute.

Além dos modelos onde o gene determinante de eNOS sofreu ablação, Brunner e colaboradores (BRUNNER et al., 2001) induziram a superexpressão de eNOS especificamente nos cardiomiócitos, conseguindo produzir uma linhagem onde a atividade de eNOS foi quase 100 vezes maior do que a de animais-controle. Os corações isolados destes animais transgênicos, apresentaram diminuição da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo, mas não demonstraram alteração na frequência cardíaca ou na resposta a agonistas adrenérgicos e colinérgicos (embora a PDVE fosse

sempre menor nos corações transgênicos).

Animais nocautes para o gene determinante de iNOS, foram gerados principalmente com o intuito de investigar a função da enzima no sistema imunológico (LAUBACH et al., 1995; MACMICKING et al., 1995; WEI et al., 1995). Estes animais não apresentaram alterações morfológicas distinguíveis dos animais-controle, em condições basais. No entanto, os animais iNOS nocaute eram mais susceptíveis a certas infecções e apresentaram maior mortalidade em um modelo experimental de sepse induzida. Contudo, durante a estimulação com LPS e consequente indução da expressão de iNOS, os animais iNOS nocaute não apresentaram hipotensão arterial, característica de animais com sepse induzida. Quanto à mortalidade induzida pelo LPS, Laubach e colaboradores (LAUBACH et al., 1995) não encontraram vantagens em animais iNOS nocaute, enquanto Wei e colaboradores (WEI et al., 1995) e MacMicking e colaboradores (MACMICKING et al., 1995) reportaram que animais iNOS nocaute eram mais resistentes.

Em corações isolados de animais iNOS nocaute onde a isquemia foi induzida, Xi e colaboradores (XI et al., 1999) não reportaram diferenças funcionais logo após a isquemia enquanto, Wildhirt e colaboradores (WILDHIRT et al., 1999), encontraram que a expressão da enzima 48 horas após o isquemia estava associada com disfunção reversível do coração.

Devido ao fato de iNOS ser expressa durante certas doenças cardíacas, como a insuficiência, é lógico pensar que a expressão desta enzima está relacionada com o desenvolvimento da patofisiologia das doenças cardiovasculares. Para estudar esta possibilidade, dois grupos de pesquisadores independentes, desenvolveram animais que superexpressam a enzima iNOS no coração (HEGER et al., 2002; MUNGRUE et al., 2002a).

Heger e colaboradores (HEGER et al., 2002), geraram animais que superexpressavam iNOS, através da colocação do clone de DNA para esta enzima sob

controle do promotor da cadeia pesada da miosina- α (α -MHC), enquanto Mungrue e colaboradores (MUNGRUE et al., 2002a), geraram um modelo de superexpressão de iNOS restrito ao coração porém, condicionado ao fator de transcrição responsivo à tetraciclina, podendo assim controlar o momento da expressão do gene determinante da expressão de iNOS. Embora a presença e atividade de iNOS tenha sido confirmada no coração destes animais, os resultados obtidos pelos dois grupos foram conflitantes.

Heger e colaboradores (HEGER et al., 2002) não reportaram a ocorrência de disfunção cardíaca severa em animais transgênicos, no entanto, os autores reportaram que animais com superexpressão de iNOS, apresentaram redução do débito cardíaco (medido por ecocardiografia), das pressões arteriais diastólica e média, além de redução da pressão sistólica em corações isolados. Por outro lado, Mungrue e colaboradores (MUNGRUE et al., 2002a) reportaram que a superexpressão de iNOS estava associada com o aumento da produção de peroxinitrito, aumento da fibrose no miocárdio, modesta hipertrofia e dilatação cardíaca e sobretudo aumento da mortalidade devido à arritmias. O tratamento com doxiciclina, e consequente supressão da expressão de iNOS, reverteu o fenótipo descrito.

Com base nos dados obtidos dos experimentos que utilizaram NO exógeno, bloqueadores do NO e dos modelos de animais com manipulação genética da NOS é possível afirmar que: o efeito do NO no coração depende da isoforma da enzima NOS de que foi originado e também da concentração produzida; as enzimas constitutivas da NOS produzem baixa concentração de NO, que tem ação em alvos próximos ao local de sua produção, sendo que eNOS encontra-se nas cavéolas da membrana celular interagindo com canais de cálcio voltagem-dependentes, receptores β_3 e possivelmente, receptores muscarínicos, já a isoforma neuronal, encontra-se localizada no retículo sarcoplasmático modulando a liberação e recaptção de cálcio, através do controle dos canais rionidínicos e de SERCA2; a isoforma induzível é expressa em condições patológicas, gerando alta concentração de NO, e sua expressão está

associada com a diminuição da contratilidade do cardiomiócito, diminuição da resposta β -adrenérgica e possivelmente, influencia as taxas de apoptose celular.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados para os experimentos, camundongos geneticamente modificados que sofreram ablação do gene (nocaute) responsável pela produção da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS – inducible nitric oxide synthase). Utilizou-se como abreviatura, para identificar estes animais, a sigla iNOSKO. Estes animais foram gerados segundo metodologia descrita por Laubach e colaboradores (LAUBACH et al., 1995) e estão comercialmente disponíveis para compra através do revendedor The Jackson Laboratory (JAX research system, Bar Harbour, Maine, EUA). Os animais foram adquiridos com 8 a 10 semanas de idade. Como animais-controle foram utilizados camundongos da linhagem C57 sem nenhuma alteração genética, sendo estes denominados de wild-type (WT).

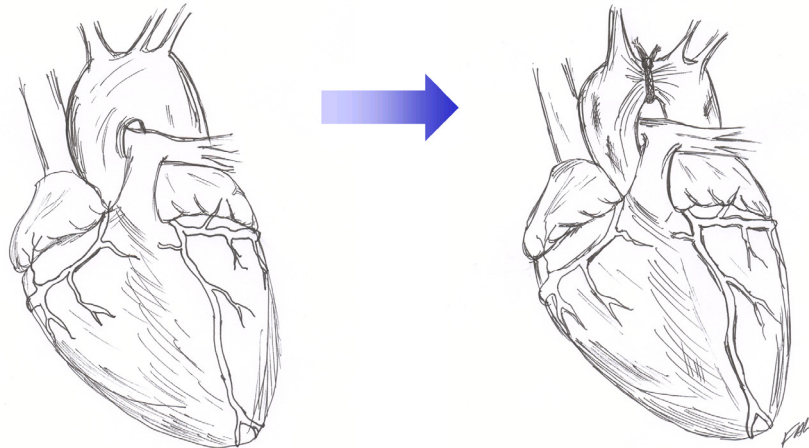
Todos os procedimentos realizados foram feitos de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de laboratório publicado pelo Instituto Nacional da Saúde dos Estados Unidos da América (U. S. National Health Institute – NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996) e foram aprovados pelo comitê institucional de cuidado animal da Universidade de Illinois em Chicago (UIC), onde os experimentos foram realizados.

3.2 CIRURGIA PARA DIMINUIÇÃO DO DIÂMETRO DA ARTÉRIA AORTA TORÁCICA

Animais WT e iNOSKO, com média de idade de 12 semanas, foram submetidos à cirurgia para diminuição (coarctação) do diâmetro da aorta torácica (AoB – Aortic Banding), que foi feita através da colocação de uma sutura entre os

ramos da artéria braquiocefálica e do tronco carotídeo comum esquerdo como ilustrado na figura 07.

FIGURA 07 - ILUSTRAÇÃO DA COARCTAÇÃO DA ARTÉRIA AORTA – AORTIC BANDING (AoB)



Dessa forma, existe um aumento da pós-carga imposta ao coração com geração de hipertensão e, a longo prazo, hipertrofia cardíaca e diminuição do débito cardíaco, simulando a insuficiência cardíaca hipertensiva. Os animais WT e iNOSKO submetidos à cirurgia foram denominados WT AoB e iNOSKO AoB, respectivamente. A metodologia utilizada para a realização da cirurgia foi modificada do protocolo descrito previamente por Roman e colaboradores (ROMAN et al., 2001). Os animais submetidos à cirurgia tiveram a função cardíaca avaliada previamente através de ecocardiografia para excluir animais que tivessem qualquer anormalidade como, por exemplo, aumento das dimensões das paredes ventriculares, demonstrando indício de hipertrofia.

Como será descrito adiante, animais iNOSKO apresentam função basal e medidas ecocardiográficas compatíveis com a normalidade, tendo sido raras as exclusões de animais de ambas as linhagens. Apenas 1 animal WT e 1 iNOSKO foram excluídos por apresentar disfunção cardíaca (baixos valores da fração de encurtamento

avaliada por ecocardiografia) e 1 animal WT foi excluído por apresentar insuficiência de válvulas pulmonar e aórtica.

Os camundongos foram inicialmente anestesiados por inalação de metoxiflurano, em uma câmara fechada, e intubados utilizando-se o protetor plástico (sleeve) de uma agulha de 18 gauge utilizada para cateterização arterial (angiocath). Após intubação, os animais foram posicionados na mesa cirúrgica, aquecida a 37°C para evitar hipotermia, e o tubo usado para intubação traqueal foi acoplado a um respirador mecânico que manteve a respiração artificial com volume corrente de 0,2 a 0,3 mL. Os animais foram mantidos sob anestesia, utilizando-se isoflurano na concentração de 1% a 2%.

Fez-se então uma incisão paraesternal esquerda, dissecação das camadas de tecido muscular e desarticulação da 2ª e 3ª articulações esterno-costais esquerda para poder ter acesso aos vasos da base cardíaca. Procedeu-se a dissecação do tecido adjacente ao arco da aorta e exposição da mesma no segmento compreendido entre o tronco carotídeo comum esquerdo e artéria braquiocefálica.

Para coarctação da aorta, foi utilizada uma agulha de 0,6 mm de diâmetro (gauge 25) com ponta romba e entordada para assemelhar-se ao formato do arco da aorta. A agulha foi posicionada sobre o arco da aorta e, em seguida, foi colocada uma sutura ao redor da agulha e da aorta, ocluindo momentaneamente o vaso. Feita a sutura, a agulha foi imediatamente retirada e o vaso, naquele segmento, passou a ter o diâmetro externo similar ao da agulha. O diâmetro do vaso, na posição da sutura, passou a ter aproximadamente 60% do diâmetro inicial.

Após tal procedimento, fez-se a sutura da musculatura torácica e inserção de um pequeno dreno para drenagem de sangue e ar aprisionados no tórax. O dreno foi retirado logo que se fez a sutura final da pele.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em ventilação mecânica por alguns minutos até que recuperassem a ventilação pulmonar espontânea e, após isto,

foram transferidos para gaiolas individuais que foram aquecidas durante a primeira noite.

Foi observado não ser necessário nenhum outro cuidado com estes animais no período pós-cirúrgico, exceto em dois casos, quando se fez o uso de creme antibiótico tópico devido à infecção da ferida cirúrgica.

Os animais foram sacrificados para a realização de experimentos, em média, depois de 2,5 meses e 6,0 meses da cirurgia, sendo estes períodos denominados de curto prazo e longo prazo após a cirurgia, respectivamente.

3.3 ECOCARDIOGRAFIA TRANSTORÁCICA

A função cardíaca dos animais utilizados nos experimentos foi avaliada através de ecocardiografia transtorácica, realizada por pesquisador treinado sem que este fosse informado das características genéticas dos animais.

Todos os animais foram avaliados antes do procedimento cirúrgico descrito acima e antes de serem sacrificados. Eventuais ecocardiogramas foram obtidos no período compreendido entre a cirurgia e o sacrifício para avaliar a progressão da hipertrofia e da disfunção ventricular ou para determinar a necessidade de antecipar o sacrifício devido a alguma disfunção cardíaca mais severa como, por exemplo, arritmias.

Animais-controle, WT e iNOSKO, sem sofrerem intervenção cirúrgica, também foram submetidos ao exame ecocardiográfico para critério de comparação com os animais com coarctação da aorta. Os animais foram anestesiados, intubados e mantidos sob anestesia utilizando-se os mesmos métodos descritos para realização da cirurgia de coarctação da aorta (item 3.2).

A metodologia utilizada para realização da ecocardiografia foi a mesma descrita por Urboniene e colaboradores (URBONIENE et al., 2005). A ecocardiografia transtorácica bidimensional (em modo M) e Doppler pulsátil foram realizados com um

transdutor de arranjo linear de 15 MHz acoplado ao sistema de processamento de imagens Sequoia C256. O transdutor foi acoplado utilizando-se uma camada fina de gel de acoplamento aplicado no hemitórax esquerdo dos animais, previamente tricotomizados e respirando artificialmente. Imagens do ventrículo esquerdo (VE), ao nível dos músculos papilares (MMPP), foram obtidas a partir do eixo paraesternal transversal. A espessura do septo interventricular (SIV), da parede posterior do ventrículo esquerdo (PPVE) e as dimensões internas do ventrículo esquerdo, durante a sístole (DSVE) e diástole (DDVE), foram obtidas segundo o método adotado pela Sociedade Americana de Ecocardiografia.

A função do VE foi estimada pela fração de encurtamento (FE), calculada pela razão: $[(\text{dimensão diastólica do VE} - \text{dimensão sistólica do VE}) / \text{dimensão diastólica do VE}] \times 100$. Outro índice da função ventricular esquerda adotada foi a velocidade média de encurtamento circunferencial (Vcf) que é obtida pela razão $FE / LVET$, onde LVET é igual ao tempo de ejeção do VE, calculado a partir dos dados do ecodoppler durante as mensurações de fluxo na aorta ascendente.

O fluxo através da valva mitral foi avaliado pelo plano de corte apical de 4 câmaras, utilizando-se Doppler pulsátil (7MHz). Dois parâmetros da função diastólica do ventrículo esquerdo foram avaliadas: a razão (E/A) entre a fase de enchimento rápido do VE (E) e a fase de contração atrial (A); o tempo de relaxamento isovolumétrico do VE (IVRT), que foi mensurado desde o fechamento da válvula aórtica até a abertura da válvula mitral.

3.4 EXPERIMENTOS UTILIZANDO MÚSCULO PAPILAR ISOLADO DO VENTRÍCULO ESQUERDO E CÁLCULO DO ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA

Estudos funcionais com músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo foram realizados para avaliação da contratilidade do miocárdio e da sensibilidade β -

adrenérgica, utilizando-se isoproterenol, na presença ou ausência de bloqueador de iNOS (1400W). Foram utilizados para estes experimentos os animais submetidos à coarctação da aorta sacrificados a curto e a longo prazo após a cirurgia. Como controles, foram utilizados animais WT e iNOSKO sem cirurgia e com média de idade equivalente aos animais submetidos à coarctação da aorta.

Para estes experimentos, os camundongos foram injetados com heparina sódica na dose de 5 U/g trinta minutos antes de serem sacrificados. Os animais foram anestesiados com a dose de 22 μ L por grama de peso corporal do anestésico tri-bromoetanol diluído a 2% em água. O tórax foi rapidamente aberto e o coração retirado e lavado em solução para dissecação (descrita abaixo) na temperatura ambiente, sendo posteriormente pesado e colocado em um recipiente para dissecação sob microscópio ótico. Imediatamente foi feita a canulação da artéria aorta e o coração foi perfundido retrogradamente (Langendorff) com a solução de dissecação Krebs–Hanseleit (K-H) na seguinte composição em mM : NaCl 118,5; KCl 15,0; MgSO₄ 1,2; NaH₂PO₄ 2,0; NaHCO₃ 21,0; D-Glucose 10,0 e CaCl₂ 0,4. A solução foi previamente e continuamente borbulhada com 95% de O₂ e 5% de CO₂, tendo o pH corrigido para 7,4.

Após canulada a aorta, o ventrículo direito foi aberto através de acesso pelo tronco arterial pulmonar e, em seguida, fez-se o acesso da câmara esquerda através de corte longitudinal na linha média do septo interventricular. O músculo papilar anterior do ventrículo esquerdo foi retirado junto com uma porção da válvula bicúspide e parte do miocárdio adjacente à base do músculo.

O músculo foi transferido para uma câmara de 2 ml e teve uma das extremidades presa a um transdutor de força (FORT – 10, Transduction Laboratories Co.). A outra extremidade foi presa a um gancho que estava acoplado a um pequeno motor (Muscle Lever System Motor, Aurora Scientific Inc.) que serviu para manipular o comprimento do músculo.

O músculo foi então banhado em solução de perfusão K-H na seguinte composição em mM: NaCl 118,5 ; KCl 5,0; MgSO₄ 1,2, NaH₂PO₄ 2,0; NaHCO₃ 21,0; D-Glucose 10,0 e CaCl₂ 0,4; borbulhada continuamente com 95% de O₂ e 5% de CO₂ tendo o pH igual a 7,4. A preparação foi continuamente perfundida com a solução K-H por meio de uma bomba peristáltica. Através de um sistema de controle de temperatura (Isotemp 1006S, Fischer Sci.) acoplado aos recipientes e tubos por onde a solução circulava, a temperatura pôde ser mantida constante durante todo o experimento. A temperatura escolhida para os experimentos foi de 22°C. Para confirmação da temperatura durante os experimentos foi utilizado um termômetro digital (Digi-Sense, Cole Parmer Inc.), sendo que o eletrodo para mensuração da temperatura foi imerso na solução de perfusão próximo ao músculo (a uma distância de aproximadamente 5mm).

A concentração de cálcio da solução K-H foi gradualmente aumentada até atingir 1mM. O músculo foi eletro-estimulado através de ondas quadráticas com pulsos de 5 ms de duração e voltagem 20% acima do limiar de excitação do músculo. A frequência de 0,2 Hz foi utilizada inicialmente para que o músculo atingisse contrações estáveis.

Depois de aproximadamente 35 minutos, intervalo de tempo suficiente para que as contrações do músculo se tornassem estáveis em um determinado valor de força desenvolvida, o músculo foi progressivamente estirado até determinar-se o valor máximo de força desenvolvida (o que corresponde ao pico da relação comprimento-tensão). Uma vez determinada a relação comprimento-tensão, o músculo foi imediatamente relaxado até obter-se 90% do valor máximo de força produzida.

A frequência imposta ao músculo foi então alterada para 2,0 Hz. Esperou-se um intervalo de tempo de 10 minutos para que o músculo adquirisse contrações estáveis nesta frequência. Os parâmetros de contratilidade medidos a 2,0 Hz, antes da infusão de isoproterenol, foram usados como base para normalização dos resultados. Os músculos foram em seguida perfundidos com o agonista β -adrenérgico

isoproterenol (ISO) nas seguintes concentrações em nM: 2,5; 5; 10; 100 e 1000.

Para o bloqueio da atividade enzimática de iNOS, o bloqueador de iNOS 1400W (10 μ M, Calbiochem) foi utilizado. Os músculos foram pré-incubados com 1400W, por 25 minutos, na frequência de 0,2Hz; e 15 minutos durante estimulação a 2,0Hz. Além disso, o bloqueador de iNOS estava presente na solução durante a perfusão de ISO.

Foram registrados durante os experimentos: a força desenvolvida pelos músculos; os valores para o tempo de ativação até o pico da contração (TP), que se refere ao intervalo de tempo transcorrido desde o início da contração até o valor máximo de força produzida; o tempo de relaxamento muscular desde o pico de contração até 50% do valor de pico de produção de força, representado pelo símbolo TR₅₀ e expresso em milésimos de segundo (ms).

Para o registro dos dados foi utilizado o programa LabVIEW versão 4.0.1.

Para o cálculo do índice de hipertrofia (IH) utilizou-se como parâmetro a razão da massa cardíaca (em miligramas) dividida pela massa corporal (em gramas). A massa cardíaca foi obtida imediatamente após a retirada do coração da cavidade torácica e após ser feito o devido debridamento dos tecidos adjacentes ao coração (por exemplo o timo, o tecido gorduroso e as porções dos vasos da base, à exceção da aorta que foi utilizada para a perfusão retrógrada).

3.5 MENSURAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA *IN SITU*

Para avaliação da função cardíaca *in situ* foram realizadas mensurações através do uso de transdutor de volume e pressão inserido no interior da câmara ventricular esquerda.

Foram feitas medidas do volume e pressão ventricular durante o estado basal e durante diminuição do retorno venoso, feito através do fechamento temporário da veia cava inferior.

Foram utilizados para os experimentos animais submetidos à cirurgia avaliados a longo prazo e animais-controle com a mesma média de idade.

O procedimento foi realizado segundo método descrito por Goldspink e colaboradores (GOLDSPINK et al., 2004). O animal foi inicialmente anestesiado por inalação de metoxiflurano e, em seguida, intubado e submetido à ventilação mecânica sob anestesia, utilizando-se isoflurano (1% a 2%) misturado com oxigênio através de um vaporizador. O grau de anestesia foi avaliado através do reflexo podal após estimulação da dor pelo pinçamento das patas traseiras.

Através de uma incisão no pescoço, foi exposta a artéria carótida por onde o transdutor foi inserido até chegar ao ventrículo esquerdo. Para a mensuração de volume e pressão, foi utilizado um cateter Millar 1.4F SPR-839 (Millar instruments, Houston, Texas) que é composto de quatro eletrodos de condutância e um micromanômetro. Foi usado para aquisição dos dados o sistema PowerLab e para o registro e análise dos dados, foi utilizando o software Chart for Windows.

Após a inserção do transdutor, foram inicialmente registrados os valores basais de contratilidade cardíaca. Através de um acesso na cavidade abdominal, paralelo à inserção do músculo diafragma, foi realizada a dissecação da veia cava inferior no seu segmento abdominal. Para a diminuição temporária do retorno venoso foi feita uma oclusão transiente da veia cava inferior. A diminuição do retorno venoso e conseqüentemente da pré-carga cardíaca gerou o registro de uma série de curvas da relação volume-pressão.

Através dos valores obtidos de pressão e volume foram calculados os parâmetros de função cardíaca: frequência cardíaca (FR); derivada de pressão pelo tempo (dp/dt), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE); pressão diastólica do ventrículo esquerdo (PDVE); relação volume-pressão sistólica final (ESPVR), trabalho cardíaco pré-carga (PRSW) e a inclinação da reta da relação volume pressão diastólica final (E_{max}).

3.6 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA ATRAVÉS DE REAÇÃO DE CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR)

A análise da expressão gênica foi realizada através de RT-PCR quantitativo utilizando-se SYBR green, em um termociclador LightCycler (Roche Diagnostics), como descrito previamente por Alden e colaboradores (ALDEN et al., 2002)

Foram utilizadas amostras provenientes dos animais submetidos à cirurgia de coarctação aórtica e de animais-controle com idade equivalente. Para estes experimentos, uma porção do ápice do coração foi retirada após a dissecação do músculo papilar esquerdo, como descrito no item 3.4. O ápice foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e guardado em um congelador na temperatura de -80°C.

O RNA foi extraído através de homogenização das amostras em TRIzol (Invitrogen) e subsequentemente separado utilizando-se clorofórmio seguido de isopropanol.

Foi inicialmente feita a reação para obtenção do cDNA, utilizando-se a enzima transcriptase reversa em um ciclo de 15 minutos na temperatura de 55°C. À seguir, foi feita a ativação da Taq DNA polimerase e consequente inativação da transcriptase reversa através de um único ciclo de 15 minutos na temperatura de 95°C. O cDNA foi amplificado durante 40 ciclos de PCR da seguinte maneira: 95°C durante 10s, 55°C durante 10s, 70°C durante 10s e um ciclo de 20s na temperatura de 80-89 °C para aquisição de sinal fluorescente.

Para quantificação do produto obtido, a derivada calculada para a fase linear de amplificação foi comparada com curvas padrões. O valor do produto amplificado foi então normalizado para o valor da expressão da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) obtido na mesma amostra.

Foi quantificada a expressão dos genes determinantes da cadeia pesada da miosina- β (β -MHC), fator natriurético atrial (FNA), bomba de cálcio do retículo

sarcoplasmático (SERCA2) e fosfolambano (PLB).

As sequências iniciadoras (primers) utilizadas para a amplificação foram construídas para regiões próximas da extremidade 3', no gene de interesse, segundo a sequência gênica descrita abaixo:

QUADRO 01 - SEQUÊNCIA GÊNICA DO PRIMERS UTILIZADOS PARA RT-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer	Numero de acesso Genebank
β -MHC	AAGGTGAAGGCCTACAAGCG	TTCTGCTTCCACCTAAAGGGC	M74752
FNA	TGGAGGAGAAGATGCCGGTA	CGAAGCAGCTGGATCTTCGTAG	K02781
SERCA2	GACATTGAAACATGCTTTCTAATGGGC	TGAACTGACGCTGAGCACTTTATTACG	AJ223584
PLB	AAGTGCAATACCTCACTCG	GATCAGCAGCAGACATATC	NM_023129
GADPH	TATGACAATGAATACGGCT	CTCCTGTTATTATGGGGG	M32599

3.7 IMMUNOBLOTTING PARA iNOS, eNOS, fosfo-eNOS, SERCA2 E FOSFOLAMBANO

Para este procedimento, amostras dos ventrículos cardíacos foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até a homogeneização.

As amostras foram homogeneizadas na solução de seguinte composição: 50mM Tris-HCl (pH 7,4); 1% NP-40; 0,25% deoxicolato de sódio; 150mM NaCl; 1mM EGTA; 1mM PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ de cada composto, aprotinina, leupeptina e pepstatina; 1mM vanadato de sódio (Na_3VO_4) e 1mM NaF.

A seguir, as amostras foram centrifugadas à 10.000 rpm, durante 10 minutos, sendo o sobrenadante separado para análise das proteínas em questão. A concentração de proteínas na amostra foi mensurada pelo método de Bradford e quando a separação das proteínas, através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), não era realizada no mesmo momento, as amostras eram então estocadas no congelador na temperatura de -80°C .

