

# Expressão das Óxido Nítrico Sintetases na Fisiopatologia das Doenças Cardiovasculares

Fernanda Viaro, Fernando Nobre, Paulo Roberto B. Evora

Ribeirão Preto, SP

O óxido nítrico (NO) além de ser um potente vasodilatador e inibidor da adesão e agregação plaquetárias, reduz a aderência de leucócitos no endotélio vascular e, também, suprime a proliferação de células da musculatura lisa vascular por inibição de fatores de crescimento. O conhecimento das óxido nítrico sintetases (NOSs) é de extrema importância científica, não só para o entendimento de novos mecanismos fisiopatológicos, mas, também, por ser um alvo à descoberta de novas intervenções terapêuticas<sup>1</sup>. Assim, o propósito deste texto é o de revisar o papel das NOSs nos mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos, do sistema cardiovascular.

## Conceitos básicos

As NOSs, do ponto de vista bioquímico, são uma família de enzimas complexas que catalisam a oxidação da L-arginina para formar óxido nítrico e L-citrulina. As três formas humanas da NOS identificadas até agora, ecNOS (endotelial constitutiva), nNOS (neuronal), e iNOS (induzida), são encontradas nos cromossomos humanos 7, 12 e 17, respectivamente, e assim foram nomeadas, com base nos tecidos nos quais foram primeiramente clonadas e caracterizadas<sup>1,2</sup>.

**Óxido nítrico sintetase constitutiva ou endotelial (ecNOS)** - O papel do NO na regulação do tônus vascular e da função plaquetária é atribuído à atividade da isoforma ecNOS. A sua inativação limita a contribuição do NO na homeostase dos vasos e resulta num aumento do tônus vascular e da adesão e agregação plaquetárias. A via de transdução de sinal, que leva à ativação da ecNOS, no seu curso completo, encontra-se representada na figura 1, onde observa-se que a atividade da ecNOS é regulada pela concentração de cálcio livre intracelular e pelo complexo  $Ca^{++}$ -calmodulina. A ecNOS é uma proteína expressa de maneira constitucional associada, predominantemente, com a fração subcelular, sugerindo que a enzima nativa é uma proteína com-

ponente da membrana. Recentes e detalhadas análises da associação da ecNOS com a membrana celular, mostraram que esta enzima está localizada no Complexo de Golgi, bem como em estruturas específicas na membrana identificadas como cavéolas. A associação da ecNOS com uma região da membrana plasmática, na qual estão concentradas várias chaves dos complexos de transdução de sinal (como as G-proteínas), tem, provavelmente, profunda repercussão na atividade enzimática bem como na sua acessibilidade aos processos intracelulares da via de liberação do NO, incluindo processos não associados ao aumento do cálcio intracelular<sup>3-5</sup>.

**Óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS)** - Esta isoforma está presente nas células neuronais centrais e periféricas, e, certamente, em células epiteliais. Sua atividade também é regulada por  $Ca^{++}$  e calmodulina. Suas funções incluem regulação duradoura da transmissão sináptica no sistema nervoso central, regulação central da pressão sanguínea, relaxamento do músculo liso e vasodilatação via nervos nitrérgicos periféricos. Tem sido envolvida também na morte de neurônios no acidente vascular cerebral<sup>6</sup>.

**Óxido nítrico sintetase induzível (iNOS)** - A expressão desta enzima é manifestada em uma multidão de células diferentes, incluindo macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos, depois de estimulação com lipopolissacarídeos (LPS), citoquinas (como IL-1 $\beta$ , TFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6) e outros. Por estas características tem importante papel em atividades antimicrobianas, antiparasitárias e antineoplásicas<sup>7</sup>. Esta isoforma não é regulada pelo cálcio. Ela produz grande quantidade de NO que tem efeito citostático nas células alvo parasitadas via inibição de enzimas férricas, causando fragmentação do DNA. A indução da iNOS está envolvida na fisiopatologia das doenças auto-imunes e no choque séptico<sup>6</sup>.

