

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

DANIELE CAMPOS REZENDE

INFLUÊNCIA DA DELEÇÃO DO GENE DA ÓXIDO NÍTRICO
SINTASE ENDOTELIAL SOBRE ATPases E CINASES
CARDÍACAS

RIO DE JANEIRO

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**Influência da Deleção do Gene da Óxido Nítrico Sintase Endotelial Sobre
ATPases e Cinases Cardíacas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal), do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia)

Orientadores: Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas
Prof. Dr. François Germain Noël

Rio de Janeiro
Dezembro/2009

Rezende, Daniele Campos

Influência da Deleção do Gene da Óxido Nítrico Sintase Endotelial sobre ATPases e Cinases Cardíacas / Daniele Campos Rezende. Rio de Janeiro: UFRJ/ICB, 2009.

ix, 87f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Rio de Janeiro, 2009.

Orientadores: Luis Eduardo Menezes Quintas e François Germain Noël

1. Óxido nítrico. 2. Na⁺/K⁺-ATPase. 3. Ca²⁺-ATPase. 4. MAP cinases. 5. Coração. I. Quintas, Luis Eduardo Menezes (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biomédicas. III. Título.

Daniele Campos Rezende

**Influência da Deleção do Gene da Óxido Nítrico Sintase Endotelial Sobre
ATPases e Cinases Cardíacas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal), do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia)

Aprovada por:

Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas – UFRJ

Prof. Dr. François Germain Noël – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Claudia Lucia Martins da Silva – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Patrícia Dias Fernandes - UFRJ

Prof^a. Dr^a. Jennifer Lowe - UFRJ

Prof. Dr. Mauricio Younes-Ibrahim - UERJ

Rio de Janeiro

Dezembro/2009

À minha família,

Alice e Carlos, meus pais, figuras exemplares, por todo carinho, perseverança e sacrifício. Por serem a base de tudo que sou e o que serei. Pelo amor e incentivo em cada meta conquistada.

Carla, minha irmã, pelo companheirismo, carinho e amizade em todos os momentos. Pelo exemplo de superação no qual eu me espelho, e do qual me orgulho. Que eu possa um dia retribuir todo o amor que você tem me dispensado.

Amo vocês...

Agradecimentos

Este espaço é dedicado àqueles que deram sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada. Desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

A Deus, pela fé que me mantém viva e fiel à vida honesta de trabalho e estudo.

Ao Professor Luis Eduardo Menezes Quintas, meu orientador, pela orientação científica prestada, bem como pela disponibilidade e amizade demonstradas. Pelos conhecimentos transmitidos e apoio na execução experimental, assim como pelo persistente incentivo com que me distinguiu, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho. Agradeço pela convivência e aprendizado ao longo destes anos.

Ao Professor François Germain Noël, meu co-orientador, pelo exemplo profissional e pelo apoio prestado, tanto ao longo da realização das atividades experimentais, como na elaboração do trabalho final. Agradeço pela cordialidade com que sempre me recebeu, assim como pelas críticas, correções e sugestões feitas durante a orientação.

À Professora Claudia Lucia Martins da Silva, pelo apoio e colaboração durante a realização deste trabalho, pela disponibilidade sempre manifestada e pelo seu exemplo de profissionalismo e espírito crítico. Pelas contribuições durante a revisão deste trabalho e ao longo da minha formação.

Aos amigos de trabalho Elisa Pôças e Jean Pierre Thibaut, pelo apoio prestado, pelas proveitosas conversas e pelos conselhos transmitidos. Pelos exemplos os quais tentei seguir.

Aos colegas e amigos de laboratório, Daniele Valentim, Luciana Amaral, Natália Touza, Marco Antônio Rodrigues, Fernanda Chagas, Suellen D'Arc, Jéssica Barbosa e Renam Oliveira, por toda a colaboração prestada na execução experimental e também pela amizade e companheirismo dispensados. Pelo ótimo ambiente de trabalho, que tornou tão agradável nossa convivência diária.

Aos meus queridos amigos, que compreenderam minha ausência e me deram incentivo em tantos momentos dessa caminhada. Pela amizade sincera, além de todo o apoio com que sempre me recompensaram ao longo desta jornada.

Aos professores desse Programa de Pós-Graduação, pela forma como lecionaram e pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas que me acompanharam nesse curso de Pós-Graduação, pela boa disposição com que realizamos os muitos trabalhos em comum.

Aos professores da UNIFESP, pela colaboração essencial para a realização deste trabalho.

Aos professores Patrícia Dias, Jennifer Lowe e Maurício Ibrahim, por aceitarem avaliar este trabalho e pelas contribuições que hão de fazer.

Aos funcionários do Instituto, pela forma carinhosa como sempre fui tratada e pelo apoio nos mais variados problemas que surgiram durante a realização deste trabalho.

Ao técnico de laboratório José Ferreira de Oliveira pela colaboração.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

RESUMO

REZENDE, Daniele Campos. **Influência da Deleção do Gene da Óxido Nítrico Sintase Endotelial Sobre ATPases e Cinases Cardíacas**. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

A enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que encontra-se presente no miocárdio e rins, tem sido considerada importante para a homeostasia cardíaca. Em humanos, o polimorfismo da eNOS está associado com algumas desordens cardiovasculares. Além da sua reconhecida ação vasodilatadora, o NO em concentrações fisiológicas tem se mostrado um importante citoprotetor endógeno, por neutralizar espécies reativas de oxigênio deletérias. Neste trabalho, foi avaliada a influência da ausência da eNOS em proteínas cardíacas e renais que têm um papel crucial na manutenção da fisiologia cardiovascular. O objetivo foi determinar a atividade enzimática e a expressão protéica das isoformas α da Na^+/K^+ -ATPase (NKA), de Ca^{2+} -ATPases (CaA) e de MAP cinases (MAPK), em camundongos onde o gene que codifica a eNOS foi deletado (eNOS/KO). Ensaio bioquímico e de Western Blot demonstraram que a atividade NKA e a expressão da isoforma α_2 observadas no coração de camundongos eNOS/KO foram significativamente diminuídas (70% e 43% em relação aos selvagens, respectivamente, $p < 0,05$), mas não a expressão de α_1 ou α_3 . De modo similar, nos rins dos animais eNOS/KO houve diminuição da atividade NKA sem alteração na expressão de α_1 , única isoforma presente nesse órgão. Os níveis de atividade CaA das preparações de tecido cardíaco se mostraram similares entre os dois grupos, porém foi observado um aumento significativo da densidade de SERCA2 nos camundongos eNOS/KO (190% em relação aos selvagens, $p < 0,05$). Ao avaliar o grau de oxidação dos grupos sulfidríla, essenciais para a função do sítio catalítico de ATPases, detectou-se no grupo eNOS/KO diminuição desses grupos sulfidríla reduzidos, tanto nas preparações de coração quanto nas de rim (23% e 14% em relação aos selvagens, respectivamente, $p < 0,05$). Considerando o papel do NO como sinalizador e ativador de importantes vias de sinalização das células, avaliou-se os níveis de expressão e ativação das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Nos animais eNOS/KO, foi observada uma menor densidade das formas ativadas (fosforiladas) de p38 cinase e de ERK 1/2 (90% e 99% em relação aos selvagens, respectivamente, $p < 0,05$), sem alteração da ativação de JNK 1/2. O conjunto de dados sugere que no modelo eNOS/KO, a ausência da eNOS e provável deficiência na geração endógena local de NO pode contribuir para a diminuição da atividade ATPásica, resultante da oxidação de grupos sulfidríla indispensáveis para a atividade catalítica dessas ATPases, provavelmente gerada pelo desequilíbrio redox nos camundongos eNOS/KO. Além disso, no coração, a diminuição da expressão da isoforma α_2 da NKA deve também contribuir para essa queda de atividade. A alteração na expressão de SERCA2 pode indicar uma adaptação de maneira a compensar o prejuízo na homeostasia do Ca^{2+} no miocárdio. As modificações observadas tanto em ATPases quanto em MAPKs nessa fase do desenvolvimento murino parecem apontar para o início de disfunção cardíaca que é observada nesse modelo em idades mais avançadas.

Palavras-chave: Óxido nítrico, Na^+/K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase, MAP cinases, coração

ABSTRACT

REZENDE, Daniele Campos. **Influência da Deleção do Gene da Óxido Nítrico Sintase Endotelial Sobre ATPases e Cinases Cardíacas**. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS), found in heart and kidney, has been considered important for cardiac homeostasis. In humans, eNOS polymorphisms are associated with some cardiovascular diseases. Besides its well-established vasodilatory action, physiological concentrations of NO has been shown an important endogenous cytoprotective, by scavenging harmful reactive oxygen species. This work evaluates the influence of the absence of eNOS on some important cardiac and renal proteins that have crucial role on maintaining cardiovascular physiology. The aim was to assess enzymatic activity and protein expression of Na^+/K^+ -ATPase (NKA) α isoforms, Ca^{2+} -ATPases (CaA) and MAP kinases (MAPK) from mice knocked out for eNOS gene (eNOS/KO). Biochemical assays and Western Blot showed that myocardial NKA activity and protein expression of NKA α_2 isoform for eNOS/KO were significantly reduced (70% and 43%, compared to wild-type mice, $p < 0.05$), but not α_1 or α_3 expression. Likewise, eNOS/KO kidneys showed reduced NKA activity, but no difference for α_1 isoform, unique in this organ. CaA activity levels from heart preparations were similar for both groups, but it was observed a significant augment of SERCA2 density in eNOS/KO mice (190% of wild-type mice, $p < 0.05$). Assessing the oxidation levels of sulfhydryl groups, that are essential for the function of catalytic sites of ATPases, it was detected a decrease of these free sulfhydryl groups in eNOS/KO heart and kidney preparations (23% and 14% of wild-type mice, $p < 0.05$). Concerning the role of NO on signaling and activation of important cell signaling pathways, the levels of expression and activation of MAPKs were evaluated. In eNOS/KO mice, lower density of active (phosphorylated) p38 kinase and ERK 1/2 (90% and 99% of wild-type, $p < 0.05$) were observed, with no alteration of JNK 1/2 activation. Data suggest that in eNOS/KO model, absence of eNOS and probably reduced local endogenous NO generation may contribute to depressed ATPase activity, in result of sulfhydryl groups oxidation, that are crucial for theses ATPases catalytic activity, probably due to redox unbalance in eNOS/KO mice. Besides, downregulation of cardiac NKA α_2 isoform may also contribute for depressed activity. Alterations observed in SERCA2 expression seem to indicate an adaptation to compensate impaired myocardial Ca^{2+} homeostasis. These changes, observed for both ATPases and MAPKs in this stage of mice development, seem to indicate the outset of cardiac disfunction that is observed in this model in older stages.

Keywords: Nitric oxide, Na^+/K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase, MAP kinases, heart

ABREVIATURAS

A₂₃₁₈₇	ionóforo de cálcio
ANP	peptídeo natriurético atrial
Asp	aspartato
ATP	trifosfato de adenosina
BH₄	tetrahidrobiopterina
BSA	albumina sérica bovina
C57BL/6J	linhagem de camundongos a partir da qual o modelo eNOS/KO foi desenvolvido
DTT	ditiotreitól
DTNB	ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico)
ECL	do inglês <i>enhanced chemiluminescence</i> , amplificador de sinal quimioluminescente
EDRF	do inglês <i>endothelium-derived relaxing factor</i> , fator de relaxamento derivado do endotélio
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i> , receptor do fator de crescimento do epitélio
EGTA	ácido etileno-bis(oxietilenonitrilo)tetra-acético
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
eNOS/KO	do inglês <i>eNOS knockout</i> , camundongo com nocaute para eNOS
epm	erro padrão da média
ERK	do inglês <i>extracellular signal-regulated kinase</i> , cinase regulada por sinal extracelular
g_{av}	força de gravidade média
GMPc	monofosfato de guanosina cíclico
GTP	trifosfato de guanosina
HEPES	ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetanosulfônico
IC	insuficiência cardíaca
IgG	imunoglobulina G
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
JNK	do inglês <i>c-Jun-N-terminal kinase</i> , cinase c-Jun-N-terminal
kDa	quiloDalton
L-NAME	do inglês <i>L- nitro arginine methyl ester</i> , éster de L-nitrometilarginina
mA	miliampere
MAP	do inglês <i>mitogen activated protein</i> , proteína ativada por mitógeno
MAPK	do inglês <i>mitogen activated protein kinase</i> , proteína cinase ativada por mitógeno
MEK	do inglês <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i> , proteína cinase cinase ativada por mitógeno
mtNOS	óxido nítrico sintase mitocondrial
NAD[P]H	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (reduzido)
NO	óxido nítrico (formula química)
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal

NOS	do inglês <i>nitric oxide synthase</i> , óxido nítrico sintase
PA	pressão arterial
Pi	fosfato inorgânico
PKG	proteína cinase G
PLB	do inglês <i>phospholamban</i> , fosfolamban
PMCA	do inglês <i>plasma membrane Ca²⁺-ATPase</i> , Ca ²⁺ -ATPase de membrana plasmática
PMSF	fenilmetilssulfonil fluoreto
Raf	uma Serina/Treonina cinase de 74kDa
Ras	proteína G monomérica Ras
RNS	do inglês <i>reactive nitrogen species</i> , espécies reativas de nitrogênio
ROS	do inglês, <i>reactive oxygen species</i> , espécies reativas de oxigênio
RyR	receptor de rianodina
SAPK	do inglês <i>stress-activated protein kinase</i> , proteína cinase ativada por estresse
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SERCA	do inglês <i>sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i> , Ca ²⁺ -ATPase de retículo sarcoendoplasmático
Ser/Thr	Serina/Treonina
SPCA	do inglês <i>secretory pathway Ca²⁺-ATPase</i> , Ca ²⁺ -ATPase de vias secretoras
Src	tirosina cinase Src
TBS-T	do inglês <i>Tris-buffered saline + Tween®</i> , tampão salino composto de Tris + Tween®
TNFα	fator de necrose tumoral alfa
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
Tween®	marca registrada de surfactantes não-iônicos do tipo monolaurato de polioxietileno sorbitano
V	Volts
WHO	do inglês <i>World Health Organization</i> , Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract	vii
Abreviaturas	viii
Introdução	1
1.1 O coração e o sistema cardiovascular	2
1.2 Doenças cardiovasculares: Importância da disfunção endotelial e do óxido nítrico	2
1.3 Aspectos biológicos do óxido nítrico	4
1.3.1 Tipos de NOS	6
1.3.2 Localização das NOS	6
1.3.3 Polimorfismos da NOS e sua relevância	8
1.4 Papel do óxido nítrico na manutenção da pressão arterial	8
1.5 Radicais livres e estresse oxidativo	9
1.6 Danos causados a proteínas pelo estresse oxidativo cardíaco	11
1.7 ATPases e cinases: proteínas importantes para a fisiologia cardíaca	12
1.7.1 Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	13
1.7.2 Ca ²⁺ -ATPases	18
1.7.3 MAP cinases	21
1.8. O papel funcional da eNOS: Lições do modelo nocaute murino	23
Objetivos	25
Materiais & Métodos	27
3.1 Modelo experimental murino	28
3.2 Coleta de tecido e análise biométrica dos animais	28
3.3 Preparações subcelulares dos tecidos	29
3.4 Dosagem de proteínas	30
3.5 Determinação da atividade ATPásica	30
3.5.1 Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	31
3.5.2 Ca ²⁺ -ATPases	31
3.6 Ensaio de Western Blot.....	31
3.7 Dosagem de grupos sulfidril livres	33

3.8	Análise dos dados	33
3.9	Listagem de reagentes	34
3.10	Soluções utilizadas	34
	Resultados	38
4.1	Análise fenotípica dos camundongos eNOS/KO	39
4.2	Avaliação da expressão de MAP cinases cardíacas	41
4.3	Avaliação da atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase cardíaca	46
4.4	Avaliação da expressão das isoformas da subunidade α da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase cardíaca	46
4.5	Avaliação da atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase renal	50
4.6	Avaliação da expressão da isoforma α_1 da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase renal	50
4.7	Avaliação da atividade Ca ²⁺ -ATPásica cardíaca	52
4.8	Avaliação da expressão de SERCA2 cardíaca	52
4.9	Avaliação da expressão de PMCA cardíaca.....	53
4.10	Dosagem de grupos sulfidril em coração e rins	55
	Discussão	57
	Conclusões	65
	Referências	67

Introdução

1.1 O coração e o sistema cardiovascular

Em mamíferos, o sistema cardiovascular é composto por circuitos de sangue oxigenado e desoxigenado (completamente separados), e serve para transportar e distribuir substâncias essenciais para os tecidos, assim como para remover os produtos provenientes do metabolismo. Além disso, participa da regulação homeostática do organismo contribuindo para o controle da temperatura, para a comunicação humoral através dos tecidos e para ajustar o suprimento de oxigênio e nutrientes em diferentes situações fisiológicas (AIRES, 1999).

A perfusão tecidual apropriada é garantida pela manutenção da força motriz da circulação – o débito cardíaco – em níveis adequados e razoavelmente constantes ao longo de toda a vida dos indivíduos, estejam eles em repouso ou desenvolvendo diferentes atividades comportamentais. Os níveis de pressão arterial (PA), gerados pela atividade cardíaca e vascular, são controlados por complexos mecanismos.

Os efetores do sistema cardiovascular são o coração e os vasos (de resistência e capacitância). A homeostase do volume dos fluidos corporais e a regulação a longo prazo da pressão arterial também estão intimamente relacionadas via mecanismo de retroalimentação rim/volume extracelular. A manutenção de valores relativamente constantes de PA por longos períodos e, provavelmente, durante toda a vida adulta é possível devido à interação harmônica de mecanismos de controle que ajustam a função contrátil do miocárdio (controle de débito cardíaco) e do músculo liso vascular (controle da resistência vascular e retorno venoso) e o balanço do volume extracelular (via controle da excreção renal de sódio e água) (AIRES, 1999). Entretanto, quando esse ajuste é comprometido, uma série de consequências nocivas ao organismo podem surgir.

1.2 Doenças cardiovasculares: Importância da disfunção endotelial e do óxido nítrico

As doenças cardiovasculares adquiriram maior importância durante o século XX, com o aumento da expectativa de vida da população em geral e um conseqüente aumento da população de idosos. Nos Estados Unidos, por exemplo, no ano de 1900 a expectativa de vida era de 47 anos; este valor aumentou para 78

anos em 2006. Em nosso país, quem nasceu no ano 2006, poderá esperar ter uma vida média de 72 anos (WHO, 2008).

Este aumento da expectativa de vida, juntamente com os problemas decorrentes da mudança no estilo de vida das pessoas, acabou por determinar um aumento na incidência das doenças cardiovasculares, que surgem mais freqüentemente após os 50 anos de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Essas doenças têm se mostrado um grave problema de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde estima, segundo um relatório global divulgado em 2008, que 17,1 milhões de indivíduos tenham morrido no ano de 2004, em função de desordens cardiovasculares (o que corresponde a 29% do total de mortes) (WHO, 2008). De acordo com dados do Caderno de Informações de Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009), divulgado pelo Ministério da Saúde brasileiro em fevereiro de 2009, elas são a principal causa de óbitos no nosso país (32% - dado relativo ao ano de 2006) e uma das principais causas de internação hospitalar (10,2% do total – dado relativo ao ano de 2007) – ficando atrás apenas de parto e doenças do sistema respiratório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Outro problema das doenças cardiovasculares se deve às sequelas incapacitantes, como ocorrem freqüentemente após de infarto do miocárdio e acidentes vasculares, por exemplo. As sequelas acontecem em cerca de 20 a 30% dos indivíduos acometidos por essas doenças (O'KEEFE e cols., 2009).

Existem alguns fatores que são predisponentes para as doenças cardiovasculares, e que não se pode modificar (hereditariedade, sexo, idade, raça, etc). Já outros fatores são adquiridos ou podem ser controlados (obesidade, sedentarismo, tabagismo); entre esses está a hipertensão arterial. Apesar da maioria dos casos de hipertensão ter uma origem inerente ao próprio indivíduo, ela pode e deve ser controlada com dieta, medicamentos e exercícios (O'KEEFE e cols., 2009).

A disfunção do endotélio vascular é reconhecida como um fenômeno comum em um espectro de desordens cardiovasculares (MOMBOULI & VANHOUTTE, 1999). O endotélio vascular é reconhecido como um importante participante no sistema cardiovascular saudável, e a disfunção dessa monocamada celular pode ser o evento iniciador na maioria das desordens cardiovasculares (MOMBOULI & VANHOUTTE, 1999). Uma característica marcante da função endotelial é a síntese e a liberação de óxido nítrico (NO), que promove vasodilatação, além de ações

antitrombóticas (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980; MOMBOULI & VANHOUTTE, 1999).

O NO é reconhecido como um importante sinalizador molecular e neurotransmissor, atuando praticamente em todos os sistemas orgânicos, não apenas em mamíferos, mas também em espécies de plantas, peixes, e insetos (MONCADA & HIGGS, 1993; STUART-SMITH, 2002). A princípio denominado de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980), teve sua identidade “revelada” por PALMER e colaboradores, em 1987.

Em humanos, o NO exerce notavelmente diversas funções fisiológicas e fisiopatológicas, e é um importante mediador de funções relacionadas ao sistema cardiovascular (GILES, 2006). Como potente vasodilatador, o NO desempenha um papel essencial no funcionamento normal do sistema cardiovascular. É uma molécula-chave na regulação das funções endoteliais. Conforme já foi ressaltado, a deficiência de NO, característica da disfunção endotelial, é o primeiro passo para a ocorrência de muitos estados patológicos no sistema cardiovascular.

1.3 Aspectos biológicos do óxido nítrico

Em função dos seus numerosos papéis fisiológicos, e de sua rápida reação/inativação em sistemas celulares, é crucial que haja um controle rigoroso da produção de NO para suas ações seletivas (WATTANAPITAVAKUL e cols., 2001).

Ele é sintetizado pelas células a partir do aminoácido L-arginina e oxigênio molecular. A óxido nítrico sintase (NOS) catalisa a reação que converte a L-arginina em L-citrulina e NO, e requer o complexo Ca^{2+} - calmodulina e a tetraidrobiopterina (BH_4) como cofatores (CENGEL & SAHINARSLAN, 2006). Uma ilustração esquemática da NOS é apresentada na Figura 1. O “*shear stress*” (que é o estresse de cisalhamento do sangue com os seus constituintes) causado pelo fluxo vascular é o estímulo fisiológico primário para a produção de NO pelo endotélio (BEHRENDT & GANZ, 2002), embora não seja o único estímulo. Esta força induz a abertura de canais de Ca^{2+} nas células endoteliais, promovendo então a ativação Ca^{2+} -dependente da NOS endotelial, que, por sua vez, induz a liberação de NO (BUHIMSCHI e cols., 1998).

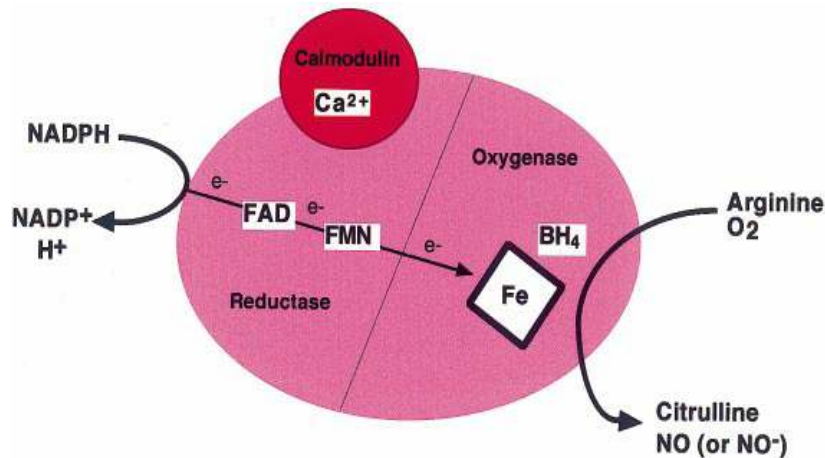


Figura 1: Ilustração esquemática da NOS. São mostrados os domínios redutase e oxigenase da enzima, além sítios de ligação para os cofatores da reação. Retirado de ALDERTON e cols., 2001.

O pequeno tamanho e a natureza lipofílica do NO permitem que ele se difunda prontamente através das membranas celulares sem precisar de canais ou receptores (BUHIMSCHI e cols., 1998). Uma vez sintetizado, o NO se difunde pela camada muscular subendotelial. Ali, ele promove a hiperpolarização das células devido à ativação de canais de K^+ (BOLOTINA e cols., 1994). Além disso, o NO induz a guanilato ciclase solúvel a sintetizar GMPc a partir de GTP. O GMPc ativa a proteína cinase dependente do GMPc (PKG), que por sua vez promove a diminuição dos níveis intracelulares de Ca^{2+} por estímulo da bomba de Ca^{2+} e pelo fechamento de canais de Ca^{2+} ativados por voltagem (BEHRENDT & GANZ, 2002; CENGEL & SAHINARSLAN, 2006; LINCOLN e cols., 1994; MONCADA & HIGGS, 1993). A PKG também estimula a fosfatase da miosina de cadeia leve, levando à desfosforilação dessa miosina, com conseqüente desacoplamento do sistema actina-miosina. Em última instância, é observado relaxamento do músculo liso vascular, e vasodilatação no sistema cardiovascular.