As proteínas foram separadas pelo método SDS-PAGE utilizando-se géis na concentração de 8% de Bis-Acrilamida (1:29) para os experimentos de

immunoblotting para eNOS e iNOS, 15% Bis-Acrilamida (1:29) para PLB e 8% Bis-Acrilamida (1:29) para SERCA2.

As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose de 0,22 μ m (0,05 μ m para transferência de PLB) pelo método semi-seco (eNOS, SERCA) em um tampão contendo: 48mM Tris base; 39 mM glicina; 0,037% SDS e 20% metanol ou pelo método convencional, dentro de tanque de transferência (iNOS, PLB), em um tampão contendo: 25mM Tris base; 192mM Glicina; 0.1% SDS e 20% Metanol.

As membranas foram bloqueadas com leite desnatado diluído a 5% no tampão fosfato acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e, em seguida, incubadas com o anticorpo primário por diferentes períodos de tempo, dependendo da proteína em questão, como será detalhado abaixo. Feita a incubação no anticorpo primário, as membranas foram incubadas no anticorpo secundário apropriado conjugado com a enzima peroxidase. As membranas foram reveladas pela reação de quimioluminescência (ECL plus, Amersham) seguida de exposição das membranas a filmes de raio X. Entre e após a incubação com anticorpos, as membranas foram lavadas em tampão PBS-T por 3 vezes de 10 minutos.

Os filmes de raio-x foram revelados e o sinal obtido foi calculado através de densitometria utilizando-se o scanner Personal densitometry (Amersham). Para a quantificação de PLB e SERCA2, os filmes foram digitalizados em scanner de mesa (HP scanjet) e analisados utilizando-se o software ImageJ (NIH).

Para a confirmação da quantidade de proteínas carregadas em cada poço dos géis, as membranas foram posteriormente coradas com a solução de Ponceau.

Para a determinação dos níveis de fosforilação da enzima eNOS no sítio de fosforilação localizado na treonina 495, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-fosfo-eNOS durante uma noite a 4°C (1:1000, Upstate). Após a visualização das bandas nos filmes de raio X, os anticorpos ligados à membrana foram lavados (stripping) utilizando-se solução disponível comercialmente (Stripping buffer,

PIERCE). As mesmas membranas foram então incubadas em anticorpo contra eNOS (1:1000, Transduction Laboratories), por 2 horas na temperatura ambiente, para determinação da expressão desta proteína. Dessa forma, pôde-se corrigir o sinal obtido para a fosforilação de eNOS pela quantidade total de eNOS expressa na mesma amostra.

Para detecção de iNOS, foi feita incubação da membrana em anticorpo policlonal proveniente da empresa Cayman Chemicals na concentração de 1:500 durante uma noite na temperatura de 4°C.

Para detecção de SERCA2 e PLB, a incubação da membrana foi feita com anticorpos anti-SERCA2 (1:2000, ABR) e anti-PLB (1:5000, Upstate), respectivamente; durante 2 horas e em temperatura ambiente.

Para o cálculo da expressão das proteínas, os valores obtidos pela densitometria foram normalizados para uma amostra proveniente de animais WT, carregada no primeiro poço do gel seguinte ao marcador de massa molecular. Para a quantificação de iNOS entre animais WT AoB avaliados a curto e a longo prazo a expressão da enzima foi normalizada para a expressão da actina sarcomérica (anticorpo monoclonal 1:10,000, Sigma), avaliada na mesma membrana de nitrocelulose.

3.8 HISTOLOGIA E IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para avaliação histológica do grau de hipertrofia, presença de tecido cicatricial e anormalidades do tecido muscular cardíaco, foram feitos cortes histológicos e coloração com hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson. Para determinação da expressão e localização de iNOS, foi realizada imunofluorescência para iNOS nos cortes histológicos obtidos.

Para estes experimentos, os animais foram heparinizados (5000U/Kg, injeção intraperitoneal) 30 minutos antes do sacrifício. Procedeu-se anestesia como descrito

para os experimentos com músculo papilar (item 3.4) e o coração foi retirado do tórax e perfundido retrogradamente com salina (3 mL) e, logo após, com solução de fixação Methacarn (5 mL). Após a perfusão, foram feitas secções partindo-se do ápice cardíaco em direção à base dividindo o coração em 4 porções. Os cortes foram colocados em cassetes fenestrados e mergulhados por 30 minutos em solução de fixação. Feito isso, os cassetes foram submersos em etanol para desidratação, seguida de 2 trocas (1 hora cada) de xilol e embebidos em parafina aquecida à 60°C por 30 minutos. Os cassetes foram então transferidos para uma segunda solução de parafina que foi deixada à temperatura ambiente para solidificação. Foram feitos cortes de 7 µm das amostras e estas foram montadas em lâminas de vidro.

As colorações utilizadas foram a hematoxilina-eosina e o tricrômio de Masson, seguindo protocolos convencionais.

Para imunofluorescência, foi feita a desparafinização e rehidratação da amostra seguida de incubação, durante 12 minutos (na temperatura de 90°C), em solução para exposição do epítipo de ligação na proteína iNOS (BD retrieval solution). Após retorno à temperatura ambiente, os lâminas foram bloqueadas com a combinação de 5% de plasma de cabra e 20% do bloqueador avidina (Vector Laboratories) diluídos em PBS durante 25 minutos.

Foi então realizada a incubação em anticorpo primário para iNOS (1:50, Cayman) combinado com 20% de bloqueador biotina (Vector Laboratories) durante uma noite à 4°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com PBS (3 vezes de 5 minutos) e incubadas durante 1 hora na temperatura ambiente em anticorpo secundário anti-IgG de coelho (1:1000) conjugado com 20% de biotina (Vector Laboratories) diluídos em PBS.

Para marcação de iNOS, foi usado o corante fluorescente (fluorescência vermelha) Alexa Fluor 594 conjugado com streptavidina (1:1000, Molecular Probes) diluído em PBS, sendo o tempo de incubação de 20 minutos na temperatura ambiente.

Para melhorar o contraste e diminuir a imagem de fundo, foi feita a coloração dos cortes com solução de Sudan (0,1 % Sudan Black diluído em etanol a 70%) por 30 minutos. Após lavagem do corante excedente com PBS, as lâminas foram montadas utilizando-se Vectashield + DAPI (Vector Laboratories). Esta é uma solução para montagem de lâminas para imunofluorescência conjugada com o composto DAPI, que cora os núcleos celulares emitindo fluorescência azul. Os cortes foram cobertos com lamínula de vidro e deixados em câmara úmida durante à noite (na temperatura de 4°C). No dia seguinte, as bordas das lamínulas de vidro foram coladas utilizando-se esmalte incolor para unhas.

A fluorescência foi visualizada em microscópio confocal (Zeiss LSM 510), utilizando-se os filtros apropriados. As imagens foram digitalizadas e analisadas com a utilização do software Zeiss LSM Image Browser versão 2.30.011.

Como controle negativo, foram utilizados animais iNOSKO AoB. Como controle positivo, animais WT foram injetados com lipopolissacarídeo (LPS, Sigma) na dose de 2,5 mg/Kg de peso corporal através de injeção intraperitoneal. Os animais foram sacrificados após 2 dias e os corações fixados seguindo a mesma metodologia descrita nesta seção.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

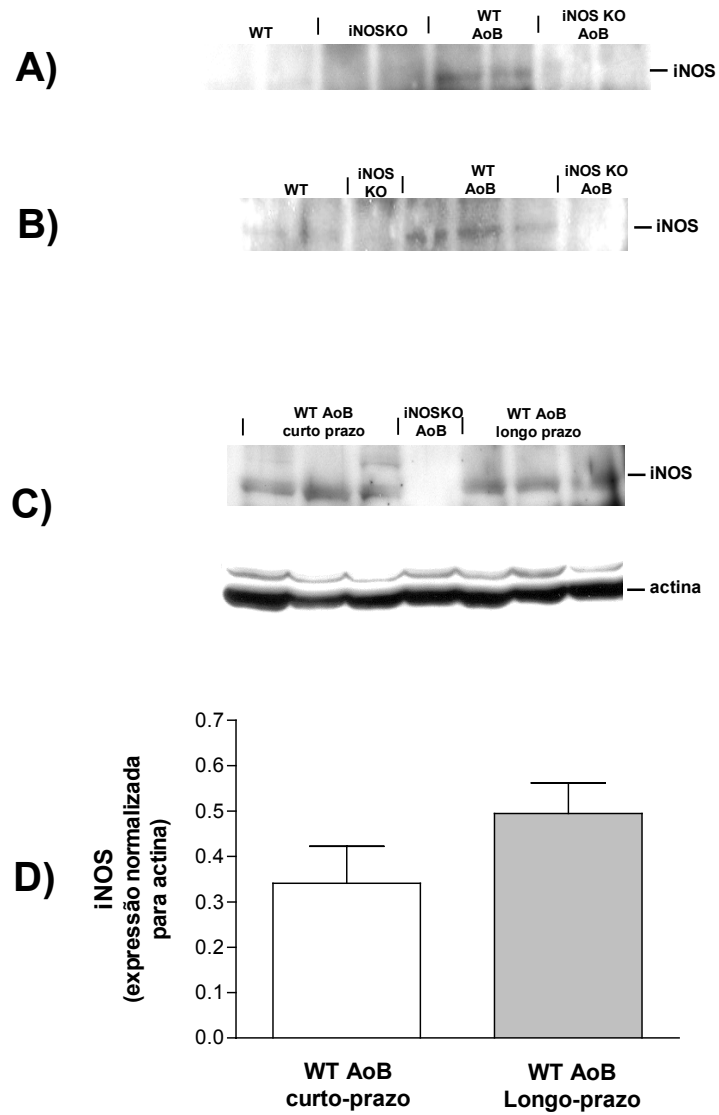
Os resultados apresentados representam a média \pm o erro padrão da medida. A significância das diferenças entre os grupos foi medida pelo teste de análise de variância ANOVA, utilizando-se, como pós-teste, o teste de Student-Newman-Keuls. Para a comparação da expressão protéica de iNOS entre os grupos de animais WT AoB avaliados a curto e a longo prazo, foi utilizado o teste t. O valor de $P < 0,05$ foi aplicado como critério de significância.

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO DE iNOS APÓS A COARCTAÇÃO DA AORTA

A expressão de iNOS foi avaliada por immunoblotting em amostras de ventrículos de corações perfundidos retrogradamente (figura 08). Animais WT AoB expressaram a enzima iNOS nas amostras de ventrículo cardíaco, representada pela banda de 130 kDa nos experimentos de immunoblotting. Animais WT ou não expressam iNOS ou apresentam baixa expressão caracterizada como uma banda de baixa densidade. Não foi detectada expressão de iNOS em animais-nocaute, como era esperado. Todos os animais WT AoB testados apresentaram expressão de iNOS. Animais WT AoB, avaliados a curto e a longo prazo, não apresentaram diferenças na expressão de iNOS. A expressão de iNOS normalizada pela expressão de actina sarcomérica foi igual a $0,341 \pm 0,08$ (n=6) no grupo WT AoB avaliado a curto prazo, e $0,494 \pm 0,07$ (n=6) no grupo WT AoB avaliado a longo prazo (P = 0,177).

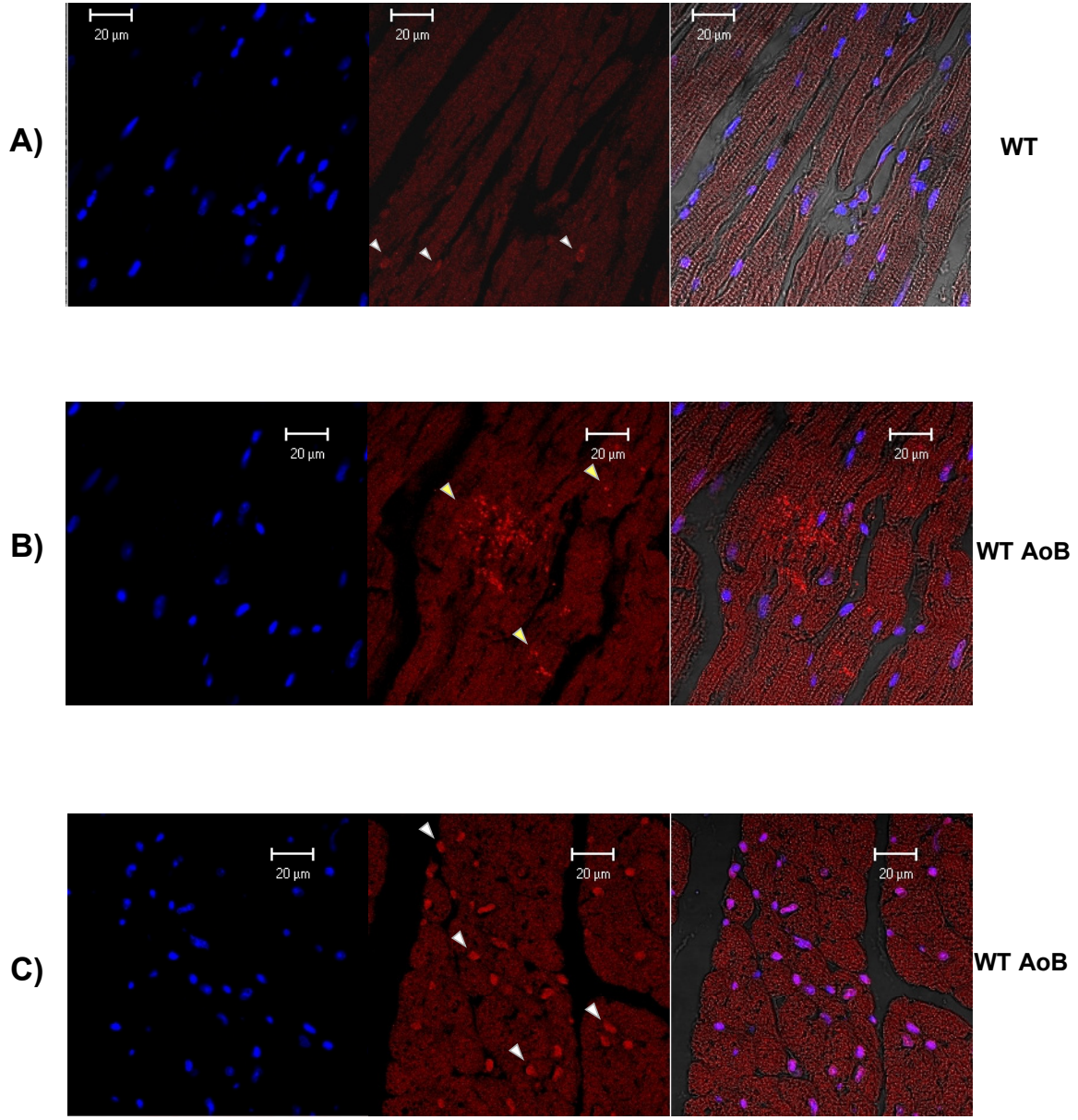
FIGURA 08 - IMMUNOBLOTTING PARA DETECÇÃO DE INOS

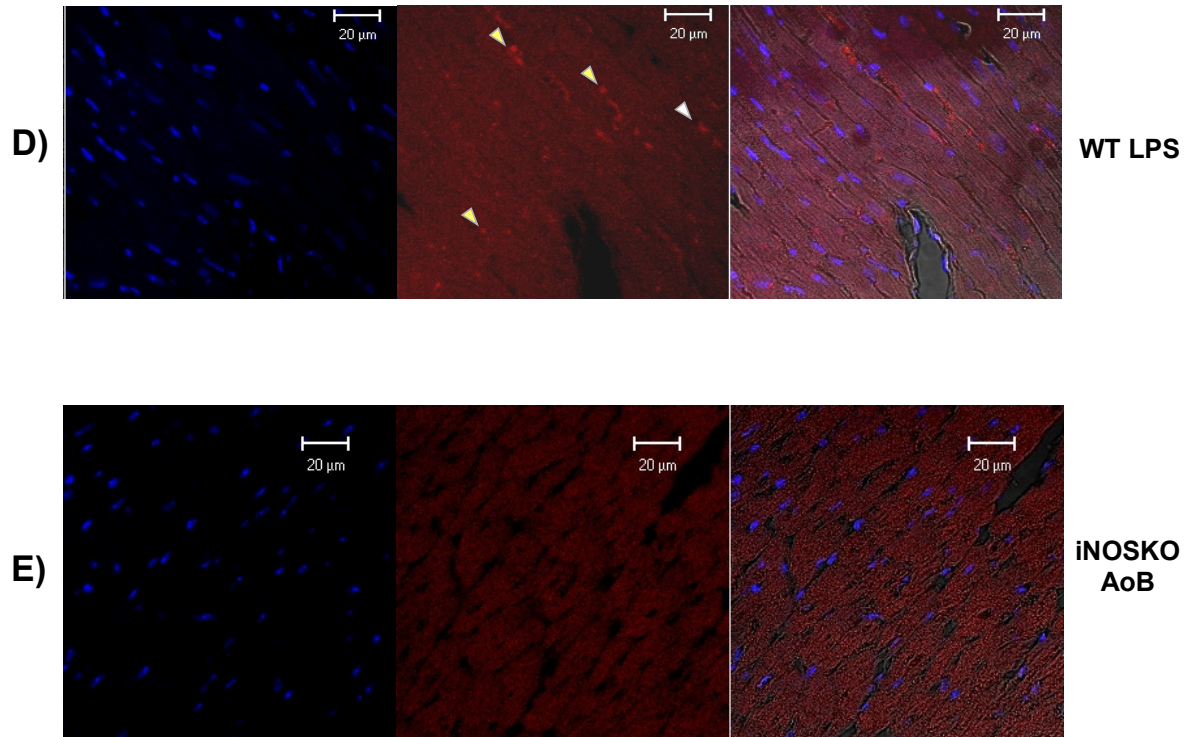


Nota: Amostras provenientes de animais, após coarctação da aorta, avaliados a curto prazo (A) e a longo prazo (B) e controles pareados por idade. C) Representa immunoblotting para iNOS e actina sarcomérica em amostras de animais WT AoB avaliados a curto prazo e a longo prazo. C) Expressão de iNOS normalizada pela expressão de actina.

Para confirmar a expressão e localizar iNOS no tecido cardíaco foi utilizada a técnica de imunofluorescência (figura 09 A-E) em amostras obtidas de animais submetidos à coarctação da aorta e sacrificados a longo prazo, após a cirurgia, além de amostras de animais-controle pareados por idade e de animais WT injetados com LPS, usados como controle positivo. Como descrito anteriormente, a expressão de iNOS foi quase inexistente em animais WT. Alguns cortes demonstraram baixa fluorescência para iNOS, como o corte representado na figura 09-A, onde três núcleos parecem estar corados para iNOS. Animais WT AoB apresentam expressão de iNOS no tecido cardíaco como demonstrado na figura 09B-C. A expressão de iNOS foi identificada no citoplasma de alguns cardiomiócitos figura 09B e co-localizada no núcleo de algumas células, como pode ser observado na figura 09C, no quadro da direita, que representa a superimposição das fluorescências vermelha (iNOS) e azul (núcleos). Como controle positivo, animais WT foram injetados com LPS para estimular a expressão de iNOS. Estes animais expressaram iNOS no coração como pode ser observado na figura 09D. Embora nestes animais alguns núcleos pareçam estar corados para iNOS, a maior parte da fluorescência estava localizada no citoplasma dos cardiomiócitos e nas células endoteliais dos vasos sanguíneos. Como controle negativo, foram utilizados animais iNOSKO e animais iNOSKO AoB. Não foi detectada a expressão de iNOS nestes animais como pode ser observado na figura 09E, que traz um exemplo de imunofluorescência em um animal iNOSKO AoB.

FIGURA 09 - IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DE INOS





Nota: Cortes histológicos provenientes de animal WT (A); animal WT AoB (B-C); animal WT, injetado com LPS (D) e animal iNOSKO AoB (E). A proteína iNOS foi marcada com o corante fluorescente Alexa Fluor 594, de fluorescência vermelha, e os núcleos celulares estão marcados com o corante de fluorescência azul DAPI. Os quadrados da direita nas figuras A) a E) representam a imagem sobreposta da fluorescência vermelha e azul. As setas brancas representam iNOS expressa em núcleos e as setas amarelas representam iNOS expressa no citoplasma. A magnificação usada foi de 63x.

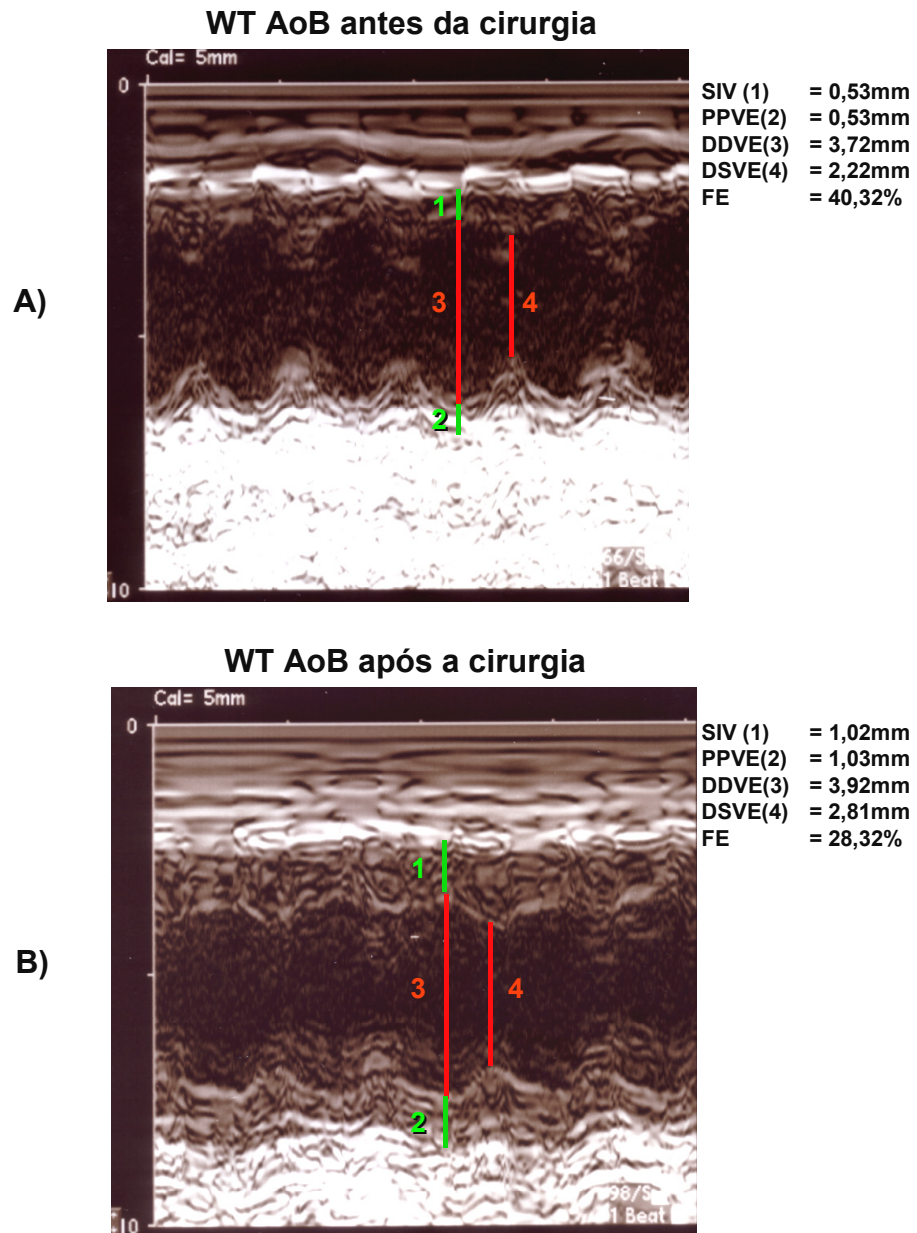
4.2 ECOCARDIOGRAFIA TRANSTORÁCICA E ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA

A ecocardiografia transtorácica foi utilizada para a quantificação do grau de hipertrofia ventricular cardíaca e para avaliar o desenvolvimento da disfunção cardíaca após a cirurgia de coarctação da aorta.

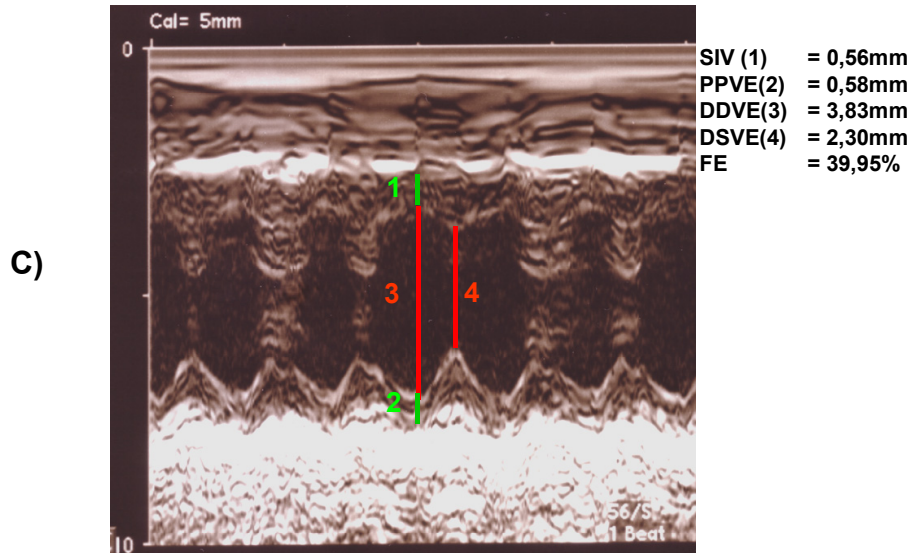
A figura 10 (A-B) apresenta ecocardiogramas de um animal WT submetido à coarctação da artéria aorta. Em A) está representada o ecocardiograma antes da cirurgia, e em B) o ecocardiograma do mesmo animal antes do sacrifício. Como pode ser observado, existe hipertrofia das paredes ventriculares com aumento da dimensão do septo ventricular (SIV, número 1 nas imagens) de 0,53mm para 1,02mm e aumento da parede posterior do ventrículo esquerdo (PPVE, número 2 nas imagens) de 0,53mm para 1,03mm. Particularmente, este animal apresentou aumento da dimensão diastólica do ventrículo esquerdo (DDVE, número 3 nas imagens) de 3,72mm para 3,92mm e disfunção sistólica representada pela diminuição da fração de ejeção de 40,32% para 28,32%.