Devido à dificuldade encontrada pelos autores desta revisão, em relação às diferentes nomenclaturas das isoformas das NOSs, resolveu-se pela elaboração de uma tabela simples com as possíveis nomenclaturas de cada isoforma, a fim de entendimento e esclarecimento dos leitores do tema aqui apresentado (tab. I).

## Métodos para o estudo da atividade da NOS

Embora a metodologia laboratorial não seja a maior motivação desta revisão, um breve comentário poderá ser

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Faculdade de Medicina da UNAERP, CECORP – Centro Especializado do Coração e Pulmão de Ribeirão Preto  
Correspondência: Paulo Roberto B. Evora - Rua Rui Barbosa, 367/7 - 14015-120 Ribeirão Preto, SP - E-mail: prbevora@keynet.com.br  
Recebido para publicação em 4/10/99  
Aceito em 15/3/00

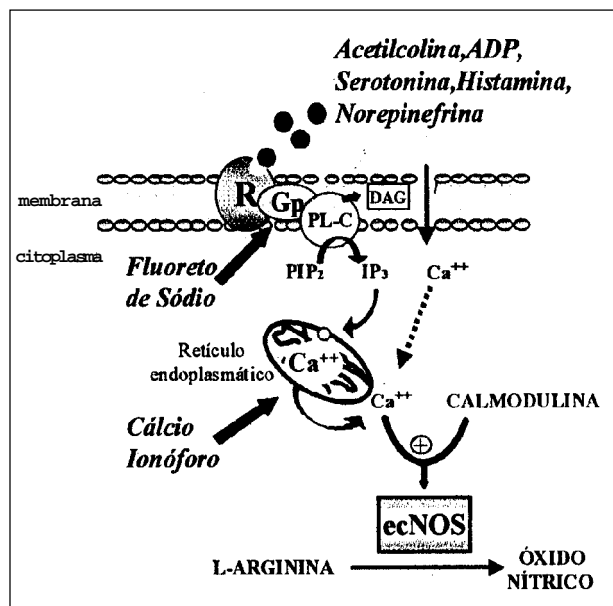


Fig. 1 - Via de liberação do óxido nítrico (NO); PIP2- fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; IP3- inositoltrifosfato; ecNOS- óxido nítrico sintetase endotelial constitutiva.

Tabela I - Nomenclatura da óxido nítrico sintetases (NOSs).	
Enzimas	Nomenclaturas
NOS endotelial	eNOS, ecNOS, cNOS, NOS III ou NOS3
NOS neuronal	bNOS(brain), NOS I ou NOS1
NOS induzida	iNOS, NOS II ou NOS2

interessante. A atividade da NOS pode ser documentado por: a) métodos diretos usando espectrofotometria e métodos eletromecânicos, e; b) métodos indiretos por detecção dos efeitos do NO, incluindo a localização da NOS por imunquímica ou hibridização *in situ* do RNAm, ensaios biológicos, inibição da atividade da NOS, atividade de hemeoproteínas, produção de nitrato/nitrito, L-citrulina, GMPC. Uma avaliação cuidadosa das potenciais armadilhas associadas a estes métodos indiretos antes das suas utilizações, é importante para evitar erros de interpretação <sup>8</sup>.

**Inibidores inespecíficos** - São aqueles que inibem tanto a ecNOS como, também, a iNOS. Sendo derivados metilados e nítricos da L-arginina, atuam por competição. Entre eles, os mais conhecidos são o L-NMMA, o L-NAME e o L-NOARG. Como outro exemplo, pode-se mencionar a dimetilarginina assimétrica (*asymmetric dimethylarginine* - ADMA) que é um inibidor endógeno circulante da NOS. Estudos demonstraram que o nível plasmático de ADMA está positivamente relacionado a fatores de risco para aterosclerose, sugerindo-se que este antagonista endógeno da NOS possa ser um marcador de aterosclerose <sup>9</sup>.

**Inibidores específicos** - Inibem especificamente a isoforma iNOS. São eles os glicocorticóides (como a dexametasona), a aminoguanidina, a L-canavanina, a N6-(1-imioetil)lisina(L-NIL) e a 2,4-diamino 6-hidróxi-pirimidina <sup>10</sup>.

O conhecimento dos inibidores específicos das NOSs

é de fundamental importância para ensaios farmacológicos experimentais e terapêuticos (fig. 2).