Além disso, o NO é um radical livre que modula o funcionamento e o metabolismo de diversos sistemas biológicos. Por essa razão, o $NO\cdot$ pode agir como uma importante molécula sinalizadora de oxidação biológica em uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo cardioproteção, relaxamento do músculo liso, regulação da pressão sangüínea, neurotransmissão, mecanismo de defesa, regulação imune, e função plaquetária (MONCADA & ERUSALIMSKI, 2002; BERGENDI e cols., 1999; RADOMSKI e cols., 1987).

Do ponto de vista físico-químico, o NO é um gás prontamente difusível, com estabilidade limitada (meia-vida de alguns segundos), e é sabido que participa de uma variedade de reações químicas com metais, tióis e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) (BECKMAN & KOPPENOL, 1996).

1.3.1 Tipos de NOS

As óxido nítrico sintases (NOS) são membros de uma família de redutases do tipo citocromo P450 ligadas a uma enzima oxidase nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (reduzido) (NAD[P]H). As NOS são formadas por duas unidades catalíticas distintas: o domínio redutase C-terminal e o domínio oxigenase N-terminal (GORREN e cols., 1997). Em condições fisiológicas, na presença de níveis suficientes de BH_4 , estas unidades trabalham juntas e sintetizam NO (CENGEL & SAHINARSLAN, 2006).

Existem três diferentes enzimas de NOS: endotelial (eNOS; ou NOS tipo III), neuronal (nNOS; ou NOS tipo I) e induzível (iNOS; ou NOS tipo II).

A eNOS, uma isoforma constitutiva, é uma forma Ca^{2+} -dependente da enzima encontrada em diversos tipos celulares e é responsável pela produção da maior parte do NO no vaso sanguíneo saudável (CENGEL & SAHINARSLAN, 2006).

A nNOS, uma segunda isoforma constitutiva, está presente no sistema nervoso central e periférico, assim como em músculo esquelético. Tanto eNOS quanto nNOS são Ca^{2+} -calmodulina-dependentes.

A terceira isoforma conhecida da NOS é a iNOS, que não é expressa constitutivamente, além de ter sua atividade independente de Ca^{2+} . Sua expressão é induzida pela ação de citocinas inflamatórias tais como interleucina-1 (IL-1) ou fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) em macrófagos e outros tipos celulares (MONCADA & HIGGS, 1993, TOGASHI e cols., 1997). Todas as três isoformas, entretanto, têm sido encontradas em diversos tecidos, e as isoformas constitutivas podem também ser induzíveis (SCATENA e cols., 2005).

1.3.2 Localização das NOS

A eNOS, é primordialmente expressa no endotélio, em células musculares e no epitélio das vias respiratórias. Além disso, já foi identificada em neurônios do

hipocampo, diversos tipos de células epiteliais, plaquetas e também em miócitos cardíacos e células renais (BALLIGAND e cols., 1993; FORSTERMANN e cols., 1998, ALEXANDER e cols., 1999). A falta de seletividade celular na expressão das NOS resulta na co-expressão de diversas isoformas de NOS em um mesmo tipo celular, como exemplificado em células musculares cardíacas, onde a eNOS e a nNOS constitutivas podem coexistir com a iNOS, induzida sob estimulação com mediadores inflamatórios apropriados (MASSION & BALLIGAND, 2003). Uma NOS mitocondrial (mtNOS) também foi identificada (BATES e cols., 1996), correspondendo a uma variante da NOS neuronal (KANAI e cols., 2001; ELFERING e cols., 2002), embora seu impacto funcional no funcionamento da mitocôndria *in vivo* ainda precise ser melhor estabelecido (FRENCH e cols., 2001).

Recentemente, um número considerável de publicações concentrou-se em elucidar o papel do NO na regulação da função cardíaca. Em cardiomiócitos, o NO produzido localmente pode modular o estado inotrópico e cronotrópico além do consumo de oxigênio no coração normal e no coração insuficiente (MONCADA & ERUSALIMSKI, 2002; CHEN e cols., 2002; RECCHIA e cols., 1998).

A eliminação do NO produzido pela eNOS no coração também pode aumentar o débito cardíaco e a contratilidade. No coração, a eNOS é expressa não apenas no endotélio dos vasos coronarianos, mas também nos miócitos cardíacos (ZHOU e cols., 2002; BALLIGAND e cols., 1993; PAPAPETROPOULOS e cols., 1999). Em adição à eNOS de sarcolema, e também da membrana de retículo sarcoplasmático cardíaco (ZHRADNIKOVA e cols., 1997), os cardiomiócitos também expressam a nNOS na mitocôndria e no retículo sarcoplasmático (KANAI e cols., 2001; YANG e cols., 1999), sugerindo que o NO exerce um papel importante na fisiologia do miócito. Um desses trabalhos mostrou que o NO produzido localmente pela eNOS localizada na membrana de cardiomiócitos parece proteger a função de enzimas membranares (XU e cols., 2003). Além disso, o NO é um radical livre que modula o funcionamento e o metabolismo do coração (XU e cols., 1999). Ele já se mostrou um importante regulador fisiológico da homeostasia do Ca^{2+} (CAMPBELL e cols., 1996) e da função contrátil do miocárdio (KELLY e cols., 1996) (podendo produzir, de maneira concentração dependente, efeitos inotrópicos positivos ou negativos). Através de interações com os canais de Ca^{2+} do tipo L em cardiomiócitos (CAMPBELL e cols., 1996) e o receptor de rianodina (RyR) (XU e

cols., 1998), o NO pode promover aumento ou diminuição da concentração intracelular de Ca^{2+} .

1.3.3 Polimorfismos da NOS e sua relevância

Variações polimórficas do gene que codifica a eNOS são conhecidas e têm sido investigadas com relação ao risco de doenças (WATTANAPITAYAKUL e cols., 2001). Diversos estudos identificaram mutações específicas no gene da eNOS como sendo significativamente mais prevalentes em pacientes com hipertensão do que em normotensos (HYNDMAN e cols., 2002). Embora alguns estudos não tenham encontrado associação entre esses genótipos e a hipertensão (KATO e cols., 1999; LACOLLEY e cols., 1998), muitos deles são contraditórios. Os principais problemas incluem: controles inapropriados, interações multigênicas e consequências biológicas plausíveis. Até o momento, as inconsistências não são específicas dos polimorfismos da eNOS, mas provavelmente representam vastos desafios para a definição dos aspectos genéticos de processos patológicos complexos (WATTANAPITAYAKUL e cols., 2001).

A importância da eNOS no controle da pressão arterial a longo prazo é sustentada pela associação de hipertensão com os polimorfismos da eNOS no homem (WATTANAPITAYAKUL e cols., 2001) e pelos relatos de hipertensão em camundongos com deficiência na eNOS (BEIERWALTES e cols., 2002; BRANDES e cols., 2000; DUPLAIN e cols., 2001; GÖDECKE e cols., 1998; HUANG e cols., 1995; KURIHARA e cols., 1998; SHESELY e cols., 1996; STAUSS e cols., 1999; VAN VLIET e cols., 2003; YANG e cols., 1999).

Esses polimorfismos provavelmente têm um pequeno efeito na produção de NO, que podem se tornar significativos na presença de outros mecanismos ou fatores de risco (HERMANN e cols., 2006).

1.4 Papel do óxido nítrico na manutenção da pressão arterial

Em resposta a agonistas de receptores metabotrópicos tais como bradicinina e acetilcolina, ou a forças mecânicas como o “*shear stress*”, as células endoteliais produzem NO, que se difunde pela camada de células de músculo liso vascular e causa vasodilatação (SHESELY e cols., 1996). Tal processo parece ser de suma

importância para a homeostasia da pressão arterial já que a administração de inibidores competitivos das enzimas NOS, como os análogos da arginina N^G -monometil-L-arginina e L-nitroarginina, a animais (REES e cols., 1989; WHITTLE e cols., 1989; SALAZAR e cols., 1992; BAYLIS e cols., 1992; RIBEIRO e cols., 1992) ou a humanos (VALLANCE e cols., 1989a; VALLANCE e cols., 1989b) resulta em aumento da resistência vascular periférica e elevação da pressão arterial.

O aumento da pressão arterial é uma desordem que se caracteriza por um aumento da pressão exercida pelo fluxo sanguíneo sobre as paredes das artérias. Nessas condições, o coração precisa aumentar seu trabalho para garantir uma irrigação satisfatória dos tecidos. O aumento da pós-carga acaba, ao longo do tempo, por sobrecarregar o coração. Pacientes hipertensos não-controlados correm o triplo do risco de desenvolverem isquemia miocárdica (angina ou infarto) e sete vezes mais chances de apresentarem um acidente vascular cerebral - dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia (disponível em <<http://www.cardiol.br>>, acessado em 15/09/2009).

Dados recentes demonstraram que a previsão é de que dentro dos próximos 20 anos, o percentual da população adulta que será afetado pela hipertensão arterial cresça em 60%, correspondendo a um total de mais de 1,5 bilhão de indivíduos (KEARNEY e cols., 2005). As evidências experimentais indicam um papel importante das ROS na gênese da hipertensão arterial (ZENG e cols., 2009).

1.5 Radicais livres e estresse oxidativo

Os radicais livres são moléculas com elétrons não-pareados na sua camada mais externa. Eles são altamente reativos e são formados em processos que envolvem o oxigênio. Os radicais livres que se originam do oxigênio são chamados ROS, enquanto que radicais livres que se originam da reação do oxigênio com nitrogênio são considerados uma subclasse de radicais livres, e são chamados espécies reativas de nitrogênio (RNS). Radicais livres de oxigênio incluem o ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxil ($OH\cdot$), enquanto que RNS incluem o óxido nítrico ($NO\cdot$), o dióxido de nitrogênio ($NO_2\cdot$) e o peroxinitrito ($ONOO^-$), este último sendo originado da reação do O_2^- com o $NO\cdot$ (FUKUTO e cols., 2008).

O dano oxidativo devido ao aumento da formação de radicais livres leva a mudanças na permeabilidade de membrana, ruptura da bicamada lipídica da

membrana e modificações funcionais de várias proteínas celulares. De fato, o estresse oxidativo, que ocorre quando há uma ruptura no balanço celular pró-oxidante e antioxidante (SIES, 1991), está associado com modificações de fosfolípidios e proteínas de membrana, levando à peroxidação e oxidação de grupos tióis (WINK e cols., 2003; DONZELLI e cols., 2006; ESPEY e cols., 2002; RIDNOUR e cols., 2004a; RIDNOUR e cols., 2004b; FUKUTO e cols., 2005; MIRANDA e cols., 2003; MOLAVI & MEHTA, 2004; THOMAS e cols., 2003).

Em adição ao dano de proteínas e lipídios celulares, alterações na função celular devido ao aumento do estresse oxidativo estão associadas com os efeitos de radicais livres em organelas subcelulares. Como exemplo, foi sugerido que as ROS podem influenciar o fluxo de Ca^{2+} em cardiomiócitos. Contudo, a incubação do sarcolema com ânion superóxido resulta em redução de 15% na acumulação de Ca^{2+} dependente de ATP no sarcolema assim como nas atividades ATPásicas estimuladas por Ca^{2+} . Estes efeitos podem ser específicos de espécies radicais de oxigênio (KANEKO e cols., 1989; KANEKO e cols., 1990).

As ROS, incluindo $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\text{OH}\cdot$, HOCl , ferril, peroxil, e alcoxil, são constantemente formadas em todas as células animais e removidas por defesas antioxidantes, que podem ser elementos sintetizados por mecanismos fisiológicos. Um antioxidante é uma substância que, quando presente em baixas concentrações (se comparada à concentração da substância oxidável), retarda significativamente ou previne a oxidação do substrato. Os antioxidantes podem atuar neutralizando biologicamente importantes espécies reativas de oxigênio, prevenindo a formação destas, ou reparando os danos que elas causam (HALLIWELL, 1991). Acredita-se que as células são protegidas contra lesão quando elas mantêm um balanço entre a sinalização protetora oxidante/antioxidante *versus* os efeitos prejudiciais (BECKER, 2004; MARCZIN e cols., 2003; FERDINANDY e cols., 2007).

Tradicionalmente, os radicais livres eram considerados subprodutos inúteis do metabolismo, deletérios aos sistemas biológicos. Hoje em dia, entretanto, está claro que baixas concentrações de algumas ROS e RNS exercem um papel central em cascatas de sinalização que são essenciais para muitas respostas biológicas, incluindo a cardioproteção.

De fato, nem todas as condições redox são deletérias ao coração. O próprio NO, em concentrações fisiológicas, pode atuar como um neutralizador (“*scavenger*”)

de radicais livres deletérios. Assim, o NO é considerado como um antioxidante sob determinadas condições (DONZELLI e cols., 2006; PENNA e cols., 2009), sendo importante também para a preservação do tecido cardíaco após evento de pós-isquemia/reperfusão (SIGFRIED e cols., 1992; WEYRICH e cols., 1992).

São considerados “efeitos diretos” do NO aquelas reações que ocorrem entre o NO e moléculas biológicas específicas (WINK & MITCHELL, 1998). Assim, os efeitos antioxidantes do NO são primariamente um resultado dos efeitos diretos de baixas concentrações de NO (WINK e cols., 2001).

Em um trabalho de 2001, WINK e colaboradores já haviam mostrado consistentemente os mecanismos dos efeitos antioxidantes do NO, demonstrando a importância desse. A capacidade do NO em controlar o estresse oxidativo tem importância fundamental nos mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos, envolvendo propriedades de níveis químico, celular e fisiológico. As concentrações relativamente baixas de NO requeridas para que ele atue como um antioxidante sugerem que esse radical funciona como um contrabalanceador do estresse oxidativo. Esse balanço entre o NO e o estresse oxidativo proporciona um importante mecanismo regulatório em muitos efeitos fisiológicos, que quando perturbado pode levar a diversas condições fisiopatológicas.

Em 2006, HUMMEL e colaboradores descreveram que apenas concentrações nanomolares de NO são requeridas para impedir a oxidação de lipídios celulares. Estima-se que os níveis normais de NO *in vivo* atinjam estas concentrações; as concentrações *in vivo* se tornariam mais altas durante eventos de sinalizações e algumas patologias. O que foi mais um indício de que o NO é, de fato, um antioxidante *in vivo* em função dos seus baixos níveis basais.

1.6 Danos causados a proteínas pelo estresse oxidativo cardíaco

A formação de ROS pode ser uma resposta fisiológica normal ao desequilíbrio no suprimento e demanda de oxigênio, ou estresse ambiental, e pode exercer um papel ainda indefinido nos mecanismos normais de resposta a esses estímulos. No caso do miocárdio, quando submetido à exposição crônica e extrema à causa geradora desses radicais livres, ele pode falhar na manutenção da homeostasia redox normal, resultando em dano celular ou disfunção (CLANTON, 2007).

As ROS são também reconhecidas como importantes reguladores da função celular por alterar o estado redox de proteínas. Hoje em dia reconhece-se que a função de canais iônicos cardíacos pode ser regulada por essas ROS (HOOL, 2006). Ademais, já foi observado que ocorre uma sobrecarga de Ca^{2+} intracelular quando os órgãos são expostos a um excesso de ROS. Embora as atividades da Na^+/K^+ -ATPase e do trocador Na^+/H^+ sejam inibidas por ROS, ainda não está claro se os níveis intracelulares de Na^+ se elevam ou não sob condições de estresse oxidativo. Como a atividade da Ca^{2+} -ATPase de sarcolema (PMCA) é diminuída por ROS, a extrusão de Ca^{2+} do citosol para o meio extracelular é considerada diminuída também. Foi mostrado que esses radicais promovem a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e inibem a captação deste para o retículo. Então, essas mudanças nos sistemas de manipulação do Ca^{2+} devido às ROS poderiam causar uma sobrecarga do íon (KANEKO e cols., 1994).

O estado redox de grupos -SH específicos, presentes em domínios importantes de canais e enzimas, controla as respostas destes a mudanças na concentração intracelular de Ca^{2+} (MARENGO e cols., 1998). Alguns trabalhos mostram que os grupos -SH no estado reduzido são fundamentais para a atividade catalítica de ATPases e para o correto funcionamento de canais iônicos (SCHOOT e cols., 1978; WINSLOW, 1981). Em adição, XU e cols. (1997b) mostraram que o radical $\text{OH}\cdot$ induz à perda de atividade enzimática da Na^+/K^+ -ATPase cardíaca, e que há desnaturação da proteína por ataque direto ao sítio de ligação do ATP. REIFENBERGER e cols. (2008) também observaram que um radical livre (peroxinitrito) é um potente inibidor da atividade Na^+/K^+ -ATPásica e que pode induzir modificações em aminoácidos da bomba.

1.7 ATPases e cinases: proteínas importantes para a fisiologia cardíaca

Uma das principais características das células é a capacidade de manter seu meio interno com concentrações relativamente estáveis de íons que estão presentes no ambiente extracelular.

Esta propriedade advém da existência de certos tipos de transportadores protéicos (transportadores ativos primários) que, situados na membrana plasmática e utilizando-se da energia potencial contida em ligações intramoleculares de alta

energia, conseguem carrear espécies iônicas contra seus gradientes eletroquímicos e conservar tais distribuições assimétricas. Dentre estas proteínas, podemos destacar as ATPases do tipo P, caracterizadas pela formação de um intermediário acil fosfato durante a hidrólise do ATP. As ATPases do tipo P contêm sequências comuns implicadas no acoplamento e hidrólise do ATP e na formação do intermediário fosforilado aspartato. Outra característica comum às ATPases do tipo P é sua inibição pelo ortovanadato, o qual funciona como análogo do estado de transição do fosfato, fato que as distingue das ATPases dos tipos V e F (MOBASHERI e cols., 2000).

A família de ATPases do tipo P apresenta mais de 300 membros, divididos por diversas classificações baseadas no tipo de íons transportados, similaridades e diferenças estruturais. A classificação mais recente, completa e complexa é baseada na especificidade pelo substrato e baseia-se na análise de sequências conservadas entre as ATPases do tipo P. Por esta classificação, a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA), a H^+ , K^+ -ATPase gástrica e a Na^+ / K^+ -ATPase seriam pertencentes ao grupo de ATPases do tipo IIA (AXELSEN e PALMGREN, 1998; KAPLAN, 2002).

Essas ATPases são responsáveis pelo transporte específico de determinados cátions, dentre eles o Na^+ e o K^+ , de fundamental importância para a fisiologia celular.

1.7.1 Na^+ / K^+ -ATPase

A Na^+ / K^+ -ATPase, o equivalente bioquímico da bomba de Na^+ , é uma enzima localizada na membrana plasmática de células eucarióticas, atuando no transporte dos íons Na^+ e K^+ contra seus gradientes eletroquímicos.

A Na^+ / K^+ -ATPase catalisa o transporte ativo de 2 íons K^+ para dentro e a extrusão de três íons Na^+ , mantendo uma concentração intracelular baixa para o Na^+ e alta para o K^+ .

As conseqüências fisiológicas desse transporte são, direta ou indiretamente, muito relevantes para o desempenho e viabilidade celular. Assim, é possível a manutenção do equilíbrio osmótico celular, a preservação do potencial de repouso de diversos tipos celulares e das propriedades elétricas de células excitáveis.

Ademais, influencia o transporte de outros íons e moléculas acoplados ao gradiente de Na^+ (e.g. contra-transporte de Ca^{2+} e H^+ , cotransporte de ânions como Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}), substratos (e.g. cotransporte de aminoácidos neutros e glicose), e cotransporte de neurotransmissores. Outras funções mais restritas, contudo importantes também, são mediadas pela enzima, como a remoção do excesso de K^+ extracelular por células musculares e gliais no sentido de evitar distúrbios na excitabilidade celular (SPECHT e cols., 1995; TIRUPATTUR e cols., 1993); e no transporte transepitelial, como por exemplo, na reabsorção tubular renal de Na^+ e água.

A composição da Na^+/K^+ -ATPase agrega pelo menos duas subunidades peptídicas, designadas α e β . Um terceiro peptídeo, inicialmente encontrado apenas em associação com a Na^+/K^+ -ATPase renal e designado subunidade γ , apresenta-se ligado ao complexo protéico em uma estequiometria 1:1 (REEVES e cols., 1980; MERCER e cols., 1993).

A subunidade α é uma proteína integral de membrana, com 10 domínios transmembranares, a qual apresenta massa molecular de cerca de 112 kDa. Nesta subunidade estão os sítios de ligação para os cátions Na^+ , K^+ e Mg^{2+} , e para o ATP, sendo por isso também designada como subunidade catalítica ou funcional (KAPLAN, 2002). Além disso, nesta subunidade se encontra o sítio de ligação para os glicosídeos cardioativos, substâncias esteroidais de ocorrência natural que inibem especificamente a Na^+/K^+ -ATPase.

A subunidade β é essencial para a atividade normal da enzima e é conhecida como subunidade regulatória, acreditando-se que ela tenha importância para a biogênese e atividade do complexo enzimático (BROTHERUS e cols., 1983).

Atualmente, sabe-se que o peptídeo γ faz parte de uma família de proteínas denominadas FXFD. Apesar de não ter sido descrita como essencial para a atividade da enzima, esta subunidade parece ter uma função regulatória sobre a Na^+/K^+ -ATPase, adaptando as propriedades cinéticas do transporte ativo de Na^+ e K^+ , de acordo com as necessidades celulares (GEERING, 2005).

Uma representação esquemática das subunidades da Na^+/K^+ -ATPase é apresentada na Figura 2.

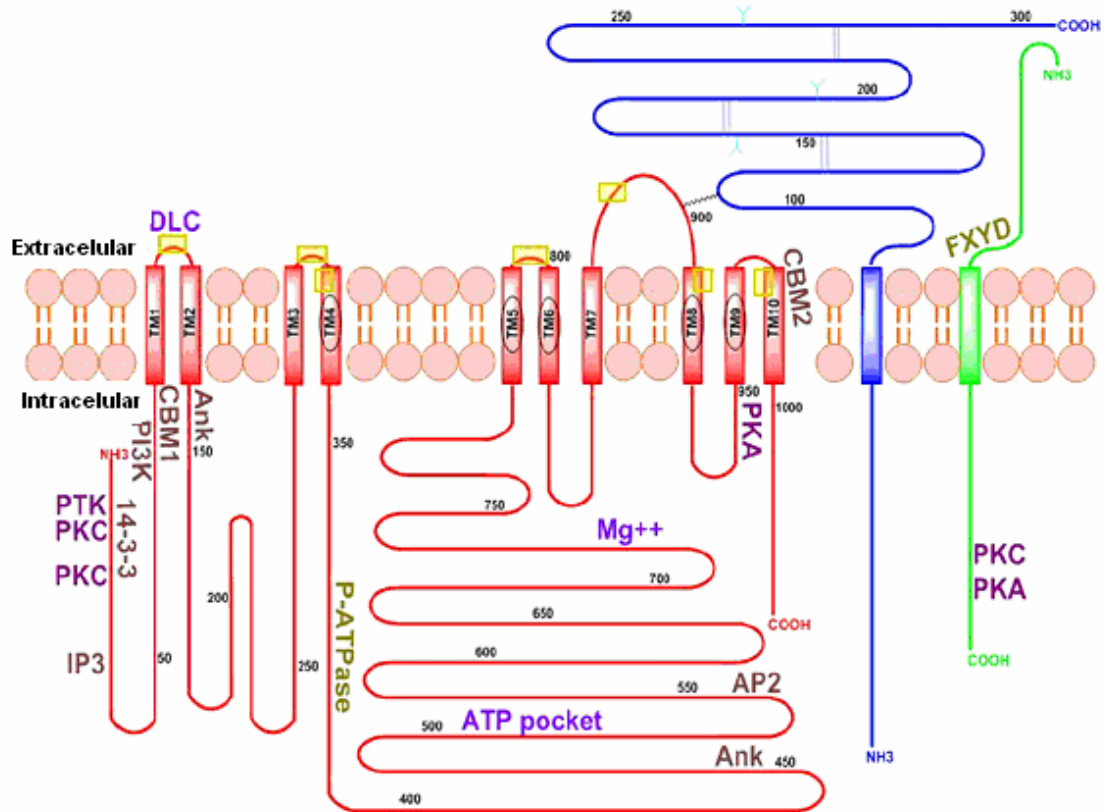


Figura 2: Ilustração esquemática das subunidades da Na⁺/K⁺-ATPase. Os principais ligantes e sítios nas subunidades α1 (vermelho), β1 (azul) e FXYD1 (verde), estão destacados. As elipses nos domínios transmembrana indicam as regiões envolvidas nas ligações com Na⁺ e /ou K⁺. DLC indica o principal sítio de ligação dos esteróides cardíacos. Retângulos amarelos indicam outros sítios envolvidos na ligação destes esteróides. PTK, PKC e PKA indicam os sítios de ligação de tirosina cinase, proteínas cinase C e A, respectivamente. PI3K, sítio da fosfoinositol 3-cinase, IP3, sítio de ligação para o inositol 1,4,5-trifosfato, CBM1/2, sítios para caveolina 1 e 2, Ank, sítio de ligação para Anquirina, Mg⁺⁺, sítio de ligação do magnésio. ATP *pocket* indica a área envolvida na ligação do ATP. P-ATPase indica a porção conservada das ATPases do tipo P. Retirado de NESHER e cols., 2007.

Hoje, devido aos avanços da biologia molecular, são descritas quatro isoformas para as subunidades α e β: α₁, α₂, α₃ e α₄, β₁, β₂, β₃ e β_m. Para o peptídeo FXYD são descritas 7 isoformas, das quais pelo menos cinco são subunidades auxiliares da Na⁺/K⁺-ATPase (GEERING, 2005).