A figura 10 (C-D) apresenta ecocardiogramas de um animal iNOSKO AoB. Estão representados ecocardiogramas antes (C) e após (D) o procedimento cirúrgico. Como pode ser observado, existe hipertrofia ventricular esquerda, com aumento da SIV de 0,56mm para 1,18mm, e da PPVE, de 0,58mm para 1,04mm. A dimensão diastólica do ventrículo esquerdo aumentou de 3,83mm para 4,06mm. A variação na fração de ejeção neste animal foi menor do que o animal WT AoB, apresentado na mesma figura, diminuindo de 39,95% para 31,53% .

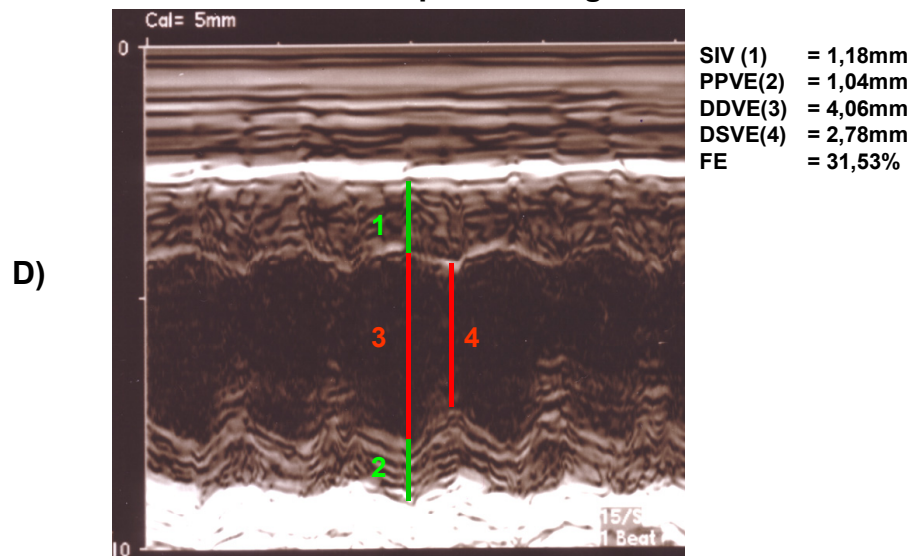
FIGURA 10 - EOCARDIOGRAMAS DE VENTRÍCULO ESQUERDO DE ANIMAIS WT AoB E iNOSKO AoB ANTES E APÓS A CIRURGIA.



iNOSKO AoB antes da cirurgia



iNOSKO AoB após a cirurgia



Nota: A) Ecocardiograma de animal WT AoB antes da cirurgia e em B) ecocardiograma após cirurgia. Em C) ecocardiograma de animal iNOSKO AoB antes da cirurgia e em D) após a cirurgia. Os números que aparecem no canto superior direito das figuras representam as medidas da: (1) espessura do septo interventricular; (2) espessura da parede posterior do VE; (3) diâmetro diastólico do VE e (4) diâmetro sistólico do VE. Os valores de fração de encurtamento (FE) também estão incluídos no canto superior direito das imagens.

Os resultados obtidos na avaliação ecocardiográfica dos grupos experimentais estão apresentados nas tabelas 01 e 02. A tabela 01 apresenta os resultados obtidos no grupo de animais sacrificados a curto prazo, após a cirurgia, e a tabela 02 apresenta os resultados obtidos no grupo de animais sacrificados a longo prazo, após a cirurgia.

Em animais sacrificados a curto prazo, houve significativa hipertrofia das paredes do ventrículo esquerdo (PPVE) e do septo interventricular (SIV) em ambos os grupos WT AoB e iNOSKO AoB quando comparados aos animais-controle de idade equivalente. Contudo, não houve diferença nestas medidas entre os animais WT AoB e iNOSKO AoB. Um outro índice de hipertrofia (IH) avaliado foi a razão entre o peso cardíaco e o peso corporal. O IH não diferiu entre os animais WT AoB e iNOSKO AoB embora esta medida tenha sido significativamente maior quando estes dois grupos foram comparados aos grupos WT e iNOSKO.

Quanto às dimensões da cavidade do ventrículo esquerdo, a curto prazo após a coarctação da aorta, não houve aumento significativo no DDVE, porém houve tendência a um aumento nas medida do DSVE, sendo que, quando o grupo WT AoB foi comparado ao grupo iNOSKO, o valor do DSVE foi estatisticamente maior. Nos animais WT AoB e iNOSKO AoB sacrificados a curto prazo, houve redução na contratilidade cardíaca representada pela diminuição estatisticamente significativa dos valores de FE e de Vcf quando comparado aos animais WT e iNOSKO. A diminuição na contratilidade cardíaca em animais WT AoB tendeu a ser mais acentuada comparada aos animais iNOSKO AoB. Os valores de P, quando os animais WT AoB foram comparados aos animais iNOSKO AoB, foram menores do que 0,1 para FE e igual a 0,07 para a velocidade de encurtamento circunferencial (Vcf).

Os parâmetros de relaxamento avaliados pela ecocardiografia, o tempo de relaxamento isovolumétrico do VE (IVRT) e a relação E/A, apresentaram valores similares nos quatro grupos experimentais.

Animais WT AoB e iNOSKO AoB, avaliados a longo prazo após a coarctação da aorta, apresentaram hipertrofia de VE evidenciada pelo aumento das medidas de SIV, PPVE e IH quando comparados aos animais-controle. Contudo, não houve diferença nestas medidas entre os animais WT AoB e iNOSKO AoB. A medida do diâmetro diastólico do VE não diferiu entre os grupos enquanto que a medida do DSVE foi significativamente maior nos animais WT AoB quando comparado aos controles e também aos animais iNOS KO AoB.

Animais AoB, avaliados a longo prazo, apresentaram progressão da disfunção cardíaca, representada pelos menores valores da FE e Vcf quando comparado aos valores apresentados por animais AoB avaliados a curto prazo. Os valores da FE e Vcf foram significativamente menores nos animais AoB comparado aos animais-controle. Novamente, observou-se que os animais WT AoB apresentaram valores de FE que tenderam a ser menores quando comparados aos animais iNOSKO AoB, sendo que o valor de P, calculado para esta medida, foi igual a 0,057, valor este muito próximo da significância estatística.

Os parâmetros de relaxamento avaliados por ecocardiografia não foram estatisticamente diferentes entre os quatro grupos experimentais.

Em relação aos animais usados como controle para ecocardiografia, não foi observada diferença nas medidas ecocardiográficas entre animais WT e iNOSKO. A única exceção foi o menor valor para a medida do SIV no grupo iNOSKO, comparado ao grupo WT, em animais com idade equivalente aos animais AoB sacrificados a longo prazo (tabela 02).

TABELA 01 - MEDIDAS ECOCARDIOGRÁFICAS E ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA EM ANIMAIS AOB AVALIADOS A CURTO PRAZO APÓS A COARCTAÇÃO DA AORTA

Medidas Ecocardiográficas	WT (n=5)	WT AoB (n=11)	INOS KO (n=7)	INOS KO AoB (n=9)
FC (bpm)	464,60 ± 18,24	379,82 ± 35,72	462,29 ± 31,32	467,33 ± 38,44
DDVE (mm)	3,80 ± 0,15	3,81 ± 0,11	3,63 ± 0,08	3,72 ± 0,09
DSVE (mm)	2,21 ± 0,09	2,64 ± 0,15+	2,00 ± 0,09	2,39 ± 0,14
FE (%)	41,80 ± 1,07	31,34 ± 2,42**	45,00 ± 1,63	36,42 ± 2,48+
Vcf (circ/s)	8,68 ± 0,85	5,96 ± 0,52**	9,73 ± 0,61	7,44 ± 0,61+
SIV (mm)	0,69 ± 0,04	1,01 ± 0,04**	0,64 ± 0,02	1,05 ± 0,04**
PPVE (mm)	0,65 ± 0,02	1,02 ± 0,04**	0,65 ± 0,02	1,05 ± 0,03**
E/A	1,14 ± 0,06	1,28 ± 0,20	1,31 ± 0,19	1,21 ± 0,14
IVRT (ms)	0,017 ± 0,002	0,022 ± 0,002	0,018 ± 0,001	0,019 ± 0,002
IH (mg/g)	6,24 ± 0,44	9,41 ± 0,64**	6,35 ± 0,19	9,31 ± 0,39**
Tempo pós-cirurgia (semanas)	-----	11,09 ± 1,23	-----	9,70 ± 1,28

TABELA 02 - MEDIDAS ECOCARDIOGRÁFICAS E ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA EM ANIMAIS AoB AVALIADOS A LONGO PRAZO APÓS A COARCTAÇÃO DA AORTA

Medidas Ecocardiográficas	WT (n=13)	WT AoB (n=10)	INOS KO (n=10)	INOS KO AoB (n=8)
FC (bpm)	399,77 ± 17,78	441,50 ± 19,13	451,60 ± 26,32	368,00 ± 18,42
DDVE (mm)	3,89 ± 0,09	4,11 ± 0,10	3,79 ± 0,08	3,90 ± 0,13
DSVE (mm)	2,47 ± 0,07	3,05 ± 0,13#	2,41 ± 0,08	2,73 ± 0,12
FE (%)	36,58 ± 1,20	26,00 ± 1,43**	37,13 ± 1,53	30,00 ± 1,15**
Vcf (circ/sec)	7,55 ± 0,33	5,09 ± 0,36**	7,67 ± 0,44	5,76 ± 0,29**
SIV (mm)	0,75 ± 0,03	1,02 ± 0,03**	0,67 ± 0,02*	1,00 ± 0,03**
PPVE (mm)	0,70 ± 0,02	1,01 ± 0,04**	0,66 ± 0,01	0,98 ± 0,02**
E/A	1,34 ± 0,08	1,56 ± 0,33	1,33 ± 0,10	1,45 ± 0,17
IVRT (ms)	0,019 ± 0,001	0,021 ± 0,002	0,018 ± 0,001	0,021 ± 0,001
IH (mg/g)	6,77 ± 0,27	9,13 ± 0,54**	6,81 ± 0,24	8,14 ± 0,34**
Tempo pós-cirurgia (semanas)	-----	27,67 ± 2,77	-----	25,97 ± 3,55

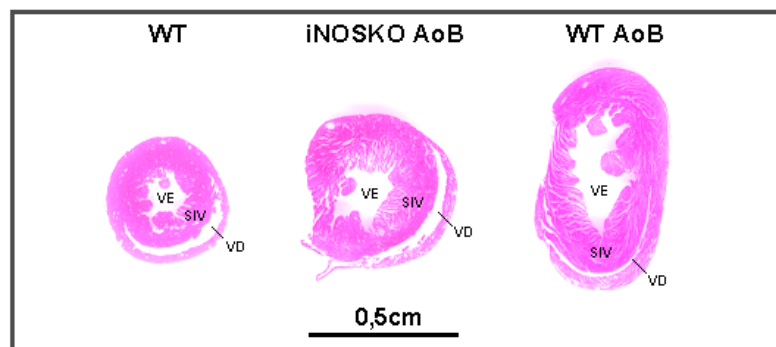
Nota: As tabelas 01 e 02 representam as médias dos valores ± o erro padrão da medida. # Representa o valor de P<0,05 quando comparado com todos os outros grupos; * representa o valor de P<0,05 quando comparado com o grupo WT; e + representa o valor de P<0,05 quando comparado com o grupo iNOSKO. As abreviações usados são: frequência cardíaca (FC), dimensão diastólica do ventrículo esquerdo (DDVE), dimensão sistólica do ventrículo esquerdo (DSVE), fração de encurtamento (FE), velocidade de encurtamento circunferencial (Vcf), espessura do septo interventricular durante a diástole (SIV), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo durante a diástole (PPVE), razão entre a fase de enchimento rápido do ventrículo esquerdo (E) e contração atrial (A) representado por (E/A), relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo (IVRT) e índice de hipertrofia (IH).

4.3 HISTOLOGIA

A figura 11 e 12 apresentam cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson, respectivamente. Na figura 11 estão ilustradas imagens de baixa magnificação de cortes histológicos corados com HE obtidos de animais WT, iNOSKO AoB e WT AoB. Pôde-se visualizar o aumento na espessura das paredes do ventrículo esquerdo, por exemplo do SIV, nos animais AoB quando comparados ao controle. Também é possível visualizar nas imagens o aumento do diâmetro da câmara ventricular esquerda nos animais AoB, mais evidente no animal WT AoB.

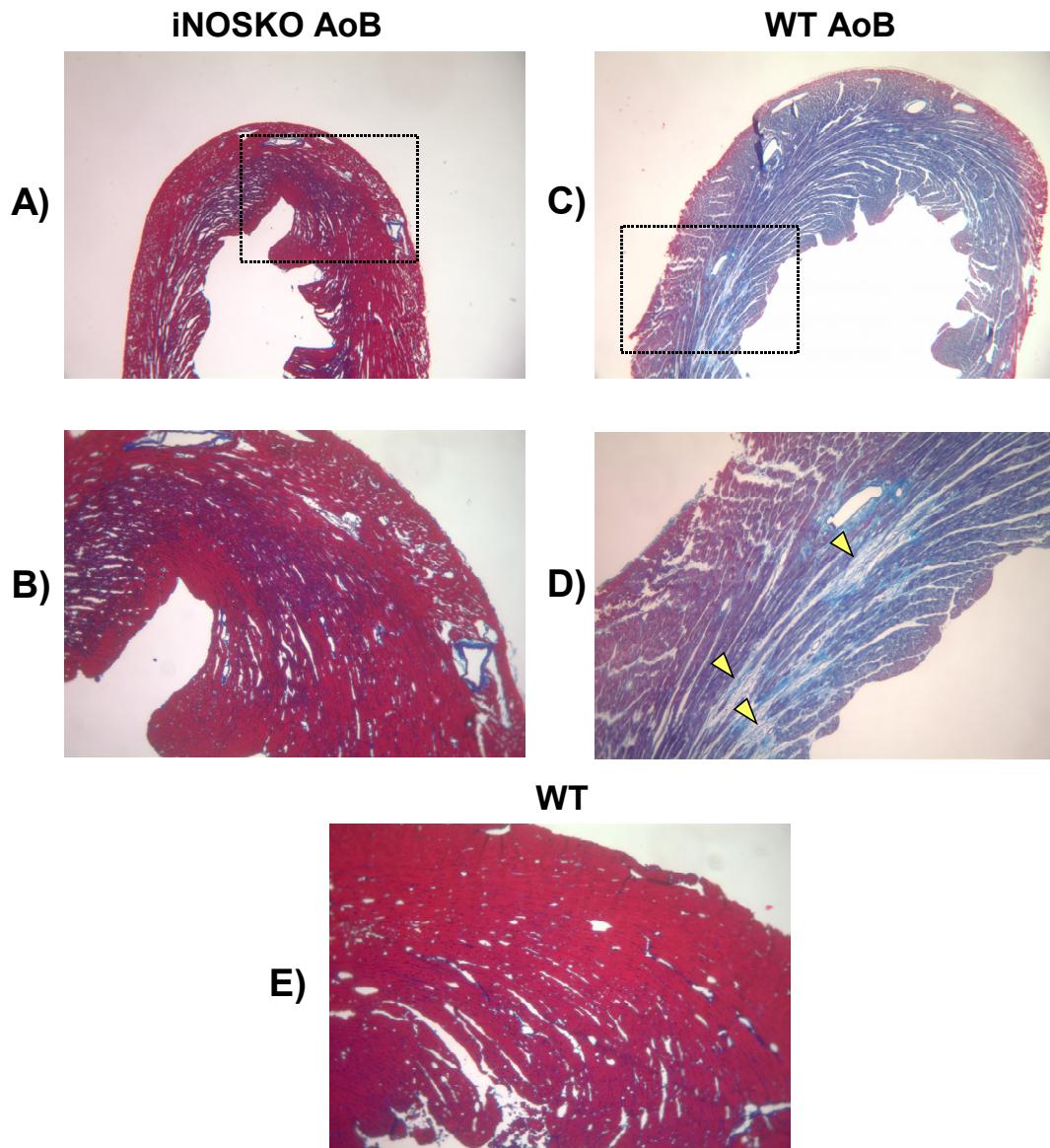
A figura 12 representa cortes histológicos corados com tricrômio de Masson. A coloração com tricrômio demonstra a presença de tecido conjuntivo, como por exemplo, tecido cicatricial. As imagens representam cortes histológicos de animais iNOSKO AoB (A e B), WT AoB (C e D) e WT (E). Animais iNOSKO AoB apresentaram pouco aumento na quantidade de tecido conjuntivo nas paredes ventriculares, enquanto que, nos animais WT AoB, o aumento na quantidade de tecido conjuntivo nas paredes ventriculares foi muito mais evidente. Na figura 12D (setas), pôde-se observar, no animal WT AoB, a presença de tecido cicatricial em meio ao tecido muscular. No entanto, estas observações não foram avaliadas quantitativamente.

FIGURA 11 - CORTES HISTOLÓGICOS CORADOS COM HEMATOXILINA-EOSINA



Nota: Os cortes histológicos foram feitos próximos à porção média do cavidade ventricular esquerda.

FIGURA 12 - CORTES HISTOLÓGICOS CORADOS COM TRICRÔMIO DE MASSON



Nota: Os cortes histológicos são provenientes de animais iNOSKO AoB (A e B), WT AoB (C e D) e WT (E). A magnificação usada foi de 4x nas imagens A e C e de 10x nas imagens B, D e E. As setas indicam a presença de tecido cicatricial.

4.4 EXPERIMENTOS UTILIZANDO MÚSCULO PAPILAR ISOLADO DO VENTRÍCULO ESQUERDO

Para avaliar a resposta β -adrenérgica do tecido muscular cardíaco e a cinética de contração muscular, foram realizados experimentos com músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo. Os músculos foram perfundidos com doses crescentes de isoproterenol na presença ou não do bloqueador da enzima iNOS (1400W).

A figura 13 apresenta os resultados obtidos utilizando-se músculo isolado de animais AoB sacrificados a curto prazo e de animais-controle. Na figura 13 estão representados registros originais de experimentos realizados com músculos isolados de animais iNOSKO AoB (A) e WT AoB (B). Em C), estão representadas as médias dos valores de força desenvolvida nas várias doses de isoproterenol utilizadas. Houve um pequeno deslocamento da curva de dose-resposta para maiores valores de força desenvolvida nos músculos provenientes de animais AoB; no entanto, os valores de força desenvolvida não foram estatisticamente diferentes entre os quatro grupos (figura 13 C). A tabela 03 apresenta as médias dos valores de força desenvolvida pelos grupos experimentais avaliados a curto prazo.

TABELA 03 - FORÇA DESENVOLVIDA PELOS MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A CURTO PRAZO

Concentração de Isoproterenol	WT (n = 7)		WT AoB (n = 9)		INOSKO (n = 7)		INOSKO AoB (n = 7)	
	Média (%)	Erro padrão	Média (%)	Erro padrão	Média (%)	Erro padrão	Média (%)	Erro padrão
2,5 nM	-----	-----	138,348	8,426	-----	-----	159,664	26,095
5 nM	-----	-----	167,921	17,338	-----	-----	176,303	25,350
10 nM	156,334	16,710	186,520	20,368	175,784	13,742	202,237	29,748
100 nM	202,561	24,125	247,710	30,155	232,610	19,725	276,649	39,840
1000 nM	214,427	21,427	253,153	31,046	248,916	20,914	288,026	37,038

Em relação à cinética muscular, foi observado um déficit no relaxamento muscular no grupo WT AoB, antes da perfusão de isoproterenol, representado pelo

aumento no valor do TR₅₀ que foi estatisticamente diferente dos demais grupos (figura 13D). Os valores de TR₅₀ antes da perfusão de isoproterenol foram de 72,37 ms ± 3,19 no grupo WT (n=7); 98,80 ms ± 7,47 (n=9) no grupo WT AoB; 77,86 ms ± 5,30 (n=7) no grupo iNOSKO e 90,18 ms ± 6,10 no grupo iNOSKO AoB. Os animais AoB apresentaram também maior tempo de relaxamento durante a perfusão com a maior dose de isoproterenol (1000 nM) quando comparados aos grupos-controle (figura 13 D). Animais WT AoB apresentaram ainda maiores valores de TP antes da perfusão de ISO (figura 13 E). Durante a perfusão de ISO, os grupos apresentaram valores similares para o TP. A média dos valores obtidos para o TR₅₀ e TP estão apresentados nas tabelas 04 e 05, respectivamente.

TABELA 04 - TR₅₀ EM MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A CURTO PRAZO

Concentração de Isoproterenol	WT (n = 7)		WT AoB (n = 9)		iNOSKO (n = 7)		iNOSKO AoB (n = 7)	
	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão
0 nM	72,369	3,190	98,797**	7,472	77,857	5,302	90,176	6,098
10 nM	62,636	1,863	71,972	2,746	64,426	3,402	74,464	4,472
100 nM	56,036	1,208	63,508	2,339	59,051	2,785	66,073*	2,959
1000 nM	53,739	1,011	62,495*	2,048	57,354	2,383	62,391*	2,813

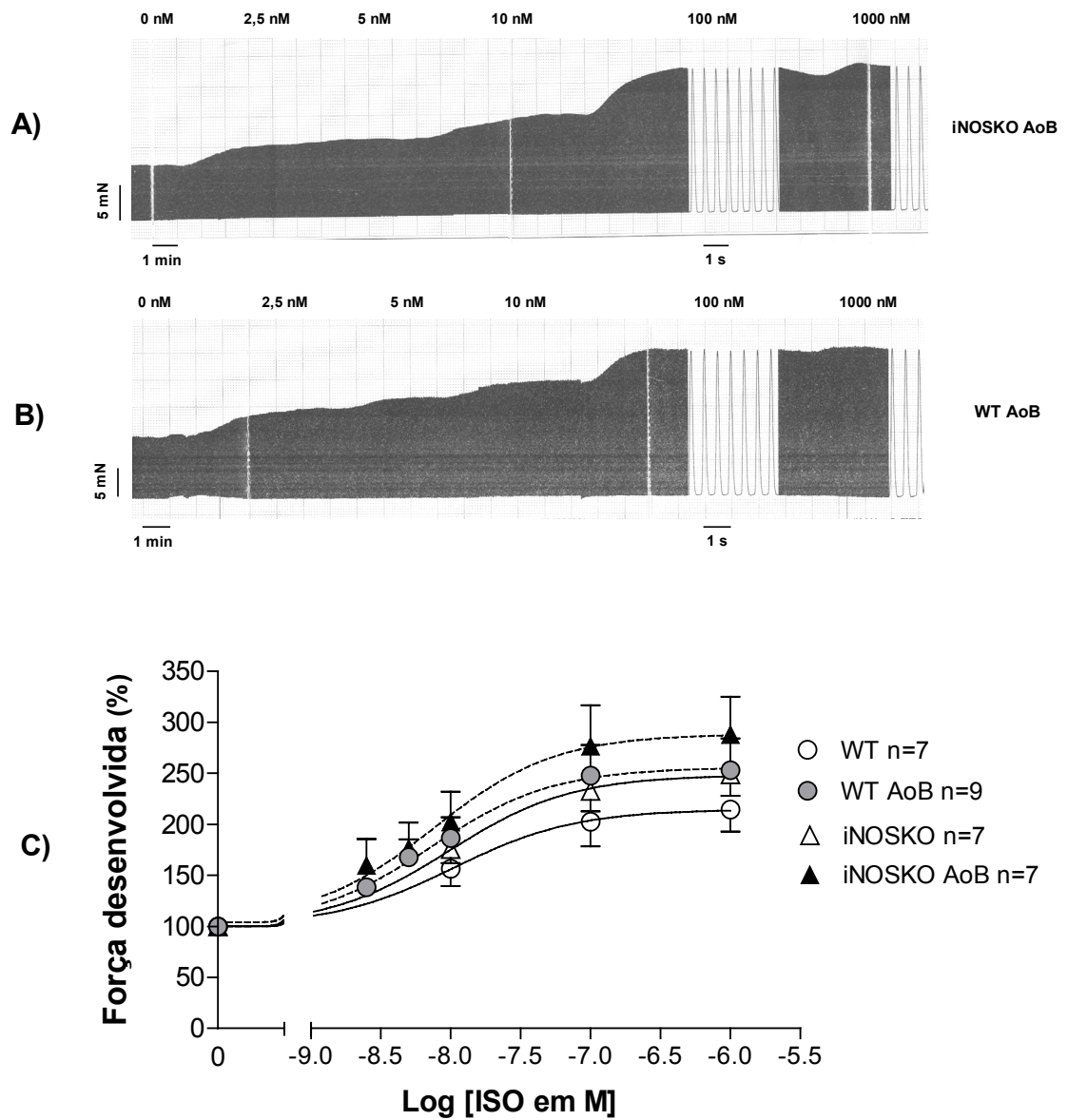
Nota: * representa o valor de P<0,05 quando comparado com o grupo WT e + representa o valor de P<0,05 quando comparado com o grupo iNOSKO.