Algumas comparações entre as atividades das diferentes isoformas são dignas de apresentação dentro da proposição da discussão dos conceitos básicos. Como já foi dito, a ecNOS é uma enzima que tem sua localização associada a membrana, enquanto que as formas iNOS e nNOS são amplamente citosólicas <sup>1</sup>. Uma outra diferença existente entre as isoformas da NOS é em relação à quantidade e a duração da produção de NO. A molécula de NO é sintetizada por um curto período de tempo (segundos a minutos) quando decorrente da ativação enzimática da ecNOS ou nNOS. Em contraste, a iNOS só se expressa depois da ativação celular e então produz NO por, um relativamente longo período de tempo (horas a dias).

### Distribuição anatômica da NOS no coração normal

A maior parte da atividade da ecNOS no coração está presente no endotélio ao longo da extensa rede de artérias, veias e capilares dentro do miocárdio. Esta isoforma endotelial também existe na camada endocárdica das cavidades cardíacas. A nNOS parece muito menos proeminente, embora a exata quantidade desta isoforma seja incerta no coração. Embora a iNOS não exista no coração normal, macrófagos associados com processos de remodelamento após várias formas de lesões cardíacas contêm esta isoforma. Para todas as NOS, entretanto, variações entre espécies animais e variabilidade entre modelos experimentais enfatizam a importância de estudos relacionados entre estrutura e função <sup>11</sup>.

### Funções autócrinas e parácrinas da NOS no coração

Do ponto de vista das funções autócrinas e parácri-

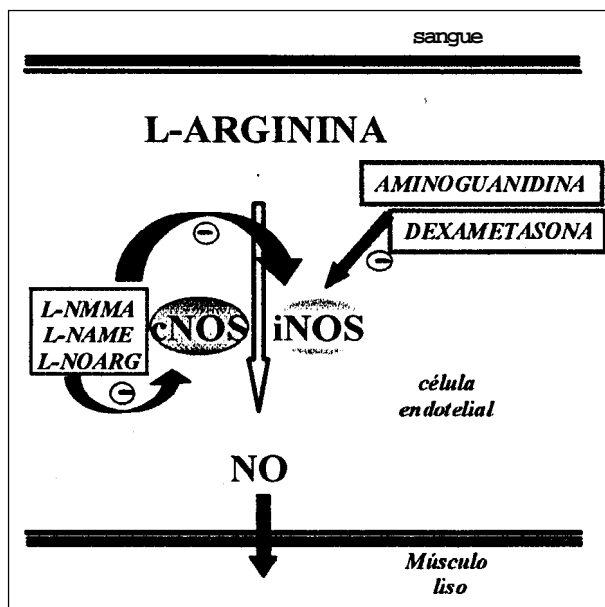


Fig. 2 - Inibidores da óxido nítrico sintetase (NOS).

nas, os diferentes tipos de células compreendendo o músculo cardíaco, expressam um ou mais das três isoformas (nNOS, ecNOS ou iNOS) da NOS. A nNOS é expressa em terminações simpáticas normais e regula a liberação de catecolaminas no coração. A ecNOS, expressa nas células endoteliais, inibe o tônus contrátil e a proliferação de células musculares lisas subjacentes dos vasos, inibe a agregação plaquetária e a adesão de monócitos, promove relaxamento diastólico, e diminuição do consumo de oxigênio no músculo cardíaco através de ação parácrina do NO. A ecNOS é, também, expressa de modo constitucional nos miócitos cardíacos de roedores e espécies humanas, onde ela se opõe autocrinamente à ação inotrópica de catecolaminas após estimulação muscarínica colinérgica e estimulação de receptores beta-adrenérgicos. A transcrição genética e a expressão protéica da iNOS, como já foi dito, são induzidas em todos os tipos de células após a exposição a uma variedade de citocinas. À parte de participar na defesa imunológica contra microrganismos intracelulares e vírus, as grandes quantidades de NO produzidas autócrina ou paracrinamente modulam a vasoplegia e a depressão miocárdica características da estimulação do sistema imune e promove morte celular através da apoptose. Nos miócitos cardíacos, o NO pode regular o fluxo pelo canal de cálcio tipo L e contração através da ativação da proteína quinase dependente do GMPc e das fosfodiesterases mediadas pelo GMPc. Outros mecanismos independentes das elevações do GMPc podem operar através da interação do NO com hemoproteínas, ferro não heme, ou resíduos livres de tiol em proteínas sinalizadoras, enzimas ou canais iônicos. Considerando-se a multiplicidade das isoformas da NOS expressas no músculo cardíaco e os potenciais alvos moleculares para o NO produzido, uma estreita regulação molecular da expressão e atividade da NOS, aos níveis transcricional e pós-transcricional, parece ser necessária na coordenação de muitos das funções do NO na função cardíaca na saúde e na doença <sup>12</sup>.