A expressão das isoformas é regulada de uma maneira altamente seletiva, de forma que há diferenças regionais específicas no padrão de expressão. Também é sabido que o padrão de expressão das isoformas é órgão-específico em muitos casos (exemplos: rins, músculo esquelético), sugerindo funções específicas para as isoformas. Existem evidências de propriedades bioquímicas específicas das diferentes isoformas da Na⁺/K⁺-ATPase em humanos, assim como um impacto funcional específico na contratilidade cardíaca em camundongos. Portanto, as

isoformas da Na⁺/K⁺-ATPase não seriam intercambiáveis (MÜLLER-EHMSEN e cols., 2002).

A isoforma α_1 , associada à isoforma β_1 , é conhecida como isoforma *housekeeping* (está presente em todos os tecidos; apresenta distribuição ubíqua). Até o momento, é a única isoforma encontrada nos rins (BLANCO & MERCER, 1998). A isoforma α_2 encontra-se expressa em adipócitos, músculo esquelético e liso, coração e cérebro (preferencialmente células da glia e não em neurônios), enquanto α_3 é abundante em neurônios (sendo usado como marcador neuronal), mas está presente também em coração de rato neonato, no qual seu nível decai ao longo do desenvolvimento (LUCCHESI & SWEADNER, 1991), cartilagem (MOBASHERI e cols., 1998) e endotélio (MAYOL e cols., 1998). Já foi descrita também a existência de uma quarta isoforma da subunidade α , denominada α_4 (SHAMRAJ & LINGREL, 1994). Esta isoforma apresenta distribuição restrita à cauda do espermatozóide, e sua atividade parece estar envolvida com a motilidade (WOO e cols., 2000; BLANCO e cols., 2000.)

Do mesmo modo, a subunidade β apresenta distribuição tecidual específica, sendo a isoforma β_2 expressa em músculo esquelético, glândula pineal e tecido nervoso, enquanto β_3 se encontra em testículos, retina, fígado e pulmão (BLANCO & MERCER, 1998). A quarta isoforma da subunidade β é expressa principalmente em músculo esquelético e em menor extensão no músculo cardíaco. Devido à sua localização, esta isoforma foi denominada isoforma β_m (PESTOVA e cols., 1999).

As isoformas da subunidade FXYD também apresentam distribuição tecidual específica (GEERING, 2005).

As quatro isoformas da subunidade α até então identificadas também diferem entre si quanto à disposição peculiar para responder a estímulos (BLANCO & MERCER, 1998; LOPEZ e cols., 2002; QUINTAS e cols., 1997). Por exemplo, enquanto a isoforma α_1 , presente em todos os tipos de células de mamíferos, teria sua atividade e/ou expressão pouco influenciadas por alterações ambientais (MCDONOUGH e cols., 1992), a isoforma α_2 é influenciada por várias condições fisiopatológicas (QUINTAS e cols., 2000; SCHWINGER e cols., 2003; VAGUE e cols., 1997). A isoforma α_3 , que exhibe uma distribuição bem mais restrita tem seu

aspecto modulatório menos conhecido. Para a isoforma α_4 existem ainda poucos estudos sobre sua caracterização e propriedades adaptativas (BLANCO e cols., 2000; WOO e cols., 2000).

As isoformas da Na^+/K^+ -ATPase apresentam diferenças sutis em suas propriedades cinéticas e afinidades para cátions e ATP, sendo importante objeto de estudo e discussão a respeito de sua relevância e função nos diferentes tecidos. A importância fisiológica das isoformas pode também ser considerada a partir da forma como elas são ajustadas mediante condições fisiológicas ou patológicas diversas. É importante salientar que grande parte do conhecimento acerca da Na^+/K^+ -ATPase está concentrada na subunidade α , por suas próprias características acima destacadas.

No coração adulto, quer seja de roedores ou de humanos, as isoformas α_1 , α_2 e α_3 foram identificadas. No rato, por exemplo, as isoformas α_1 e α_2 estariam presentes no miocárdio enquanto que a isoforma α_3 , de difícil detecção experimental, estaria restrita ao tecido de condução (YUSUF e cols., 1989). Essa multiplicidade de isoformas aumenta a complexidade adaptativa e, portanto, maiores são os desafios de estudo dos ajustes precisos que representarão o quadro homeostático final.

Diversos estudos tentaram identificar uma possível localização preferencial de α_2 de rato (que é uma isoforma mais sensível aos glicosídeos cardíacos que α_1) no túbulo T. O sistema tubular transverso é um sistema composto pelos túbulos T que, através da excitação elétrica da célula, induzem a liberação de Ca^{2+} armazenado nas vesículas do retículo sarcoplasmático e ativam a contração do músculo. MCCDONOUGH e cols. (1996) não observaram esse padrão em miócitos de ventrículo de ratos, mas dados recentes de BERRY e cols. (2007) parecem indicar que a proporção de α_2 é, de fato, maior nos túbulos T. Entretanto, o estudo de DOSTANIC-LARSON e cols. (2006) com animais transgênicos mostra que funcionalmente ambas as isoformas são importantes para a contração cardíaca.

Diversos trabalhos apontam uma diminuição específica ou não para uma determinada isoforma da Na^+/K^+ -ATPase em pacientes acometidos de insuficiência cardíaca (IC) (BUNDGAARD & KJELDSEN, 1996; NORGAARD e cols., 1990), o que provocaria aumento da força contrátil e da sensibilidade desses pacientes aos

glicosídeos cardiotônicos (SCHWINGER e cols., 1999). Vários modelos experimentais de hipertensão descrevem uma mudança da expressão da Na^+/K^+ -ATPase, qual seja, uma perda seletiva da isoforma α_2 cardíaca de roedores (VERDONCK e cols., 2003; QUINTAS e cols., 2007). Na IC em humanos, por exemplo, SCHWINGER e cols. (1999) observaram uma diminuição da expressão das isoformas α_1 e α_3 , sem alteração na expressão de α_2 . Provavelmente, este seria um mecanismo compensatório na tentativa de manter a contratilidade cardíaca, uma vez que a diminuição do número de bombas levaria a um aumento dos níveis basais de Na^+ celular e conseqüentemente, os níveis intracelulares de Ca^{2+} . Associada a esta diminuição, ocorre um aumento na sensibilidade aos agentes inotrópicos.

1.7.2 Ca^{2+} -ATPases

Outros agentes importantes no controle da homeostasia do Ca^{2+} no coração são as Ca^{2+} -ATPases de retículo sarcoplasmático (tipo SERCA) e do sarcolema (tipo PMCA). As representações esquemáticas das duas enzimas estão mostradas nas Figuras 3 e 4.

A família SERCA, presente na membrana de retículo sarcoplasmático, transporta os íons Ca^{2+} para o interior do retículo, contra um elevado gradiente iônico. Trata-se de um sistema de alta afinidade e baixa capacidade de transporte de Ca^{2+} . Este trabalho tem importância fundamental no relaxamento do músculo cardíaco onde, em conjunto com o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, a SERCA é grande responsável pela diminuição das concentrações citosólicas de Ca^{2+} durante a diástole. Além disso, ela é crucial para o acúmulo de Ca^{2+} no retículo e, portanto, para a formação de estoques prontos a serem liberados mediante estímulos celulares.

A Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático tem um papel proeminente no acoplamento excitação/contração do músculo cardíaco, já que induz o relaxamento por sequestrar o Ca^{2+} do citoplasma. O Ca^{2+} estocado é, por sua vez, liberado para desencadear a contração (INESÍ e cols., 2008).

Sua estrutura compreende 10 alças transmembranares, além de sítios de ligação para o Ca^{2+} e um domínio de fosforilação (resíduo de Asp 351).

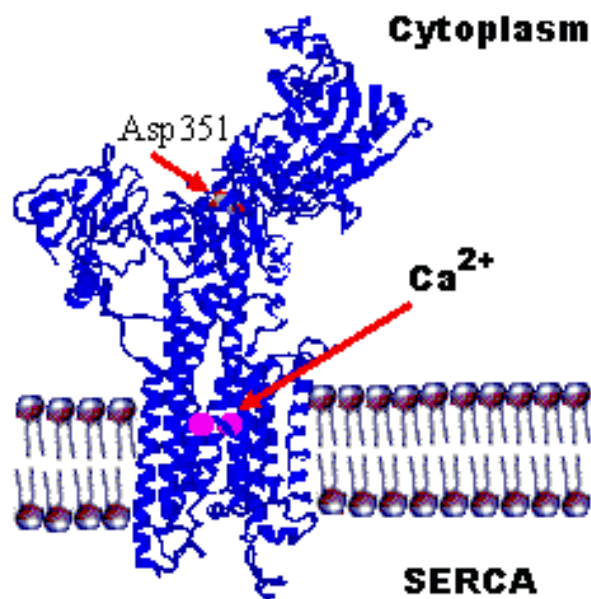


Figura 3: Representação da estrutura da SERCA, mostrando suas alças transmembranares, o sítio de ligação ao Ca^{2+} e o domínio de fosforilação (Asp 351). Retirado de <<http://www.cellscience.com/reviews1/serca.gif>>, acessado em 27/09/2009.

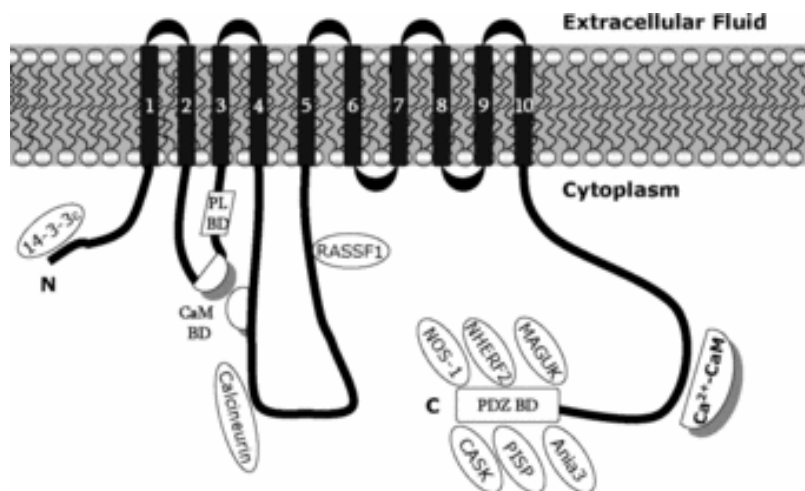


Figura 4: Representação da estrutura da PMCA. Suas proteínas ligadoras conhecidas e os sítios de interação estão indicados. CaM, calmodulina; CaM BD, domínio de ligação de calmodulina; PDZ BD, domínio de ligação PDZ; PL BD, domínio de ligação de fosfolípideo; RASSF1, fator 1 associado a Ras. Retirado de BRINI e cols., 2007.

A diversidade da família de bombas SERCA se deve à ocorrência de três genes, cada um dos quais gera diferentes isoformas de SERCA (HASENFUSS, 1998b; STREHLER & TREIMAN, 2004). No rato, o gene de SERCA1 (ATP2A1) gera as isoformas SERCA1a, particularmente expressa em fibras musculares

esqueléticas de contração rápida na fase adulta, e SERCA1b, em neonatos; o gene de SERCA2 (ATP2A2) codifica as isoformas SERCA2a, expressa em fibras musculares esqueléticas de contração lenta e predominantemente em tecido muscular cardíaco, e SERCA2b, localizada primariamente em tecidos não-musculares e em músculo liso, enquanto que o gene de SERCA3 (ATP2A3) codifica SERCA3, expressa em uma ampla variedade de tecidos musculares e não-musculares, assim como em células epiteliais e endoteliais (HASENFUSS, 1998b; MARTONOSI & PIKULA, 2003; STREHLER & TREIMAN, 2004). No coração, a principal isoforma expressa de SERCA é a SERCA2a.

Com relação à PMCA, já foram descritas 4 isoformas — PMCA1 e PMCA4, quase ubiquamente expressas, sendo consideradas isoformas *housekeeping* e, as isoformas PMCA2 e PMCA3, mais especializadas, sendo encontradas predominantemente no sistema nervoso central (CARAFOLI, 2002; LEHOTSKY e cols., 2002). Em tecido cardíaco tanto de humanos quanto de roedores, foi mostrada a presença das isoformas PMCA1, PMCA4 e, em níveis mais baixos, PMCA2 (STREHLER & ZACHARIAS, 2001).

Em termos estruturais, a principal característica que distingue as PMCAs da subfamília SERCA, é a presença de uma cauda citoplasmática que forma um domínio auto-inibitório contendo um sítio de ligação para calmodulina (LEHOTSKY e cols., 2002). Com relação à farmacologia, a SERCA é especificamente inibida pela tapsigargina, uma ferramenta laboratorial que permite diferenciá-la experimentalmente da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (PMCA) e das Ca^{2+} -ATPases secretórias (SPCA) (WUYTACK e cols., 2002).

Além disso, a SERCA2 pode ser modulada pelo fosfolamban (PLB). O PLB é um peptídeo que interage com a SERCA2, modulando sua atividade. Quando não fosforilado, o PLB se liga à SERCA, reprimindo a atividade enzimática desta. A fosforilação do PLB leva à perda de sua interação com a enzima, o que promove um aumento da afinidade de ligação ao Ca^{2+} e da atividade máxima da SERCA.

1.7.3. MAP cinases

Entre os diversos mecanismos de sinalização que podem ser influenciados pelo estresse oxidativo e pelo dano celular, temos as MAP cinases (MAPKs). A superfamília das MAPKs (“proteínas cinases ativadas por mitógenos”) consiste de diversas cinases pertencentes a um sistema de fosforilação em cascata, que culmina na ativação de cinases efetoras terminais. O sistema de cascata das diversas MAPKs está representado na Figura 5. De maneira geral, a ativação da cascata é decorrente da liberação de fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e de estresse, como por exemplo o estresse oxidativo; levando a respostas como inflamação, apoptose, crescimento e diferenciação celular, no final da cascata.

Essas Ser/Thr cinases são importantes transdutores de alterações em cardiomiócitos (DORN & FORCE, 2005; FREY & OLSON, 2003; MOLKENTIN & DORN, 2001), sendo os principais subtipos de MAPKs as ERKs (do inglês *extracellular signal-regulated kinase*, cinase regulada por sinal extracelular), a p38 e as JNKs (do inglês *c-Jun-N-terminal kinase*, cinase c-Jun-N-terminal).

Durante o desenvolvimento ontogênico ou em alguns processos fisiopatológicos, elas são responsáveis por ativarem substratos nucleares (por exemplo, c-myc, c-jun e ATF-2) levando à reprogramação transcricional que parece ser responsável, pelo menos em parte, pela expressão gênica alterada associada à remodelagem cardíaca (PETRICH & WANG, 2004; SUSSMAN e cols., 2002).

A via das ERKs é a mais bem caracterizada cascata das MAPKs. Nesse sentido, duas isoformas de ERK foram descritas, ERK1 de ~42 kDa e ERK2 de ~44 kDa, ativadas respectivamente por MEK1 e 2 (do inglês *mitogen-activated protein kinase kinase*, proteína cinase cinase ativada por mitógeno; MKKs), as quais, por conseguinte, são fosforiladas por proteínas da família Ras (MKKKs), que são proteínas G de baixo peso molecular com atividade GTPase intrínseca, capazes de se acoplar a múltiplos efetores (MOLKENTIN & DORN, 2001). As Ser/Thr cinases da família JNK são proteínas altamente conservadas, codificadas por três genes capazes de produzir isoformas distintas de JNK através de processamento alternativo. Também são conhecidas como SAPKs (do inglês *stress-activated protein kinase*, proteína cinase ativada por estresse). Com respeito ao miocárdio, no entanto, apenas são detectáveis JNK1 e 2, as quais apresentam um peso molecular de cerca de 46 kDa e 54 kDa, respectivamente.

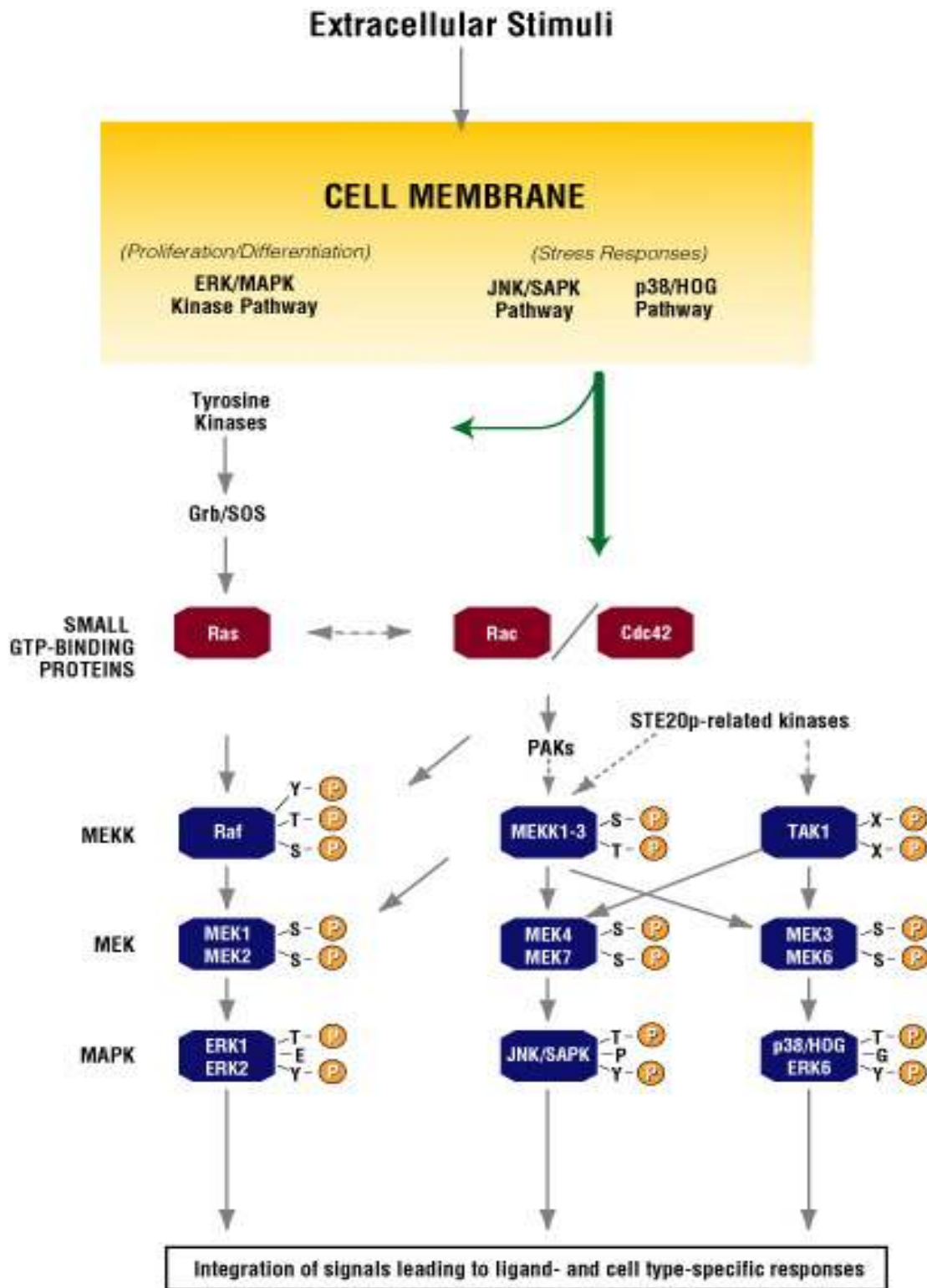


Figura 5: Ativação de diferentes cascatas de sinalização de MAPKs (MAP cinases) por diferentes estímulos extracelulares. As cascatas de ERK, JNK e p38 contém as mesmas series de 3 cinases. A MEK cinase (MEKK) fosforila e ativa a MAP cinase cinase (MEK), e então MEK fosforila e ativa a MAP cinase (MAPK). Abreviaturas: ERK, cinase regulada por sinal extracelular; JNK, cinase c-Jun-N-terminal; MEK, proteína cinase cinase ativada por mitógeno; SOS; fator ativador do Ras que apresenta homologia à *Drosophila Son of Sevenless* gene; SAPK, proteína cinase ativada por estresse; HOG, *high-osmolarity glycerol*, induz estresse osmótico. Retirado de <<http://www.promega.com/paguide/chap7.htm>>, acessado em 15/11/2009.

Esta classe de MAPKs é diretamente fosforilada por MEK4 (JNK1) e MEK7 (JNK2), as quais são reguladas por fosforilação por MEKK1 (FREY & OLSON, 2003; PETRICH & WANG, 2004). Juntamente com JNK, as proteínas cinases de ~38 kDa da família das p38-MAPKs compõem o grupo das MAPKs ativadas por estresse (SAPKs). Nesse sentido, foram descritas quatro diferentes isoformas de p38-MAPKs, incluindo p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ , embora os níveis de expressão das isoformas p38 γ e p38 δ no tecido cardíaco sejam indetectáveis (SUGDEN & CLERK, 1998). As p38-MAPKs são ativadas por MEK3 e MEK6, as quais, por sua vez, são reguladas por fosforilação por MEKKs, embora também possa haver algum papel de proteínas G de baixo peso molecular nesta ativação, o que ainda permanece obscuro.

Estudos com diferentes modelos animais de hipertrofia cardíaca/IC demonstram uma indução significativa da atividade das MAPK (COMMUNAL e cols., 2001; LEMKE e cols., 2001), contudo as contribuições relativas de cada MAPK no disparo ou na inibição do processo hipertrófico continuam especulativas e muitos dos mecanismos referentes à função das MAPK em cardiomiócitos são obscuros (SUGDEN, 2001).

1.8. O papel funcional da eNOS: Lições do modelo nocaute murino

Para estudar especificamente o papel do NO produzido pela eNOS, foram gerados camundongos que não possuem o gene que codifica a enzima. Até então, não havia sido possível provar um envolvimento específico da eNOS, e nem mesmo caracterizar a influência específica do NO derivado do endotélio, uma vez que os inibidores de NOS disponíveis afetavam todas as três isozimas (SHESELY e cols., 1996; BALLIGAND e cols., 1993; MASSION & BALLIGAND, 2003).

Como já foi descrito que a eNOS tem uma localização na membrana de cardiomiócitos (ZHOU e cols., 2002), acredita-se que a própria ausência do NO possa induzir mudanças sobre as propriedades de diversas proteínas, numa ação independente da pressão arterial. ZHOU e cols. (2002) mostraram que a redução na produção de NO poderia desequilibrar a homeostasia de radicais livres, reduzindo a atividade enzimática e afetando os sistemas de transporte ativo iônico no coração. Por outro lado, VRBJAR e cols. (2002) mostraram que em cães, a inibição de curta duração da síntese de NO levou a um aumento da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase.

Nos camundongos onde o gene que codifica a eNOS é deletado, são observadas algumas diferenças, quando comparados aos camundongos controles. Entre elas, pode-se destacar a pressão arterial aumentada. Os estudos de SHESELY e cols. (1996), assim como outros autores (HUANG e cols., 1995; GÖDECKE e cols., 1998; KURIHARA e cols., 1998; STAUSS e cols., 1999; YANG e cols., 1999; BRANDES e cols., 2000; DUPLAIN e cols., 2001; BEIERWALTES e cols., 2002) demonstraram que essa isoforma da enzima é essencial para manutenção da pressão arterial normal. Os mutantes homozigotos perdem totalmente a expressão da eNOS e apresentam valores de pressão arterial 18 mmHg mais altos que os não-mutantes, e 14 mmHg mais altos que os dos heterozigotos, desde o nascimento (SHESELY e cols., 1996). Quanto à frequência cardíaca desses animais, os dados são controversos. Alguns autores observaram uma redução significativa na frequência cardíaca dos camundongos eNOS/KO homozigotos, quando comparadas aos seus respectivos controles e heterozigotos (GÖDECKE e cols., 1988; SHESELY e cols., 1996). Entretanto, essa diferença não foi observada por HUANG e cols. (1995), o que é atribuído ao fato de as medições terem sido feitas, nesse caso, em camundongos anestesiados. De modo interessante, seus corações são histologicamente normais, e a razão peso do coração/peso corporal não difere da observada para os camundongos controles (GÖDECKE e cols., 1988, SHESELY e cols., 1996).

Como a possibilidade de investigação utilizando corações humanos é escassa, a utilização desses modelos animais é valiosa para melhor compreensão da contribuição do NO proveniente da eNOS no desenvolvimento de patologias e seu tratamento (HASENFUSS, 1998a). Assim, esses animais permitem elucidar de que forma proteínas que são importantes para a fisiologia cardíaca se adaptam e/ou contribuem para fenômenos fisiopatológicos decorrentes do desbalanço oxidativo.

Objetivos

Com o intuito de investigar o efeito da ausência da eNOS sobre a adaptação de proteínas relacionadas à homeostasia cardíaca, essas serão avaliadas no coração de camundongos transgênicos com deleção seletiva do gene da NOS endotelial (eNOS/KO).

O objetivo do presente trabalho é, portanto, investigar alterações de expressão e atividade das ATPases de transporte iônico (isoformas/subtipos da Na^+/K^+ -ATPase [α_1 , α_2 e α_3] e da Ca^{2+} -ATPase [SERCA e PMCA]) e MAP cinases (ERK 1/2, JNK 1/2 e p38) no coração destes animais. Será objeto deste estudo também verificar o estado de oxidação de grupos sulfidríla presentes no sítio catalítico dessas enzimas.