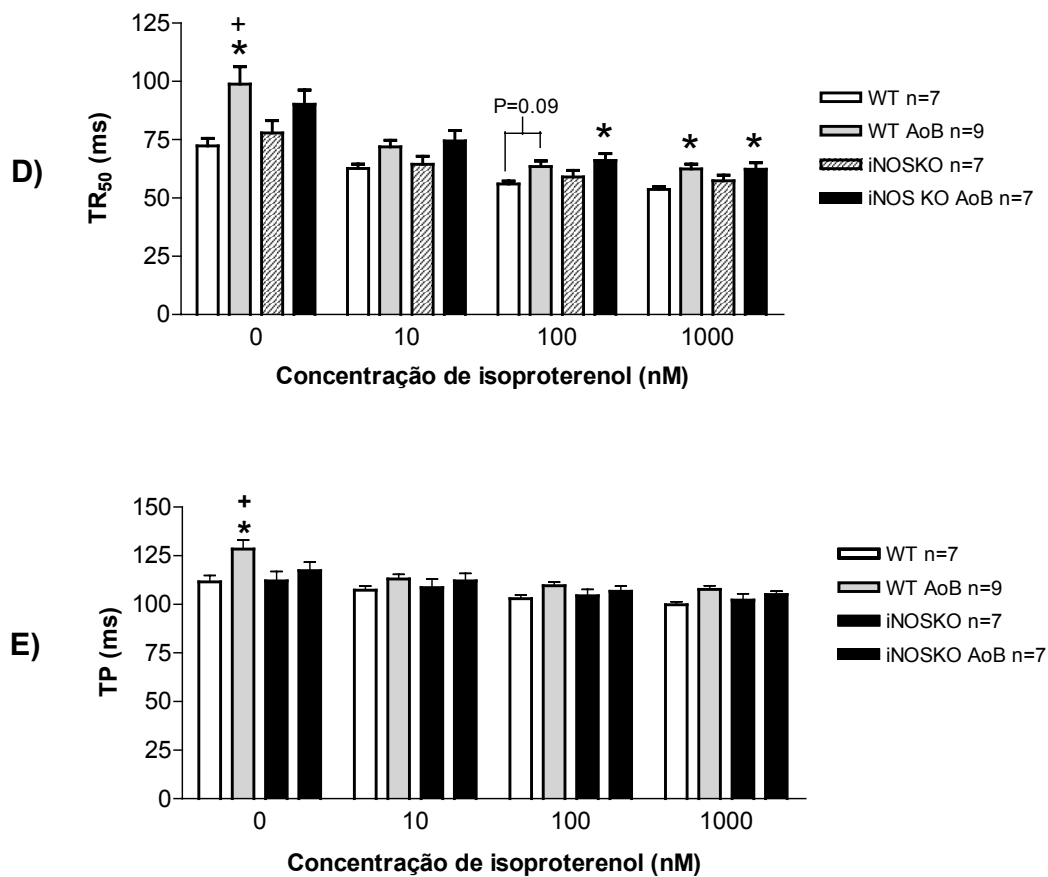
TABELA 05 - TP EM MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A CURTO PRAZO

Concentração de Isoproterenol	WT (n = 7)		WT AoB (n = 9)		iNOSKO (n = 7)		iNOSKO AoB (n = 7)	
	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão
0 nM	111,590	3,182	128,492**	4,565	112,077	4,876	117,260	4,387
10 nM	107,260	2,195	113,074	2,328	108,611	4,361	112,073	3,852
100 nM	102,931	1,873	109,620	1,756	104,451	3,231	106,651	2,648
1000 nM	99,871	1,501	107,750	1,816	102,130	3,323	105,013	1,802

Nota: * representa o valor de P<0,05 quando comparado com o grupo WT e + representa o valor de P<0,05 quando comparado com o grupo iNOSKO.

FIGURA 13 - DOSE-RESPOSTA AO ISOPROTERENOL EM MÚSCULO PAPILAR DE VENTRÍCULO ESQUERDO PROVENIENTE DE ANIMAIS AoB SACRIFICADOS A CURTO PRAZO E DE ANIMAIS-CONTROLE





Nota: A) Registro original de experimento realizado com músculo isolado de animal iNOSKO AoB. B) Registro original de experimento realizado com músculo isolado de animal WT AoB. C) Valores de força desenvolvida na presença de ISO. Os valores de força estão normalizados para a força desenvolvida antes da perfusão de ISO. D) Tempo de relaxamento (50%) em resposta ao ISO. E) tempo de contração até o pico de força (TP) em resposta ao ISO. * representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com o grupo WT; e + representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com o grupo iNOSKO.

A figura 14 apresenta os resultados obtidos utilizando-se músculo isolado de animais AoB sacrificados a longo prazo e de animais-controle. Na figura 14, estão representados registros originais de experimentos realizados com músculos isolados de animais iNOSKO AoB (A) e WT AoB (B).

Como observado na figura 14 C, que representa a média dos valores de força desenvolvida nas diferentes doses de ISO, houve aumento na força desenvolvida em resposta ao ISO no grupo de animais iNOSKO AoB comparado aos demais grupos. Este aumento na força desenvolvida foi mais evidente nas maiores doses de isoproterenol utilizadas, 100nM e 1000nM. A média dos valores de força desenvolvida na presença de ISO estão sumarizados na tabela 06.

TABELA 06 - FORÇA DESENVOLVIDA POR MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A LONGO PRAZO

Concentração de Isoproterenol	WT (n = 9)		WT AoB (n = 6)		INOSKO (n = 8)		INOSKO AoB (n = 6)	
	Média (%)	Erro padrão	Média (%)	Erro padrão	Média (%)	Erro padrão	Média (%)	Erro padrão
2,5 nM	106,018	4,204	103,340	6,538	100,539	2,121	116,053	9,268
5 nM	109,018	2,487	109,853	8,307	103,399	2,824	120,690	11,676
10 nM	117,018	5,198	125,885	16,650	105,736	3,617	144,318 ⁺	6,936
100 nM	154,965	8,155	178,992	23,138	130,476	4,180	267,343 [#]	32,182
1000 nM	186,849	14,381	216,837	26,506	165,300	10,136	343,912 [#]	45,705

Nota: # Representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com todos os outros grupos e + representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com o grupo iNOSKO.

Assim como nos animais sacrificados a curto prazo, o grupo de animais WT AoB sacrificados a longo prazo apresentou déficit de relaxamento muscular antes da perfusão de ISO. O valor do TR_{50} foi maior no grupo WT AoB, comparado aos demais grupos antes do início da perfusão de ISO (figura 14 D).

Em relação aos valores do TP, não houve diferença significativa entre os grupos (figura 14E). As médias dos valores de TR_{50} e TP estão sumarizados nas tabelas 07 e 08, respectivamente.

TABELA 07 - TR₅₀ EM MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A LONGO PRAZO

Concentração de Isoproterenol	WT (n = 9)		WT AoB (n = 6)		INOSKO (n = 8)		INOSKO AoB (n = 6)	
	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão
0 nM	78,741	5,198	101,068*	6,559	82,152	3,963	95,279	6,339
10 nM	74,398	3,436	88,721	3,367	77,302	3,321	85,911	5,153
100 nM	68,984	2,829	72,289	1,965	71,075	2,838	70,567	2,737
1000 nM	62,594	2,024	64,838	1,933	64,972	1,831	64,305	2,973

Nota: * representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com o grupo WT.

TABELA 08 - TP EM MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A LONGO PRAZO

Concentração de Isoproterenol	WT (n = 9)		WT AoB (n = 6)		INOSKO (n = 8)		INOSKO AoB (n = 6)	
	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão
0 nM	115,818	1,879	121,009	0,933	115,495	1,707	120,572	3,389
10 nM	115,970	1,773	119,833	1,521	114,663	2,324	118,220	4,121
100 nM	114,188	1,881	111,479	1,662	110,350	1,793	112,480	3,302
1000 nM	110,071	1,221	105,227	0,792	105,833	1,195	106,127	2,968

Para avaliar a participação direta da enzima iNOS como determinante do aumento na resposta β -adrenérgica, foi utilizado o bloqueador de iNOS 1400W em alguns músculos provenientes de animais AoB. Os valores obtidos de força desenvolvida em resposta ao ISO, na presença de 1400W, foram similares nos grupos de animais WT AoB e iNOSKO AoB em todas as doses de ISO utilizadas (figura 15 A e tabela 09). Os valores do TR₅₀ (figura 15 B, tabela 10) e do TP (figura 15C, tabela 10) também foram similares nestes grupos quando ISO foi perfundido na presença de 1400W.

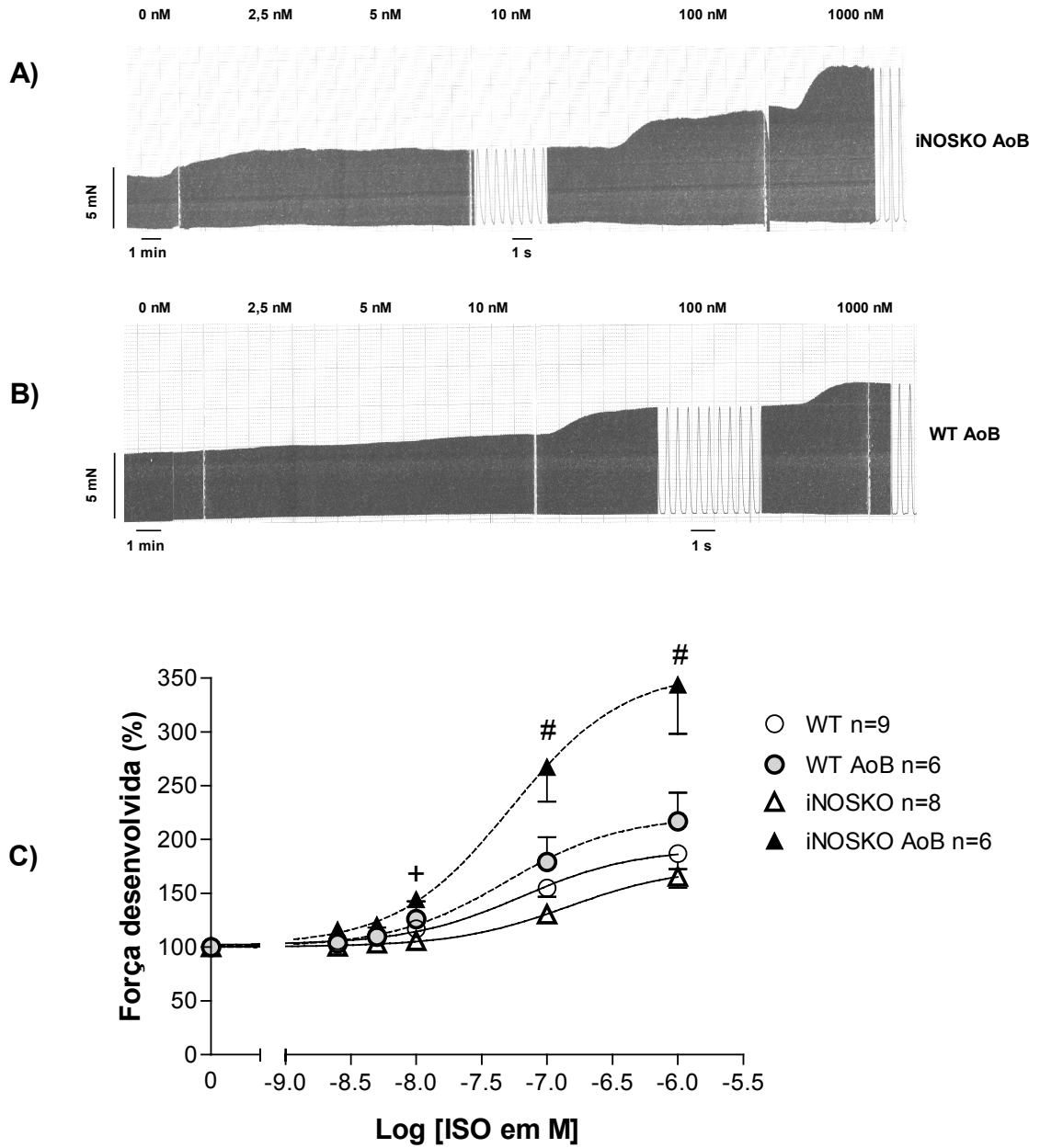
TABELA 09 - FORÇA DESENVOLVIDA POR MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A LONGO PRAZO NA PRESENÇA DE 1400W

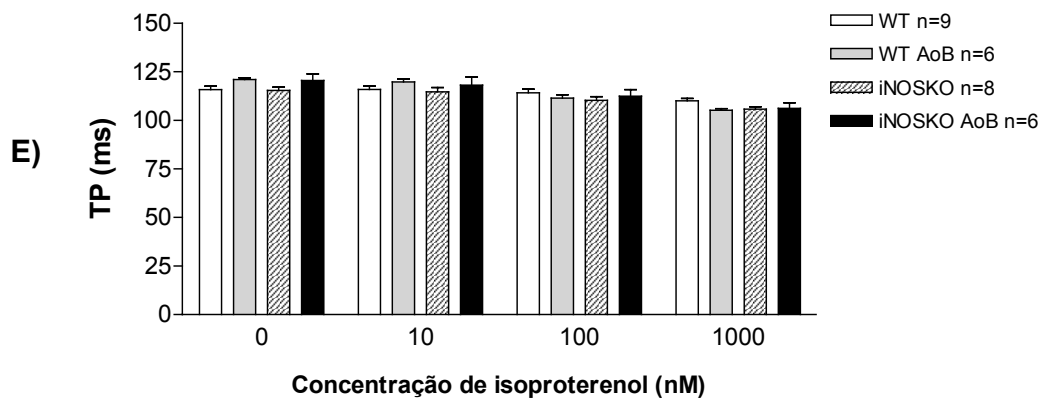
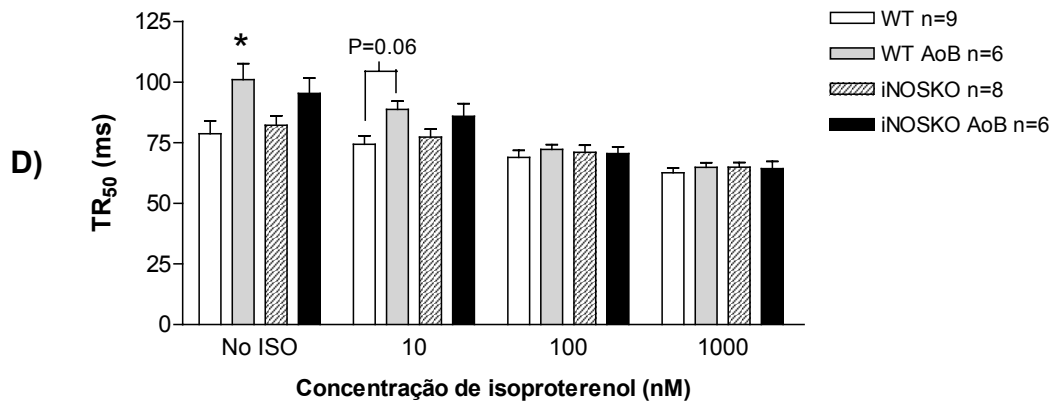
Concentração de Isoproterenol	WT AoB (n = 3)		INOSKO AoB (n = 3)	
	Média (%)	Erro padrão	Média (%)	Erro padrão
2,5 nM	106,390	12,332	104,870	3,409
5 nM	99,910	12,315	112,747	10,896
10 nM	118,680	21,807	124,300	25,513
100 nM	215,183	39,207	227,517	45,409
1000 nM	253,077	33,248	261,857	37,512

TABELA 10 - TR₅₀ E TP EM MÚSCULOS PAPILARES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS AVALIADOS A LONGO PRAZO NA PRESENÇA DE 1400W

Concentração de Isoproterenol	TR ₅₀				TP			
	WT AoB (n = 3)		INOSKO AoB (n = 3)		WT AoB (n = 3)		INOSKO AoB (n = 3)	
	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão	Média (ms)	Erro padrão
0 nM	85,306	9,378	87,320	13,638	118,217	1,315	110,503	4,543
10 nM	78,450	3,523	82,390	8,174	116,470	1,675	108,723	5,329
100 nM	68,853	3,492	71,123	4,141	110,897	3,944	106,007	2,219
1000 nM	64,417	2,769	66,043	4,201	106,857	3,001	103,623	2,040

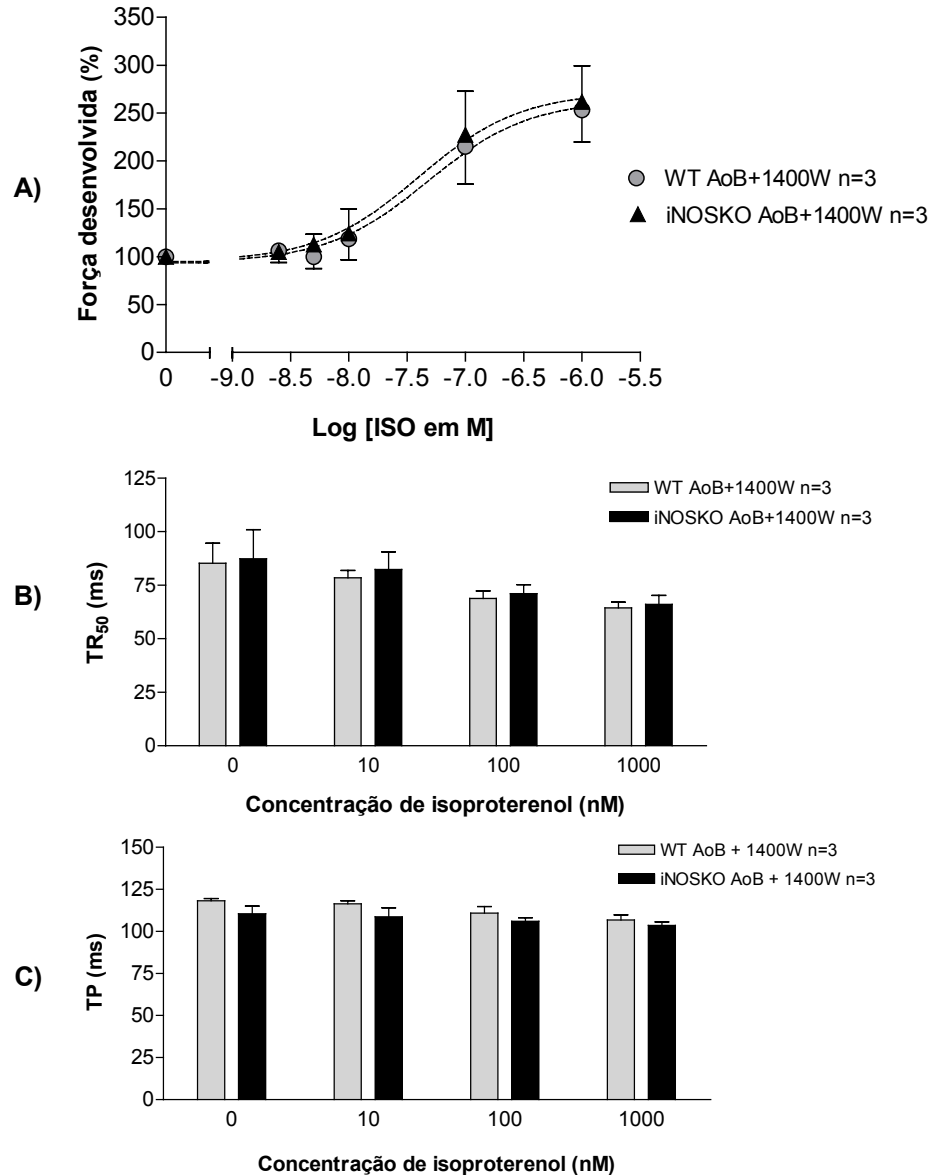
FIGURA 14 - DOSE-RESPOSTA AO ISOPROTERENOL EM MÚSCULO PAPILAR DE VENTRÍCULO ESQUERDO PROVENIENTE DE ANIMAIS AoB SACRIFICADOS A LONGO PRAZO E DE ANIMAIS-CONTROLE





Nota: A) Registro original de experimento realizado com músculo isolado de animal iNOSKO AoB. B) Registro original de experimento realizado com músculo isolado de animal WT AoB. C) Valores de força desenvolvida na presença de ISO. Os valores de força estão normalizados para a força desenvolvida antes da perfusão de ISO. D) Tempo de relaxamento (50%) em resposta ao ISO. E) tempo de contração até o pico de força (TP) em resposta ao ISO. # Representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com todos os outros grupos; * representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com o grupo WT; e + representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com o grupo iNOSKO.

FIGURA 15 - DOSE-RESPOSTA AO ISOPROTERENOL, NA PRESENÇA DE 1400W, EM MÚSCULO PAPILAR DE VENTRÍCULO ESQUERDO PROVENIENTE DE ANIMAIS AoB SACRIFICADOS A LONGO PRAZO



Nota: A) Valores de força desenvolvida em presença de ISO + 1400W. Os valores de força estão normalizados para a força desenvolvida antes da perfusão de ISO. B) Tempo de relaxamento (50%) em resposta ao ISO +1400W. C) tempo de contração até o pico de força (TP) em resposta ao ISO + 1400W.

4.5 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

A figura 16 representa curvas (ciclos cardíacos) da relação volume-pressão de ventrículo esquerdo obtidas durante a avaliação hemodinâmica de animais AoB.

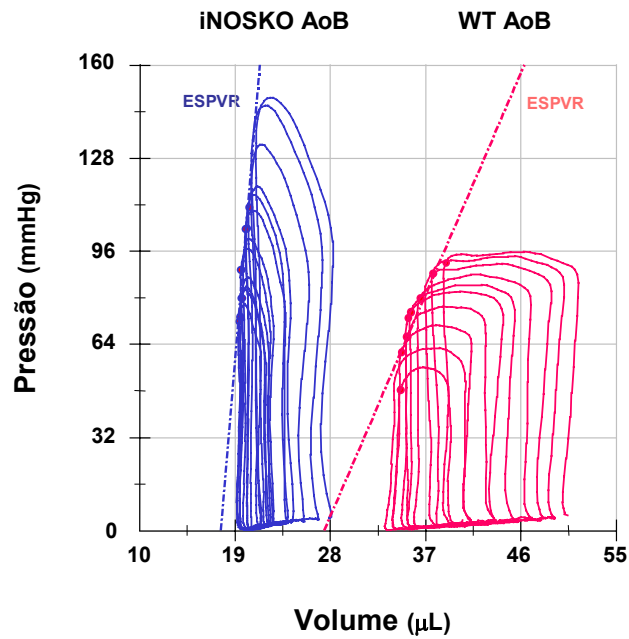
Pôde-se observar que o animal iNOSKO AoB desenvolveu maior pressão sistólica do que o animal WT AoB. Além disso, o animal WT AoB, representado na figura, apresenta o volume diastólico final aumentado em comparação com o animal iNOSKO AoB.

A figura 16 também exemplifica a diferença na ESPVR entre os animais AoB. Pode ser observado que a linha que representa a ESPVR, no animal WT AoB, apresentou menor inclinação e estava deslocada para a direita (indicando progressão para a cardiomiopatia dilatada) enquanto no animal iNOSKO AoB, a inclinação da linha representativa da ESPVR estava aumentada e sem deslocamento (cardiomiopatia hipertrófica). No entanto, a média dos valores de ESPVR não diferiu significativamente entre os animais AoB.

Os gráficos da figura 17 representam os principais achados obtidos dos experimentos de avaliação hemodinâmica *in situ* realizada nos animais AoB. Animais iNOSKO AoB apresentaram melhores parâmetros de contratilidade quando comparados aos demais grupos. Estes animais desenvolveram maior pressão sistólica do VE e apresentaram maior valor da PRSW comparado aos animais-controle iNOSKO. Além disso, o valor de PRSW nos animais iNOSKO AoB tendeu a ser maior quando comparado aos animais WT AoB, sendo o valor de P igual a 0,058. Em relação à cinética de contração, os animais iNOSKO AoB apresentaram melhores valores para os parâmetros de contração (dp/dt_{max}) e relaxamento (dp/dt_{min}) comparado aos animais WT AoB.