### **NOS e doenças cardiovasculares**

**Isquemia miocárdica** - Esta parte do texto incluirá aspectos gerais da isquemia miocárdica: lesão de isquemia e reperfusão, pré-condicionamento e infarto agudo do miocárdio.

**Lesão de isquemia e reperfusão** - Achados *in vivo* demonstram um papel cardioprotetor do NO derivado da ecNOS na isquemia-reperfusão cardíaca. A lesão de isquemia-reperfusão miocárdica é exacerbada na ausência de ecNOS <sup>13</sup>. Embora a disfunção endotelial ocorra após a isquemia e venha sendo considerada como uma consequência do comprometimento da liberação de NO, a base bioquímica desta disfunção é desconhecida. Assim sendo, realizaram-se estudos para determinar os efeitos da isquemia e reperfusão miocárdica na expressão da ecNOS em corações isolados de ratos sujeitos a períodos de isquemia global ou isquemia seguida de reperfusão. Enquanto a atividade foi preservada depois de 30min de isquemia, ela diminuiu de 77% após 60min e se tornou quase indetectável após

120min. A reperfusão resultou em apenas um restabelecimento parcial desta atividade. O declínio na atividade com isquemia foi devido, em parte, a uma perda protéica da ecNOS. Estudos hemodinâmicos mostraram que o começo da reatividade vascular prejudicada acompanhou a perda funcional da ecNOS. Portanto, o comprometimento da função endotelial que se segue à isquemia é acompanhada por uma perda da atividade da ecNOS devido, talvez, a uma combinação de desnaturação e proteólise dependente do pH <sup>14</sup>.

**Pré-condicionamento** - Períodos breves de isquemia miocárdica precedendo um subsequente período de isquemia mais prolongado de 24-72h conferem proteção contra infarto do miocárdio (“pré-condicionamento tardio” ou “segunda janela de pré-condicionamento”). Três inibidores da NOS estruturalmente diferentes: 1) N-omega-nitro-L-arginina (L-NA – inibidor não específico); 2) aminoguanidina (AMG – inibidor específico da iNOS) e; 3) S-metilisotiourea sulfato (SMT – inibidor específico da iNOS) dados 24h após a isquemia do pré-condicionamento, aboliram, consistentemente, o pré-condicionamento tardio contra o miocárdio “atoradoado” (*stunning*) em coelhos conscientes, indicando que este efeito cardioprotetor é mediado por atividade da NOS. Os resultados obtidos com a AMG e SMT implicam, especificamente, a isoforma iNOS como o mediador da proteção no segundo dia. Estudos prévios têm mostrado que o NO provoca o desenvolvimento de pré-condicionamento tardio. Os presentes resultados indicam que o NO tem duplo papel no pré-condicionamento tardio contra o atordamento miocárdico, agindo inicialmente como o causador e subsequentemente como mediador de proteção <sup>15,16</sup>.