Materials & Métodos

3.1 Modelo experimental murino

Para realização do presente trabalho foram utilizados camundongos transgênicos adultos machos, com deleção específica do gene que codifica a NOS endotelial [eNOS/KO; B6.129P2-Nos3^{tm1Unc}/J] com 10 a 15 semanas de idade. Esses camundongos apresentam o perfil genético da linhagem C57BL/6J, onde se utilizou a estratégia de *gene targeting* para comprometer o sítio de ligação da calmodulina, essencial para a função da eNOS, e introduzir um códon de parada prematura da tradução nos transcritos de eNOS (SHESELY e cols., 1996). Os animais apresentam aumento da pressão arterial, diminuição da frequência cardíaca, mas não há alteração histológica detectável no coração (SHESELY e cols., 1996). Como controles (selvagens) foram utilizados os camundongos da linhagem C57BL/6J, reconhecidos como matriz para desenvolvimento desse modelo murino transgênico. As etapas de obtenção dos animais, genotipagem, coleta de tecido e análise biométrica dos animais transgênicos foram realizadas em colaboração com o Dr. Aron Jurkiewicz e seu grupo da Escola Paulista de Medicina, da Universidade Federal de São Paulo (EPM/UNIFESP). Os animais provêm do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME/UNIFESP) e as matrizes foram originalmente adquiridas do “The Jackson Laboratory” (detalhes da linhagem no site http://jaxmice.jax.org/strain/002684_3.html, acessado em 10/09/2009). Os procedimentos experimentais com os animais usados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da UNIFESP, e pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP) do CCS, UFRJ (NO. DFCB-ICB 011).

3.2 Coleta de tecido e análise biométrica dos animais

Os camundongos eNOS/KO e C57BL/6J foram pesados, anestesiados com éter, e eutanasiados. Em seguida, coração e rins de cada animal foram rapidamente retirados. Os corações foram imersos em solução fisiológica de Krebs (composição de todas as soluções no item 2.11) previamente aquecida a 37 °C, para preservação dos batimentos cardíacos, possibilitando a expulsão de todo o sangue que ainda estivesse retido nas câmaras cardíacas. Posteriormente, os corações foram

colocados sobre uma placa de gelo e com o uso de tesouras retirava-se todo tecido residual que não pertencesse ao coração; este era aberto para verificar a existência e, se presente, efetuar a remoção de algum coágulo sanguíneo. Os rins também foram retirados, lavados com a mesma solução fisiológica e colocados sobre uma placa de gelo. Com o auxílio de tesouras e pinças, retirou-se a camada membranosa que os envolve (cápsula renal). Sequencialmente, os órgãos foram secos em papel de filtro, pesados em balança analítica eletrônica, envoltos com papel laminado e etiquetados de maneira que se pudesse identificar de qual animal o órgão provinha. Os órgãos foram armazenados em nitrogênio líquido (N₂) para posterior utilização no preparo das frações subcelulares.

3.3 Preparações subcelulares dos tecidos

As frações subcelulares foram preparadas de acordo com o método descrito por MOHAMMADI e cols. (2003), modificado (QUINTAS e cols., 2007). Todas as operações executadas a partir dessa etapa foram realizadas a 4 °C. Foi utilizado um órgão por cada preparação (massa aproximada de 100-150 mg). Os órgãos foram banhados continuamente com N₂ líquido e triturados em um gral de porcelana com o auxílio de um pistilo. O tecido foi homogeneizado em Ultra-Turrax, em um meio de homogeneização que continha inibidores de proteases e fosfatases. Após as passagens do pistão em velocidade de 9500 rpm por 10 s, o tubo que continha o homogeneizado era colocado novamente em gelo por 20 s. A operação foi repetida mais duas vezes, em velocidade de 13500 rpm. Para evitar a presença de fragmentos remanescentes, o homogeneizado foi submetido ainda a 10 passagens por homogeneizador manual do tipo Dounce. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 100.000 g_{av} por 1 h em ultracentrífuga refrigerada. O sobrenadante foi tomado como a fração solúvel (citossólica). O sedimento (*pellet*) foi ressuspenso em meio de homogeneização, e tomado então como a fração membranar (particulada). Ambas as frações foram estocadas em N₂ líquido.

A escolha de se trabalhar com este tipo de homogeneizado praticamente “bruto” e não com preparações mais purificadas está relacionada a fatores como: maior facilidade de preparação; maior flexibilidade na normalização dos dados obtidos, já que a recuperação protéica é quase integral; e, ser metodologicamente mais apropriado para investigar a plasticidade e controle de entidades

macromoleculares como receptores e enzimas (BAMBRICK e cols., 1988). Um fato indesejado neste tipo de preparação é que a retenção de outros componentes celulares conduz à diminuição da atividade enzimática específica, não tendo sido, entretanto, limitante para a realização de nossos experimentos.

3.4 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada segundo uma modificação do método colorimétrico proposto por LOWRY e cols. (1951). Para tanto, foi utilizado como padrão a albumina sérica bovina (BSA), cujas concentrações variaram entre 50 e 350 μg de BSA/mL. A todos os tubos foi adicionado 2 mL de uma solução contendo Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1% e $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,5%, seguida da adição de 100 μL do reagente de Folin, a cada tubo, em intervalos de 30 s. Os valores de absorbância foram obtidos em espectrofotômetro após um intervalo de 45 min, no comprimento de onda de 750 nm. Os cálculos foram realizados utilizando-se a curva padrão para relacionar a absorbância medida à concentração de proteína, cuja relação não é linear sendo, portanto, obtida com o auxílio do programa de regressão não-linear LOWRY (G.A. McPherson, Elsevier-Biosoft, Reino Unido). O conteúdo de proteína foi expresso em mg proteína. mL homogeneizado⁻¹.

3.5 Determinação da atividade ATPásica

A atividade ATPásica foi determinada segundo o método colorimétrico do fosfomolibdato (FISKE & SUBBAROW, 1925), o qual se baseia na determinação quantitativa do fosfato inorgânico (Pi) liberado devido à hidrólise enzimática do ATP. A reação se processou a 37 °C em banho-maria, sendo iniciada pela adição de 50 μL da preparação membranar (5-30 μg de proteína) em 450 μL de meio apropriado. Em paralelo, foi construída uma curva padrão, com concentrações variando entre 0,1 e 0,5 μmol de Pi/mL (KH_2PO_4). Após uma incubação por um intervalo de 1 h, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL da solução de Fiske gelada. Assim, o Pi produzido pela hidrólise enzimática do ATP é levado a reagir com o molibdato de amônio, formando o fosfomolibdato de amônio. Em seguida, na presença de agentes redutores, são formados óxidos de molibdênio – que determinam a coloração azul,

evidenciando indiretamente a presença de Pi – cujos valores de absorvância foram determinados com auxílio de espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 650 nm, após 30 min da adição do reagente de Fiske.

3.5.1. Na⁺/K⁺-ATPase: A avaliação da atividade Na⁺/K⁺-ATPásica foi realizada através da diferença entre os valores de atividade ATPásica total (obtidos em presença dos íons Na⁺, K⁺ e Mg²⁺) e de atividade ATPásica basal (obtidos na ausência do íon K⁺ e presença de 1 mM de ouabaína, inibidor específico da Na⁺/K⁺-ATPase em concentração que atinge a inibição máxima) (LOPEZ e cols., 2002).

3.5.2. Ca²⁺-ATPases: A avaliação da atividade Ca²⁺-ATPásica foi realizada através da diferença entre os valores de atividade ATPásica total (obtidos em presença de 10 µM Ca²⁺ livre) e de atividade ATPásica basal (obtidos na ausência do Ca²⁺). Para ambos experimentos, ao serem confrontados os resultados obtidos para a preparação com aqueles referentes à curva padrão, foi obtido um valor específico de atividade enzimática, que é expresso em µmol Pi.mg proteína⁻¹.h⁻¹.

3.6 Ensaios de Western Blot

O padrão de expressão das diferentes isoformas da subunidade α da Na⁺/K⁺-ATPase, das (Ca²⁺-Mg²⁺)ATPases SERCA e PMCA, da eNOS e das proteínas cinases da superfamília de MAPKs (ERK1/2, p38-MAPK e JNK/SAPK) foi analisado através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e Western blot (QUINTAS e cols., 2005; QUINTAS e cols., 2007). O SDS-PAGE é realizado de acordo com LAEMMLI (1970). Dessa forma, as amostras protéicas de tecido cardíaco ou renal (20-40 µg/poço) e as preparações utilizadas como controle foram diluídas em tampão de amostra redutor na proporção 1:2 (volume de tampão:volume de preparação) e submetidas à corrida em gel 7,5% (eNOS e ATPases) ou 10 ou 12% para as MAPKs (40 mA constante por cerca de 1 h). Ademais, era adicionado a um poço um padrão de peso molecular, a fim de se determinar o peso de cada banda visualizada ao final do experimento. Dependendo do tipo de proteína investigada, utilizou-se como controle preparações de hemisfério cerebral de camundongo e/ou rim de rato (POÇAS e cols., 2003). Após esta fase, as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose imersas em tampão de transferência (50 V constante por 1 h). Posteriormente, as membranas foram tratadas com corante *Rouge de Ponceau* por 10 min para a visualização

inespecífica das bandas protéicas e era feita análise densitométrica das bandas, para controle de carregamento de proteína nos poços. Em seguida, todas as etapas foram realizadas sob agitação e intercaladas por lavagens com TBS-T. As membranas eram incubadas por 1 h com solução de leite Molico[®] desnatado (5%) em TBS-T, com o objetivo de bloquear sítios inespecíficos de ligação do anticorpo na membrana. Após este processo, incubou-se por mais 1 h, com diferentes anticorpos primários diluídos em TBS-T, de acordo com o alvo protéico a ser caracterizado: anticorpo IgG policlonal de coelho anti-eNOS (diluição de 1:1500), monoclonal anti-isoformas α_1 , α_2 ou α_3 da Na^+/K^+ -ATPase de camundongo ou coelho (diluições de 1:1000, 1:750 e 1:750, respectivamente), anticorpo anti-SERCA2 de camundongo (1:2500), anti-PMCA de camundongo (1:2000), e anticorpos específicos de coelho contra cada uma das proteínas cinases da superfamília de MAPKs (1:2000 para anti-ERK1/2 e anti-fosfo-p38-MAPK; 1:1500 para anti-fosfo-ERK1/2 e anti-p38-MAPK; e 1:1000 para anti-SAPK/JNK e anti-fosfo-SAPK/JNK). Seguiu-se então a incubação por 1 h com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:12000), ou anti-IgG de coelho (1:4000), dependendo da proteína em análise, ambos conjugados à enzima peroxidase. A detecção das imunomarcações foi realizada por tratamento da membrana com um amplificador de sinal quimioluminescente (ECL, Amersham Biosciences, Reino Unido) e exposição a filmes fotográficos de alta sensibilidade (Hyperfilm[®], Amersham Biosciences, Reino Unido) por cerca de 1-5 min. A quantificação da marcação, definida como densidade ótica, foi realizada através de densitometria e análise de imagem das autoradiografias através de densitômetro GS-700 e com o programa *Quantity One* (Bio-Rad Laboratories, EUA).

Usualmente, em experimentos de Western blot utiliza-se uma proteína constitutiva a fim de normalizar os resultados de expressão protéica observados. A escolha dessa entidade se baseia em características como expressão constitutiva e pouco variável naquele tipo celular. Entretanto, diversos marcadores utilizados já se mostraram questionáveis, uma vez que sua expressão pode ser modificada em função de alterações fisiopatológicas. A própria Na^+/K^+ -ATPase, objeto de estudo deste trabalho, já foi citada como uma possível proteína normalizadora. Para células musculares, uma outra opção é o uso da beta-actina. Em um trabalho publicado em 2003, SU e colaboradores mostraram que a eNOS está associada à actina em

células de endotélio pulmonar, e que o estado de polimerização da actina e atividade da eNOS estão interligados. Diante de tudo isso, optamos por normalizar os resultados cuidando do carregamento de proteína de cada experimento.

3.7 Dosagem de grupos sulfidril livres

A dosagem dos grupos sulfidril livres nas preparações particuladas de coração e rim (200 µg de proteína/tubo) foi realizada pelo método de Ellman (SEDLAK & LINDSAY, 1968; POÇAS e cols., 2008). Este método colorimétrico se baseia na reação entre os grupos contendo sulfidril livre (reduzidos) da proteína com o reagente de Ellman [ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) – DTNB], e conseqüente liberação do ácido tionitrobenzóico, o qual apresenta coloração amarela. A reação se processou à temperatura ambiente, em um volume de 1 mL de meio metanólico, contendo EDTA 3 mM e tampão Tris-HCl 0,2 M em pH 8,2, tendo sido iniciada pela adição de DTNB 0,01 M diluído em metanol absoluto. Após 30 min de incubação foi feita a leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 412 nM. Utilizou-se como curva padrão concentrações de cisteína variando de 1 a 100 µM, para posterior cálculo da concentração de sulfidrila livre por mg de proteína.

3.8 Análise dos dados

Todos os procedimentos foram realizados em paralelo para os grupos transgênico e controle. As análises estatísticas foram feitas por teste *t* de Student. Para a mediana, foi utilizado o teste de Mann-Whitney (não paramétrico). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os cálculos estatísticos foram realizados através do programa assistido por computador GraphPad Prism® (verão 4, GraphPad Software, EUA). Os dados representam os resultados de pelo menos três experimentos e foram expressos como média \pm erro padrão da média (epm).

3.9 Listagem de reagentes

Da firma Sigma Chemical Company (EUA) foram obtidos o ATP, o Ponceau S, o ionóforo de cálcio A_{23187} e o padrão de peso molecular (*wide range molecular marker*). Acrilamida, bis-acrilamida, APS e TEMED foram adquiridos da Pharmacia Biotech (EUA), enquanto que SDS, Tris base, glicina, 2-mercaptoetanol e bromofenol foram provenientes da BioAgency (Brasil). O ECL foi adquirido da Amersham Biosciences (Reino Unido), a albumina da Merck (EUA) e o leite Molico[®] desnatado da Nestlé do Brasil. As soluções de revelação e fixação foram obtidas da empresa Kodak (EUA).

Os anticorpos foram provenientes das firmas norte-americanas Affinity Bioreagents (anti- Na^+/K^+ -ATPase α_1 , anti- Na^+/K^+ -ATPase α_3 e anti-SERCA2), Cell Signaling Technology/Upstate (anti-eNOS, anti- Na^+/K^+ -ATPase α_2 , anti-PMCA, anti-ERK1/2, anti-fosfo-ERK1/2, anti-p38-MAPK, anti-fosfo-p38-MAPK, anti-SAPK/JNK e anti-fosfo-SAPK/JNK) e Promega (anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo).

3.10 Soluções utilizadas

Meio de homogeneização

EGTA -----	10 mmol
EDTA -----	1 mmol
Tris-HCl-----	20 mM até pH 7,2 à temperatura ambiente
DTT -----	0,5 mmol
Sacarose -----	250 mmol
PMSF -----	1 mmol
NaF -----	1 mmol
Aprotinina -----	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Antipaína -----	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Água deionizada -----	qsp 1000 mL

Meio de incubação para atividade Na⁺/K⁺-ATPásica

NaCl	87,6 mmol
KCl	3 mmol
MgCl ₂	3 mmol
ATPNa ₂	1,2 mmol
EGTA	1 mmol
NaN ₃	10 mmol
Água deionizada	qsp 1000 mL

Meio de incubação para atividade Ca²⁺-ATPásica

KCl	100 mmol
NaN ₃	10 mmol
EGTA	0,3 mmol
ATPNa ₂	5 mmol
MgCl ₂	4 mmol
A ₂₃₁₈₇	5 µmol
HEPES 50 mM-Tris	até pH 7,4 a 37°C
Água deionizada	qsp 1000 mL

Solução A

Acrilamida	7,3 g
Bis-acrilamida	0,2 g
Água deionizada	qsp 25 mL

Solução Gel de Poliacrilamida

Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8; <i>gel de corrida</i>)	volume dependente da % do gel
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8; <i>gel de empilhamento</i>)	volume dependente da % do gel
Solução A	volume dependente da % do gel
SDS 10%	1 %
Persulfato de amônio (APS) 10%	0,5 %
Tetrametil-etilenodiamina (TEMED)	0,05 %
Água deionizada	qsp 10 mL

Solução Krebs/HCl

NaCl -----	6,545 g
KCl -----	0,373 g
NaHCO ₃ -----	2,1 g
Glicose anidra -----	2,07 g
MgSO ₄ 7H ₂ O -----	0,296 g
KH ₂ PO ₄ -----	0,136 g
CaCl ₂ -----	0,139 g
Água deionizada -----	<i>qsp</i> 1000 mL

Solução de Fiske & Subbarow

Bissulfito de sódio -----	1,45 mmol
Sulfito de sódio -----	2,19 mmol
Ácido 2-amino 2-hidroxi naftaleno sulfônico -----	0,19 mmol
Molibdato de amônio -----	3 mmol
Ácido sulfúrico -----	375 mmol
Tampão maleato-Tris 20 mM -----	pH 7,4 a 37°C
Água deionizada -----	<i>qsp</i> 1000 mL

Solução corante *Rouge de Ponceau*

Rouge de Ponceau -----	0,2 %
Ácido tricloroacético -----	3 %
Água deionizada -----	<i>qsp</i> 100 mL

Solução TBS-T

NaCl -----	4 g
Tween 20 -----	0,1 %
Tris 1,21 g-HCl -----	até pH 7,6 à temperatura ambiente
Água deionizada -----	<i>qsp</i> 1000 mL

Tampão de amostra

Glicerol -----	3 mL
SDS 10 % -----	0,6 g
2-Mercaptoetanol -----	1,5 mL
Bromofenol 1% -----	300 µL
Tampão Tris 0,5 M-HCl (pH 6,8) -----	2,4 mL
Água deionizada -----	<i>qsp</i> 10 mL

Tampão de corrida

Glicina -----	21,6 g
SDS -----	1,5 g
Tris base 4,5 g-HCl -----	até pH 8,3 à temperatura ambiente
Água deionizada -----	<i>qsp</i> 300 mL

Tampão de transferência

Tris -----	4,55 g
Glicina -----	21,6 g
Metanol -----	300 mL
Água deionizada -----	<i>qsp</i> 1500 mL

Resultados

4.1 Análise fenotípica dos camundongos eNOS/KO

Com o objetivo de caracterizar fenotipicamente os animais, avaliou-se a razão entre o peso do coração e o peso corporal dos animais. A determinação da massa cardíaca constitui um parâmetro clássico para se avaliar a ocorrência ou não de hipertrofia cardíaca nos modelos animais, uma vez que aumentos na razão peso do coração (mg) / peso corporal (g) acompanham a hipertrofia cardíaca (MILANO e cols., 1994; QUINTAS e cols., 2007; ZHENG e cols., 1996).

A Tabela 1 apresenta a idade, o peso corporal e o peso do coração extraído de cada animal.

Tabela 1. Parâmetros fenotípicos dos camundongos controles (C57BL/6J) e transgênicos (eNOS/KO)

	Nº	Idade (semanas)	Peso do coração (mg)	Peso corporal (g)	Razão peso do coração (mg) / peso corporal (g)
C57BL/6J	<u>1</u>	10	92	19	4,84
	<u>2</u>	10	102	19,7	5,18
	<u>3</u>	10	108	20,8	5,19
	<u>4</u>	10	109	20,9	5,22
	<u>5</u>	10	106	19,9	5,33
	<u>6</u>	10	107,5	21,5	5,00
eNOS/KO	<u>4</u>	14	142	24	5,92
	<u>5</u>	14	144	25	5,76
	<u>6</u>	14	140	24	5,83
	<u>7</u>	14	138	23	6,00
	<u>9</u>	14	143	27	5,30
	10	14	133	21	6,33
	1	15	155	32	4,84
	<u>2</u>	15	151	31	4,87
	<u>3</u>	15	153	32	4,78
	8	15	154	33	4,67

Conforme demonstrado na Figura 6, a análise da população de animais disponíveis mostrou que não há diferença significativa na razão massa cardíaca / massa corporal dos camundongos transgênicos, quando comparados ao grupo C57BL/6J. Este resultado é indicativo de que eles não apresentam hipertrofia cardíaca. A linha horizontal indica a mediana dos valores para cada grupo (C57BL/6J: 5,19; eNOS/KO: 5,53), sendo que a diferença entre elas não é significativa ($p = 0,4923$).

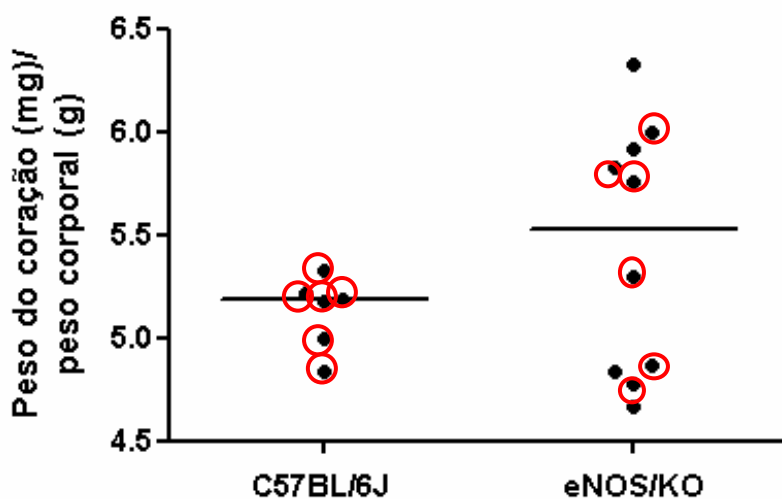


Figura 6. Distribuição das razões peso do coração (mg)/peso corporal (g) para os camundongos controle C57BL/6J e eNOS/KO. A linha horizontal indica a mediana dos valores para cada grupo (controle: 5,19; eNOS/KO: 5,53). A diferença não é significativa; $p = 0,4923$; teste de Mann-Whitney (não-paramétrico).

Nota-se que utilizamos a mediana, e não a média, por não ser tão influenciada por valores individuais discrepantes erráticos e não significativos (VIEIRA, 2003). Tal vantagem é ainda mais marcante quando se avalia populações com poucos indivíduos, como a deste estudo.

É interessante notar que a dispersão entre os valores de razão encontrados para o grupo transgênico está associada à diferença de idade entre os camundongos. Em função do menor peso, observa-se que os camundongos mais jovens (mais leves) apresentam razões ligeiramente mais altas que os mais velhos. Ou seja, a dispersão se deve exclusivamente a diferenças no peso corporal, uma vez que a massa cardíaca não estava alterada. A observação de que para os camundongos transgênicos não há desenvolvimento de hipertrofia é consistente

com estudos anteriores acerca do modelo (SHESELY e cols., 1996; GODECKE e cols., 1998; BUBIKAT e cols., 2005).

As preparações subcelulares utilizadas para os experimentos realizados subseqüentemente foram obtidas a partir dos tecidos extraídos de animais que foram escolhidos aleatoriamente nessas populações (aqueles com a numeração sublinhada na Tabela 1, e destacados com um círculo vermelho na Figura 6).

Além da genotipagem de todos os camundongos da população em estudo (dados não mostrados; realizados na UNIFESP), a fim de confirmar que nos camundongos nocaute o gene que codifica a eNOS havia sido silenciado, fez-se a avaliação da expressão da proteína eNOS por Western Blot. Os resultados, representados na Figura 7, mostraram que só foi possível observar a banda característica da proteína (na faixa de peso molecular de 140 kDa) para as frações particuladas de coração dos camundongos C57BL/6J.



Figura 7. Western Blotting da proteína eNOS (anticorpo de coelho anti-NOS3) em preparação de coração. Foram utilizadas 37,5 µg proteína de preparações eNOS/KO (K) e controle (C) para comparação. A preparação de hemisfério cerebral de camundongo (HC, 20 µg proteína) foi empregada como controle positivo.

4.2 Avaliação da expressão de MAP cinases cardíacas

Passamos então para a avaliação da expressão de proteínas envolvidas com as vias de sinalização celular. Primeiramente, foi feita a avaliação da ERK 1/2. Foram observadas bandas na faixa de peso molecular esperada (42/44 kDa), tanto para os camundongos controle como para os camundongos nocaute, quando se utilizou um anticorpo para a população total de ERK1/2 (Figura 8a). O gráfico referente à análise densitométrica de ERK 1/2 total mostra que não foi detectada alteração significativa na densidade da forma total dessa cinase (Figura 8c). Em contraste, para a forma fosforilada (ativada) houve uma drástica diminuição de densidade no grupo eNOS/KO (Figuras 8b, 8d).