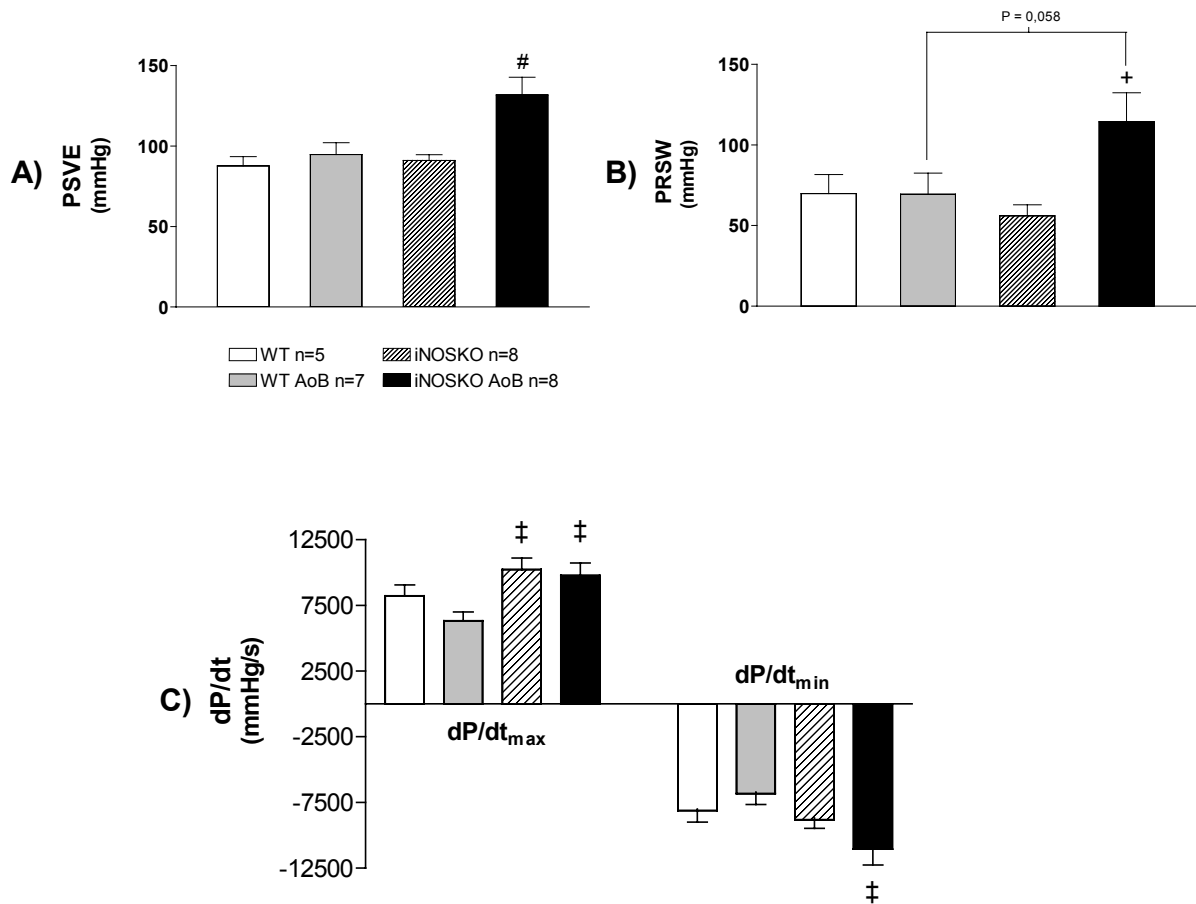
Animais utilizados como controle, WT e iNOSKO, não apresentaram diferenças nas medidas hemodinâmicas. Animais iNOSKO apresentaram maior valor da dp/dt_{max} quando comparado aos animais WT AoB.

FIGURA 16 - CURVAS DE VOLUME-PRESSÃO OBTIDAS DO VENTRÍCULO ESQUERDO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À COARCTAÇÃO DA AORTA



Nota: As imagens representam curvas de volume-pressão obtidas durante as mensurações hemodinâmicas em animais submetidos à coarctação da aorta. As curvas de volume-pressão foram geradas após oclusão temporária da veia cava inferior. A imagem representa as curvas da relação volume-pressão em animais iNOSKO AoB (azul) e WT AoB (vermelho) e as linhas que representam a ESPVR.

FIGURA 17 - PSVE, PRSW E dP/dt EM ANIMAIS AoB E ANIMAIS CONTROLE



Nota: Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), trabalho cardíaco pré-carga (PRSW) e derivadas de pressão por tempo (dP/dt) em animais controle e com coarctação de aorta. # Representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com todos os outros grupos; + representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com o grupo iNOSKO e ‡ representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com o grupo WT AoB.

A tabela 11 apresenta a média dos valores obtidos nos experimentos para avaliação hemodinâmica, realizados com os animais AoB e animais controle.

TABELA 11 - MEDIDAS HEMODINÂMICAS *IN SITU* EM VENTRÍCULO ESQUERDO DE ANIMAIS AoB E DE ANIMAIS CONTROLE

Medidas Hemodinâmicas	WT (n=5)	WT AoB (n=7)	INOS KO (n=8)	INOS KO AoB (n=8)
FC (bpm)	571,4 ± 21,3	545,6 ± 24,1	619,8 ± 13,4	592,5 ± 17,6
PSVE (mmHg)	87,6 ± 5,7	94,7 ± 7,3	91,0 ± 3,6	131,6 ± 11,0 #
PDVE (mmHg)	3,6 ± 0,4	3,3 ± 0,2	3,0 ± 0,2	3,3 ± 0,2
dP/dt _{max} (mmHg/s)	8246,4 ± 822,1	6346,9 ± 654,2	10244,1 ± 876,5 ‡	9791,5 ± 944,8 ‡
DP/dt _{min} (mmHg/s)	-8114,2 ± 880,4	-6817,4 ± 830,8	-8794,4 ± 670,5	-11056,6 ± 1196,6 ‡
ESPVR (mmHg/mL)	9,4 ± 3,0	12,4 ± 3,8	7,2 ± 1,5	15,3 ± 2,6
PRSW (mmHg)	70,0 ± 11,8	69,4 ± 13,1	56,1 ± 6,8	114,4 ± 18,0 +
E _{max} (mmHg/mL)	14,2 ± 11,8	22,9 ± 11,1	16,2 ± 4,7	29,9 ± 4,7

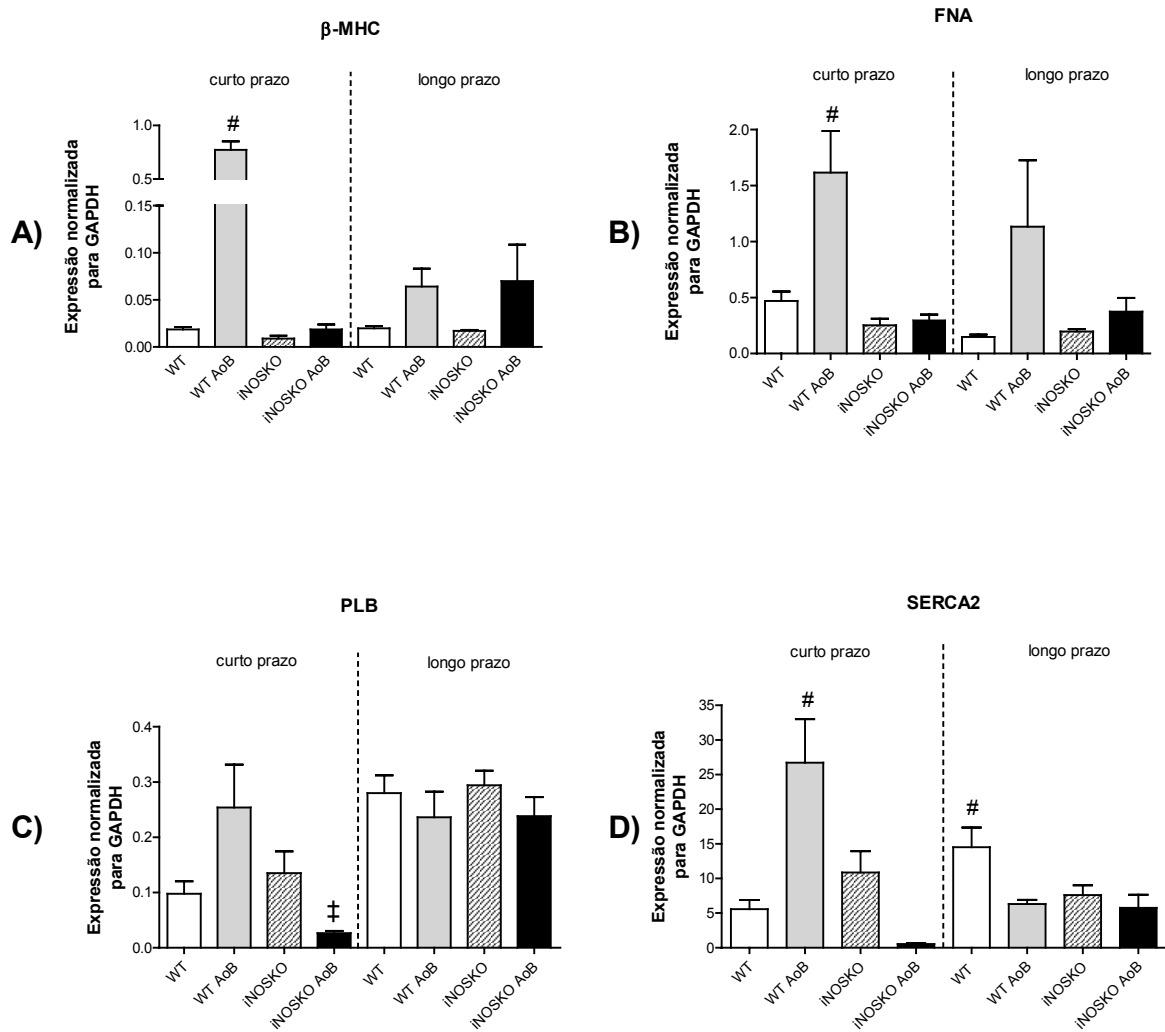
Nota: Estão representadas as médias dos valores ± o erro padrão da medida. # Representa o valor de P<0,05 quando comparado com todos os outros grupos; ‡ representa o valor de P<0,05 quando comparado com o grupo WT AoB e + representa o valor de P<0,05 quando comparado com o grupo iNOSKO. As abreviações usados são: frequência cardíaca (FC), pressão sistólica no ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica no ventrículo esquerdo (PDVE), derivada de pressão pelo tempo (dP/dt), relação pressão-volume sistólica final (ESPVR), trabalho cardíaco pré-carga (PRSW), relação volume-pressão diastólica final (E_{max}).

4.6 EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA E FOSFORILAÇÃO DE ENOS

À partir de amostras obtidas do ventrículo cardíaco, foram feitas análises da expressão gênica (figura 18) e da expressão protéica (figura 19-20) nos grupos experimentais.

A figura 18 apresenta a média dos valores da expressão normalizada dos genes determinantes da produção da β -MHC (A), do FNA (B), PLB (C) e SERCA2 (D) em animais sacrificados a curto e a longo prazo, após a cirurgia, e em animais-controle.

FIGURA 18 - EXPRESSÃO GÊNICA EM VENTRÍCULOS CARDÍACO DE ANIMAIS AoB SACRIFICADOS A CURTO E A LONGO PRAZO E DE ANIMAIS-CONTROLE



Nota: # Representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com todos os outros grupos; ‡ representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com o grupo WT AoB.

Observou-se que dois marcadores que têm sua expressão aumentada durante a insuficiência cardíaca, a cadeia pesada da miosina- β e o fator natriurético atrial, aumentaram significativamente nos animais WT AoB sacrificados a curto prazo, enquanto estes valores permaneceram normais nos iNOSKO AoB e tiveram um pequeno aumento, embora não significativo, nos animais iNOSKO AoB sacrificados a longo prazo.

A expressão gênica de PLB estava aumentada nos animais WT AoB comparado ao grupo iNOSKO AoB, a curto prazo, após a cirurgia. A expressão deste gene não foi diferente entre os grupos avaliados a longo prazo. Similarmente ao que ocorreu com a expressão de PLB, a expressão de SERCA2 foi maior no grupo WT AoB comparado aos demais grupos quando avaliado a curto prazo. A longo prazo, a expressão de SERCA2 estava reduzida nos grupos de animais AoB e inclusive no grupo iNOSKO quando estes foram comparados aos animais controle WT. As médias dos valores da expressão gênica estão sumarizadas na tabela 12.

TABELA 12 - EXPRESSÃO GÊNICA EM ANIMAIS SUBMETIDOS À COARCTAÇÃO DE AORTA E CONTROLES PAREADOS POR IDADE.

Expressão gênica	WT (n=3-4)	WT AoB (n=4)	INOS KO (n=4)	INOS KO AoB (n=4)
Curto-prazo				
β -MHC	0,0186 \pm 0,0025	0,7730 \pm 0,0774#	0,0090 \pm 0,0029	0,0185 \pm 0,0054
FNA	0,4690 \pm 0,0855	1,616 \pm 0,3720#	0,2530 \pm 0,0571	0,300 \pm 0,0477
PLB	0,0977 \pm 0,0227	0,2540 \pm 0,0775	0,1350 \pm 0,0395	0,0264 \pm 0,0040‡
SERCA2	5,5730 \pm 1,3090	26,7250 \pm 6,304#	10,8630 \pm 3,0890	0,5540 \pm 0,0935
Longo-prazo				
β -MHC	0,0198 \pm 0,0023	0,0641 \pm 0,0190	0,0171 \pm 0,0010	0,0699 \pm 0,0388
FNA	0,1480 \pm 0,0212	1,1320 \pm 0,5940	0,1960 \pm 0,0209	0,3730 \pm 0,1230
PLB	0,2800 \pm 0,0321	0,2360 \pm 0,0466	0,2940 \pm 0,0263	0,2380 \pm 0,0346
SERCA2	14,5150 \pm 2,8470#	6,3090 \pm 0,6060	7,5980 \pm 1,4130	5,7600 \pm 1,900

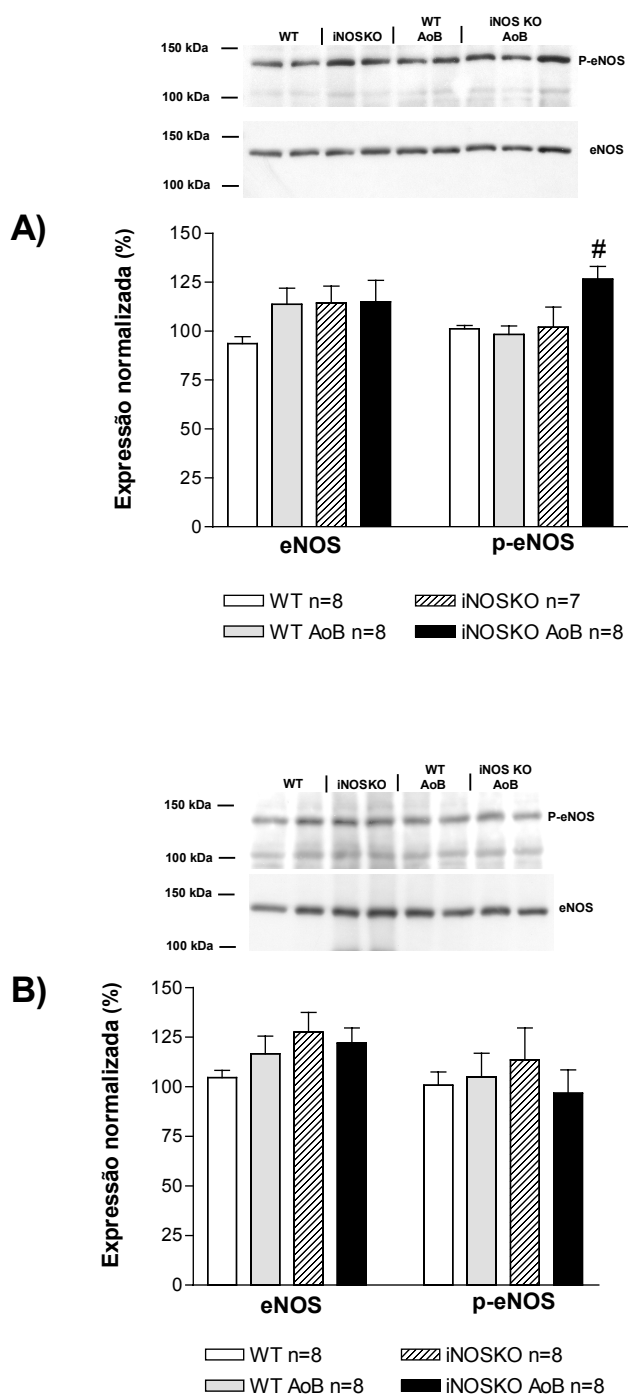
Nota: Os valores estão apresentados como a média e o erro padrão da medida. A expressão de cada gene foi normalizada pela expressão de GAPDH. # Representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com todos os outros grupos; ‡ representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com o grupo WT AoB.

A figura 19 representa a expressão e fosforilação de eNOS no coração dos animais sacrificados a curto prazo (A) e a longo prazo (B), após a cirurgia. As imagens acima dos gráficos na figura representam os resultados de um dos immunoblottings para detecção de fosfo-eNOS e para a detecção da expressão total de eNOS. Os gráficos que seguem abaixo das imagens de immunoblotting representam a média dos valores normalizados.

Não houve diferença significativa na expressão de eNOS entre os grupos experimentais tanto nos grupos avaliados a curto prazo quanto nos grupos avaliados a longo prazo. A única diferença na fosforilação de eNOS ocorreu no grupo de animais iNOSKO AoB, avaliados a curto prazo, que apresentou fosforilação de eNOS aumentada quando comparado com os demais grupos experimentais. A fosforilação de eNOS neste grupo não foi diferente dos demais quando avaliado a longo prazo.

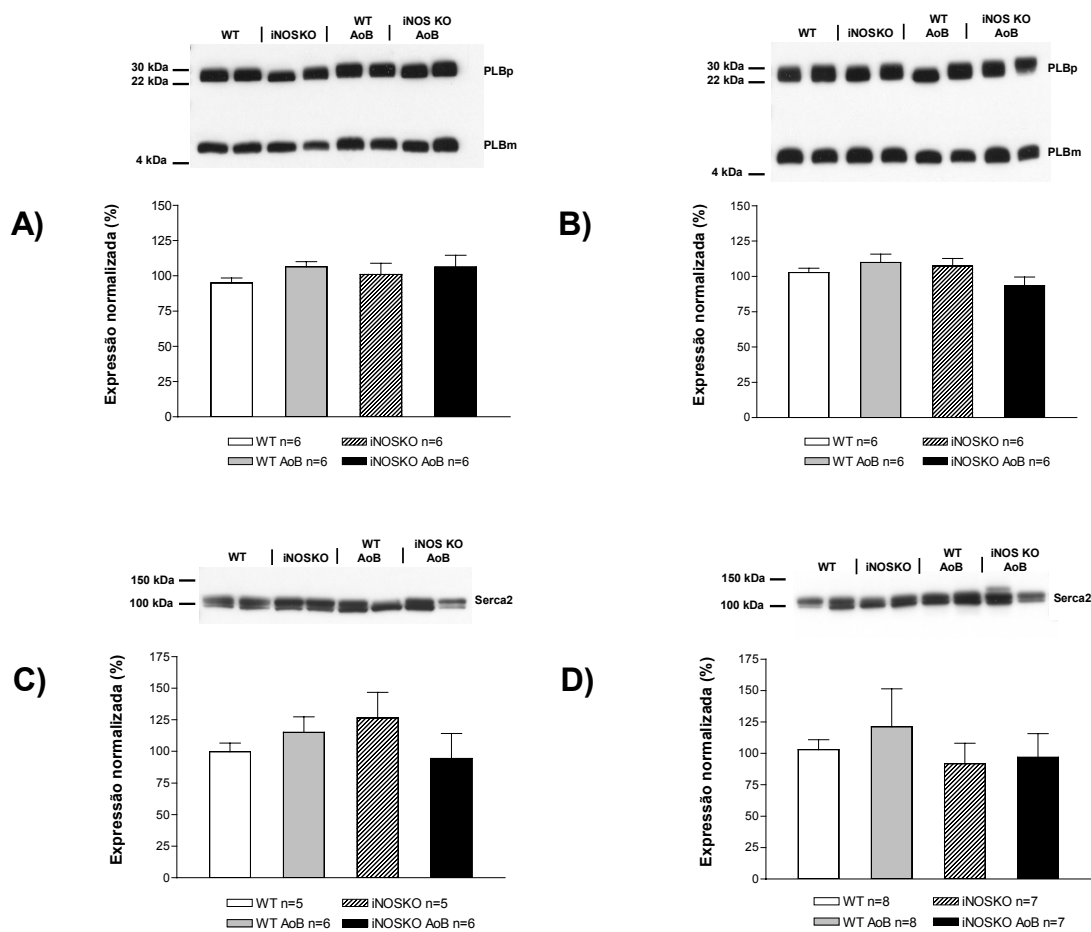
A figura 20 apresenta os resultados da avaliação da expressão de PLB e SERCA2. Não foi observada diferença entre os grupos experimentais quanto à expressão de PLB nem de SERCA2 tanto nos animais avaliados a curto prazo quanto nos animais avaliados a longo prazo. No entanto, animais WT AoB, avaliados a longo prazo, apresentaram maior variação na expressão de SERCA2 dentro do grupo, tornando o erro da medida maior que os demais grupos avaliados no mesmo momento.

FIGURA 19 - EXPRESSÃO E FOSFORILAÇÃO DE ENOS



Nota: A figura representa a expressão e fosforilação de eNOS (P-eNOS) em animais avaliados a curto prazo (A) e a longo prazo (B) após a coarctação da aorta. # Representa o valor de $P < 0,05$ quando comparado com todos os outros grupos.

FIGURA 20 - EXPRESSÃO DE PLB E SERCA2 EM ANIMAIS AoB E ANIMAIS-CONTROLE



Nota: A figura representa a expressão de Fosfolambano (A e B) e de SERCA2 (C e D) nos grupos experimentais avaliados a curto (A, C) e a longo prazo (B, D) após a coarctação da aorta. As formas pentamérica e monomérica do PLB estão representadas pelas siglas PLBp e PLBm, respectivamente.

A tabela 13 apresenta as médias dos valores da expressão protéica avaliada nos grupos experimentais.

TABELA 13 - EXPRESSÃO PROTÉICA E FOSFORILAÇÃO DE eNOS EM ANIMAIS SUBMETIDOS À COARCTAÇÃO DA AORTA E EM ANIMAIS-CONTROLE PAREADOS POR IDADE

Expressão protéica e fosforilação de eNOS	WT (n)	WT AoB (n)	INOS KO (n)	INOS KO AoB (n)
Curto-prazo				
p-eNOS (%)	101,32 ± 1,59 (8)	98,38 ± 4,34 (8)	102,01 ± 10,33 (7)	126,48 ± 6,60 (8) #
eNOS (%)	93,70 ± 3,49 (8)	113,65 ± 8,30 (8)	114,35 ± 8,66 (7)	115,07 ± 10,88 (8)
PLB (%)	94,92 ± 3,61 (6)	106,43 ± 3,60 (6)	101,00 ± 7,92 (6)	106,22 ± 8,43 (6)
SERCA2 (%)	99,71 ± 6,85 (5)	114,95 ± 12,45 (6)	126,35 ± 20,40 (5)	94,29 ± 19,84 (6)
Longo-prazo				
p-eNOS (%)	100,66 ± 6,73 (8)	104,94 ± 11,91 (8)	113,40 ± 16,14 (8)	96,72 ± 11,70 (8)
eNOS (%)	104,62 ± 3,54 (8)	116,67 ± 8,77 (8)	127,59 ± 9,89 (8)	121,97 ± 7,61 (8)
PLB (%)	102,68 ± 3,16 (6)	109,85 ± 5,89 (6)	107,46 ± 5,31 (6)	93,34 ± 6,21 (6)
SERCA2 (%)	102,86 ± 8,03 (8)	121,19 ± 30,21 (7)	91,75 ± 16,28 (8)	96,79 ± 18,88 (7)

Nota: Os valores estão apresentados como a média ± o erro padrão da medida. Entre parênteses está o número de amostras utilizadas nos experimentos. #Representa o valor de P<0,05 quando comparado com todos os outros grupos.

5 DISCUSSÃO

5.1 A ENZIMA iNOS É EXPRESSA NO CORAÇÃO DURANTE A SOBRECARGA POR PRESSÃO

A isoforma induzível da enzima NOS tem a característica de ser expressa em condições específicas, não sendo descrita como uma proteína constitutiva das células musculares cardíacas.

A expressão de iNOS, no tecido muscular cardíaco humano, é induzida durante o infarto do miocárdio e durante a insuficiência cardíaca (DE BELDER et al., 1993; LEWIS et al., 1996; HAYWOOD et al., 1996; VEJLSTRUP et al., 1998; ZIOLO et al., 2004; PATTEN et al., 2005) e também foi observada em modelos experimentais dessas doenças em animais de laboratório (FENG et al., 2001; SAM et al., 2001; FUNAKOSHI et al., 2002; GEALEKMAN et al., 2002; SAITO et al., 2002).

No estudo aqui apresentado, a expressão de iNOS foi induzida após a cirurgia para geração de sobrecarga por pressão imposta ao coração (figuras 8 e 9). A expressão de iNOS foi evidente em animais WT AoB e nos controles positivo (WT + LPS), inexistente nos animais iNOSKO, mesmo após a cirurgia e presente, raramente, em cortes histológicos de coração de animais WT. Estas observações foram feitas tanto pela técnica de immunoblotting quanto pela técnica de imunofluorescência. Além de confirmar a presença de iNOS, pôde-se demonstrar que esta enzima estava localizada no citoplasma e co-localizada com os núcleos celulares das células musculares cardíacas.