Na mesma linha de pesquisa, um bom e recente estudo examinou os efeitos dos bloqueadores específicos da iNOS na proteção tardia conferida pelo pré-condicionamento isquêmico, após 48h, em um modelo de coelho anestesiado com infarto miocárdico. Em coelhos sem intervenção farmacológica, a porcentagem de infarto do miocárdio dentro da zona de risco foi 43,9+5,0%. Esta porcentagem foi significativamente reduzida para 18,5+5,6%, após 48h de pré-condicionamento isquêmico com quatro oclusões coronarianas de 5min. A administração de um inibidor da expressão da iNOS, dexametasona (4mg/kg<sup>-1</sup> EV), 60min antes pré-condicionamento isquêmico bloqueou completamente o efeito limitador do infarto pelo pré-condicionamento isquêmico. Além disso, administração de AMG (300mg kg<sup>-1</sup>, s.c.), um inibidor relativamente seletivo da atividade da iNOS, 60min antes da isquemia prolongada, também aboliu a proteção tardia fornecida pelo pré-condicionamento isquêmico. Nem a AMG e nem a dexametasona, por si só, tiveram efeito significativo no tamanho do infarto do miocárdio. Estes dados fornecem evidências farmacológicas de que a indução da iNOS, após breves períodos de oclusão coronariana, associa-se com aumento da tolerância do miocárdio ao infarto após 48h <sup>17</sup>.

O tratamento prévio com monofosforil lipídico A (MLA) pode farmacologicamente mimetizar a segunda janela do pré-condicionamento isquêmico, reduzindo significativamente o tamanho do infarto e a infiltração neutrofilica.

A inibição da atividade da iNOS pela AMG aboliu o efeito redutor do tamanho do infarto causado pelo MLA. A AMG também bloqueou a habilidade do MLA de reduzir significativamente a infiltração neutrofilica. Estes resultados sugerem que o tratamento prévio com MLA pode aumentar a atividade enzimática da iNOS durante a isquemia, o que pode ser responsável pela cardioproteção<sup>18</sup>.

**Infarto agudo do miocárdio** - A atividade da iNOS está significativamente aumentada em coelhos com infarto agudo do miocárdio, quando comparados a miocárdios saudáveis 48h após oclusão coronariana. Entretanto, a ecNOS não aumenta significativamente nas regiões infartadas, mas pode ser localizada nas células endoteliais e do endocárdio em tecidos normais e infartados. Constatou-se a presença de atividade da iNOS em macrófagos no infarto agudo do miocárdio, ressaltando-se que cardiomiócitos e neutrófilos não apresentam a expressão imunológica das isoformas ecNOS e iNOS. Em resumo: 1) macrófagos infiltrantes são a principal fonte de aumento da atividade da iNOS no infarto do miocárdio em coelhos; 2) a atividade da ecNOS não é significativamente aumentada em tecidos infartados quando comparada ao miocárdio normal e; 3) neutrófilos e cardiomiócitos não expressam NOS imunorreativa em miocárdio infartado e normal de coelhos<sup>19</sup>.

Dados experimentais sugerem que o NO derivado da isoforma iNOS contribui para algum dano miocárdico após infarto agudo do miocárdio, possivelmente causando morte celular miocárdica nas áreas limitrofes da região isquêmica do coração. Desta forma, a indução da iNOS miocárdica após 72h do infarto agudo do miocárdio contribui para o desenvolvimento de disfunção ventricular esquerda e, como a regulação da atividade da iNOS pela SMT melhora o desempenho ventricular, o seu efeito inibitório pode ser benéfico após infarto agudo do miocárdio. Esses achados sugerem que a inibição seletiva da atividade da iNOS pode determinar uma estratégia terapêutica em doenças cardíacas como o infarto agudo do miocárdio, pela melhora na disfunção ventricular esquerda e redução no tamanho do infarto do miocárdio<sup>20-22</sup>.

**Hipertensão** - Os dados disponíveis sobre o papel da via L-arginina/NO na gênese e sustentação da hipertensão em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são limitados e contraditórios. A expressão da nNOS foi demonstrada na camada média de artérias de ratos SHR, mas não em ratos normais. A expressão da ecNOS foi observada no endotélio, mas não foram encontrados níveis detectáveis de iNOS nesses tecidos. Esses resultados demonstram a expressão da nNOS nas células musculares lisas vasculares de ratos e sua ativação pela estimulação com angiotensina II em animais SHR, mas não em animais normotensos<sup>23</sup>. Machos SHR foram estudados durante a fase inicial de evolução de hipertensão (de 8 a 12 semanas) para distinguir as primeiras mudanças no metabolismo do NO até aquelas causadas pelo avanço da hipertensão (vasculopatia e envelhecimento) no curso da doença. Os ratos SHR apresentaram uma elevação na pressão arterial e uma significativa diminuição na excreção urinária e concentração plasmática de metabó-