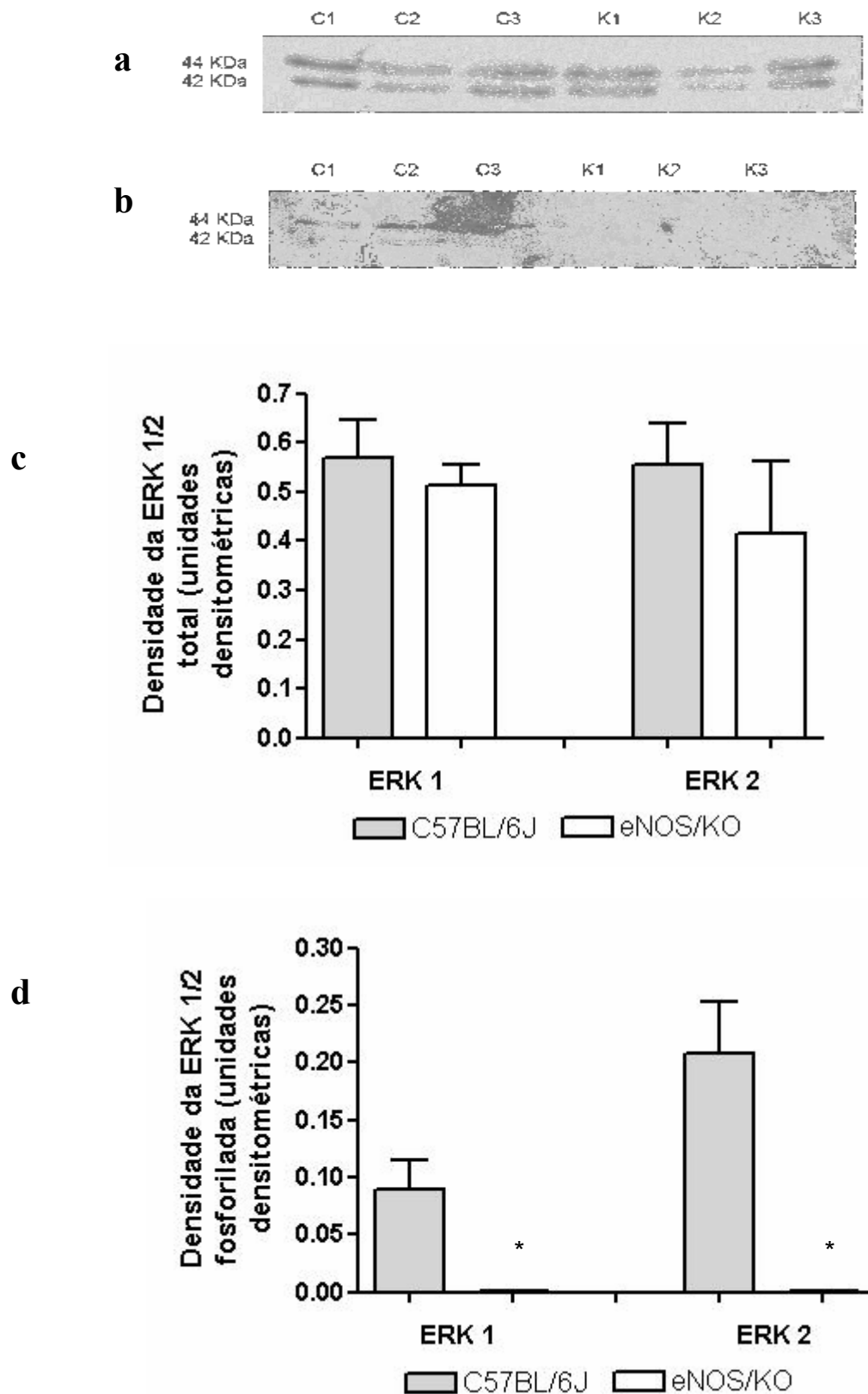


Figura 8. Western Blotting da ERK 1/2 (42/44 kDa) total **(a)** e ERK 1/2 fosforilada **(b)** (anticorpo de coelho anti-ERK 1/2). Foram utilizadas 30 µg de proteína de cada preparação citosólica de eNOS/KO (K1-3) e controle C57BL/6J (C1-3) para comparação. **(c, d)** A análise densitométrica de ERK 1/2 indica que há alteração significativa na ativação desta MAPK (forma fosforilada) nos corações do modelo eNOS/K. * $p < 0,0001$, teste t de Student, $n = 3$.

Ou seja, no modelo transgênico a ativação dessa via está praticamente abolida.

A avaliação da forma total da p38 cinase mostrou bandas na faixa de peso molecular de 38 kDa, tanto para os camundongos controle como para os camundongos nocaute (Figura 9a). Observou-se que não foi detectada alteração significativa na densidade desta proteína entre os dois grupos de camundongos (Figura 9c). Entretanto, ensaios de Western blot utilizando anticorpo para a forma fosforilada (ativada) também mostraram menor densidade no grupo eNOS/KO (redução de 86%, $p = 0,0291$) (Figuras 9b, 9d).

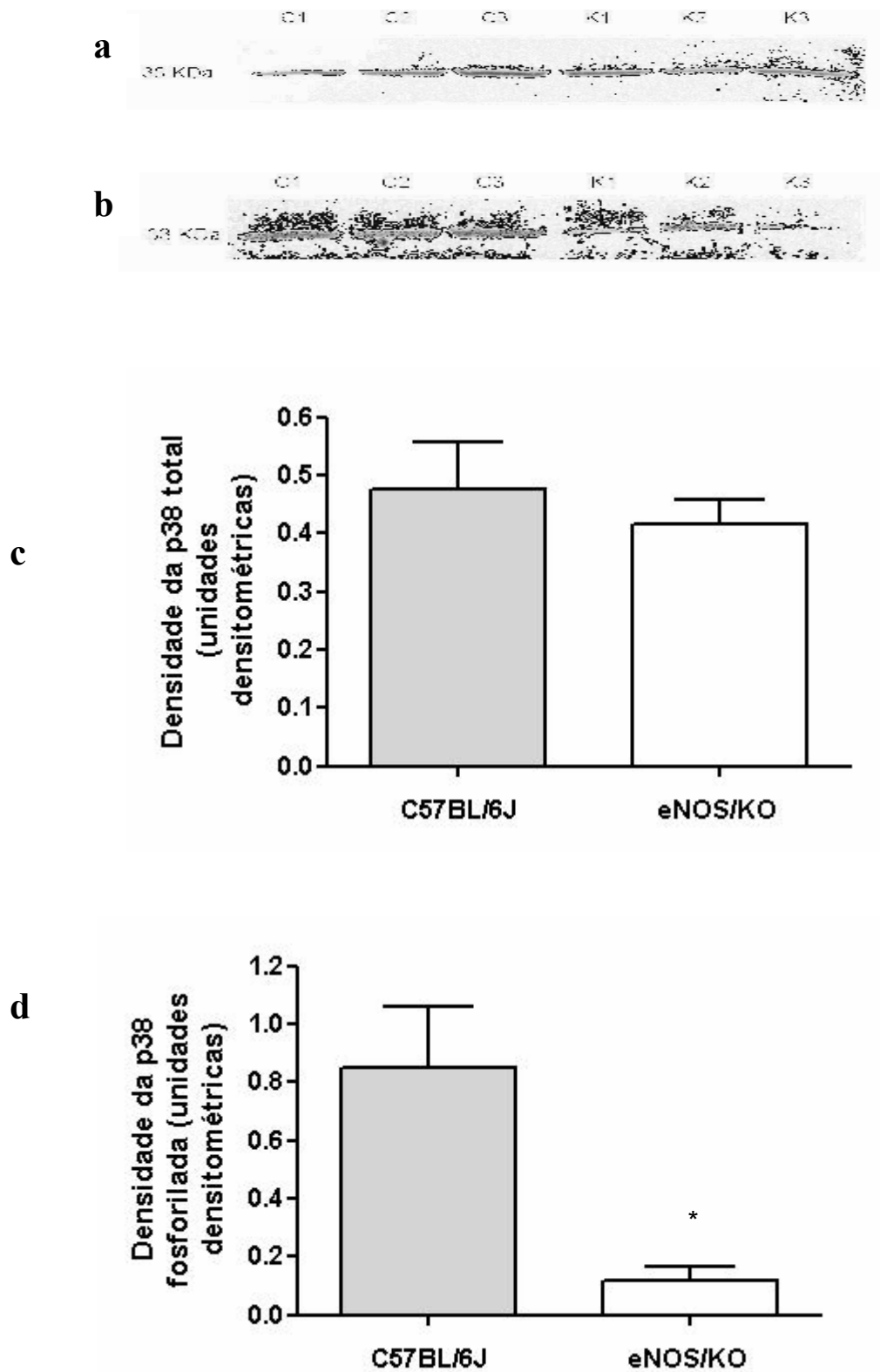


Figura 9. Western Blotting da p38 (38 kDa) total **(a)** e p38 fosforilada **(b)** (anticorpo de coelho anti-p38). Foram utilizadas 30 µg de proteína de cada preparação eNOS/KO (K1-3) e controle C57BL/6J (C1-3) para comparação. **(d)** A análise densitométrica da p38 fosforilada indica que há alteração significativa na ativação desta MAPK (forma fosforilada) nos corações do modelo eNOS/KO. *p = 0,0291, teste t de Student, n = 3.

Diferentemente do que foi observado para as outras MAP cinases, na avaliação da JNK1/2 (peso molecular 46/54 kDa) não foi encontrada diferença significativa no padrão de expressão entre os dois grupos de animais, tanto para a forma total quanto para a forma ativada da cinase (Figuras 10a, 10b, 10c, 10d).

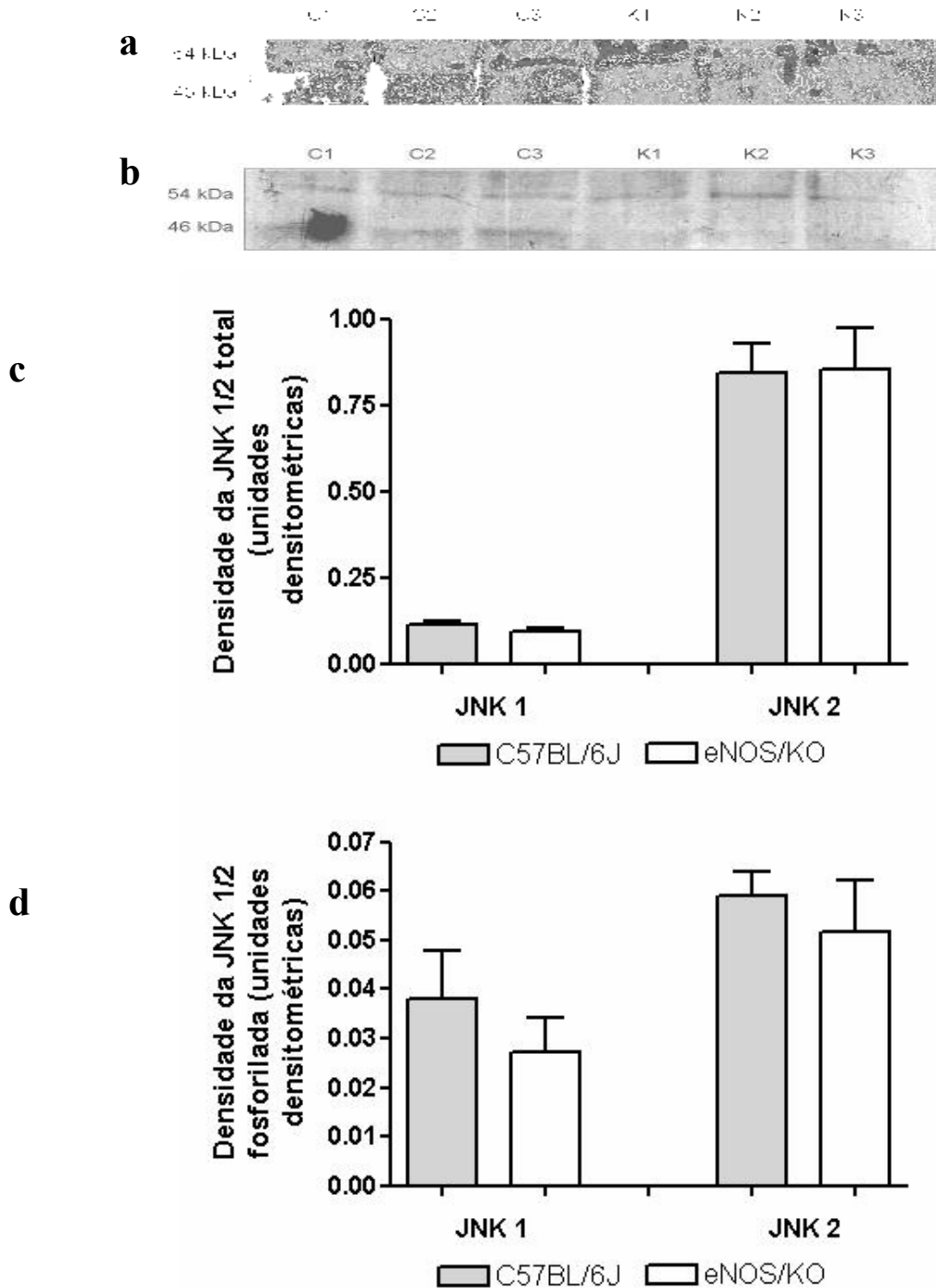


Figura 10. Western Blotting da JNK1/2 (46/54 kDa) total **(a)** e JNK1/2 (46/54 kDa) fosforilada **(b)** (anticorpo de coelho anti-JNK1/2). Foram utilizadas 30 µg de proteína de cada preparação eNOS/KO (K1-3) e controle C57BL/6J (C1-3) para comparação. **(c,d)** A análise densitométrica indica que não há alteração significativa na ativação desta MAPK nos corações do modelo eNOS/KO; ($p = 0,1480$; $p = 0,9368$; $p = 0,2578$; $p = 0,5545$), test *t* de Student, $n = 3$.

4.3 Avaliação da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase cardíaca

Como pode ser observado na Figura 11, a atividade Na⁺/K⁺-ATPásica é significativamente menor nos camundongos transgênicos quando comparados aos camundongos selvagens (redução de 30%, $p = 0,0011$).

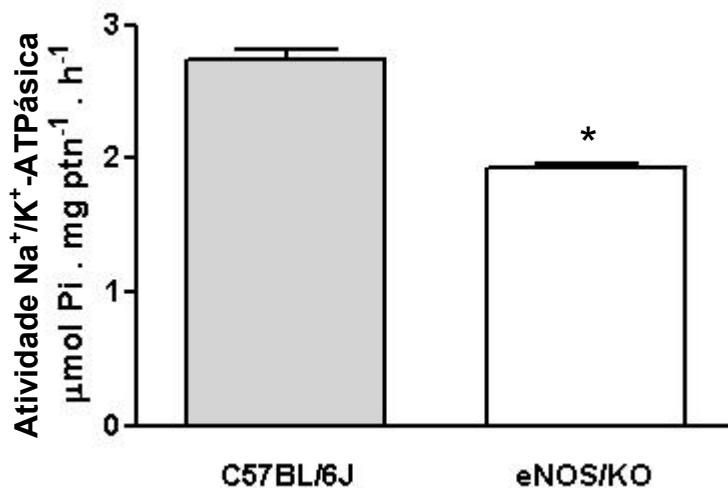


Figura 11. Comparação entre a atividade Na⁺/K⁺-ATPásica nas preparações particuladas de tecido cardíaco, para os camundongos C57BL/6J e eNOS/KO. 30 μg de proteína de cada preparação foram incubados a 37 °C por 1 h. * $p = 0,0011$, teste *t* de Student, $n = 3$.

Esse resultado corrobora com o descrito por ZHOU e cols. (2002), onde a pesquisa da atividade Na⁺/K⁺-ATPásica nesse mesmo modelo mostrou haver diminuição da atividade da enzima nos animais eNOS/KO.

A menor atividade no grupo nocaute poderia ser explicada por uma menor expressão dessa proteína nos corações desses camundongos, ou por alguma alteração no funcionamento da enzima. Deste modo, foram realizados experimentos para investigar os níveis de expressão dessa proteína nos grupos de animais.

4.4 Avaliação da expressão das isoformas da subunidade α da Na⁺/K⁺-ATPase cardíaca

Primeiramente, foi feita a avaliação da isoforma α₁ da Na⁺/K⁺-ATPase, majoritária no coração de roedores (NOËL & GODFRAIND, 1984; LUCCHESI & SWEADNER, 1991). Na Figura 12 é mostrado um Western Blot dos resultados obtidos e o gráfico referente à análise densitométrica. Ele mostra que não foi

observada diferença significativa na expressão da isoforma α_1 , que é a *housekeeping*, entre os dois grupos de animais.

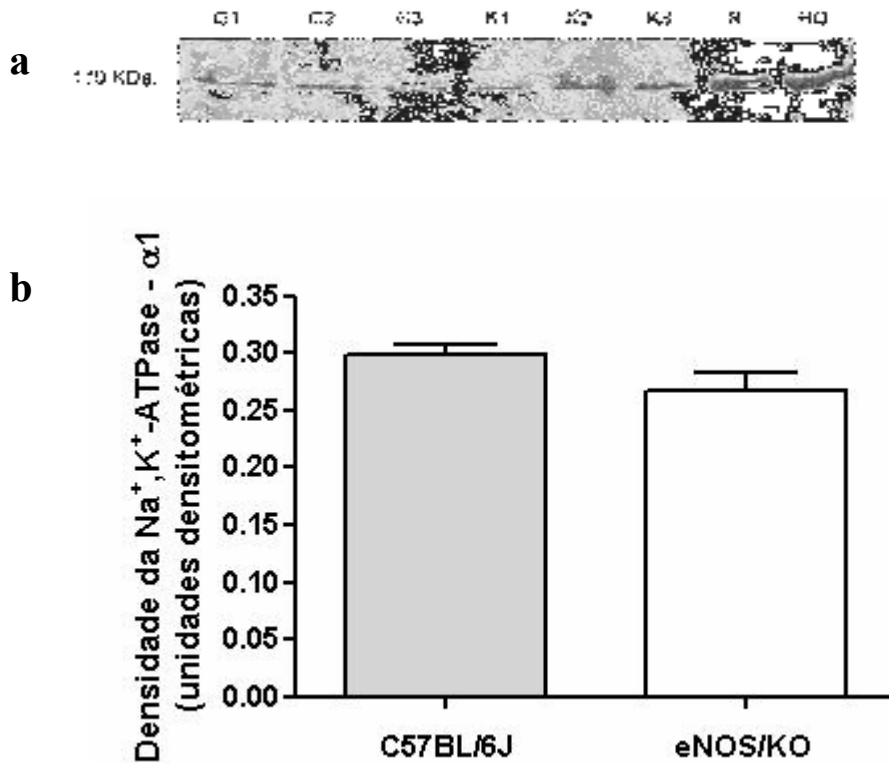


Figura 12. Western Blotting da isoforma α_1 da Na⁺/K⁺-ATPase (anticorpo de coelho anti- α_1). (a) Foram utilizadas 25 μ g proteína das preparações particuladas de eNOS/KO (K1-3) e controle C57BL/6J (C1-3) para comparação. Preparações de rim de rato (R, 20 μ g proteína) e hemisfério cerebral de camundongo (HC, 20 μ g proteína) foram utilizadas como controle positivo. (b) A análise densitométrica indica que não há alteração significativa na expressão desta isoforma no coração do modelo eNOS/KO. $p = 0,1580$, teste t de Student, $n = 3$.

Entretanto, para a isoforma α_2 da Na⁺/K⁺-ATPase foi observada uma diferença significativa na expressão entre os dois grupos (Figura 13). As preparações de coração do modelo eNOS/KO evidenciaram uma expressão 57% menor dessa isoforma quando comparadas às preparações de camundongos C57BL/6J ($p = 0,0089$).

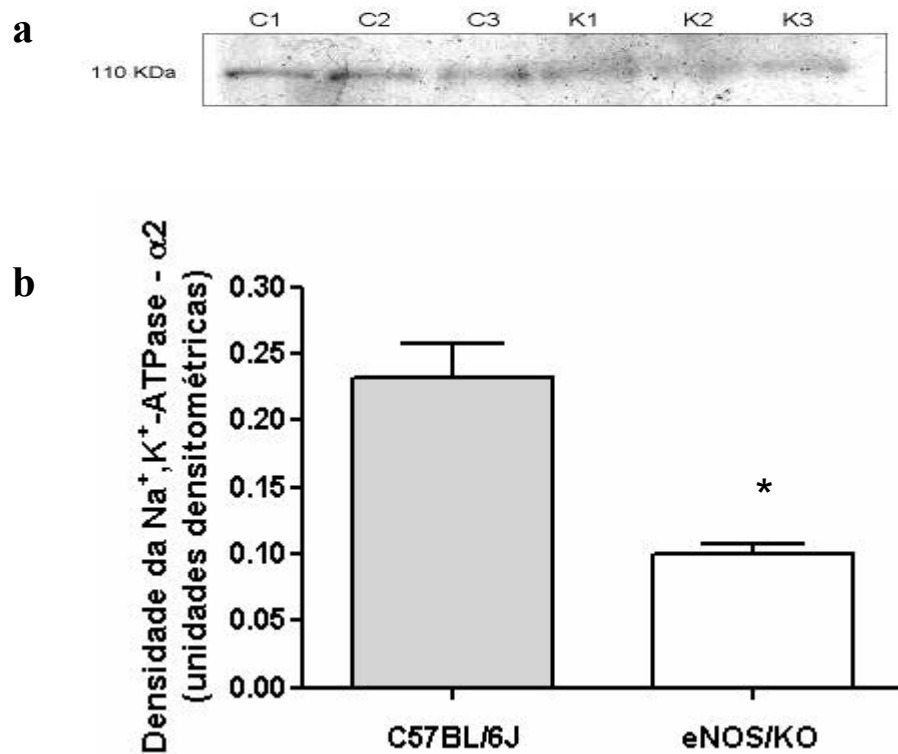


Figura 13. Western blot da isoforma α_2 da Na⁺/K⁺-ATPase (anticorpo de coelho anti- α_2). **(a)** Foram utilizadas 25 μ g proteína das preparações particuladas de eNOS/KO (K1-3) e controle C57BL/6J (C1-3) para comparação. **(b)** A análise densitométrica indica que há alteração significativa na expressão desta isoforma no coração do modelo eNOS/KO. * $p = 0,0089$, teste t de Student, $n = 3$.

Com relação à isoforma α_3 da Na⁺/K⁺-ATPase, cuja expressão está basicamente restrita ao tecido de condução de impulsos nervosos no coração (ZÄHLER e cols., 1996), as análises mostraram que o padrão de expressão não apresenta diferença significativa entre os dois grupos (Figura 14).

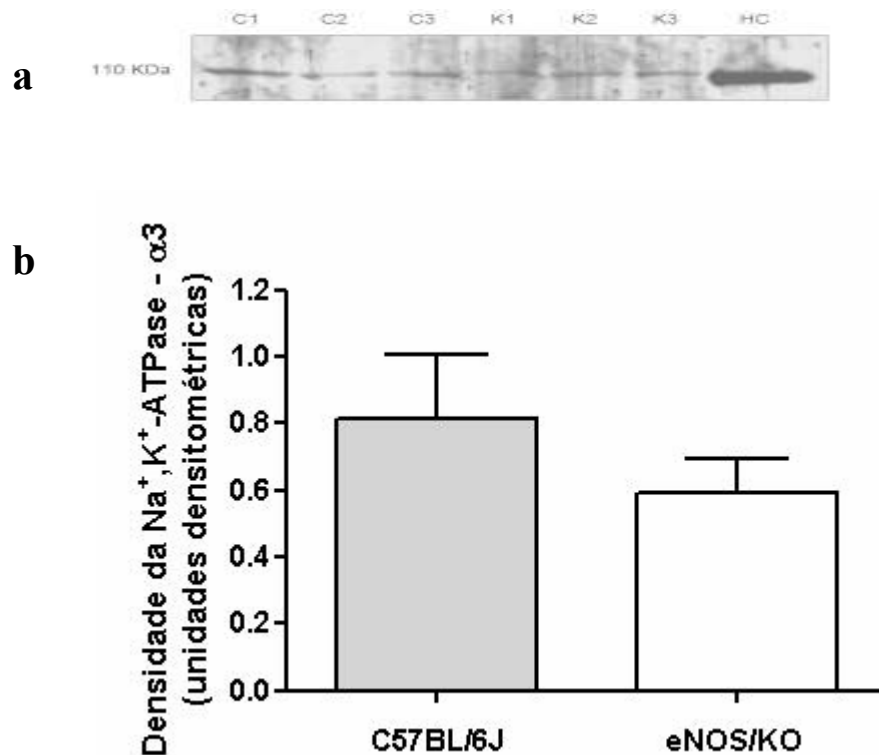


Figura 14. Western Blotting da isoforma α_3 da Na⁺/K⁺-ATPase (anticorpo de camundongo anti- α_3). **(a)** Foram utilizadas 35 μ g proteína das preparações particuladas de eNOS/KO (K1-3) e controle C57BL/6J (C1-3) para comparação. Preparação de hemisfério cerebral de camundongo (HC, 20 μ g proteína) foi utilizada como controle positivo. **(b)** A análise densitométrica indica que não há alteração significativa na expressão desta isoforma no coração do modelo eNOS/KO. $p = 0,3583$, teste t de Student, $n = 3$.

Em suma, foram observadas redução da atividade enzimática total da Na⁺/K⁺-ATPase e da expressão da isoforma α_2 nas preparações de coração do modelo eNOS/KO.

Já foi descrito que a isoforma α_2 da Na⁺/K⁺-ATPase é bastante suscetível a sofrer influência de sua expressão em diferentes condições fisiopatológicas, e isso pode estar colaborando para a diminuição da atividade enzimática global nesse modelo. Entretanto, como a isoforma α_2 não é a isoforma da subunidade α majoritária no coração (ORLOWSKI & LINGREL, 1988; LUCCHESI & SWEADNER, 1991), supôs-se que a diminuição observada na sua expressão não seria suficiente para causar alteração de tal magnitude na atividade Na⁺/K⁺-ATPásica.

Para tentar desvendar este aparente paradoxo, decidimos investigar o tecido renal, também ligado ao sistema cardiovascular mas contendo apenas a isoforma α_1 da Na⁺/K⁺-ATPase (LÜCKING & NIELSEN, 1997; ORLOWSKI & LINGREL, 1988; LOPEZ e cols., 2002).