A localização de iNOS nos cardiomiócitos também foi investigada por outros pesquisadores, em cultura de células musculares cardíacas e em cortes histológicos de miocárdio. Buchwalow e colaboradores (BUCHWALOW et al., 1997), demonstraram a presença de iNOS localizada no envelope nuclear, no complexo de Golgi, nas

miofibrilas e nas mitocôndrias de células cardíacas em cultura, provenientes de ratos neonatos. Buchwalow e colaboradores (BUCHWALOW et al., 2001), posteriormente demonstraram a expressão de iNOS em cultura de células provenientes de ratos adultos. Novamente, encontraram a enzima localizada na região perinuclear, em membranas e confirmaram, pela técnica de imunoprecipitação de partículas de ouro, que os grânulos citoplasmáticos observados nos experimentos de imunocitoquímica eram a enzima iNOS localizada em mitocôndrias. Os mesmos autores também encontraram a expressão de iNOS nas miofibrilas e no citoplasma de células musculares cardíacas, em cortes de miocárdio provenientes de ratos adultos, sugerindo a expressão constitutiva de iNOS. Neste mesmo trabalho, os autores ainda demonstraram, pela técnica de imunofluorescência, a presença de iNOS no miocárdio de um paciente com insuficiência cardíaca.

No presente trabalho, foi observada a presença de iNOS em padrão granular no citoplasma de células musculares cardíaca. Embora não tenha sido possível determinar a sub-localização de iNOS, pode-se especular que os grânulos citoplasmáticos possam ser iNOS localizada em mitocôndrias, como foi anteriormente demonstrado por Buchwalow e colaboradores (BUCHWALOW et al., 1997; BUCHWALOW et al., 2001). A presença de NOS nas mitocôndrias tem gerado a hipótese de que o produto desta enzima, o óxido nítrico ou seus derivados, possam inibir a respiração celular e iniciar o processo de apoptose celular (MONCADA e ERUSALIMSKY, 2002). Sabe-se, por exemplo, que o NO pode ligar-se com alta afinidade e reversivelmente à citocromo c oxidase, presente na membrana interna da mitocôndria, competindo assim com o oxigênio (CLEETER et al., 1994). Ghaufourifas e Ritcher (GHAFOURIFAR e RICHTER, 1997), vão mais além, sugerindo a existência de uma isoforma de NOS exclusiva das mitocôndrias, denominando-a de mtNOS, demonstrando um possível controle da função mitocondrial pelo NO.

Em um estudo mais recente, Zanella e colaboradores (ZANELLA et al.,

2004) demonstraram a presença de eNOS e iNOS em mitocôndrias isoladas do coração de ratos. Além disso, Lopez e colaboradores (LOPEZ et al., 2006) demonstraram que mitocôndrias de diafragma de camundongos com sepse induzida, apresentaram aumento da atividade de NOS, que estava associada à inibição significativa da respiração mitocondrial e ao aumento do estresse oxidativo mitocondrial. Isto não foi observado em animais iNOSKO submetidos ao mesmo procedimento ou em animais-controle tratados com melatonina, para diminuir a expressão de iNOS. Estes autores sugeriram a participação direta de iNOS, ou de uma isoforma provavelmente expressa a partir do gene que codifica iNOS, no controle da função mitocondrial.

Baseado nestes fatos, é possível que a ablação do gene que codifica iNOS tenha preservado a função mitocondrial nos animais iNOSKO submetidos à coarctação da aorta, explicando em parte a melhor função hemodinâmica observada nestes animais quando comparados aos animais WT AoB, visto que, durante a hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão e durante a insuficiência cardíaca, existe deteriorização nas vias de oxidação de ácidos graxos e de fosforilação oxidativa (RUSSELL et al., 2005). No entanto, a relação entre o NO e o metabolismo energético do coração, durante a insuficiência cardíaca, ainda não foi investigada.

Uma observação interessante foi a presença de iNOS co-localizada no núcleo celular (figura 09-D). Apesar da expressão de iNOS no núcleo ter sido demonstrada anteriormente por outros autores (BUCHWALOW et al., 1997; BUCHWALOW et al., 2001; GIORDANO et al., 2002), não há uma explicação precisa sobre o papel de iNOS e de seus produtos na expressão gênica, nem sobre os mecanismos que induziriam uma possível translocação de iNOS citoplasmático para o núcleo celular. Sabe-se, no entanto, que baixas doses de NO estão associadas à prevenção da ocorrência de apoptose (RAZAVI et al., 2005), entretanto, a expressão de iNOS e consequente produção de altas doses de NO ou de espécies reativas de oxigênio, está

associada ao aumento da taxa de apoptose, inclusive nas células cardíacas (WOLLERT e DREXLER, 2002; RAZAVI et al., 2005; HU et al., 2006). A expressão de iNOS também pode contribuir para a lesão direta do DNA nuclear, pela ação de seus produtos. Foi demonstrado que a expressão de iNOS e consequente produção de peroxinitrito pôde causar lesão direta do DNA (BENTZ et al., 2004).

A toxicidade induzida pela expressão de iNOS é de extrema importância no combate à infecções pelo sistema imunológico, por exemplo, quando esta enzima é expressa em macrófagos durante processos infecciosos porém, pode causar grave prejuízo quando expressa em outros tipos celulares, como nos cardiomiócitos. O principal estímulo para a expressão de iNOS nas células de mamíferos é a presença de citocinas e mediadores inflamatórios (BALLIGAND et al., 1994; SATOH et al., 1997; AFULUKWE et al., 2000; BARTH et al., 2006). Torre-Amione e colaboradores (TORRE-AMIONE et al., 1996a; TORRE-AMIONE et al., 1996b), demonstraram que pacientes com insuficiência cardíaca apresentam níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (fator de necrose tumoral) e interleucina-6, que estava relacionado com a gravidade da insuficiência cardíaca (pacientes agrupados segundo os critérios da Associação do coração de Nova Iorque, classes I a III). Em paciente na classe IV (biópsia de corações transplantados), o aumento de TNF- α chegou a ser 10 vezes maior que o controle (coração de doadores) (TORRE-AMIONE et al., 1996b). A presença destas citocinas no tecido cardíaco serve de estímulo para a expressão de iNOS no miocárdio.

5.2 A ABLAÇÃO DE iNOS NÃO EVITA O DESENVOLVIMENTO DE HIPERTROFIA CARDÍACA NEM ALTERA A TAXA DE MORTALIDADE EM ANIMAIS SUBMETIDOS À COARCTAÇÃO DA AORTA

No presente trabalho, a ablação de iNOS não preveniu o desenvolvimento de

hipertrofia cardíaca. Animais iNOSKO AoB desenvolveram níveis similares de hipertrofia, comparados aos animais WT AoB, como pôde ser observado pelos valores obtidos nas mensurações ecocardiográficas da espessura da parede do VE e do septo interventricular e ainda, pelo índice de hipertrofia cardíaca utilizado neste trabalho (figura 10, tabela 01). Os valores obtidos para estes parâmetros foram similares, entre os grupos de animais AoB, nos dois períodos pós-cirúrgicos avaliados.

Isto sugere que o mecanismo de desenvolvimento de hipertrofia cardíaca é provavelmente independente da expressão de iNOS. Os resultados de Sam e colaboradores (SAM et al., 2001) corroboram com essa hipótese. Estes investigadores também encontraram melhor função cardíaca em corações de animais iNOSKO submetidos ao infarto do miocárdio, apesar da hipertrofia cardíaca ser similar ao dos animais WT submetidos ao mesmo procedimento.

Apesar de apresentarem as mesmas dimensões das paredes ventriculares, os animais WT AoB apresentaram mais áreas do miocárdio com presença de tecido fibrótico, quando comparado aos animais iNOSKO AoB. Isto pôde ser observado nos cortes histológicos corados com tricrômio de Masson (figura 12). Embora tenha sido uma avaliação qualitativa, a presença de tecido fibrótico em substituição às fibras musculares, pode ter tido impacto significativo na contratilidade cardíaca, explicando em parte porque corações com o mesmo nível de hipertrofia apresentaram diferentes valores para os parâmetros de contratilidade cardíaca.

A ablação do gene determinante da expressão de iNOS também não alterou a taxa de mortalidade nos animais submetidos à cirurgia. Animais iNOSKO AoB apresentaram taxa de mortalidade similar ao grupo de animais WT AoB; sendo que, nas primeiras 48 horas após a cirurgia 13,64% dos animais WT AoB (6 animais de um total de 44 cirurgias) e 16,67% dos animais iNOSKO AoB (8 animais de um total de 48 cirurgias) morreram. No período compreendido entre a cirurgia e o sacrifício, 6 animais morreram em cada grupo, sendo 3 mortes acidentais por grupo (durante

procedimentos de intubação, anestesia, etc). Cinco mortes ocorreram nos primeiros 10 dias de pós-cirúrgico e um dos animais WT AoB morreu 25 semanas após a cirurgia.

5.3 A ABLAÇÃO DE iNOS PREVINE A DETERIORIZAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA DURANTE A SOBRECARGA POR PRESSÃO

Animais com ablação de iNOS e submetidos à sobrecarga de pressão, apresentaram melhores medidas da função cardíaca do que os animais WT AoB. Isto foi confirmado pelas medidas hemodinâmicas realizadas (figura 16-17, tabela 11), onde animais iNOSKO AoB, apresentaram maiores valores para a PSVE, dP/dt máximo e mínimo e PRSW, que é um indicador da função cardíaca independente da pré-carga imposta ao coração. Ainda quanto ao relaxamento muscular cardíaco, pôde-se também observar maior tempo de relaxamento em músculos isolados de animais WT AoB, quando comparado aos animais-controle WT, em condições basais (antes da perfusão de isoproterenol, figura 13-14, tabelas 04 e 07).

Embora na avaliação ecocardiográfica as medidas de contratilidade, em especial a FE, tenham sugerido uma tendência à melhor função cardíaca nos animais iNOSKO AoB, quando comparados ao grupo de animais WT AoB avaliados a longo prazo após a cirurgia, as diferenças não foram significativas ($P = 0,057$; tabela 01). Isto se deve, provavelmente, às características da técnica e em parte a dificuldade de obter estimativas mais precisas em corações de dimensões tão pequenas como os corações de camundongos. As mensurações hemodinâmicas utilizadas neste trabalho, por sua vez, permitiram a avaliação direta (invasiva) dos valores de pressão e volume da câmara ventricular esquerda, sendo mais precisa para a mensuração destes valores do que a técnica ecocardiográfica, consequentemente, permitindo uma melhor avaliação da contratilidade do VE.

Este foi o primeiro trabalho demonstrando que a ablação de iNOS durante a

sobrecarga do coração por pressão retarda a progressão da disfunção cardíaca (DIAS et al., 2004a; DIAS et al., 2004b). A sobrecarga por pressão utilizada neste trabalho simula uma das maiores causas da insuficiência cardíaca que é a hipertensão arterial. Durante a preparação deste trabalho, outro grupo demonstrou a prevenção do desenvolvimento de disfunção cardíaca no mesmo modelo animal, embora tenham encontrado atenuação da hipertrofia cardíaca (ZHANG et al., 2007). A diferença entre a intensidade de hipertrofia gerada nos animais submetidos à coarctação da aorta, entre os dois trabalhos, deveu-se provavelmente ao diâmetro do vaso após o procedimento cirúrgico. Os autores referidos utilizaram agulhas de 26 e 27 gauge (agulhas de 25 gauge foram utilizadas nos experimentos descritos no presente trabalho). Aparentemente, existe a possibilidade de que a prevenção da expressão de iNOS, também atenua a hipertrofia cardíaca. No entanto, isto depende da intensidade da pós-carga imposta ao coração. No modelo adotado no presente trabalho, ocorreu uma evolução mais lenta da hipertrofia e disfunção cardíaca subsequente à oclusão da aorta, comparado ao trabalho de Zhang e colaboradores, simulando de maneira mais próxima a evolução da disfunção cardíaca hipertensiva que ocorre no ser humano, visto que, esta doença tem progressão lenta, demorando anos até que os sinais de disfunção cardíaca apareçam.

Outros modelos de hipertrofia e insuficiência cardíaca, também apontam que a ablação de iNOS ou a inibição da ação da enzima sejam benéficas durante a progressão da insuficiência cardíaca. Embora Jones e colaboradores (JONES et al., 2005) não tenham encontrado diferenças na função cardíaca entre animais iNOSKO e WT, submetidos ao infarto do miocárdio (IM) e avaliados após 10 semanas, outros pesquisadores que também utilizaram animais iNOSKO, mostraram que a ablação do gene determinando da expressão de iNOS estava associada com melhores índices de contratilidade cardíaca em animais com insuficiência cardíaca induzida por IM (FENG et al., 2001; SAM et al., 2001) ou sobrecarga por volume (GEALEKMAN et al.,

2002). A diferença entre estes estudos está, provavelmente, relacionada com o tamanho da área infartada e especialmente com o tempo de avaliação dos animais após a cirurgia experimental.

Feng e colaboradores (FENG et al., 2001), por exemplo, reportaram melhor função cardíaca pós-IM, em animais iNOSKO, um mês após a cirurgia experimental enquanto, Sam e colaboradores (SAM et al., 2001), observaram que a ablação de iNOS preservava a função cardíaca, diminuía a taxa de apoptose e de mortalidade ao redor dos 4 meses após o infarto do miocárdio.

No presente trabalho, foi possível observar que a expressão de iNOS no miocárdio não causou efeitos “agudos” sobre a contratilidade cardíaca, visto que, em animais WT AoB avaliados a curto prazo após a cirurgia, os parâmetros de contratilidade e sensibilidade β -adrenérgica foram similares aos valores encontrados em animais iNOSKO AoB (tabela 01, figura 13); exceto no caso do tempo de relaxamento de músculos isolados, que estava aumentado no grupo WT AoB (figura 13D, tabela 04). Contudo, a expressão sustentada de iNOS, que ocorreu nos animais WT AoB, é um fator que contribui para a aceleração do processo de disfunção cardíaca, já que o bloqueio da expressão desta enzima, através do nocaute do gene para iNOS, resultou em melhores valores de contratilidade cardíaca, aumento da sensibilidade β -adrenérgica e prevenção da expressão gênica relacionada à insuficiência cardíaca. O efeito da expressão de iNOS parece então ser tempo-dependente, visto que, a expressão da enzima durante os dois momentos em que os animais WT AoB foram avaliados não diferiu significativamente (Figura 08 C-D).

Além do uso do modelo de animais iNOSKO, estudos onde bloqueadores de iNOS foram utilizados, também demonstraram prevenção na disfunção cardíaca associada à inibição da atividade desta enzima. Saito e colaboradores (SAITO et al., 2002) demonstraram que o tratamento com o bloqueador de iNOS, S-metilisotiouréia, feito em ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio, resultou

em melhor função cardíaca, menor tamanho da área infartada, redução da hipertrofia cardíaca e diminuição da taxa de mortalidade. Zheng e colaboradores (ZHENG et al., 2004), usando o tratamento com o mesmo inibidor de iNOS, também demonstraram o benefício do bloqueio da enzima na prevenção da disfunção cardíaca em ratos submetidos à IM. Galeakman e colaboradores (GEALEKMAN et al., 2002), demonstraram o benefício da inibição de iNOS, através do uso do inibidor 1400W, na função cardíaca de ratos durante a sobrecarga do coração por volume.

Provavelmente, o melhor trabalho que correlaciona iNOS e disfunção cardíaca, em amostras de tecido humano, foi o realizado por Patten e colaboradores (PATTEN et al., 2005). Estes autores demonstraram, que corações de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, têm expressão de iNOS aumentada e alta taxa de apoptose, comparados a amostras de corações de pacientes com função cardíaca normal. Mais importante, foi o fato de que pacientes que passaram pelo procedimento para colocação de uma bomba para auxílio do ventrículo esquerdo, apresentarem diminuição significativa da expressão de iNOS, que estava associada com a melhora da função cardíaca. Além disso, a diminuição da expressão de iNOS, também estava correlacionada com a diminuição da taxa de apoptose celular no tecido cardíaco.

Baseado nos resultados obtidos no trabalho aqui apresentado e nas citações anteriores (SAM et al., 2001; GEALEKMAN et al., 2002; ZHENG et al., 2004; RUETTEN et al., 2005; PATTEN et al., 2005; ZHANG et al., 2007), existe evidência de que a expressão de iNOS no miocárdio é um fator que contribui para a deteriorização da performance cardíaca durante a progressão da insuficiência cardíaca.

No entanto, fica a questão: Seria a expressão de iNOS por si só a causadora da disfunção cardíaca ou seria apenas um dos diversos fatores que contribuem para o seu desenvolvimento?

Para dar resposta a esta questão, dois grupos independentes geraram camundongos transgênicos que superexpressam iNOS no coração. Heger e

colaboradores (HEGER et al., 2002), geraram animais que superexpressavam iNOS, através da colocação do clone de DNA para iNOS sobre o controle do promotor da cadeia pesada da miosina- α (α -MHC), determinando assim, a expressão da proteína restrita ao coração. Mungrue e colaboradores (MUNGRUE et al., 2002a), também geraram um modelo de superexpressão de iNOS restrito ao coração porém, condicionado ao fator de transcrição responsivo à tetraciclina, podendo assim controlar o momento da expressão do gene determinante de iNOS. Embora ambos os grupos, tivessem demonstrado que iNOS era expressa no coração e que havia aumento da atividade da enzima, o fenótipo encontrado nos animais foi marcadamente diferente. As especulações que se seguiram para justificar os resultados contraditórios levaram a certa indisposição entre os dois grupos (MUNGRUE et al., 2003; GODECKE e SCHRADER, 2004).

Heger e colaboradores (HEGER et al., 2002), não reportaram a ocorrência de disfunção cardíaca severa em animais transgênicos, embora eles apresentassem redução do débito cardíaco (medido por ecocardiografia) e das pressões arteriais diastólica e média, além de redução da pressão sistólica em corações isolados. Por outro lado, Mungrue e colaboradores (MUNGRUE et al., 2002a) reportaram que a superexpressão de iNOS levou ao aumento da produção de peroxinitrito, aumento da fibrose no miocárdio, modesta hipertrofia e dilatação cardíaca e sobretudo, aumento da mortalidade devido à arritmias. Através do tratamento com doxiciclina e conseqüente supressão da expressão de iNOS, o fenótipo observado pôde ser revertido. Este contraste nos resultados é difícil de ser explicado porque, apesar do fenótipo “benéfico” encontrado por Heger e colaboradores, os autores reportaram aumento na produção de NO tecidual e plasmático; já Mungrue e colaboradores, que encontraram o fenótipo com maior mortalidade e lesão tecidual, não reportaram alterações na concentração de NO plasmático ou urinário e sugeriram então que o desacoplamento do homodímero formado por iNOS, seria responsável pela geração de espécies reativas

de oxigênio e, conseqüentemente peroxinitrito (observado no miocárdio pelos autores), que contribuiria para os efeitos deletérios da superexpressão de iNOS.

Heger e colaboradores, sugeriram que o fenótipo pouco prejudicial encontrado nos animais com superexpressão de iNOS, deveu-se ao fato da mioglobina agir como tamponante do NO (formando metamioglobina e nitrato), protegendo a célula dos efeitos decorrentes do aumento da atividade de iNOS. Esta hipótese, foi investigada em dois trabalhos posteriores, usando o mesmo modelo de animal transgênico gerado por Heger e colaboradores (HEGER et al., 2002), e gerou evidência para o papel protetor da mioglobina. Quando a mioglobina foi inibida quimicamente, corações isolados dos animais com superexpressão de iNOS apresentaram piores valores de contratilidade cardíaca (WUNDERLICH et al., 2003). Quando animais com superexpressão de iNOS foram cruzados com animais nocaute para o gene produtor da mioglobina, os animais desenvolveram disfunção cardíaca (GODECKE et al., 2003).

Mungrue e colaboradores (MUNGRUE et al., 2002a; MUNGRUE et al., 2003), sugerem que devido à geração do modelo de transgenia direta (não-condicional) feita por Heger e colaboradores (HEGER et al., 2002), houve uma provável seleção negativa contra as linhagens que produziram iNOS com níveis de atividade que geraria uma condição patológica. Esta sugestão foi feita, baseada no fato de que quando o seu grupo tentou gerar animais com superexpressão de iNOS utilizando a mesma técnica de Heger e colaboradores, os autores puderam produzir poucas linhagens viáveis e ainda, a superexpressão de iNOS no modelo condicional causou aumento da mortalidade fetal (levando-os a tratar as mães durante o período gestacional com doxiciclina, para inibir a expressão de iNOS). No entanto, Mungrue e colaboradores não apresentaram até o momento, evidências complementares, utilizando o modelo de expressão condicional de iNOS, que pudessem esclarecer melhor o papel desta enzima no desenvolvimento da insuficiência cardíaca.

Baseado nos resultados controversos dos modelos de animais que superexpressam iNOS, ainda não é possível afirmar que a expressão de iNOS no coração, pode por si só, induzir o desenvolvimento da disfunção cardíaca.

Uma hipótese recente aponta para o papel do superóxido e do peroxinitrito como determinantes dos efeitos patológicos advindos da alta expressão das enzimas produtoras de NO (TAKIMOTO et al., 2005; GUPTE et al., 2006; ZHANG et al., 2007). Isto porque, como descrito no item 2.2, a escassez de co-fatores como a tetraidrobiopterina e do substrato L-arginina, pode fazer com que ocorra o desacoplamento da NOS e consequente produção de superóxido, que se combinado ao NO produz o peroxinitrito. Dois grupos de pesquisadores (TAKIMOTO et al., 2005; ZHANG et al., 2007) que utilizaram como modelo camundongos submetidos à coarctação da aorta, encontraram que tanto a isoforma endotelial (TAKIMOTO et al., 2005) quanto a isoforma induzível (ZHANG et al., 2007) de NOS, estavam parcialmente desacopladas, favorecendo o estresse oxidativo e a produção de peroxinitrito. Encontraram também que a quantidade de nitrotirosina, um marcador da ação do peroxinitrito, estava aumentada em animais submetidos à cirurgia de coarctação da aorta. Além disso, animais com ablação de iNOS (ZHANG et al., 2007) ou de eNOS (TAKIMOTO et al., 2005) e também animais controle suplementados com tetraidrobiopterina (TAKIMOTO et al., 2005) (para evitar o desacoplamento da NOS), apresentaram melhores valores de contratilidade cardíaca do que animais-controle submetidos aos mesmos procedimentos. Estas observações suportam um mecanismo de ação mediada por derivados do NO e não exclusivamente mediado pela ação direta do NO.

O trabalho de Ichinose (ICHINOSE et al., 2003) e colaboradores, contrasta com o resultado dos dois trabalhos citados no parágrafo acima. Ichinose e colaboradores, evitaram a dimerização de iNOS através do uso de um inibidor da formação de homodímeros, denominado de BBS2 (BLASKO et al., 2002) e

constataram que a hipotensão arterial, a disfunção cardíaca e também a disfunção hemodinâmica pulmonar, subsequente à sepse induzida, foram prevenidas.

5.4 A ABLAÇÃO DE iNOS ESTÁ ASSOCIADA COM A HIPERSENSIBILIDADE β -ADRENÉRGICA

A expressão de iNOS, foi demonstrada estar associada com a inibição da resposta β -adrenérgica em: células e músculo cardíaco isolado de ventrículo cardíaco humano durante a insuficiência cardíaca (ZIOLO et al., 2004); em corações de camundongos durante a cardiomiopatia induzida por citocinas (BALLIGAND et al., 1994; FUNAKOSHI et al., 2002) ou induzida por choque séptico (BARTH et al., 2006) e em cardiopatia induzida por sobrecarga de volume (GEALEKMAN et al., 2002). Além disso, o uso de inibidores específicos de iNOS em dois dos trabalhos acima citados, resultou em aumento da inotropia induzida por agonista β -adrenérgico (GEALEKMAN et al., 2002; BARTH et al., 2006). A inibição da atividade de NOS também demonstrou aumentar a resposta β -adrenérgica em corações humanos *in situ* (HARE et al., 1998).

Neste trabalho, a ablação de iNOS durante a sobrecarga por pressão, resultou em aumento da resposta β -adrenérgica no músculo cardíaco (figura 14, tabela 06). Adicionalmente, a pré-incubação dos músculos com o inibidor de iNOS, 1400W, alterou a resposta β -adrenérgica em animais WT AoB para valores similares aos encontrados nos animais iNOSKO AoB (figura 15, tabela 09), nas mesmas condições experimentais, sugerindo que a expressão e atividade de iNOS estão diretamente envolvidas na depressão da resposta β -adrenérgica que acompanha a disfunção cardíaca. Animais WT e iNOSKO utilizados como controle, não diferiram quanto à resposta β -adrenérgica, sendo este resultado esperado, pois a expressão de iNOS em animais WT foi quase indetectável.

Embora tenha havido leve aumento da resposta β -adrenérgica no grupo de animais iNOSKO AoB, avaliados a curto prazo após a cirurgia experimental, houve diferença estatística entre este grupo e o grupo de animais WT AoB, apenas a longo prazo após o início da sobrecarga por aumento de pressão imposta ao coração. Existe a curto prazo, provavelmente, algum mecanismo compensatório contribuindo para a normalização da resposta β -adrenérgica ou talvez até este momento, ainda não tenha havido a dessensitização dos receptores β -adrenérgicos que ocorre durante a progressão da insuficiência cardíaca (CASTELLANO e BOHM, 1997; LOHSE et al., 2003; BARKI-HARRINGTON et al., 2004).

Atualmente, sabe-se que o uso de bloqueadores dos receptores β -adrenérgicos aumenta a sobrevida e diminui a morbidade em paciente com insuficiência cardíaca. O uso destes bloqueadores, que há décadas atrás era uma contra-indicação, passou a ser um dos tratamentos padrões para a insuficiência cardíaca (BRISTOW, 2000a; BRISTOW, 2000b; BOUZAMONDO et al., 2001; LOHSE et al., 2003). A explicação para a ação dos β -bloqueadores durante a insuficiência cardíaca ainda não está totalmente elucidada. Em parte, o efeito dos β -bloqueadores parece dever-se: ao efeito anti-arrítmico das drogas; à prevenção dos efeitos adversos da estimulação contínua dos receptores β -adrenérgicos (como a hipertrofia e o aumento da taxa de apoptose); à melhora do balanço energético no coração insuficiente e sugere-se que possa promover a ressensitização dos receptores β -adrenérgicos (LOHSE et al., 2003).