4.5 Avaliação da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase renal

Assim como no tecido cardíaco, foi observada redução significativa da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase das preparações particuladas de rins de camundongos eNOS/KO quando comparados aos C57BL/6J (redução de 14%, $p = 0,0039$; Figura 15).

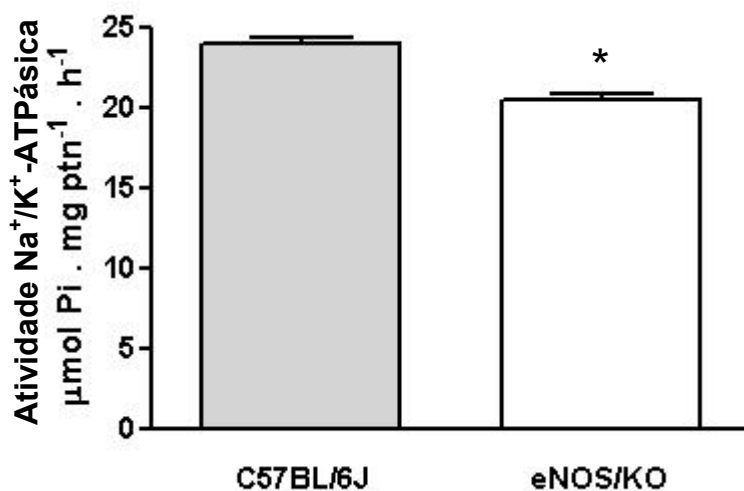


Figura 15. Comparação entre a atividade Na⁺/K⁺-ATPásica nas preparações particuladas de tecido renal, para os camundongos C57BL/6J e eNOS/KO. 5 μg de proteína de cada preparação foram incubados a 37 °C por 1 h. * $p = 0,0039$, teste *t* de Student, $n = 3$.

Em seguida, foram realizados experimentos para investigar os níveis de expressão dessa proteína nos grupos de animais.

4.6 Avaliação da expressão da isoforma α₁ da Na⁺/K⁺-ATPase renal

De modo semelhante ao observado no coração, não foi observada diferença significativa entre os dois grupos de animais quanto a expressão da isoforma α₁ renal, única isoforma presente nesse órgão (Figura 16).

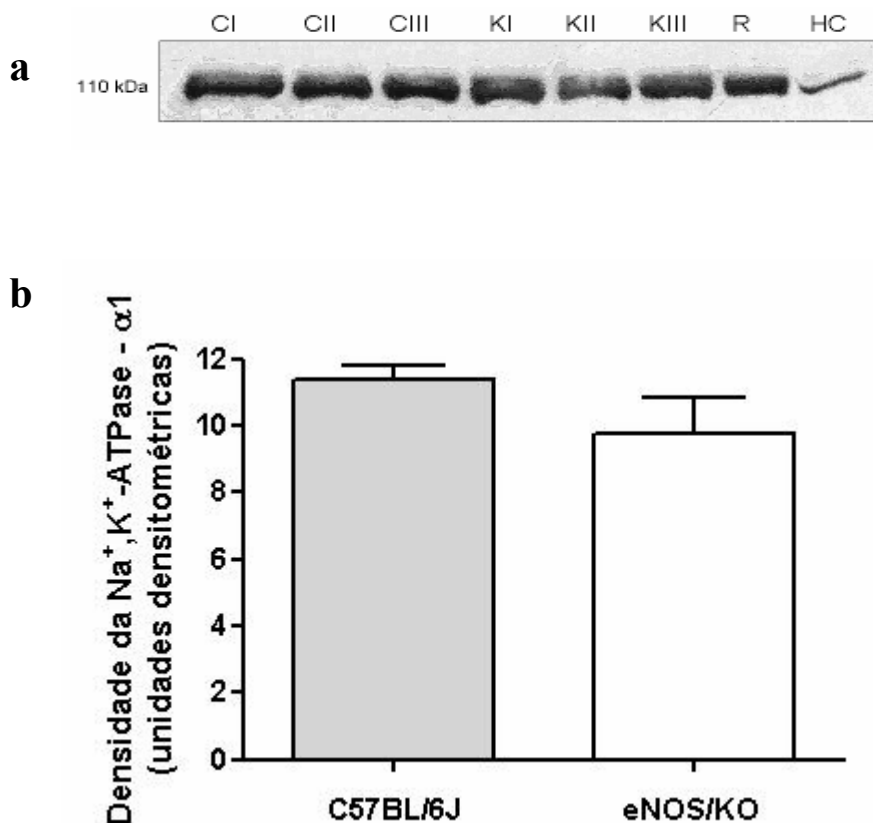


Figura 16. Western Blotting da isoforma $\alpha 1$ da Na^+/K^+ -ATPase (anticorpo de coelho anti- $\alpha 1$). **(a)** Foram utilizadas 20 μg proteína das preparações particuladas de eNOS/KO (K1-3) e controle C57BL/6J (C1-3) para comparação. Preparações de rim de rato (R, 20 μg proteína) e hemisfério cerebral de camundongo (HC, 20 μg proteína) foram utilizadas como controle positivo. **(b)** A análise densitométrica indica que não há alteração significativa na expressão desta isoforma no coração do modelo eNOS/KO. $p = 0,2622$, teste t de Student, $n = 3$.

Assim sendo observamos uma redução da atividade enzimática da Na^+/K^+ -ATPase nas preparações de tecido renal do modelo eNOS/KO, mas com níveis de expressão da proteína similares aos camundongos selvagens. Desta forma, a diminuição da expressão não seria a única causa da diminuição da atividade Na^+/K^+ -ATPásica no modelo eNOS/KO.

A deficiência na geração local de NO endógeno, causada pela ausência da eNOS, poderia estar contribuindo, de alguma maneira, à redução de atividade Na^+/K^+ -ATPásica nos dois tecidos.

Partiu-se então para a investigação de outra família de ATPases, que poderia também sofrer alteração em função da ausência de eNOS: as Ca^{2+} -ATPases. Conforme já visto, elas constituem uma família de ATPases do tipo P de suma importância para a manutenção da homeostasia do cálcio no coração.

4.7 Avaliação da atividade Ca^{2+} -ATPásica cardíaca

A atividade Ca^{2+} -ATPásica total (correspondendo à contribuição de todas as isoformas das famílias SERCA e PMCA) mostrou-se similar para os dois grupos de camundongos (Figura 17).

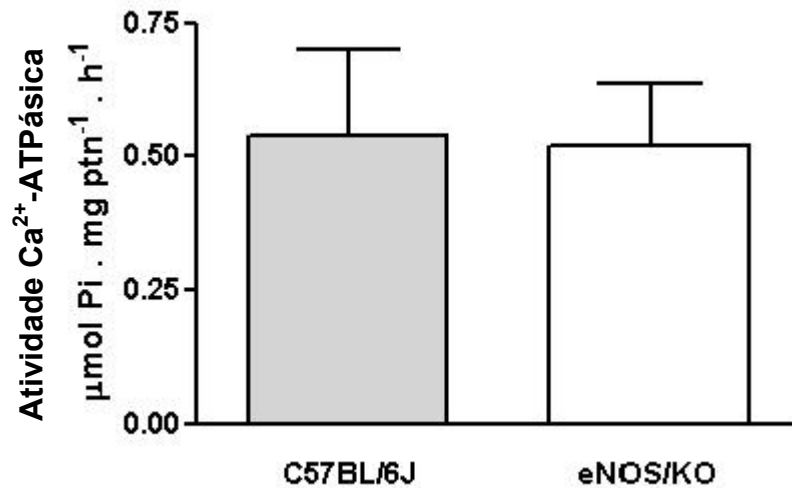


Figura 17. Comparação entre a atividade Ca^{2+} -ATPásica nas preparações particuladas de tecido cardíaco, para os camundongos C57BL/6J e eNOS/KO. 15 μg de proteína de cada preparação foram incubados a 37 °C por 1 h. $p = 0,9243$, teste t de Student, $n = 3$.

4.8 Avaliação da expressão de SERCA2 cardíaca

Na Figura 18 pode-se notar que a expressão de SERCA2, principal isoforma nesse órgão, é significativamente maior nos camundongos transgênicos, quando comparados aos camundongos selvagens (aumento de 190%, $p = 0,0247$).

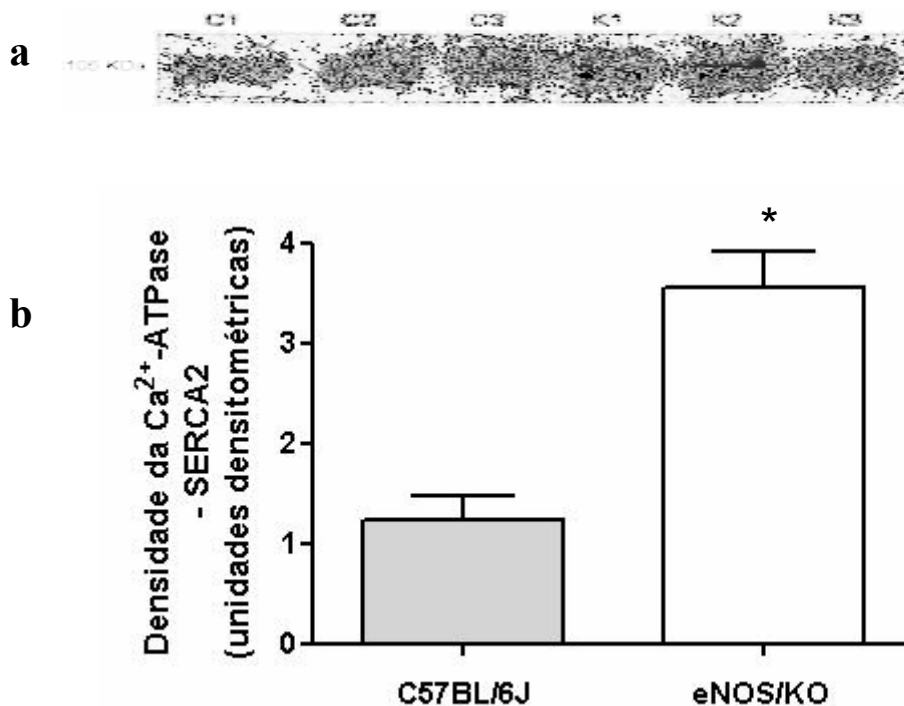


Figura 18. Western Blotting da Ca²⁺-ATPase SERCA (anticorpo de camundongo anti-SERCA2). **(a)** Foram utilizadas 25 µg de proteína das preparações particuladas de eNOS/KO (K1-3) e controle C57BL/6J (C1-3) para comparação. **(b)** A análise densitométrica indica que há alteração significativa na expressão desta isoforma no coração do modelo eNOS/KO. *p = 0,0247, teste *t* de Student, n = 3.

4.9 Avaliação da expressão de PMCA cardíaca

A avaliação da expressão de PMCA, entretanto, mostrou não haver diferença significativa na expressão dessa proteína entre os dois grupos (Figura 19).

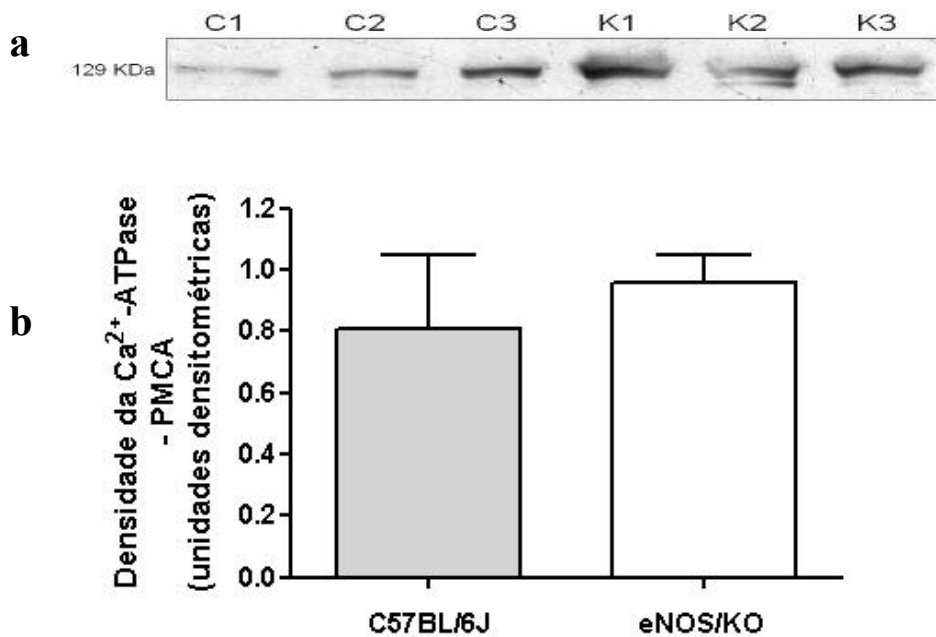


Figura 19. Western Blotting da Ca²⁺-ATPase PMCA (anticorpo de camundongo anti-PMCA). **(a)** Foram utilizadas 25 µg de proteína das preparações particuladas de eNOS/KO (K1-3) e controle C57BL/6J (C1-3) para comparação. **(b)** A análise densitométrica indica que não há alteração significativa na expressão desta isoforma no coração do modelo eNOS/KO. $p = 0,5996$, teste t de Student, $n = 3$.

Em resumo, foram observados níveis similares de atividade enzimática entre os dois grupos, sendo que houve aumento da expressão da SERCA2 e manutenção dos níveis de expressão de PMCA, nas preparações de coração do modelo eNOS/KO.

Pode-se dizer que a SERCA é a principal responsável pela atividade Ca²⁺-ATPásica no coração (principalmente em função de seu padrão de expressão; a contribuição de outras Ca²⁺-ATPases como PMCA e SPCA é bem pequena). A SERCA possui um papel importante no acoplamento excitação/contração do músculo cardíaco (INESÍ e cols., 2008).

Sendo assim, a manutenção do nível de atividade Ca²⁺-ATPásica, mesmo havendo aumento da expressão de SERCA, parece indicar que as preparações particuladas de coração do grupo eNOS/KO têm a função enzimática da Ca²⁺-ATPase prejudicada, corroborando os dados de ZHOU e cols. (2002).

Esse conjunto de resultados indica que a redução da atividade enzimática no modelo eNOS/KO: (1) não se restringe a uma única ATPase; (2) não se restringe a um tipo tecidual; (3) não está exclusivamente associada à diminuição da expressão da proteína.

Vários trabalhos indicam que, em concentrações fisiológicas, o NO endógeno apresenta importante papel antioxidante e sequestrador de radicais livres (WINK e cols., 2001; HUMMEL e cols., 2006). Já foi descrito também que a ação de radicais livres sobre P-ATPases levaria à inibição de sua atividade, particularmente pela oxidação de grupos -SH fundamentais para a função catalítica da enzima (WINSLOW, 1981; KANEKO e cols., 1989; XIE e cols., 1990; OSTADAL e cols., 2004). Diante disso, foi feita a dosagem do conteúdo de grupos sulfidril livres nas preparações.

4.10 Dosagem de grupos sulfidril em coração e rins

Observou-se que o conteúdo de sulfidrilas livres era menor, nas preparações particuladas de tecido cardíaco do grupo eNOS/KO (77% do controle, $p = 0,0090$) (Figura 20) e renal (65% do controle, $p = 0,0336$) (Figura 21).

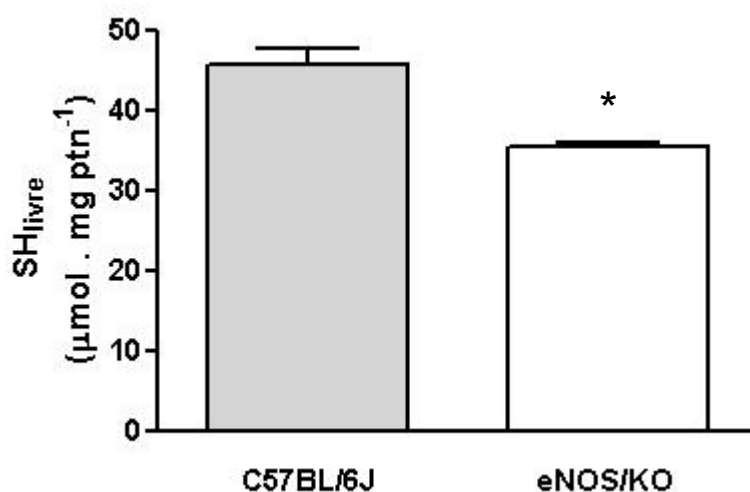


Figura 20. Comparação entre a concentração de grupos sulfidril livres nas preparações particuladas de tecido cardíaco, para os camundongos C57BL/6J e eNOS/KO. Foram utilizados 200 μg proteína/tubo das preparações particuladas de eNOS/KO e controle C57BL/6J para comparação. * $p = 0,0090$, teste *t* de Student, $n = 3$.

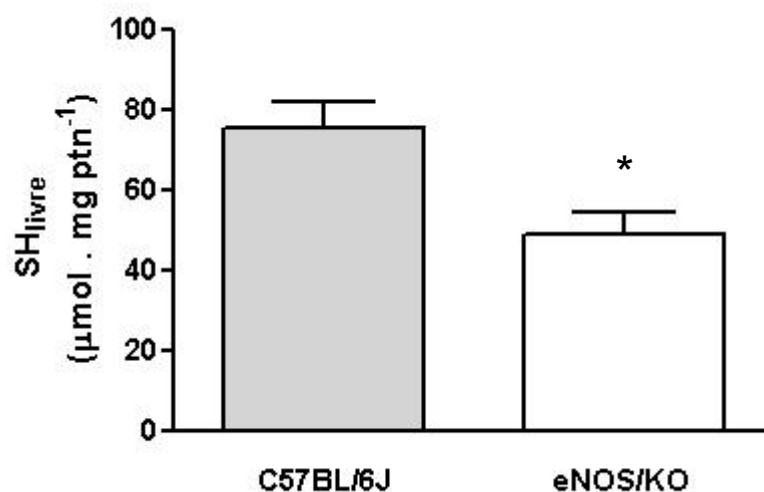


Figura 21. Comparação entre a concentração de grupos sulfidrila livres nas preparações particuladas de tecido renal, para os camundongos C57BL/6J e eNOS/KO. Foram utilizados 200 μg proteína/tubo das preparações particuladas de eNOS/KO e controle C57BL/6J para comparação *p = 0,0336, teste *t* de Student, n = 3.

A diminuição de grupos sulfidrila para o modelo eNOS/KO reforça a hipótese de que o desbalanço redox nesse modelo leva à oxidação de grupos sulfidrila, sugerindo que seja, pelo menos em parte, a causa da redução da atividade ATPásica muito maior do que a diminuição da expressão, quando observada.

Discussão

Os dados de análise biométrica evidenciaram o perfil que desejávamos para o modelo animal em estudo: camundongos transgênicos, adultos jovens, sem o desenvolvimento de macroalterações no coração. Nosso intuito era investigar as possíveis alterações moleculares precoces que poderiam existir no coração, provocadas pela ausência da eNOS (isto é, ainda numa fase sem sintomas e alterações no coração).

Além disso, os resultados da genotipagem e fenotipagem confirmaram a mutação nos camundongos transgênicos. A ausência de expressão da proteína eNOS no modelo transgênico confirma a obtenção do fenótipo em questão, uma vez que já foi demonstrado que essa proteína é fisiologicamente expressa em cardiomiócitos (FORSTERMANN e cols., 1998; MASSION & BALLIGAND, 2003; XU e cols., 2003).

A caracterização fenotípica dos animais estudados veio de encontro aos dados já descritos na literatura acerca desse modelo animal. De fato, não era esperado que os animais com deleção do gene que codifica a NOS endotelial apresentassem cardiomegalia ou sinais de hipertrofia cardíaca. Já foi mostrado em vários estudos que parece não haver desenvolvimento de hipertrofia cardíaca em camundongos eNOS/KO adultos (BAROUCH e cols., 2002; HUANG e cols., 1995; ICHINOSE e cols., 2004; LI e cols., 2004; SHESELY e cols., 1996), sendo apenas observadas alterações cardíacas em idades bem avançadas (> 12 meses) (BAROUCH e cols., 2002; LI e cols., 2004).

Tais dados corroboram com os presentes resultados, que mostram haver inibição de vias de sinalização (tais como as MAP cinases) ligadas ao desenvolvimento de hipertrofia e remodelamento do fenótipo cardíaco, no modelo eNOS/KO. Nossos resultados se assemelham aos descritos por BUBIKAT e cols. (2005) que também mostraram não haver alteração no nível de expressão cardíaca para essas MAPs num modelo de nocaute de eNOS. O trabalho de BUBIKAT e cols. (2005), entretanto, não deixa claro se os níveis totais das MAP cinases estão alterados, nesse modelo.

O estresse oxidativo parece não estar ativando essas vias de sinalização (envolvidas no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca). É importante considerar também o papel do NO como sinalizador e ativador dessas vias. Na ausência de eNOS, a produção de NO é diminuída, e esse estímulo pode estar prejudicado.

De fato, a regulação mútua entre NO e MAP cinases, particularmente ERK1/2 e p38, tem sido descrita (CAO e cols., 2006; ENDO & LAUNEY, 2003; RABKIN e cols., 2007). SPANIKOVÁ e cols. (2008) mostraram que em coração de ratos a inibição de NOS é capaz de reduzir ERK1/2 de forma semelhante ao que observamos, mas não p38 fosforilada. BUBIKAT e cols. (2005) descrevem que os altos níveis de ANP (peptídeo natriurético atrial) encontrados no modelo eNOS/KO poderiam reprimir o remodelamento cardíaco, e que a via ANP/guanilato ciclase/GMPc contra-regularia a ativação de MAPK-ERK. Também já foi atribuído a esse aumento de expressão de ANP a normalização dos níveis de GMPc e a manutenção do relaxamento diastólico normal em camundongos eNOS/KO (HUANG, 1999).

O NO, que é produzido pela eNOS, é um importante regulador fisiológico da homeostasia do cálcio e da função contrátil de cardiomiócitos. A presença de eNOS nos cardiomiócitos levanta uma importante questão: qual poderia ser o papel da eNOS na modulação da expressão e/ou atividade das ATPases fundamentais para o controle do transporte ativo de membrana nas células musculares cardíacas?

As espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , HOCl, ferril, peróxil, e alcóxil, são constantemente formadas em todas as células animais e removidas por mecanismos antioxidantes (HALLIWELL, 1991). As ROS podem ser formadas em situações de isquemia (XU e cols., 2003; SUN e cols., 1993), hipertensão (ZENG e cols., 2009), diabetes (FORBES e cols., 2008), hipóxia (CLANTON, 2007), entre outras. As defesas antioxidantes podem ser elementos sintetizados por mecanismos fisiológicos. O próprio NO, em concentrações fisiológicas, pode atuar como um neutralizador (“*scavenger*”) de radicais livres deletérios. O NO é considerado como um antioxidante sob determinadas condições (DONZELLI e cols., 2006; PENNA e cols., 2009), sendo importante também para a preservação do tecido cardíaco pós-isquemia/reperfusão (SIGFRIED e cols., 1992; WEYRICH e cols., 1992).

Assim sendo, a disfunção da eNOS pode remover uma fonte importante de NO, gerado no cardiomiócito, o que resultaria em diminuição da neutralização de radicais livres de oxigênio tóxicos. Nossos resultados indicam que a ausência da produção de NO pela eNOS induz mudanças no padrão de expressão e atividade

das ATPases envolvidas na homeostasia do Ca^{2+} . No caso da Na^+/K^+ -ATPase, verificou-se por medida direta a diminuição da atividade; para a atividade Ca^{2+} -ATPásica, esta determinação foi indireta, uma vez que os níveis de atividade se mantiveram similares aos do grupo controle, mesmo havendo aumento da expressão da principal Ca^{2+} -ATPase presente no tecido (SERCA). Sendo assim, mostramos que, de fato, a atividade ATPásica é diminuída na ausência dessa isoforma de NOS.

Já foi demonstrado que alguns radicais tóxicos inibem a função enzimática da Na^+/K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase (XU e cols., 1997a; XU e cols., 1997b) e que o NO parece proteger a atividade Na^+/K^+ -ATPásica contra a inativação induzida por radicais hidroxil exógenos, e outros radicais gerados pelas próprias células, por neutralizar estes radicais (XU e cols., 1997b; WINK e cols., 2001; HUMMEL e cols., 2005). O NO gerado endogenamente a partir de NOS do miócito cardíaco pode ser um protetor importante *in vivo* da função da Na^+/K^+ -ATPase contra estresses oxidativos (XU e cols., 2003).

Radicais livres como o hidroxil podem atacar diretamente os sítios de ligação do ATP (XU e cols., 1997b) e danificar a função de ATPases (KANEKO e cols., 1994; XU e cols., 1997a; REIFENBERGER e cols., 2008). VLKOVICOVA e cols. (2008) mostraram que a síntese diminuída de NO em ratos causou inibição da Na^+/K^+ -ATPase decorrente de alteração de um sítio distinto do sítio de ligação do ATP, uma vez que não foram observadas alterações nos valores de afinidade deste. Portanto, os radicais livres podem atacar esse e outros sítios importantes da proteína, além de oxidar lipídios e destruir o microambiente que é favorável para as enzimas de membrana. Por outro lado, concentrações elevadas de NO, assim como o ânion peroxinitrito (ONO_2^-), inibem a Na^+/K^+ -ATPase de membrana de glóbulo vermelho de rato (MURIEL e cols., 2003).

A presença de grupamentos -SH livre parece também fundamental para a atividade catalítica de ATPases. Já foi descrito que a oxidação de grupos -SH, principalmente no sítio catalítico da enzima, levaria à inibição da atividade ATPásica (SCHOOT e cols., 1978; WINSLOW, 1981). Diante disso, decidimos comparar o conteúdo de grupos sulfidrila livres entre as preparações e, de fato, observou-se diminuição no conteúdo de grupos sulfidrila nas preparações de órgãos de camundongos eNOS/KO. Esta oxidação levaria à formação de pontes dissulfeto e

mudanças conformacionais na estrutura protéica, promovendo um bloqueio no seu ciclo catalítico e diminuição da atividade enzimática em relação à quantidade expressa de cada proteína.

A diminuição da atividade ATPásica nesse modelo murino transgênico já havia sido observada em outros trabalhos. Com relação à atividade Na^+/K^+ -ATPásica, ZHOU e cols. (2002), utilizando um modelo de camundongo nocaute para eNOS, observaram também diminuição da atividade, sendo que a pesquisa da Na^+/K^+ -ATPase mostrou não haver alteração na expressão dessa proteína. É importante salientar, entretanto, que essa investigação foi feita sob condições experimentais diferentes (anticorpo anti- Na^+/K^+ -ATPase sem especificidade contra as diferentes isoformas da subunidade α , maior purificação da preparação membranar) e que não há indicação quanto à idade com que os animais foram estudados.

A influência do NO sobre a atividade ATPásica em outros modelos animais mostra resultados controversos. Alguns trabalhos utilizando cães submetidos à tratamento agudo com L-NAME mostraram aumento (VRBJAR e cols., 2000) ou diminuição da atividade, dependendo da área do coração que era estudada (VRBJAR e cols., 2002), enquanto que ratos submetidos à tratamento crônico com L-NAME mostraram diminuição da atividade, que no entanto era reestabelecida 2 semanas após o fim do tratamento (VRBJAR e cols., 1999).

Em nosso trabalho, além da redução da atividade enzimática, observamos também uma diminuição da expressão da isoforma α_2 da Na^+/K^+ -ATPase nas preparações de coração do modelo eNOS/KO. XIE e cols. (1995) já haviam demonstrado uma maior sensibilidade à inativação por H_2O_2 da isoforma α_2 , quando comparada à isoforma α_1 da Na^+/K^+ -ATPase, em modelo de expressão heteróloga das isoformas de rato em células Sf9 (de inseto). Como a isoforma α_2 não é a isoforma majoritária no coração, sendo cerca de 20% da população total da enzima (NOËL & GODFRAIND, 1984; ORLOWSKI & LINGREL, 1988; BERRY e cols., 2006), a diminuição da expressão *per se* não seria suficiente para causar alteração de tal magnitude na atividade enzimática. Portanto, parece que a redução da expressão de α_2 associada ao dano oxidativo causado aos sítios de ligação da Na^+/K^+ -ATPase (que poderia atingir todas as isoformas) implicam na diminuição observada da atividade da enzima cardíaca nesse modelo.

De fato, a investigação do tecido renal, que também está ligado ao sistema cardiovascular, indicou realmente que apenas a alteração da expressão da enzima não explicaria a redução da atividade enzimática. É sabido que no rim não é expressa a isoforma α_2 da Na^+/K^+ -ATPase; apenas a isoforma α_1 da Na^+,K^+ -ATPase é detectada (SWEADNER, 1989; LÜCKING & NIELSEN, 1997; LOPEZ e cols., 2002).

No modelo eNOS/KO, além do estresse oxidativo (CLANTON, 2007), o aumento da pressão arterial poderia ser um fator relevante (uma vez que eNOS é vital pra manutenção da pressão arterial normal e estes camundongos têm consistentemente se mostrado hipertensos – HUANG e cols., 1995; SHESELY e cols., 1996; GÖDECKE e cols., 1998; KURIHARA e cols., 1998; STAUSS e cols., 1999; YANG e cols., 1999; BRANDES e cols., 2000; DUPLAIN e cols., 2001; BEIERWALTES e cols., 2002). Em diversos modelos de hipertensão arterial, observa-se uma diminuição seletiva da expressão da isoforma α_2 cardíaca da Na^+/K^+ -ATPase em ratos (CHARLEMAGNE e cols., 1994; HERRERA e cols., 1988; REPKE e cols., 1996; QUINTAS e cols., 2007). Também em modelos de roedores com atividade NOS diminuída, ou onde é feita a inibição farmacológica das NOS pelo uso de L-NAME, foi observada atividade Na^+/K^+ -ATPásica cardíaca diminuída (VLKOVICOVA e cols., 2008). A diminuição da expressão da isoforma α_2 da Na^+/K^+ -ATPase cardíaca poderia representar uma resposta adaptativa, de maneira a gerar um efeito inotrópico positivo, que compensaria o aumento da resistência vascular periférica.

Recentemente, foi descrita a existência de uma população da enzima Na^+/K^+ -ATPase em um microdomínio celular denominado cavéola. Neste domínio celular, a Na^+/K^+ -ATPase estaria interagindo com a caveolina 1, colocalizada com EGFR (receptor do fator de crescimento do epitélio), Src e Ras. Na ausência de baixas concentrações de ouabaína, a Na^+/K^+ -ATPase inibiria a ativação da Src. A ligação da ouabaína (em concentrações subnanomolares) à Na^+/K^+ -ATPase levaria à liberação do domínio cinase, restaurando a atividade da Src e levando a fosforilações de múltiplos efetores e diferentes vias, como a via Ras-Raf-Erk1/2 (AKIMOVA e cols., 2005; HAAS e cols., 2002). Esta via de sinalização da Na^+/K^+ -ATPase também aumenta a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ROS) e regula a concentração intracelular de cálcio (XIE & XIE, 2005).

Adicionalmente, foi demonstrado o envolvimento da ligação da ouabaína à Na^+/K^+ -ATPase em concentrações nanomolares na geração de oscilações de cálcio intracelular (AIZMAN e cols., 2001). Dessa forma, mesmo que remotamente, a alteração da atividade/expressão da Na^+/K^+ -ATPase poderia levar à falha de sinalização via ERK pela ouabaína endógena (já mostrada como aumentada em modelos de hipertensão – MANUNTA e cols., 2006; FERRANDI e cols., 2006).

Com relação às Ca^{2+} -ATPases, a manutenção do nível de atividade Ca^{2+} -ATPásica, mesmo havendo aumento da expressão de SERCA, corrobora com os dados que indicam que o modelo eNOS/KO tem a função ATPásica prejudicada. A atividade Ca^{2+} -ATPásica também é de grande importância para a manutenção da homeostasia do cálcio no coração.

Embora tenha sido observado por LI e cols. (2005) que a expressão de SERCA2 estava diminuída em roedores hipertensos, quando comparada à expressão do grupo normotenso, nossos resultados podem indicar que a diminuição da atividade Ca^{2+} -ATPásica e o desequilíbrio nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} levam a um aumento de expressão de SERCA. Já foi demonstrado por TERRACIANO e cols. (2001) que mudanças na expressão de determinadas proteínas podem compensar e permitir que a homeostasia normal do Ca^{2+} seja mantida. Esta compensação pode ocorrer através de uma interferência na transcrição e do remodelamento das vias de sinalização de Ca^{2+} (SETH e cols., 2004).

Além da Na^+/K^+ -ATPase, as NOS também estão compartimentalizadas nesses microdomínios cavéolas. É possível, portanto, que a proximidade permita que a eNOS confira proteção oxidativa mais eficaz à Na^+/K^+ -ATPase (especialmente a isoforma α_2), do que às outras ATPases da célula.

Os resultados observados sugerem que a deficiência na produção de NO nesse modelo nocaute leva a um provável desequilíbrio no sistema redox no coração. Por sua vez, esse desbalanço pode afetar diretamente a atividade de enzimas importantes e de sistemas de transporte ativo de membrana no músculo cardíaco. Ou seja, o NO gerado localmente por esta isoforma de NOS pode servir para regular o transporte ativo dos íons Na^+ e K^+ no sarcolema de cardiomiócitos.

Já é sabido que a disfunção da Na^+/K^+ -ATPase pode contribuir para uma sobrecarga de cálcio intracelular e depressão persistente da função cardíaca (XU e cols., 2003). Como exemplo, nossos dados sugerem que a deficiência na produção do NO pode ser um fator determinante na regulação das propriedades funcionais da Na^+/K^+ -ATPase cardíaca. Estes dados são corroborados pela observação de que o pré-tratamento de corações com baixas concentrações de doadores de NO protege de modo marcante a função Na^+/K^+ -ATPásica contra a inativação induzida por isquemia (XU e cols., 2003). A importância do NO na regulação da função da Na^+/K^+ -ATPase também é reforçada pelo fato de que a aplicação *in vitro* de doadores de NO estimula a bomba Na^+/K^+ -ATPase vascular (GUPTA e cols., 1994). Entretanto, é importante enfatizar que tais efeitos são limitados às quantidades de NO produzidas pelas isoformas constitutivas de NOS. Por muito tempo os radicais livres foram considerados produtos nocivos do metabolismo, deletérios aos sistemas biológicos. Atualmente, está claro que baixas concentrações dessas espécies reativas, como no caso do NO, exercem um papel fundamental em cascatas de sinalização que são essenciais para muitas respostas biológicas, entre elas, a cardioproteção (PENNA e cols., 2009).

Conclusões

Este trabalho descreve a diminuição de atividade que ocorre em ATPases de transporte iônico e cinases, proteínas importantes para a fisiologia cardíaca, em corações de camundongos adultos jovens que apresentam deleção do gene que codifica a isoforma endotelial da óxido nítrico sintase. Estes animais apresentam um desequilíbrio no sistema redox, o qual afeta diretamente a atividade de enzimas e sistemas de transporte ativo na membrana do cardiomiócito.

Os dados apresentados permitem sugerir que a deficiência na geração local endógena de NO no coração poderia causar a oxidação de grupos sulfidril essenciais para a atividade da Na^+/K^+ -ATPase e SERCA. O declínio da atividade deve ter sido provocado também pela diminuição específica da expressão da isoforma α_2 da Na^+/K^+ -ATPase. Corroborando com esses resultados, a investigação do tecido renal mostrou que há uma redução da atividade Na^+/K^+ -ATPásica e da densidade dos grupos sulfidril livres sem alteração da expressão da isoforma α_1 , única presente nos rins.

Além da inibição de atividade ATPásica, o estresse oxidativo nesse modelo parece inibir a ativação basal das MAP cinases ERK 1/2 e p38. Considerando o papel do NO como sinalizador e ativador dessas vias, podemos concluir que com a produção endógena de NO diminuída há prejuízo da ativação dessas vias de sinalização envolvidas no remodelamento cardíaco.

Por fim, este estudo trouxe à tona mais evidências acerca da importância da contribuição do NO para a função e expressão de proteínas envolvidas na homeostasia cardíaca.

Referências

AIRES M.M. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2 ed. 1999

AIZMAN O., UHLEN P., LAL M., BRISMAR H., APERIA, A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 98:13420-13424, 2001

AKIMOVA O.A., LOPINA O.D., HAMET P., ORLOV S.N. Search for intermediates of Na⁺,K⁺-ATPases-mediated [Na⁺]_i/[K⁺]_i-independent death signaling triggered by cardiotonic steroids. **Pathophysiology** 12:125-135, 2005

ALDERTON W.K., COOPER C.E., KNOWLES R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal** 357(Pt 3):593-615, 2001

ALEXANDER B.T., MILLER M.T., KASSAB S., NOVAK J., RECKELHOFF J.F., KRUCKEBERG W.C., GRANGER J.P. Differential Expression of Renal Nitric Oxide Synthase Isoforms During Pregnancy in Rats. **Hypertension** 33:435-439, 1999

AXELSEN K. B., PALMGREN M.G. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. **Journal of Molecular Evolution** 46:84-101, 1998

BALLIGAND J.L., KELLY R.A., MARSDEN P.A., SMITH T.W., MICHEL T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 90:347-351, 1993

BAMBRICK L.L., HOWLETT S.E., FENG Z.P., GORDON T. Radioligand binding to muscle homogenates to quantify receptor and ion channel numbers. **Journal of Pharmacological Methods** 20(4):313-21, 1988

BAROUCH L.A., HARRISON R.W., SKAF M.W., ROSAS G.O., CAPPOLA T.P., KOBEISSI Z.A., HOBAI I.A., LEMMON C.A., BURNETT A.L., O'ROURKE B., RODRIGUEZ E.R., HUANG P.L., LIMA J.A., BERKOWITZ D.E., HARE J.M. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. **Nature** 416(6878):337-9, 2002

BATES T. E., LOESCH A., BURNSTOCK G. & CLARK J. B. Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? **Biochemical & Biophysical Research Communications** 218: 40-44, 1996

BAYLIS C., MITRUKA B. & DENG A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **The Journal of Clinical Investigation** 90: 278–281, 1992

BECKMAN J.S. & KOPPENOL W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology** 271: C1424–C1437, 1996

BEHRENDT D. & GANZ P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. **The American Journal of Cardiology** 90(suppl 3):40L–48L, 2002

BEIERWALTES W.H., POTTER D.L., SHESELY E.G. Renal baroreceptor-stimulated renin in the eNOS knockout mouse. **American Journal of Physiology** 51: F59–64, 2002

BECKER L.B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. **Cardiovascular Research** 61: 461–470., 2004

BERGENDI L., BENES L., DURACKOVÁ Z., FERENCIK M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences** 65: 1865–1874, 1999

BERRY R.G., DESPA S., FULLER W., BERS D.M., SHATTOCK M.J. Differential distribution and regulation of mouse cardiac Na⁺,K⁺-ATPase α 1 and α 2 subunits in T-tubule and surface sarcolemmal membranes. **Cardiovascular Research** 73:92-100, 2007

BLANCO G, SÁNCHEZ G, MELTON RJ, TOURTELLOTTE WG, MERCER RW. The alpha4 isoform of the Na,K-ATPase is expressed in the germ cells of the testes. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry** 48:1023-32, 2000

BLANCO G. & MERCER R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **American Journal of Physiology Renal Physiology** 275:F633-50, 1998

BOLOTINA V.M., NAJIBI S., PALACINO J.J., PAGANO P.J., COHEN R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature** 368(6474):850-3, 1994

BRANDES R.P., SCHMITZ-WINNENTHAL F.H., FELETOU M., GÖDECKE A., HUANG P.A., VANHOUTTE P.M., FLEMING I., BUSSE R. An endothelium-derived

hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 97: 9747–9752, 2000

BRINI M., DI LEVA F., DOMI T., FEDRIZZI L., LIM D., CARAFOLI E. Plasma-membrane calcium pumps and hereditary deafness. **Biochemical Society Transactions** 35(Pt 5):913-8, 2007

BROTHERUS J.R., JACOBSEN L., JORGENSEN P.L. Soluble and enzymatically stable (Na⁺ + K⁺)-ATPase from mammalian kidney consisting predominantly of protomer alpha beta-units. Preparation, assay and reconstitution of active Na⁺, K⁺ transport. **Biochimica et Biophysica Acta** 731:290-303, 1983

BUBIKAT A., WINDT L.J., ZETSCHKE B., FABRITZ L., SICKLER H., ECKARD D., GÖDECKE A., BABA H.A., KUHN M. Local atrial natriuretic peptide signaling prevents hypertensive cardiac hypertrophy in endothelial nitric-oxide synthase-deficient mice. **The Journal of Biological Chemistry** 280 (22):21594-21599, 2005

BUHIMSCHI I.A., SAADE G.R., CHWALISZ K., GARFIELD R.E. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. **Human Reproduction Update** 4:25–42, 1998

BUNDGAARD H. & KJELDSEN K. Human myocardial Na,K-ATPase concentration in heart failure. **Molecular and Cellular Biochemistry** 163/164:277-283, 1996

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. **The Journal of General Physiology** 108: 277–293, 1996

CARAFOLI E. Calcium signaling: a tale for all seasons. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 99(3):1115-22, 2002

CAO J.L., LIU H.L., WANG J.K., ZENG Y.M. Cross talk between nitric oxide and ERK1/2 signaling pathway in the spinal cord mediates naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent rats. **Neuropharmacology** 51(2):315-26, 2006

CENGEL A. & SAHINARSLAN A. Nitric oxide and cardiovascular system. **The Anatolian Journal of Cardiology** 6(4):364-8, 2006

CHARLEMAGNE D., ORLOWSKI J., OLIVIERO P., RANNOU F., SAINTE BEUYE C., SWYNGHEDAUW B., LANE LK.. Alteration of Na,K-ATPase subunit mRNA and protein levels in hypertrophied rat heart. **The Journal of Biological Chemistry** 269:1541-1547, 1994

CHEN Y., TRAVERSE J.H., DU R., HOU M., BACHE R.J. Nitric oxide modulates myocardial oxygen consumption in the failing heart. **Circulation** 106: 273–279, 2002

CLANTON T.L. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology** 102(6):2379-88, 2007

COMMUNAL C., COLUCCI W.S., REMONDINO A., SAWYER D.B., PORT J.D., WICHMAN S.E., BRISTOW M.R., SINGH K. Reciprocal modulation of mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 and 2 in failing human myocardium. **Journal of Cardiac Failure** 8:86-92, 2002

DONZELLI S., SWITZER C.H., THOMAS D.D., RIDNOUR L.A., ESPEY M.G., ISENBERG J.S., TOCCHETTI C.G., KING S.B., LAZZARINO G., MIRANDA K.M., ROBERTS D.D., FEELISCH M., WINK D.A. The activation of metabolites of nitric oxide synthase by metals is both redox and oxygen dependent: a new feature of nitrogen oxide signaling. **Antioxidants & Redox Signaling** 8:1363–1371, 2006

DORN G.W. & FORCE T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. **The Journal of Clinical Investigation** 115:527-37, 2005

DOSTANIC-LARSON I., LORENZ J.N., VAN HUYSSSE J.W., NEUMANN J.C., MOSELEY A.E., LINGREL J.B. Physiological role of the alpha1- and alpha2-isoforms of the Na⁺-K⁺-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** 290(3):R524-8, 2006

DUPLAIN H., BURCELIN R., SARTORI C., COOK S., EGLI M., LEPORI M., VOLLENWEIDER P., PEDRAZZINI T., NICOD P., THORENS B., SCHERRER U. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **Circulation** 104: 342–345, 2001

ELFERING, S. L., SARKELA, T. M., GIULIVI, C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry** 277: 38079–38086, 2002

ENDO S., LAUNEY T. Nitric oxide activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 and enhances declustering of ionotropic glutamate receptor subunit 2/3 in rat cerebellar Purkinje cells. **Neuroscience Letters** 350(2):122-6, 2003

ESPEY M.G., MIRANDA K.M., THOMAS D.D., XAVIER S., CITRIN D., VITEK M.P., WINK D.A. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. **Annals New York Academy of Sciences** 962: 195–206, 2002

FERDINANDY P., SCHULZ R., BAXTER G.F. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. **Pharmacological Reviews** 59: 418–458, 2007

FERRANDI M., MOLINARI I., BIANCHI G., FERRARI P. Ouabain-dependent signaling in caveolae as a novel therapeutic target for hypertension. **Cellular and Molecular Biology** 52(8):15-8, 2006

FISKE C.H. & SUBBAROW Y. The colorimetric determination of phosphorus. **The Journal of Biological Chemistry** 66:375-400, 1925

FORBES J.M., COUGHLAN M.T., COOPER M.E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. **Diabetes** 57(6):1446-54, 2008

FORSTERMANN U., BOISSEL J.P., KLEINERT H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **FASEB Journal** 12:773–790, 1998

FRENCH, S., GIULIVI, C. & BALABAN, R. S. Nitric oxide synthase in porcine heart mitochondria: evidence for low physiological activity. **American Journal of Physiology Heart & Circulatory Physiology** 280: H2863–2867, 2001

FREY N. & OLSON E.N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. **Annual Review of Physiology** 65:45-79, 2003

FUKUTO J.M., SWITZER C.H., MIRANDA K.M., WINK D.A. Nitroxyl (HNO/NO⁻): chemistry, biochemistry, and pharmacology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** 45: 335–355, 2005

FUKUTO J.M., JACKSON M.I., KALUDERCIC N., PAOLOCCI N. Examining nitroxyl in biological systems. **Methods in Enzymology** 440: 411–431, 2008

FURCHGOTT R.F., ZAWADZKI J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 299: 373–376, 1980

GEERING K. Function of FXYD proteins, regulators of Na,K-ATPase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes** 37: 387-92, 2005

GILES T.D. Aspects of nitric oxide in health and disease: a focus on hypertension and cardiovascular disease. **The Journal of Clinical Hypertension** 8(suppl 4):2-16, 2006

GÖDECKE A., DECKING U.K., DING Z., HIRCHENHAIN J., BIDMON H.J., GÖDECKE S., SCHRADER J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. **Circulation Research** 82(2):186-94, 1998

GORREN A.C.F., SCHRAMMEL A., SCHMIDT K., MAYER B. Thiols and neuronal nitric oxide synthase: complex formation, competitive inhibition and enzyme stabilization. **Biochemistry** 36: 4360-6, 1997

GUPTA S., MCARTHUR C., GRADY C., RUDERMAN N.B. Stimulation of vascular Na(+)-K(+)-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. **American Journal of Physiology** 266(5 Pt 2):H2146-51, 1994

HAAS M., WANG H., TIAN J., XIE Z. Src-mediated inter-receptor crosstalk between the Na+/K+-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry** 277:18694-18702, 2002

HALLIWELL B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **The American Journal of Medicine** 91(3C):14S-22S, 1991

HASENFUSS G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. **Cardiovascular Research** 39:60-76, 1998a

HASENFUSS G. Calcium pump overexpression and myocardial function. Implications for gene therapy of myocardial failure. **Circulation Research** 83(9):966-8, 1998b

HERMANN M., FLAMMER A., LÜSCHER T.F. Nitric oxide in hypertension. **The Journal of Clinical Hypertension** 8(12suppl 4):17-29, 2006

HERRERA V.L.M., CHOBANIAN A.V., RUIZ-OPAZO N. Isoform-specific modulation of Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit gene expression in hypertension. **Science** 41:221- 223, 1988

HOOL L.C. Reactive oxygen species in cardiac signalling: from mitochondria to plasma membrane ion channels. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 33(1-2):146-51, 2006

HUANG P.L. Mouse models of nitric oxide synthase deficiency. **Journal of the American Society of Nephrology** 11: S120–S123, 2000

HUANG P.L. Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 32(11):1353-9, 1999

HUANG P.L., HUANG Z., MASHIMO H., BLOCH K.D., MOSKOWITZ M.A., BEVAN J.A., FISHMAN M.C. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature** 377(6546):239-242, 1995

HUMMEL S.G., FISCHER A.J., MARTIN S.M., SCHAFFER F.Q., BUETTNER G.R. Nitric oxide as a cellular antioxidant: A little goes a long way. **Free Radical Biology & Medicine** 40: 501 – 506, 2006

HYNDMAN M.E., PARSONS H.G., VERMA S., BRIDGE P.J., EDWORTHY S., JONES C., LONN E., CHARBONNEAU F., ANDERSON T.J. The T-786-->C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. **Hypertension** 39:919–922, 2002

ICHINOSE F., BLOCH K.D., WU J.C., HATAISHI R., ARETZ H.T., PICARD M.H., SCHERRER-CROSBIE M. Pressure overload-induced LV hypertrophy and dysfunction in mice are exacerbated by congenital NOS3 deficiency. **American Journal of Physiology Heart & Circulatory Physiology** 286: H1070-H1075, 2004

INESÍ G., PRASAD A.M., PILANKATTA R. The Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum: Physiological role and relevance to diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 369(1):182-7, 2008

KANAI A.J., PEARCE L.L., CLEMENS P.R., BIRDER L.A., VANBIBBER M.M., CHOI S.Y., DE GROAT W.C., PETERSON J. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 98: 14126–14131, 2001

KANEKO M., MATSUMOTO Y., HAYASHI H., KOBAYASHI A., YAMAZAKI N. Oxygen free radicals and calcium homeostasis in the heart. **Molecular and Cellular Biochemistry** 139(1):91-100, 1994

KANEKO M., SINGAL P.K., DHALLA N.S. Alterations in heart sarcolemmal Ca²⁺(+)-ATPase and Ca²⁺(+)-binding activities due to oxygen free radicals. **Basic Research in Cardiology** 85: 45–54, 1990

KANEKO M., ELIMBAN V., DHALLA N.S. Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca²⁺ pump by oxygen free radicals. **American Journal of Physiology Heart & Circulatory Physiology** 257(3 Pt 2):H804-11, 1989

KAPLAN J.H. Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annual Review of Biochemistry** 71:511-35, 2002

KATO N., SUGIYAMA T., MORITA H., NABIKA T., KURIHARA H., YAMORI Y., YAZAKI Y. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. **Hypertension** 33:933–936, 1999

KEARNEY P.M., WHELTON M., REYNOLDS K., MUNTNER P., WHELTON P.K., HE J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **The Lancet** 365:217–223, 2005

KELLY R. A., BALLIGAND J. L. & SMITH T. W. Nitric oxide and cardiac function. **Circulation Research** 79: 363–380, 1996

KURIHARA N., ALFIE M.E., SIGMON D.H., RHALEB N.E., SHESELY E.G., CARRETERO O.A. Role of nNOS in blood pressure regulation in eNOS mutant mice. **Hypertension** 32:856–861, 1998