O fato de animais iNOSKO AoB apresentarem sensibilidade β -adrenérgica preservada, pode ser um dos fatores que determinam a desaceleração da progressão da insuficiência cardíaca neste grupo, quando comparado ao grupo de animais WT AoB. A preservação da resposta β -adrenérgica no grupo iNOSKO AoB forneceria ao coração dos animais uma maior reserva inotrópica, comparado aos animais WT AoB, fator este que estaria suprimindo a demanda do coração à sobrecarga por pressão.

Parece contraditório que animais iNOSKO AoB apresentam maior sensibilidade β -adrenérgica e melhor performance cardíaca que animais WT AoB, sabendo-se que o bloqueio β -adrenérgico é benéfico durante a insuficiência cardíaca. No entanto, isto seria possível caso a atividade de iNOS, em corações de animais WT AoB, estivesse contribuindo para a dessensibilização das vias β -adrenérgicas. Isto requereria uma estimulação β -adrenérgica tônica para manter a contratilidade cardíaca e traria como consequência os efeitos adversos dessa estimulação. De fato, Adam e colaboradores (ADAM et al., 1999) demonstraram em diversos tipos celulares, que o uso de doadores de NO (SIN-1 e GEA) ou a expressão de iNOS em macrófagos, através da indução por LPS, significativamente inibiu a resposta β -adrenérgica, sendo este efeito causado pelo desacoplamento dos receptores β -adrenérgicos do tipo 2 e da proteína G_s . Os autores mostraram evidências de que o NO pode promover a despalmilação dos receptores β -adrenérgicos do tipo 2. Mostraram ainda, que o NO não promoveu diminuição do AMPc quando células mutantes expressando receptores β -adrenérgicos do tipo 2 não palmitoilados (cisteína da posição 341 trocada por glicina) foram usadas. Esse trabalho contribuiu para explicar, em parte, o papel do NO derivado de iNOS na dessensibilização das vias β -adrenérgicas.

Sugere-se ainda, que dentre as vias de ativação mediadas por NO, a ativação da enzima proteína quinase-G (PKG), estaria interagindo com as vias de estimulação β -adrenérgicas de maneira inibitória ou então, essa enzima poderia diretamente causar efeito inotrópico negativo no coração por diminuir a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (YASUDA e LEW, 1997). A PKG quando ativada, pode fosforilar a Troponina I, causando diminuição da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (LAYLAND et al., 2005). O NO poderia também aumentar a hidrólise de AMPc através da ativação de fosfodiesterases pelas vias dependentes do GMPc (HAN et al., 1995), embora esta hipótese seja controversa (ADAM et al., 1999).

Além disso, parece que o NO pode causar, diretamente, efeito inotrópico

negativo, por agir nos canais de cálcio voltagem-dependente na membrana do cardiomiócito (QUIGNARD et al., 1997) e agir nos canais rionidínicos da membrana do retículo sarcoplasmático (MESZAROS et al., 1996; ZHRADNIKOVA et al., 1997).

Outra possibilidade investigada no presente trabalho, foi a de que alterações na expressão ou fosforilação da isoforma endotelial de NOS (eNOS) pudesse ser a responsável pela diminuição da contratilidade basal e da resposta inotrópica positiva, induzida por agonista β -adrenérgico, observada nos animais WT AoB. Alterações na expressão de eNOS foram reportadas durante a insuficiência cardíaca humana (STEIN et al., 1998; FUKUCHI et al., 1998; DAMY et al., 2004) e a atividade de eNOS tem sido associada à diminuição da resposta β -adrenérgica na célula muscular cardíaca (KIMURA et al., 1997; BAROUCH et al., 2002; CHAMPION et al., 2004). Contudo, no modelo de sobrecarga por pressão imposta ao coração, apresentado neste trabalho, não foram observadas alterações na expressão de eNOS que pudessem explicar as alterações na contratilidade cardíaca nos animais WT AoB (figura 19, tabela 13). Houve apenas um aumento transitório na fosforilação de eNOS, na treonina da posição 495, no grupo de animais iNOSKO AoB avaliados a curto prazo após a cirurgia. A fosforilação de eNOS neste resíduo, diminuiria a atividade da enzima (FLEMING et al., 2001) e poderia potencializar a resposta β -adrenérgica neste grupo. No entanto, não foram observadas diferenças significantes na resposta β -adrenérgica entre animais iNOSKO AoB e os demais grupos de animais testados, sugerindo que alterações na fosforilação de eNOS na posição 495 não trariam grandes consequências para a resposta β -adrenérgica do miocárdio. Em animais iNOSKO AoB avaliados a longo prazo, quando apresentaram resposta aumentada à estimulação β -adrenérgica, a fosforilação de eNOS na treonina 495 não estava alterada, demonstrando não ser esta a razão que explique as diferenças encontradas na resposta β -adrenérgica entre este grupo de animais e os demais grupos experimentais.

Os resultados aqui apresentados, somados a evidência de outros trabalhos (BALLIGAND et al., 1994; ADAM et al., 1999; FUNAKOSHI et al., 2002; GEALEKMAN et al., 2002; ZIOLO et al., 2004; BARTH et al., 2006) dão suporte a hipótese de que a expressão de iNOS atenua a resposta β -adrenérgica do tecido muscular cardíaco.

5.5 ANIMAIS iNOSKO SUJEITOS À SOBRECARGA CARDÍACA POR AUMENTO DE PRESSÃO NÃO APRESENTARAM EXPRESSÃO GÊNICA RELACIONADA À INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Os corações que progridem para a insuficiência cardíaca, geralmente expressam o fator natriurético atrial e isoformas fetais da cadeia pesada da miosina (ocorrendo a troca da cadeia pesada da miosina – MHC - to tipo β para o tipo α no miocárdio humano e do tipo α para o tipo β no miocárdio de camundongos).

Animais WT AoB, apresentaram aumento da expressão do mRNA da β -MHC e do FNA, em amostras de ventrículo, já a curto prazo após a cirurgia enquanto, animais iNOSKO AoB, não apresentaram alterações na expressão destes genes em nenhum momento em que foram avaliados (figura 18, tabela 12).

Os animais WT AoB, também apresentaram a curto prazo, aumento na expressão gênica de SERCA2, talvez indicando um mecanismo compensatório para a manutenção da contratilidade cardíaca através da melhora na recaptação do cálcio citoplasmático. Esta observação, mostrou a necessidade da quantificação da expressão das proteínas envolvidas com o transporte de cálcio no retículo sarcoplasmático. Embora houvesse aumento na expressão gênica de SERCA2, não houve alteração significativa na expressão protéica desta proteína em nenhum dos grupos de animais testados, tanto a curto quanto à longo prazo após o procedimento cirúrgico (figura 20, tabela 13). Além disso, a proteína fosfolambano que controla a atividade de SERCA2,

também não apresentou variações significativas entre os grupos experimentais.

O fato de não haver alterações na expressão protéica de SERCA2 e PLB, sugere que as alterações na contratilidade cardíaca no grupo de animais WT AoB não dependem de alterações no transporte de cálcio do retículo sarcoplasmático. No entanto, apesar da expressão destas proteínas ser similar em animais AoB é possível que alterações pós-traslacionais, como a fosforilação de SERCA2 e PLB pudessem influenciar nas concentrações de cálcio transiente dentro da célula muscular cardíaca. Para elucidar esta questão, mensurações diretas das concentrações de cálcio transiente seriam necessárias.

Os resultados apresentados neste trabalho, dão suporte à hipótese de que a inibição da expressão de iNOS durante o desenvolvimento da insuficiência cardíaca poderia ser benéfica. No entanto, são necessários estudos para determinar com mais precisão quais são os mecanismos desencadeadores da expressão de iNOS durante o desenvolvimento da insuficiência cardíaca. Outra possibilidade a ser investigada, como opção terapêutica, seria a inibição da atividade da enzima, utilizando um inibidor específico de iNOS, durante o desenvolvimento da doença.

6 CONCLUSÃO

Os dados contidos neste trabalho, mostram que a sobrecarga por aumento de pressão, imposta ao coração através da coarctação da aorta, induz a expressão de iNOS no miocárdio, que está associada à hipertrofia e à disfunção cardíaca. A ablação do gene que determina a expressão de iNOS, nas condições citadas acima, embora não previna o desenvolvimento de hipertrofia, retarda a progressão da disfunção cardíaca, além de potencializar a resposta β -adrenérgica do músculo cardíaco. As evidências obtidas neste trabalho, sugerem que a inibição da expressão ou da atividade de iNOS, poderiam servir de ferramenta terapêutica para melhorar a função do coração durante a progressão da insuficiência cardíaca.

7 REFERÊNCIAS

ADAM, L.; BOUVIER, M.; JONES, T. L. Nitric oxide modulates beta(2)-adrenergic receptor palmitoylation and signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 37, p. 26337-26343, 1999.

AFULUKWE, I. F. et al. Selective NOS inhibition restores myocardial contractility in endotoxemic rats; however, myocardial NO content does not correlate with myocardial dysfunction. **Am. J. Respir. Crit Care Med.**, v. 162, n. 1, p. 21-26, 2000.

AKSOY, M. O.; MURPHY, R. A.; KAMM, K. E. Role of Ca²⁺ and myosin light chain phosphorylation in regulation of smooth muscle. **Am. J. Physiol**, v. 242, n. 1, p. C109-C116, 1982.

ALDEN, K. J. et al. Enhancement of L-type Ca(2+) current from neonatal mouse ventricular myocytes by constitutively active PKC-betaII. **Am. J. Physiol Cell Physiol**, v. 282, n. 4, p. C768-C774, 2002.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. American Heart Association. *2002 Heart and Stroke Statistical Update*. 2001. Dallas, Tex.

ANNANE, D. et al. Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. **Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1143-1148, 2000.

ASHLEY, E. A. et al. Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and beta-adrenergic contractility in murine ventricular myocytes. **Circulation**, v. 105, n. 25, p. 3011-3016, 2002.

BALLIGAND, J. L., FERON, O., KELLER, R. A. Role of Nitric Oxide in Myocardial Function. In: IGNARRO, L. J., (Ed.). **Nitric Oxide: Biology and Pathobiology**. Academic Press, 2007. p. 585-608.

BALLIGAND, J. L. et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 24, p. 14582-14586, 1995.

BALLIGAND, J. L. et al. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 44, p.

27580-27588, 1994.

BARKI-HARRINGTON, L.; PERRINO, C.; ROCKMAN, H. A. Network integration of the adrenergic system in cardiac hypertrophy. **Cardiovasc. Res.**, v. 63, n. 3, p. 391-402, 2004.

BAROUCH, L. A. et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. **Nature**, v. 416, n. 6878, p. 337-339, 2002.

BARTH, E. et al. Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock. **Crit Care Med.**, v. 34, n. 2, p. 307-313, 2006.

BELEVYCH, A. E. and HARVEY, R. D. Muscarinic inhibitory and stimulatory regulation of the L-type Ca²⁺ current is not altered in cardiac ventricular myocytes from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **J. Physiol**, v. 528 Pt 2, p. 279-289, 2000.

BENDALL, J. K. et al. Role of myocardial neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide in beta-adrenergic hyporesponsiveness after myocardial infarction-induced heart failure in rat. **Circulation**, v. 110, n. 16, p. 2368-2375, 2004.

BENTZ, B. G. et al. Nitrosative stress induces DNA strand breaks but not caspase mediated apoptosis in a lung cancer cell line. **J. Carcinog.**, v. 3, n. 1, p. 16, 2004.

BERS, D. M. **Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force**. 2. ed. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001.

BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198-205, 2002.

BLASKO, E. et al. Mechanistic studies with potent and selective inducible nitric-oxide synthase dimerization inhibitors. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 1, p. 295-302, 2002.

BLUHM, W. F. et al. Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. **Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol**, v. 278, n. 1, p. H249-H255, 2000.

BOLOTINA, V. M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-853, 1994.

BONNE, G. et al. Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. **Circ. Res.**, v. 83, n. 6, p. 580-593, 1998.

BOUZAMONDO, A. et al. Beta-blocker treatment in heart failure. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 15, n. 2, p. 95-109, 2001.

BRADY, A. J. et al. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. **Am. J. Physiol.**, v. 263, n. 6 Pt 2, p. H1963-H1966, 1992.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 768-770, 1990.

BREDT, D. S. and SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, n. 2, p. 682-685, 1990.

BRENMAN, J. E. et al. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. **Cell**, v. 84, n. 5, p. 757-767, 1996a.

BRENMAN, J. E. et al. Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. **J. Neurosci.**, v. 16, n. 23, p. 7407-7415, 1996b.

BRISTOW, M. R. beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. **Circulation**, v. 101, n. 5, p. 558-569, 2000a.

BRISTOW, M. R. What type of beta-blocker should be used to treat chronic heart failure? **Circulation**, v. 102, n. 5, p. 484-486, 2000b.

BRUNNER, F. et al. Myocardial contractile function and heart rate in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 104, n. 25, p. 3097-3102, 2001.

BU-SOUD, H. M. et al. The ferrous-dioxy complex of neuronal nitric oxide synthase. Divergent effects of L-arginine and tetrahydrobiopterin on its stability. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 28, p. 17349-17353, 1997a.

BU-SOUD, H. M. et al. Analysis of neuronal NO synthase under single-turnover conditions: conversion of Nomega-hydroxyarginine to nitric oxide and citrulline. **Biochemistry**, v. 36, n. 36, p. 10811-10816, 1997b.

BUCHWALOW, I. B. et al. Inducible nitric oxide synthase in the myocardium. **Mol. Cell Biochem.**, v. 217, n. 1-2, p. 73-82, 2001.

BUCHWALOW, I. B. et al. Intracellular localization of inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes in culture. **Acta Histochem.**, v. 99, n. 2, p. 231-240,

1997.

BURKARD, N. et al. Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility. **Circ. Res.**, v. 100, n. 3, p. e32-e44, 2007.

BURNEY, S. et al. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. **Mutat. Res.**, v. 424, n. 1-2, p. 37-49, 1999.

BUSSE, R. and FLEMING, I. Nitric Oxide and Regulation of Vascular Tone. In: MAYER, B., (Ed.). **Nitric Oxide**. Berlin: Springer, 2000. p. 179-206.

BUTLER, A. and NICHOLSON, R. **Life, death and nitric oxide**. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2003.

CAMPBELL, D. L.; STAMLER, J. S.; STRAUSS, H. C. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. **J. Gen. Physiol**, v. 108, n. 4, p. 277-293, 1996.

CASSINA, A. and RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 328, n. 2, p. 309-316, 1996.

CASSINA, A. M. et al. Cytochrome c nitration by peroxynitrite. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 28, p. 21409-21415, 2000.

CASTELLANO, M. and BOHM, M. The cardiac beta-adrenoceptor-mediated signaling pathway and its alterations in hypertensive heart disease. **Hypertension**, v. 29, n. 3, p. 715-722, 1997.

CHAMPION, H. C. et al. Modulation of in vivo cardiac function by myocyte-specific nitric oxide synthase-3. **Circ. Res.**, v. 94, n. 5, p. 657-663, 2004.

CHAMPION, H. C.; SKAF, M. W.; HARE, J. M. Role of nitric oxide in the pathophysiology of heart failure. **Heart Fail. Rev.**, v. 8, n. 1, p. 35-46, 2003.

CHO, H. J. et al. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 176, n. 2, p. 599-604, 1992.

CLEETER, M. W. et al. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. **FEBS Lett.**, v. 345, n. 1, p. 50-54, 1994.

CLEMENTI, E. et al. Nitric oxide modulation of agonist-evoked intracellular Ca²⁺ release in neurosecretory PC-12 cells: inhibition of phospholipase C activity via cyclic GMP-dependent protein kinase I. **Mol. Pharmacol.**, v. 47, n. 3, p. 517-524, 1995.

COLYER, J. Phosphorylation states of phospholamban. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 853, p. 79-91, 1998.

CORREIA, N. A.; OLIVEIRA, R. B.; BALLEJO, G. Pharmacological profile of nitrenergic nerve-, nitric oxide-, nitrosoglutathione- and hydroxylamine-induced relaxations of the rat duodenum. **Life Sci.**, v. 68, n. 6, p. 709-717, 2000.

COTTON, J. M. et al. Effects of nitric oxide synthase inhibition on Basal function and the force-frequency relationship in the normal and failing human heart in vivo. **Circulation**, v. 104, n. 19, p. 2318-2323, 2001.

CRAIG, R. and LEHMAN, W. Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments. **J. Mol. Biol.**, v. 311, n. 5, p. 1027-1036, 2001.

DAMY, T. et al. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. **Lancet**, v. 363, n. 9418, p. 1365-1367, 2004.

DANSON, E. J. et al. Disruption of inhibitory G-proteins mediates a reduction in atrial beta-adrenergic signaling by enhancing eNOS expression. **Cardiovasc. Res.**, v. 67, n. 4, p. 613-623, 2005.

DAS, A.; XI, L.; KUKREJA, R. C. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 13, p. 12944-12955, 2005.

DE BELDER, A. J. et al. Nitric oxide synthase activities in human myocardium. **Lancet**, v. 341, n. 8837, p. 84-85, 1993.

DIAS, F. A. et al. The effect of myosin regulatory light chain phosphorylation on the frequency-dependent regulation of cardiac function. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 41, n. 2, p. 330-339, 2006.

DIAS, F. A. L., URBONIENE, D., DANDEKAR, V., GOLDSPINK, P. H., GEENEN, D. L., WOLSKA, B. M. Ablation of iNOS delays cardiac contractile dysfunction and attenuates hypertrophy gene expression induced by chronic pressure overload. In: AHA SCIENTIFIC SESSIONS, 2004, New Orleans. **Circulation.**, suppl. III, v.110, n.17, p.III-226, 2004b.

DIAS, F. A. L., URBONIENE, D., GOLDSPIK, P. H., GEENEN, D. L., WOLSKA, B. M. Ablation of iNOS attenuates cardiac hypertrophic gene expression and dysfunction induced by chronic pressure overload and helps maintain the beta-adrenergic response. In: EXPERIMENTAL BIOLOGY, 2004, Washington, D.C. **The FASEB journal.**, v. 18, n. 5, p. A1217, 2004b.

DILLON, P. F. et al. Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. **Science**, v. 211, n. 4481, p. 495-497, 1981.

DOBBIE, I., PIAZZESI, G., RECONDITI, M., BÖSECKE, P., DIAT, O., IRVING, M., LOMBARDI, V. Structural dynamics of motors proteins. ESRF Newsletter 27, 12-13. 1997.

DWEIK, R. A. et al. Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. **J. Clin. Invest**, v. 101, n. 3, p. 660-666, 1998.

FENG, Q. et al. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice. **Circulation**, v. 104, n. 6, p. 700-704, 2001.

FERON, O. et al. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 37, p. 22810-22814, 1996.

FERON, O. and MICHEL, T. Cell and Molecular Biology of Nitric Oxide Synthases. In: LOSCALZO, J. and VITA, J. A., (Ed.). **Nitric Oxide and the Cardiovascular System**. Totowa, NJ: Humana Press, 2002. p. 11-31.

FERON, O. et al. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 6, p. 3125-3128, 1998.

FERON, O. et al. Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 28, p. 17744-17748, 1997.

FITZSIMONS, D. P.; BODELL, P. W.; BALDWIN, K. M. Phosphorylation of rodent cardiac myosin light chain 2: effects of exercise. **J. Appl. Physiol**, v. 67, n. 6, p. 2447-2453, 1989.

FITZSIMONS, D. P.; BODELL, P. W.; BALDWIN, K. M. Myocardial functional correlates of cardiac myosin light chain 2 phosphorylation. **J. Appl. Physiol**, v. 68, n. 6, p. 2426-2433, 1990a.

FITZSIMONS, D. P. et al. Left ventricular functional capacity in the endurance-trained rodent. **J. Appl. Physiol**, v. 69, n. 1, p. 305-312, 1990b.

FLEMING, I. et al. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. **Circ. Res.**, v. 88, n. 11, p. E68-E75, 2001.

FLESCH, M. et al. Acute effects of nitric oxide and cyclic GMP on human myocardial contractility. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 281, n. 3, p. 1340-1349, 1997.

FÖRSTERMANN, U. Regulation of Nitric Oxide Synthase Expression and Activity. In: MAYER, B., (Ed.). **Nitric Oxide**. Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2000. p. 71-91.

FORSTERMANN, U. et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, n. 6 Pt 2, p. 1121-1131, 1994.

FORSTERMANN, U. et al. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 88, n. 5, p. 1788-1792, 1991a.

FORSTERMANN, U. et al. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. **Biochem. Pharmacol.**, v. 42, n. 10, p. 1849-1857, 1991b.

FREARSON, N.; SOLARO, R. J.; PERRY, S. V. Changes in phosphorylation of P light chain of myosin in perfused rabbit heart. **Nature**, v. 264, n. 5588, p. 801-802, 1976.

FREY, C. et al. L-thiocitrulline. A stereospecific, heme-binding inhibitor of nitric-oxide synthases. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 42, p. 26083-26091, 1994.

FRIEBE, A. and KOESLING, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Circ. Res.**, v. 93, n. 2, p. 96-105, 2003.

FUKUCHI, M.; HUSSAIN, S. N.; GIAID, A. Heterogeneous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure: their relation to lesion site and beta-adrenergic receptor therapy. **Circulation**, v. 98, n. 2, p. 132-139, 1998.

FUKUTO, J. M., CHO, J. Y., SWITZER, C. H. The Chemical Properties of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides. In: IGNARRO, L. J., (Ed.). **Nitric Oxide Biology**

and Pathobiology. San Diego, CA: Academic Press, 2000. p. 23-40.

FUNAKOSHI, H. et al. Disruption of inducible nitric oxide synthase improves beta-adrenergic inotropic responsiveness but not the survival of mice with cytokine-induced cardiomyopathy. **Circ. Res.**, v. 90, n. 9, p. 959-965, 2002.

FURCHGOTT, R. F. and ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GARCIA-CARDENA, G. et al. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 44, p. 27237-27240, 1996.

GARVEY, E. P. et al. Purification and characterization of the constitutive nitric oxide synthase from human placenta. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 311, n. 2, p. 235-241, 1994.

GAUTHIER, C. et al. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. **J. Clin. Invest.**, v. 102, n. 7, p. 1377-1384, 1998.

GAUTHIER, C. et al. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. **J. Clin. Invest.**, v. 98, n. 2, p. 556-562, 1996.

GEALEKMAN, O. et al. Role of myocardial inducible nitric oxide synthase in contractile dysfunction and beta-adrenergic hyporesponsiveness in rats with experimental volume-overload heart failure. **Circulation**, v. 105, n. 2, p. 236-243, 2002.

GELLER, D. A. et al. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, n. 8, p. 3491-3495, 1993.

GHAFOURIFAR, P. and RICHTER, C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. **FEBS Lett.**, v. 418, n. 3, p. 291-296, 1997.

GIORDANO, A. et al. Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. **FEBS Lett.**, v. 514, n. 2-3, p. 135-140, 2002.

GODECKE, A. et al. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. **Circ. Res.**, v. 82, n. 2, p. 186-194, 1998.

GODECKE, A. et al. Myoglobin protects the heart from inducible nitric-oxide synthase (iNOS)-mediated nitrosative stress. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 24, p. 21761-21766, 2003.

GODECKE, A. and SCHRADER, J. The Janus faces of NO? **Circ. Res.**, v. 94, n. 6, p. e55, 2004.

GOLDSPINK, P. H. et al. Protein kinase Cepsilon overexpression alters myofilament properties and composition during the progression of heart failure. **Circ. Res.**, v. 95, n. 4, p. 424-432, 2004.

GORDON, A. M.; HOMSHER, E.; REGNIER, M. Regulation of contraction in striated muscle. **Physiol Rev.**, v. 80, n. 2, p. 853-924, 2000.

GORDON, A. M.; REGNIER, M.; HOMSHER, E. Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin "rocks and rolls". **News Physiol Sci.**, v. 16, p. 49-55, 2001.

GOW, A. J. et al. Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 12, p. 9637-9640, 2002.

GRISCAVAGE, J. M.; HOBBS, A. J.; IGNARRO, L. J. Negative modulation of nitric oxide synthase by nitric oxide and nitroso compounds. **Adv. Pharmacol.**, v. 34, p. 215-234, 1995.

GROZDANOVIC, Z.; GOSZTONYI, G.; GOSSRAU, R. Nitric oxide synthase I (NOS-I) is deficient in the sarcolemma of striated muscle fibers in patients with Duchenne muscular dystrophy, suggesting an association with dystrophin. **Acta Histochem.**, v. 98, n. 1, p. 61-69, 1996.

GUIX, F. X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog. Neurobiol.**, v. 76, n. 2, p. 126-152, 2005.

GUO, Y.; PETROF, B. J.; HUSSAIN, S. N. Expression and localization of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in Duchenne muscular dystrophy. **Muscle Nerve**, v. 24, n. 11, p. 1468-1475, 2001.

GUPTE, S. A. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH fuels superoxide production in the failing heart. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 41, n. 2, p. 340-349, 2006.

HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J.**, v. 219, n. 1, p. 1-14, 1984.

HAN, X. et al. Nitric oxide synthase (NOS3)-mediated cholinergic modulation of Ca²⁺ current in adult rabbit atrioventricular nodal cells. **Circ. Res.**, v. 78, n. 6, p. 998-1008, 1996.