LACOLLEY P., GAUTIER S., POIRIER O., PANNIER B., CAMBIEN F., BENETOS A. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. **Journal of Hypertension** 16:31–35, 1998

LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227(5259):680-5, 1970

LEHOTSKY J., KAPLAN P., MURIN R., RAEYMAEKERS L. The role of plasma membrane Ca²⁺ pumps (PMCA) in pathologies of mammalian cells. **Frontiers in Bioscience** 7:d53-84, 2002

LEMKE L.E., BLOEM L.J., FOUTS R., ESTERMAN M., SANDUSKY G., VLAHOS C.J. Decreased p38 MAPK activity in end-stage failing human myocardium: p38 MAPK alpha is the predominant isoform expressed in human heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 33:1527-40, 2001

LI S.Y., GOLDEN K.L., JIANG Y., WANG G.J., PRIVRATSKY J.R., ZHANG X., EASON A.R., CULVER B., REN J. Inhibition of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase differentially regulates contractile function in cardiac myocytes from normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of Ca²⁺ regulatory proteins. **Cell Biochemistry and Biophysics** 42(1):1-12, 2005

LI W., MITAL S., OJAIMI C., CSISZAR A., KALEY G., HINTZE T.H. Premature death and age-related cardiac dysfunction in male eNOS-knockout mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 37(3):671-80, 2004

LINCOLN T.M., KOMALAVILAS P., CORNWELL T.L. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. **Hypertension** 23: 1141–1147, 1994

LOPEZ L.B., QUINTAS L.E. & NOËL F. Influence of development on Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase expression: isoform- and tissue-dependency. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A** 131:323-33, 2002

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry** 193:265-75, 1951

LUCCHESI P.A., SWEADNER K.J. Postnatal changes in Na,K-ATPase isoform expression in rat cardiac ventricle. Conservation of biphasic ouabain affinity. **The Journal of Biological Chemistry** 266: 9327–9331, 1991

LÜCKING K., NIELSEN J.M. Abundance of alpha 3, alpha 2, and alpha 1 isoforms of Na,K-ATPase in rat kidney as estimated by competitive RT-PCR and [3H]ouabain binding. **Annals New York Academy of Sciences** 834:107-9, 1997

MANUNTA P., FERRANDI M., MESSAGIO E. FERRARI P. A new antihypertensive agent that antagonizes the prohypertensive effect of endogenous ouabain and adducin. **Cardiovascular and Hematological Agents in Medicinal Chemistry** 4(1):61-6, 2006

MARCZIN N., EL-HABASHI N., HOARE G.S., BUNDY R.E., YACOUB M. Antioxidants in myocardial ischemia–reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 420: 222–236, 2003

MARENGO J.J., HIDALGO C. & BULL R. Sulfhydryl Oxidation Modifies the Calcium Dependence of Ryanodine-Sensitive Calcium Channels of Excitable Cells. **Biophysical Journal** 74: 1263–1277, 1998

MARTONOSI N.A. & PIKULA S. The structure of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. **Acta Biochimica Polonica** 50(2):337-65, 2003

MASSION P.B., BALLIGAND J.L. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. **Journal of Physiology** 546:63-75, 2003

MAYOL V., DIGNAT-GEORGE F., GERBI A., MARTIN-VASALLO P., LESAULE G., SAMPOL J. & MAIXENT, J.M. Evidence that human endothelial cells express different isoforms of Na,K-ATPase. **Journal of Hypertension** 16:145-150, 1998

McDONOUGH A.A., ZHANG Y., SHIN V., FRANK J.S. Subcellular distribution of sodium pump isoform subunits in mammalian cardiac myocytes. **American Journal of Physiology Cell Physiology** 270: C1221-7, 1996

McDONOUGH AA, AZUMA KK, LESCALE-MATYS L, TANG MJ, NAKHOUL F, HENSLEY CB, KOMATSU Y. Physiologic rationale for multiple sodium pump isoforms. Differential regulation of alpha 1 vs alpha 2 by ionic stimuli. **Annals of the New York Academy of Sciences** 671:156-69, 1992

MERCER R.W., BIEMESDERFER D., BLISS DP J.R, COLLINS J.H., FORBUSH B 3RD. Molecular cloning and immunological characterization of the gamma polypeptide, a small protein associated with the Na,K-ATPase. **The Journal of Cell Biology** 121: 579-586, 1993

MIRANDA K.M., NIMS R.W., THOMAS D.D., ESPEY M.G., CITRIN D., BARTBERGER M.D., PAOLOCCI N., FUKUTO J.M., FEELISH M., WINK D.A. Comparison of the reactivity of nitric oxide and nitroxyl with heme proteins. A chemical discussion of the differential biological effects of these redox related products of NOS. **Journal of Inorganic Biochemistry** 93: 52–60, 2003

MILANO C.A., DOLBER P.C., ROCKMAN H.A., BOND R.A., VENABLE M.E., ALLEN L.F., LEFKOWITZ R.J. Myocardial expression of a constitutively active α 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 91: 10109-13, 1994

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Caderno de Informações de Saúde. Secretaria Executiva, 2009

MOBASHERI A., AVILA J., COZAR-CASTELLANO I., BROWNLEADER M.D., TREVAN M., FRANCIS M.J., LAMB J.F., MARTIN-VASSALLO P. Na⁺,K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Bioscience Reports** 20: 51-91, 2000

MOBASHERI A., MOBASHERI R., FRANCIS M.J., TRUJILLO E., ALVAREZ DE LA ROSA, D. & MARTIN-VASALLO P. Ion transport in chondrocytes: membrane transporters involved in intracellular homeostasis and the regulation of cell volume, free [Ca²⁺] and pH. **Histology and Histopathology** 13:893-910, 1998

MOHAMMADI K., LIU L., TIAN J., KOMETIANI P., XIE Z., ASKARI A. Positive inotropic effect of ouabain on isolated heart is accompanied by activation of signal pathways that link Na⁺/K⁺-ATPase to ERK1/2. **Journal of Cardiovascular Pharmacology** 41(4):609-14, 2003

MOLAVI B., MEHTA J.L. Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. **Current Opinion in Cardiology** 19: 488–493, 2004

MOLKENTIN J.D. & DORN II G.W. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. **Annual Review of Physiology** 63:391-426, 2001

MOMBOULI J.V., VANHOUTTE P.M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 31: 61–74, 1999

MONCADA S., ERUSALIMSKI J.D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? **Nature Reviews** 3: 214–220, 2002

MONCADA S. & HIGGS A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine** 329:2002-2012, 1993

MÜLLER-EHMTSEN J., McDONOUGH A.A., FARLEY R.A., SCHWINGER R.H. Sodium pump isoform expression in heart failure: implication for treatment. **Basic Research in Cardiology** 97 Suppl 1:125-30, 2002

MURIEL P., CASTANEDA G., ORTEGA M., NOEL F. Insights into the mechanism of erythrocyte Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by nitric oxide and peroxynitrite anion. **Journal of Applied Toxicology** 23:275-278, 2003

NESHER M., SHPOLANSKY U., ROSEN H., LICHTSTEIN D. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. **Life Sciences** 80: 2093-107, 2007

NOËL F., GODFRAIND T. Heterogeneity of ouabain specific binding sites and Na⁺,K⁺-ATPase inhibition in microsomes from rat heart. **Biochemical Pharmacology** 33:47-53, 1984

NORGAARD A., BJERREGAARD P., BAANDRUP U., KJELDTSEN K., RESKE-NIELSEN E., THOMSEN P.E. The concentration of the Na,K-pump in skeletal and heart muscle in congestive heart failure. **International Journal of Cardiology** 26:185-90, 1990

O'KEEFE J.H., CARTER M.D., LAVIE CJ. Primary and secondary prevention of cardiovascular diseases: a practical evidence-based approach. **Mayo Clinic Proceedings** 84:741-57, 2009

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

OSTADAL P., ELMOSELHI A.B., ZDOBNICKA I., LUKAS A., ELIMBAN V., DHALLA N.S. Role of oxidative stress in ischemia-reperfusion-induced changes in Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase isoform expression in rat heart. **Antioxidants & Redox Signaling** 6(5):914-23, 2004

PALMER R.M.J., FERRIGE A.G., MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** 327: 524– 526, 1987

PAPAPETROPOULOS A., RUDIC R.D., SESSA W.C. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. **Cardiovascular Research** 43: 509–520, 1999

PENNA C., MANCARDI D., RASTALDO R., PAGLIARO P. Cardioprotection: a radical view: Free radicals in pre and postconditioning. **Biochimica et Biophysica Acta** 1787(7):781-93, 2009

PESTOV N.B., ADAMS G., SHAKHPARONOV M.I., MODYANOVA N.N. Identification of a novel gene of the X,K-ATPase β -subunit family that is predominantly expressed in skeletal and heart muscles. **FEBS Letters** 456: 243-248, 1999

PETRICH B.G. & WANG Y. Stress-activated MAP kinases in cardiac remodeling and heart failure; new insights from transgenic studies. **Trends in Cardiovascular Medicine** 14:50-5, 2004

PÔÇAS E.S., COSTA P.R., DA SILVA A.J., NOËL F. 2-Methoxy-3,8,9-trihydroxy Coumestan: a new synthetic inhibitor of Na^+, K^+ -ATPase with an original mechanism of action. **Biochemical Pharmacology** 66(11):2169-76, 2003

PÔÇAS E.S.C., TOUZA N.A., PIMENTA P.H.C., LEITÃO F.B., NETO C.D., DA SILVA A.J.M., COSTA P.R.R., NOËL F. Insights into the mechanism of Na^+, K^+ -ATPase inhibition by 2-methoxy-3,8,9-trihydroxy coumestan. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 16(19):8801-5, 2008

QUINTAS L.E., LOPEZ L.B., SOUCCAR C., NOËL F. Na^+/K^+ -ATPase density is sexually dimorphic in the adult rat kidney. **Annals New York Academy of Sciences** 834:552-554, 1997

QUINTAS L.E., CARICATI-NETO A., LAFAYETTE S.S., JURKIEWICZ A., NOËL F. Down-regulation of Na^+/K^+ -ATPase $\alpha(2)$ isoform in denervated rat vas deferens. **Biochemical Pharmacology** 60:741-7, 2000

QUINTAS L.E.M., CUNHA V.M.N., SCARAMELLO C.B., DA SILVA CL, CARICATI-NETO A, LAFAYETTE SS, JURKIEWICZ A, NOËL F. Adaptive expression pattern of different proteins involved in cellular calcium homeostasis in denervated rat vas deferens. **European Journal of Pharmacology** 525: 54-9, 2005

QUINTAS L.E.M., NOËL F., WIBO M. Na⁺/K⁺-ATPase α isoforms expression in strokeprone spontaneously hypertensive rat heart ventricles: effect of salt loading and lacidipine treatment. **European Journal of Pharmacology** 565:151-7, 2007

RABKIN S.W., KLASSEN S.S., TSANG M.Y. Sodium nitroprusside activates p38 mitogen activated protein kinase through a cGMP/PKG independent mechanism. **Life Sciences** 81(8):640-6, 2007

RADOMSKI M.W., PALMER R.M., MONCADA S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. **British Journal of Pharmacology** 92: 181–187, 1987

RECCHIA F.A., MCCONNELL P.I., BERNSTEIN R.D., VOGEL T.R., XU X., HINTZE T.H. Reduced nitric oxide production and altered myocardial metabolism during the decompensation of pacing-induced heart failure in the conscious dog. **Circulation Research** 83: 969–979, 1998

REEVES A.S., COLLINS J.H., SCHWARTZ A. Isolation and characterization of Na⁺,K⁺-ATPase proteolipid. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 95: 1591-1598, 1980

REES D. D., PALMER R. M. J. & MONCADA S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 86: 3375–3378, 1989

REIFENBERGER M.S., ARNETT K.L., GATTO C., MILANICK M.A. The reactive nitrogen species peroxynitrite is a potent inhibitor of renal Na-K-ATPase activity. **American Journal of Physiology Renal Physiology** 295: F1191-F1198, 2008

REPKE K.R., SWEADNER K.J., WEILAND J., MEGGES R. SCHON R. In search of ideal inotropic steroids: recent progress. **Progress in Drug Research** 47:9-52, 1996

RIBEIRO M. O., ANTUNES E., DE NUCCI G., LOVISOLO S. M. & ZATZ R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension** 20: 298–303, 1992

RIDNOUR L.A., THOMAS D.D., MANCARDI D., DONZELLI S., PAOLOCCI N., PAGLIARO P., MIRANDA K.M., KRISHNA M.C., FUKUTO J., GRISHAM M.B., MITCHELL J.B., ESPEY M.G., WINK D.A. Antioxidant properties of nitric oxide in

cellular physiological and pathophysiological mechanisms. The implications of biological balance between NO and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents** 3: 181–188, 2004a

RIDNOUR L.A., THOMAS D.D., MANCARDI D., ESPEY M.G., MIRANDA K.M., PAOLOCCI N., FEELISCH M., FUKUTO J., WINK D.A. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. **Biological Chemistry** 385: 1–10, 2004b

SALAZAR F.J., PINILLA J. M., LOPEZ F. & ROMERO J. C. & QUESADA T. Renal effects of prolonged synthesis inhibition of endothelium-derived nitric oxide. **Hypertension** 20: 113–117, 1992

SCATENA R., BOTTONI P., MARTORANA G.E., GIARDINA B. Nitric oxide donor drugs: an update on pathophysiology and therapeutic potential. **Expert Opinion on Investigational Drugs** 14:835–846, 2005

SCHOOT B.M., DE PONT J.J.H.H.M., BONTING S.L. Studies on (Na⁺ / K⁺)-activated ATPase. XLII. Evidence for two classes of essential sulfhydryl groups. **Biochimica et Biophysica Acta** 522:602-613, 1978

SCHWINGER R.H., BUNDGAARD H., MÜLLER-EHMSSEN J. & KJELDSSEN K. The Na, K-ATPase in the failing human heart. **Cardiovascular Research** 57:913-20, 2003

SCHWINGER R.H., WANG J., FRANK K., MÜLLER-EHMSSEN J., BRIXIUS K., McDONOUGH A.A., ERDMANN E. Reduced sodium pump alpha1, alpha3, and beta1-isoform protein levels and Na⁺,K⁺-ATPase activity but unchanged Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein levels in human heart failure. **Circulation** 99:2105-12, 1999

SEDLAK J., LINDSAY R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry** 25 (1):192-205, 1968

SETH M., SUMBILLA C., MULLEN S.P., LEWIS D., KLEIN M.G., HUSSAIN A., SOBOLOFF J., GILL D.L., INESI G. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) gene silencing and remodeling of the Ca²⁺ signaling mechanism in cardiac myocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 101(47):16683-8, 2004

SHAMRAJ O.I. & LINGREL J.B. A putative fourth Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit gene is expressed in testis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 91: 12952-12956, 1994

SHESELY E.G., MAEDA N., KIM H.S., DESAI K.M., KREGE JH., LAUBACH V.E., SHERMAN P.A., SESSA W.C., SMITHIES O. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 93:13176-13181, 1996

SIES H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine** 91:31S– 38S; 1991

SIGFRIED M.R., ERHARDT J., RIDER T., MA X.L., LEFER A.M. Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 260:668-675, 1992

SPANIKOVÁ A., SIMONČÍKOVÁ P., RAVINGEROVÁ T., PECHANOVÁ O., BARANČÍK M. The effect of chronic nitric oxide synthases inhibition on regulatory proteins in rat hearts. **Molecular and Cellular Biochemistry** 312(1-2):113-20, 2008

SPECHT S.C., LOPEZ-ROSADO R., SANTOS-BERRIOS C. & FIGUEROA-NIEVES R. An ouabain-sensitive Na⁺,K⁺-ATPase in tentacles of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. **Comparative Biochemistry and Physiology** 110B:555-563, 1995

STAUSS H.M., GÖDECKE A., MROWKA R., SCHRADER J., PERSSON P.B. Enhanced blood pressure variability in eNOS knockout mice. **Hypertension** 33: 1359–1363, 1999

STREHLER E.E. & TREIMAN M. Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. **Current Molecular Medicine** 4(3):323-35, 2004

STREHLER E.E. & ZACHARIAS D.A. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. **Physiological Reviews** 81(1):21-50, 2001

STUART-SMITH K. Demystified. Nitric oxide. **Molecular Pathology** 55:360–366, 2002

SU Y., EDWARDS-BENNET S., BUBB M.R., BLOCK E.R. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by the actin cytoskeleton. **American Journal of Physiology Cell Physiology** 284:1542-1549, 2003

SUGDEN PH. Signalling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. **Annals of Internal Medicine** 33:611-22, 2001

SUGDEN P.H. & CLERK A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. **Circulation Research** 83(4):345-52, 1998

SUN J.Z., KAUR H., HALLIWELL B., LI X.Y., BOLLI R. Use of aromatic hydroxylation of phenylalanine to measure production of hydroxyl radicals after myocardial ischemia in vivo. Direct evidence for a pathogenetic role of the hydroxyl radical in myocardial stunning. **Circulation Research** 73(3):534-49, 1993

SUSSMAN M.A., McCULLOCH A. & BORG T.K. Dance band on the Titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. **Circulation Research** 91:888-98, 2002

SWEADNER K.J. Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta** 988(2):185-220, 1989

TERRACCIANO C.M., PHILIPSON K.D., MACLEOD K.T. Overexpression of the Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger and inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca⁽²⁺⁾-ATPase in ventricular myocytes from transgenic mice. **Cardiovascular Research** 49(1):38-47, 2001

THOMAS D.D., MIRANDA K.M., COLTON C.A., CITRIN D., ESPEY M.G., WINK D.A. Heme proteins and nitric oxide (NO): the neglected, eloquent chemistry in NO redox signaling and regulation. **Antioxidants & Redox Signaling** 5: 307–317, 2003

TIRUPATTUR P.R., RAM J.L., STANDLEY P.R. & SOWERS J.R. Regulation of Na,K-ATPase gene expression by insulin in vascular smooth muscle cells. **American Journal of Hypertension** 6:626-629, 1993

TOGASHI H., SASAKI M., FROHMAN E., TAIRA E., RATAN R.R., DAWSON T.M., DAWSON V.L. Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 94:2676–2680, 1997

VERDONCK F., VOLDERS P.G., VOS M.A., SIPIDO K.R. Intracellular Na⁺ and altered Na⁺ transport mechanisms in cardiac hypertrophy and failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 35: 5–25, 2003

VAGUE P., DUFAYET D., LAMOTTE M.F., MOUCHOT C., RACCAH D. Genetic factors, Na K ATPase activity and neuropathy in diabetics. **Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine** 181:1811-21, 1997

VALLANCE P., COLLIER J. & MONCADA S. Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. **Cardiovascular Research** 23: 1053–1057, 1989a

VALLANCE P., COLLIER J. & MONCADA S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. **The Lancet** 2: 997-1000, 1989b

VAN VLIET B.N., CHAFE L.L. & MONTANI J.P. Characteristics of 24 h telemetered blood pressure in eNOS-knockout and C57Bl/6J control mice. **Journal of Physiology** 549(1):313-325, 2003

VIEIRA, S. Elementos de Estatística. 4a ed. Editora Atlas, 2003

VLKOVIČOVÁ J., JAVORKOVÁ V., MÉZEŠOVÁ L., PECHÁŇOVÁ O., VRBJAR N. Regulatory role of nitric oxide on the cardiac Na, K-ATPase in hypertension. **Physiological Research** 57 (Suppl. 2): S15-S22, 2008

VRBJAR N., BERNÁTOVÁ I., PECHANOVÁ O. Changes of sodium and ATP affinities of the cardiac (Na,K)-ATPase during and after nitric oxide deficient hypertension. **Mol Cell Biochem** 202: 141-147, 1999

VRBJAR N., STRNISKOVÁ M., PECHANOVÁ O., GEROVÁ M. Short-term NO Synthase Inhibition and the Na⁺-Binding Properties of Cardiac Na,K-ATPase. **Physiological Research** 49: 65-70, 2000

VRBJAR N., STRNISKOVÁ M., PECHANOVÁ O., GEROVÁ M. Short-term NO Synthase Inhibition and the ATP Affinity of Cardiac Na,K-ATPase. **Physiological Research** 51:565-569, 2002

WATTANAPITAYAKUL S.K., MIHM M.J., YOUNG A.P., BAUER J.A. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. **Trends in Pharmacological Sciences** 22(7):361-8, 2001

WEYRICH A.S., MA X.L., LEFER A.M. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. **Circulation** 86:279-288, 1992

WHITTLE B. J., LOPEZ-BELMONTE J. & REES D. D. Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation. **British Journal of Pharmacology** 98: 646–652, 1989

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. The global burden of disease: 2004 update. World Health Organization. Suíça, 2008

WINK D.A., MIRANDA K.M., KATORI T., MANCARDI D., THOMAS D.D., RIDNOUR L., ESPEY M.G., FEELISCH M., COLTON C.A., FUKUTO J.M., PAGLIARO P., KASS D.A., PAOLOCCI N. Orthogonal properties of the redox siblings nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system: a novel redox paradigm. **American Journal of Physiol Heart and Circulatory Physiology** 285: H2264–H2276, 2003

WINK D.A., MIRANDA K.M., ESPEY M.G., PLUTA R.M., HEWETT S.J., COLTON C., VITEK M., FEELISCH M., GRISHAM M.B. Mechanisms of the Antioxidant Effects of Nitric Oxide. **Antioxidants & Redox Signaling** 3 (2): 203-213, 2001

WINK D.A., MITCHELL J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine** 25: 434–456, 1998

WINSLOW, J.W. The reaction of sulfhydryl groups of sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase with N-ethylmaleimide. The relationship between ligand-dependent alterations of nucleophilicity and enzymatic conformational states. **The Journal of Biological Chemistry** 256(18):9522-31, 1981

WOO A.L., JAMES P.F., LINGREL J.B. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. **The Journal of Biological Chemistry** 275:20693-20699, 2000

WUYTACK F., RAEYMAEKERS L., MISSIAEN L. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. **Cell Calcium** 32: 279–305, 2002

XIE Z. & XIE J. The Na/K-ATPase-mediated signal transduction as a target for new drug development. **Frontiers in Bioscience** 10:3100-9, 2005

XIE Z., JACK-HAYS M., WANG Y., PERIYASAMY S.M., BLANCO G., HUANG W.H., ASKARI A. Different oxidant sensitivities of the α_1 and α_2 isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase expressed in baculovirus-infected insect cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 207(1): 155-159, 1995

XIE Z.J., WANG Y.H., ASKARI A., HUANG W.H., KLAUNIG J.E., ASKARI A. Studies on the specificity of the effects of oxygen metabolites on cardiac sodium pump. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 22(8):911-20, 1990

XU K.Y., KUPPUSAMY S.P., WANG J.Q., LI H., CUI H., DAWSON T.M., HUANG P.L., BURNETT A.L., KUPPUSAMY P., BECKER L.C. Nitric oxide protects cardiac sarcolemmal membrane enzyme function and ion active transport against ischemia-induced inactivation. **The Journal of Biological Chemistry** 278:41798-41803, 2003

XU K.Y., HUSO D.L., DAWSON T.M., BRETT D.S., BECKER L.C. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 96: 657–662, 1999

XU L., EU J. P., MEISSNER G. & STAMLER J. S. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. **Science** 279: 234–237, 1998

XU K.Y., ZWEIER J.L., BECKER L.C. Oxygen-free radicals directly attack the ATP binding site of the cardiac Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. **Annals of the New York Academy of Sciences** 834:680-3, 1997a

XU K.Y., ZWEIER J.L., BECKER L.C. Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. **Circulation Research** 80:76-81, 1997b

YANG X.P., LIU Y.H., SHESELY E.G., BULAGANNAWAR M., LIU F., CARRETERO O.A. Endothelial nitric oxide gene knockout mice. Cardiac phenotypes and the effect

of angiotensin-converting enzyme inhibitor on myocardial ischemia/reperfusion injury. **Hypertension** 34: 24–30, 1999

YUSUF S., THOM T. & ABBOTT R.D. Changes in hypertension treatment and in congestive heart failure mortality in the United States. **Hypertension** 13(suppl 1):174-79, 1989

ZAHLER R., SUN W., ARDITO T., ZHANG Z.T., KOCSIS J.D., KASHGARIAN M. The $\alpha 3$ isoform protein of the Na⁺, K⁺-ATPase is associated with the sites of cardiac and neuromuscular impulse transmission. **Circulation Research** 78, 870–879, 1996

ZAHRADNIKOVÁ A., MINAROVIC I., VENEMA R.C. & MÉSZÁROS L.G. Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. **Cell Calcium** 22: 447–453, 1997

ZENG C., VILLAR V.A., YU P., ZHOU L., JOSE P.A. Reactive oxygen species and dopamine receptor function in essential hypertension. **Clinical and Experimental Hypertension** 31(2):156-78, 2009

ZHENG L., WIBO M., KOLÁR F., GODFRAIND T. Calcium channels and cation transport ATPases in cardiac hypertrophy induced by aortic constriction in newborn rats. **Molecular and Cellular Biochemistry** 163-164: 23-9, 1996

ZHOU L., BURNETT A.L., HUANG P.L., BECKER L.C., KUPPUSAMY P., KASS D.A., DONAHUE J.K., PROUD D., SHAM J.S.K., DAWSON T.M., XU K.Y. Lack of nitric oxide synthase depresses ion transporting enzyme function in cardiac muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 294(5):1030-5, 2002

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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