HAN, X. et al. Characteristics of nitric oxide-mediated cholinergic modulation of calcium current in rabbit sino-atrial node. **J. Physiol**, v. 509 (Pt 3), p. 741-754, 1998a.

HAN, X. et al. Muscarinic cholinergic regulation of cardiac myocyte I_{Ca-L} is absent in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 11, p. 6510-6515, 1998b.

HAN, X.; SHIMONI, Y.; GILES, W. R. A cellular mechanism for nitric oxide-mediated cholinergic control of mammalian heart rate. **J. Gen. Physiol**, v. 106, n. 1, p. 45-65, 1995.

HARE, J. M. et al. Increased sensitivity to nitric oxide synthase inhibition in patients with heart failure: potentiation of beta-adrenergic inotropic responsiveness. **Circulation**, v. 97, n. 2, p. 161-166, 1998.

HARE, J. M. et al. Contribution of caveolin protein abundance to augmented nitric oxide signaling in conscious dogs with pacing-induced heart failure. **Circ. Res.**, v. 86, n. 10, p. 1085-1092, 2000.

HARTZELL, H. C. and FISCHMEISTER, R. Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca²⁺ current in single heart cells. **Nature**, v. 323, n. 6085, p. 273-275, 1986.

HAYWOOD, G. A. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. **Circulation**, v. 93, n. 6, p. 1087-1094, 1996.

HEGER, J. et al. Cardiac-specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunction. **Circ. Res.**, v. 90, n. 1, p. 93-99, 2002.

HEYDRICK, S. Cellular Signal Transduction and Nitric Oxide. In: LOSCALZO, J. and VITA, J. A., (Ed.). **Nitric Oxide and the Cardiovascular System**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000. p. 33-49.

HIRATA, M. et al. Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 3, p. 1268-1273, 1990.

HOPKINS, S. C. et al. Orientation changes of the myosin light chain domain during filament sliding in active and rigor muscle. **J. Mol. Biol.**, v. 318, n. 5, p. 1275-1291, 2002.

- HU, A. et al. Chronic beta-adrenergic receptor stimulation induces cardiac apoptosis and aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury by provoking inducible nitric-oxide synthase-mediated nitrative stress. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 318, n. 2, p. 469-475, 2006.
- HU, H. et al. Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. **Circ. Res.**, v. 81, n. 5, p. 742-752, 1997.
- HUANG, H. et al. Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in Trypanosoma cruzi-infected mice. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 31, n. 1, p. 75-88, 1999.
- HUANG, P. L. et al. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. **Cell**, v. 75, n. 7, p. 1273-1286, 1993.
- HUANG, P. L. et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature**, v. 377, n. 6546, p. 239-242, 1995.
- HUXLEY, H. E. The mechanism of muscular contraction. **Science**, v. 164, n. 886, p. 1356-1365, 1969.
- ICHINOSE, F. et al. A selective inducible NOS dimerization inhibitor prevents systemic, cardiac, and pulmonary hemodynamic dysfunction in endotoxemic mice. **Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol**, v. 285, n. 6, p. H2524-H2530, 2003.
- IGNARRO, L. J. **Nitric Oxide: Biology and Pathobiology**. 1. ed. San Diego, USA: Academic Press, 2000. v. 1.
- IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **J. Physiol Pharmacol.**, v. 53, n. 4 Pt 1, p. 503-514, 2002.
- IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, 1987a.
- IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ. Res.**, v. 61, n. 6, p. 866-879, 1987b.
- JAMES, P. et al. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. **Nature**, v. 342, n. 6245, p. 90-92, 1989.
- JOE, E. K. et al. Regulation of cardiac myocyte contractile function by inducible nitric

oxide synthase (iNOS): mechanisms of contractile depression by nitric oxide. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 30, n. 2, p. 303-315, 1998.

JONES, S. P. et al. Deficiency of iNOS does not attenuate severe congestive heart failure in mice. **Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol**, v. 288, n. 1, p. H365-H370, 2005.

JUMRUSSIRIKUL, P. et al. Interaction between neuronal nitric oxide synthase and inhibitory G protein activity in heart rate regulation in conscious mice. **J. Clin. Invest**, v. 102, n. 7, p. 1279-1285, 1998.

KADOI, Y. and GOTO, F. Selective inducible nitric oxide inhibition can restore hemodynamics, but does not improve neurological dysfunction in experimentally-induced septic shock in rats. **Anesth. Analg.**, v. 99, n. 1, p. 212-220, 2004.

KAMM, K. E. and STULL, J. T. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 7, p. 4527-4530, 2001.

KARCZEWSKI, P. et al. Phosphorylation of phospholamban correlates with relaxation of coronary artery induced by nitric oxide, adenosine, and prostacyclin in the pig. **J. Cell Biochem.**, v. 70, n. 1, p. 49-59, 1998.

KELM, M. et al. Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation. **Cardiovasc. Res.**, v. 36, n. 2, p. 185-194, 1997.

KIMURA, Y. et al. Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 24, p. 15061-15064, 1997.

KLATT, P. et al. Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. **EMBO J.**, v. 14, n. 15, p. 3687-3695, 1995.

KOBZIK, L. et al. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 9, n. 4, p. 371-377, 1993.

KOESLING, D. and FRIEBE, A. Enzymology of Soluble Guanylyl Cyclase. In: MAYER, B., (Ed.). **Nitric Oxide**. Berlin: Springer, 2000. p. 93-109.

KOJDA, G. et al. Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. **Circ. Res.**, v. 78, n. 1, p. 91-101, 1996.

KOJDA, G.; KOTTENBERG, K.; NOACK, E. Inhibition of nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase induces cardiodepressive effects in normal rat hearts. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 334, n. 2-3, p. 181-190, 1997a.

KOJDA, G. et al. Positive inotropic effect of exogenous and endogenous NO in hypertrophic rat hearts. **Br. J. Pharmacol.**, v. 122, n. 5, p. 813-820, 1997b.

KOMALAVILAS, P. and LINCOLN, T. M. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 36, p. 21933-21938, 1996.

KORDOWSKA, J.; HUANG, R.; WANG, C. L. Phosphorylation of caldesmon during smooth muscle contraction and cell migration or proliferation. **J. Biomed. Sci.**, v. 13, n. 2, p. 159-172, 2006.

KRANIAS, E. G. and SOLARO, R. J. Phosphorylation of troponin I and phospholamban during catecholamine stimulation of rabbit heart. **Nature**, v. 298, n. 5870, p. 182-184, 1982.

LACZA, Z. et al. Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 35, n. 10, p. 1217-1228, 2003.

LANCASTER, J. R., JR. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 91, n. 17, p. 8137-8141, 1994.

LAUBACH, V. E. et al. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 92, n. 23, p. 10688-10692, 1995.

LAYLAND, J.; LI, J. M.; SHAH, A. M. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. **J. Physiol**, v. 540, n. Pt 2, p. 457-467, 2002.

LAYLAND, J.; SOLARO, R. J.; SHAH, A. M. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. **Cardiovasc. Res.**, v. 66, n. 1, p. 12-21, 2005.

LEHMAN, W.; CRAIG, R.; VIBERT, P. Ca(2+)-induced tropomyosin movement in Limulus thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction. **Nature**, v. 368, n. 6466, p. 65-67, 1994.

LEHMAN, W. et al. Troponin organization on relaxed and activated thin filaments revealed by electron microscopy and three-dimensional reconstruction. **J. Mol. Biol.**,

v. 307, n. 3, p. 739-744, 2001.

LEHMAN, W. et al. Steric-blocking by tropomyosin visualized in relaxed vertebrate muscle thin filaments. **J. Mol. Biol.**, v. 251, n. 2, p. 191-196, 1995.

LEVINE, R. J. C. and KENSLER, R. W. The thick filament of vertebrate striated muscle - The structure at rest and at work. In: SOLARO, R. J. and MOSS, R. L., (Ed.). **Molecular Control Mechanism in Striated Muscle Contraction**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002. p. 91-141.

LEWIS, N. P. et al. Induction of nitric oxide synthase in the human cardiac allograft is associated with contractile dysfunction of the left ventricle. **Circulation**, v. 93, n. 4, p. 720-729, 1996.

LINCOLN, T. M.; DEY, N.; SELLAKE, H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **J. Appl. Physiol**, v. 91, n. 3, p. 1421-1430, 2001.

LOHSE, M. J.; ENGELHARDT, S.; ESCHENHAGEN, T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? **Circ. Res.**, v. 93, n. 10, p. 896-906, 2003.

LOPEZ, L. C. et al. Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 38, n. 2, p. 267-278, 2006.

LOSCALZO, J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. **Circ. Res.**, v. 88, n. 8, p. 756-762, 2001.

MACMICKING, J. D. et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 641-650, 1995.

MASSION, P. B. et al. Cardiomyocyte-restricted overexpression of endothelial nitric oxide synthase (NOS3) attenuates beta-adrenergic stimulation and reinforces vagal inhibition of cardiac contraction. **Circulation**, v. 110, n. 17, p. 2666-2672, 2004.

MAYER, B. **Nitric oxide**. Berlin: Springer, 2007. v. 143.

MERY, P. F. et al. Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 88, n. 4, p. 1197-1201, 1991.

MESZAROS, L. G.; MINAROVIC, I.; ZAHRADNIKOVA, A. Inhibition of the

skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. **FEBS Lett.**, v. 380, n. 1-2, p. 49-52, 1996.

METZGER, J. M. and MOSS, R. L. Myosin light chain 2 modulates calcium-sensitive cross-bridge transitions in vertebrate skeletal muscle. **Biophys. J.**, v. 63, n. 2, p. 460-468, 1992.

MICHEL, J. B. et al. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 41, p. 25907-25912, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. A Saúde no Brasil: estatísticas essenciais 1990 - 2000. [22]. 2002. Brasília; Brasil. Série G. Estatística e Informação para Saúde.

MIRANDA, K. M. et al. The Chemical Biology of Nitric Oxide. In: IGNARRO, L. J., (Ed.). **Nitric Oxide Biology and Pathobiology**. San Diego, CA: American Press, 2000. p. 41-56.

MOILANEN, E. and VAPAATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. **Ann. Med.**, v. 27, n. 3, p. 359-367, 1995.

MONCADA, S. and ERUSALIMSKY, J. D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 3, n. 3, p. 214-220, 2002.

MORANO, I. Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains. **J. Mol. Med.**, v. 77, n. 7, p. 544-555, 1999.

MORANO, I. et al. Further studies on the effects of myosin P-light chain phosphorylation on contractile properties of skinned cardiac fibres. **Basic Res. Cardiol.**, v. 81, n. 6, p. 611-619, 1986.

MORANO, I. et al. Increased calcium sensitivity of chemically skinned human atria by myosin light chain kinase. **Basic Res. Cardiol.**, v. 83, n. 4, p. 350-359, 1988.

MORANO, I. et al. The influence of P-light chain phosphorylation by myosin light chain kinase on the calcium sensitivity of chemically skinned heart fibres. **FEBS Lett.**, v. 189, n. 2, p. 221-224, 1985.

MORANO, I. and RUEGG, J. C. Calcium sensitivity of myofilaments in cardiac muscle--effect of myosin phosphorylation. **Basic Res. Cardiol.**, v. 81 *Suppl 1*, p. 17-23, 1986.

MUNGRUE, I. N. et al. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. **J. Clin. Invest**, v. 109, n. 6, p. 735-743, 2002a.

MUNGRUE, I. N.; HUSAIN, M.; STEWART, D. J. The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. **Heart Fail. Rev.**, v. 7, n. 4, p. 407-422, 2002b.

MUNGRUE, I. N.; STEWART, D. J.; HUSAIN, M. The Janus faces of iNOS. **Circ. Res.**, v. 93, n. 7, p. e74, 2003.

MURPHY, R. A. Músculo. In: BERNE, R. M. et al., (Ed.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2000. p. 255-302.

NELSON, R. J. et al. Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. **Nature**, v. 378, n. 6555, p. 383-386, 1995.

NISHIO, E. et al. Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through cGMP-independent mechanism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 221, n. 1, p. 163-168, 1996.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

PAN, J. et al. Tyrosine phosphorylation of inducible nitric oxide synthase: implications for potential post-translational regulation. **Biochem. J.**, v. 314 (Pt 3), p. 889-894, 1996.

PATTEN, R. D. et al. Ventricular assist device therapy normalizes inducible nitric oxide synthase expression and reduces cardiomyocyte apoptosis in the failing human heart. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 45, n. 9, p. 1419-1424, 2005.

PAULUS, W. J.; VANTRIMPONT, P. J.; SHAH, A. M. Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion. **Circulation**, v. 89, n. 5, p. 2070-2078, 1994.

PFITZER, G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. **J. Appl. Physiol**, v. 91, n. 1, p. 497-503, 2001.

PIAZZESI, G. and LOMBARDI, V. A cross-bridge model that is able to explain mechanical and energetic properties of shortening muscle. **Biophys. J.**, v. 68, n. 5, p. 1966-1979, 1995.

POLLOCK, J. S. et al. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, v. 88, n. 23, p. 10480-10484, 1991.

PRABHAKAR, R. et al. A familial hypertrophic cardiomyopathy alpha-tropomyosin mutation causes severe cardiac hypertrophy and death in mice. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 33, n. 10, p. 1815-1828, 2001.

PRABHAKAR, R. et al. A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy caused by a alpha-tropomyosin mutation. **Mol. Cell Biochem.**, v. 251, n. 1-2, p. 33-42, 2003.

PRABHU, S. D.; AZIMI, A.; FROSTO, T. Nitric oxide effects on myocardial function and force-interval relations: regulation of twitch duration. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 31, n. 12, p. 2077-2085, 1999.

PRECKEL, B. et al. Inotropic effects of glyceryl trinitrate and spontaneous NO donors in the dog heart. **Circulation**, v. 96, n. 8, p. 2675-2682, 1997.

PUNKT, K. et al. Fibre-related nitric oxide synthase (NOS) in Duchenne muscular dystrophy. **Acta Histochem.**, 2007.

PYLE, W. G. et al. Troponin I serines 43/45 and regulation of cardiac myofilament function. **Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol**, v. 283, n. 3, p. H1215-H1224, 2002.

QUIGNARD, J. F. et al. Voltage-gated calcium channel currents in human coronary myocytes. Regulation by cyclic GMP and nitric oxide. **J. Clin. Invest**, v. 99, n. 2, p. 185-193, 1997.

RAND, M. J. and LI, C. G. Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. **Annu. Rev. Physiol**, v. 57, p. 659-682, 1995.

RAVALLI, S. et al. Inducible nitric oxide synthase expression in smooth muscle cells and macrophages of human transplant coronary artery disease. **Circulation**, v. 97, n. 23, p. 2338-2345, 1998.

RAZAVI, H. M.; HAMILTON, J. A.; FENG, Q. Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. **Pharmacol. Ther.**, v. 106, n. 2, p. 147-162, 2005.

REES, D. D.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, v. 86, n. 9, p. 3375-3378, 1989.

RICCIARDOLO, F. L. et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiol Rev.**, v. 84, n. 3, p. 731-765, 2004.

ROMAN, B. B. et al. PKC-beta is not necessary for cardiac hypertrophy. **Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol**, v. 280, n. 5, p. H2264-H2270, 2001.

RUBBO, H. et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 42, p. 26066-26075, 1994.

RUETTEN, H. et al. Concentric left ventricular remodeling in endothelial nitric oxide synthase knockout mice by chronic pressure overload. **Cardiovasc. Res.**, v. 66, n. 3, p. 444-453, 2005.

RUSSELL, L. K.; FINCK, B. N.; KELLY, D. P. Mouse models of mitochondrial dysfunction and heart failure. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 38, n. 1, p. 81-91, 2005.

SAITO, T. et al. Inhibition of NOS II prevents cardiac dysfunction in myocardial infarction and congestive heart failure. **Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol**, v. 283, n. 1, p. H339-H345, 2002.

SALERNO, J. C. et al. An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 47, p. 29769-29777, 1997.

SAM, F. et al. Mice lacking inducible nitric oxide synthase have improved left ventricular contractile function and reduced apoptotic cell death late after myocardial infarction. **Circ. Res.**, v. 89, n. 4, p. 351-356, 2001.

SANBE, A. et al. Abnormal cardiac structure and function in mice expressing nonphosphorylatable cardiac regulatory myosin light chain 2. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 30, p. 21085-21094, 1999.

SATOH, M. et al. Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in myocardium in human dilated cardiomyopathy. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 29, n. 4, p. 716-724, 1997.

SBAA, E.; FRERART, F.; FERON, O. The double regulation of endothelial nitric oxide synthase by caveolae and caveolin: a paradox solved through the study of angiogenesis. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 15, n. 5, p. 157-162, 2005.

SHAH, A. M. et al. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocytes. **Circ. Res.**, v. 74, n. 5, p. 970-978, 1994.

SHESELY, E. G. et al. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, n. 23, p. 13176-13181, 1996.

SIDDHANTA, U. et al. Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 30, p. 18950-18958, 1998.

SOLARO, R. J.; MOIR, A. J.; PERRY, S. V. Phosphorylation of troponin I and the inotropic effect of adrenaline in the perfused rabbit heart. **Nature**, v. 262, n. 5569, p. 615-617, 1976.

SOMLYO, A. P. and SOMLYO, A. V. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. **Acta Physiol Scand.**, v. 164, n. 4, p. 437-448, 1998.

SPUDICH, J. A. The myosin swinging cross-bridge model. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 2, n. 5, p. 387-392, 2001.

STAMLER, J. S. and MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiol Rev.**, v. 81, n. 1, p. 209-237, 2001.

STEIN, B. et al. Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, but not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 32, n. 5, p. 1179-1186, 1998.

STOJANOVIC, M. O. et al. Anti-adrenergic effects of nitric oxide donor SIN-1 in rat cardiac myocytes. **Am. J. Physiol Cell Physiol**, v. 281, n. 1, p. C342-C349, 2001.

STONE, J. R. and MARLETTA, M. A. Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. **Biochemistry**, v. 34, n. 45, p. 14668-14674, 1995a.

STONE, J. R. and MARLETTA, M. A. The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane. **Biochemistry**, v. 34, n. 50, p. 16397-16403, 1995b.

STONE, J. R. et al. Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinate nitrosyl-heme complex on soluble guanylate cyclase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 207, n. 2, p. 572-577, 1995.

STUEHR, D. J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 37, p. 339-359, 1997.

STUEHR, D. J. and GHOSH, S. Enzymology of Nitric Oxide Synthases. In: MAYER, B., (Ed.). **Nitric Oxide**. Berlin, Germany: Springer, 2000. p. 33-70.

SZCZESNA, D. et al. Phosphorylation of the regulatory light chains of myosin affects Ca²⁺ sensitivity of skeletal muscle contraction. **J. Appl. Physiol**, v. 92, n. 4, p. 1661-1670, 2002.

SZCZESNA, D.; ZHAO, J.; POTTER, J. D. The regulatory light chains of myosin modulate cross-bridge cycling in skeletal muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 9, p. 5246-5250, 1996.

SZYMANSKI, P. T. Calponin (CaP) as a latch-bridge protein--a new concept in regulation of contractility in smooth muscles. **J. Muscle Res. Cell Motil.**, v. 25, n. 1, p. 7-19, 2004.

TAGUCHI, K.; UEDA, M.; KUBO, T. Effects of cAMP and cGMP on L-type calcium channel currents in rat mesenteric artery cells. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 74, n. 2, p. 179-186, 1997.

TAKIMOTO, E. et al. Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. **J. Clin. Invest**, v. 115, n. 5, p. 1221-1231, 2005.

TARDIFF, J. C. Sarcomeric proteins and familial hypertrophic cardiomyopathy: linking mutations in structural proteins to complex cardiovascular phenotypes. **Heart Fail. Rev.**, v. 10, n. 3, p. 237-248, 2005.

TORRE-AMIONE, G. et al. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 27, n. 5, p. 1201-1206, 1996a.

TORRE-AMIONE, G. et al. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. **Circulation**, v. 93, n. 4, p. 704-711, 1996b.

URBONIENE, D. et al. Expression of slow skeletal troponin I in adult mouse heart helps to maintain the left ventricular systolic function during respiratory hypercapnia. **Circ. Res.**, v. 97, n. 1, p. 70-77, 2005.

VEJLSTRUP, N. G. et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human heart: expression and localization in congestive heart failure. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 30, n. 6, p. 1215-1223, 1998.

VIBERT, P.; CRAIG, R.; LEHMAN, W. Steric-model for activation of muscle thin filaments. **J. Mol. Biol.**, v. 266, n. 1, p. 8-14, 1997.

WAHLER, G. M. and DOLLINGER, S. J. Nitric oxide donor SIN-1 inhibits

mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. **Am. J. Physiol**, v. 268, n. 1 Pt 1, p. C45-C54, 1995.

WANG, G. R. et al. Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 9, p. 4888-4893, 1998.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv. Physiol Educ.**, v. 27, n. 1-4, p. 201-206, 2003.

WEI, X. Q. et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v. 375, n. 6530, p. 408-411, 1995.

WILDHIRT, S. M. et al. Aminoguanidine inhibits inducible NOS and reverses cardiac dysfunction late after ischemia and reperfusion--implications for iNOS-mediated myocardial stunning. **Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 47, n. 3, p. 137-143, 1999.

WINK, D. A. et al. The Chemical Biology of Nitric Oxide. Balancing Nitric Oxide with Oxidative and Nitrosative Stress. In: MAYER, B., (Ed.). **Nitric Oxide**. Berlin: Springer, 2000. p. 7-32.

WINK, D. A. and MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 25, n. 4-5, p. 434-456, 1998.

WINK, D. A. et al. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 300, n. 1, p. 115-123, 1993.

WOLLERT, K. C. and DREXLER, H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. **Heart Fail. Rev.**, v. 7, n. 4, p. 317-325, 2002.

WOLSKA, B. M. et al. Expression of slow skeletal troponin I in hearts of phospholamban knockout mice alters the relaxant effect of beta-adrenergic stimulation. **Circ. Res.**, v. 90, n. 8, p. 882-888, 2002.

WOLSKA, B. M. et al. Correlation between myofilament response to Ca²⁺ and altered dynamics of contraction and relaxation in transgenic cardiac cells that express beta-tropomyosin. **Circ. Res.**, v. 84, n. 7, p. 745-751, 1999.

WOLSKA, B. M. et al. Effect of ablation of phospholamban on dynamics of cardiac myocyte contraction and intracellular Ca²⁺. **Am. J. Physiol**, v. 271, n. 1 Pt 1, p. C391-C397, 1996.

WOLSKA, B. M. et al. Expression of slow skeletal troponin I in adult transgenic mouse heart muscle reduces the force decline observed during acidic conditions. **J. Physiol**, v. 536, n. Pt 3, p. 863-870, 2001.

WUNDERLICH, C. et al. Acute inhibition of myoglobin impairs contractility and energy state of iNOS-overexpressing hearts. **Circ. Res.**, v. 92, n. 12, p. 1352-1358, 2003.

XI, L. et al. Essential role of inducible nitric oxide synthase in monophosphoryl lipid A-induced late cardioprotection: evidence from pharmacological inhibition and gene knockout mice. **Circulation**, v. 99, n. 16, p. 2157-2163, 1999.

XIE, Y. W. et al. Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration in vitro. Implications for the development of heart failure. **Circ. Res.**, v. 79, n. 3, p. 381-387, 1996.

XU, K. Y. et al. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 2, p. 657-662, 1999.

XU, L. et al. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. **Science**, v. 279, n. 5348, p. 234-237, 1998.

YASUDA, S. and LEW, W. Y. Lipopolysaccharide depresses cardiac contractility and beta-adrenergic contractile response by decreasing myofilament response to Ca²⁺ in cardiac myocytes. **Circ. Res.**, v. 81, n. 6, p. 1011-1020, 1997.

ZAHRADNIKOVA, A. et al. Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. **Cell Calcium**, v. 22, n. 6, p. 447-454, 1997.

ZANELLA, B. et al. Nitric oxide synthase activity in rat cardiac mitochondria. **Basic Res. Cardiol.**, v. 99, n. 3, p. 159-164, 2004.

ZHANG, P. et al. Inducible Nitric Oxide Synthase Deficiency Protects the Heart From Systolic Overload-Induced Ventricular Hypertrophy and Congestive Heart Failure. **Circ. Res.**, 2007.

ZHENG, B. et al. Inhibition of NOS2 ameliorates cardiac remodeling, improves heart function after myocardial infarction in rats. **Basic Res. Cardiol.**, v. 99, n. 4, p. 264-271, 2004.

ZIOLO, M. T. and BERS, D. M. The real estate of NOS signaling: location, location, location. **Circ. Res.**, v. 92, n. 12, p. 1279-1281, 2003.

ZIOLO, M. T. et al. Myocytes isolated from rejecting transplanted rat hearts exhibit a nitric oxide-mediated reduction in the calcium current. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 33, n. 9, p. 1691-1699, 2001a.

ZIOLO, M. T.; KATOH, H.; BERS, D. M. Expression of inducible nitric oxide synthase depresses beta-adrenergic-stimulated calcium release from the sarcoplasmic reticulum in intact ventricular myocytes. **Circulation**, v. 104, n. 24, p. 2961-2966, 2001b.

ZIOLO, M. T.; KATOH, H.; BERS, D. M. Positive and negative effects of nitric oxide on Ca(2+) sparks: influence of beta-adrenergic stimulation. **Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol**, v. 281, n. 6, p. H2295-H2303, 2001c.

ZIOLO, M. T. et al. Myocyte nitric oxide synthase 2 contributes to blunted beta-adrenergic response in failing human hearts by decreasing Ca²⁺ transients. **Circulation**, v. 109, n. 15, p. 1886-1891, 2004.