litos do NO (nitrito/nitrato [NOx]). Da mesma forma, os SHR mostraram uma importante elevação da atividade da NOS da aorta torácica, acompanhada de aumentos significantes das proteínas da iNOS e ecNOS nos rins e na aorta. Em uma tentativa para determinar se o aumento da atividade na via L-arginina/NO é uma consequência da hipertensão, estudos foram repetidos usando ratos com três semanas de idades, antes do começo da hipertensão. Os estudos revelaram significativa diminuição na excreção urinária de NOx, assim como as proteínas da ecNOS vascular e da iNOS renal. Em conclusão, a via L-arginina/NO está ativada no SHR jovem antes e depois do início da hipertensão. Portanto, o desenvolvimento da hipertensão não é devido a um defeito primário da produção de NO no SHR. Ao contrário, a produção de NO está aumentada em SHR jovem antes e depois do início da hipertensão<sup>24</sup>.

Considerando os fatores idade e hipertensão, a atividade e expressões proteicas da ecNOS e iNOS foram investigadas durante o desenvolvimento da hipertensão em ratos SHR. Ratos SHR e ratos normais WKY foram estudados em três idades diferentes: 4, 14 a 17 e 63 semanas de idade. Após o tratamento com salina ou lipopolissacarídeos (LPS, 10mg/kg EV) por 3h, as aortas foram removidas para medida da atividade e expressão proteica da NOS. Níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NO<sup>2</sup>/NO<sup>3</sup>) e de fator de necrose tumoral (TNF-alfa) foram também determinados. Em 14 a 17 semanas e 63 semanas, a atividade basal e a expressão proteica da ecNOS em aortas foram significativamente mais baixas nos ratos SHR do que nos WKY. Além disso, os WKY mais velhos mostraram atividade mais baixa da ecNOS do que os WKY adultos, mas esta diferença não foi observada nos ratos em SHR. Por comparação, a atividade e expressão proteica da iNOS foram observadas só nos SHR do grupo de 14 a 17 semanas e no grupo de 63 semanas. Os ratos SHR mostraram, ainda, altas atividades da iNOS, e essas diferenças foram exageradamente exacerbadas pelo tratamento com LPS. Esses resultados indicam que alterações da atividade e expressão proteica da ecNOS e iNOS ocorreram nos SHR. Além disso, o envelhecimento pode reduzir a atividade da ecNOS em ratos WKY mas não nos SHR. O declínio da atividade e/ou da expressão da NOS pode contribuir para o desenvolvimento de hipertensão, enquanto o aumento da expressão da iNOS pode ser uma consequência do estado patológico dos vasos associado com hipertensão em ratos SHR. Ressalte-se que o aumento da expressão da iNOS em ratos SHR foi atenuado pela terapia anti-hipertensiva, sugerindo que a expressão anormal da iNOS desta enzima está associada com hipertensão, a qual necessita estimulação por citocinas e é, no entanto, rara e controversa<sup>25</sup>.

Ainda sobre o papel da iNOS na hipertensão, um outro estudo usando um modelo diferente de hipertensão experimental merece ser mencionado. A hipertensão sensível a sal em ratos Dahl/Rapp (linhagem S) é prevenida pela L-arginina. Com base nas observações de que a dexametasona impede o efeito anti-hipertensivo da L-arginina nesses animais e a sugestão de um *locus* no, ou perto, de um gene da iNOS no cromossomo 10, um estudo explorou a hipótese

que a isoforma iNOS no músculo liso vascular estava anormal em ratos S. Cultura primária de células do músculo liso aórtico de ratos S mostraram uma produção prejudicada da iNOS, a qual melhora com o aumento de L-arginina no meio. Uma possível mutação da iNOS e o papel desta enzima na patogênese deste tipo de hipertensão requer muito mais investigações<sup>26</sup>.

A porção medular do rim tem um papel crucial no controle de excreção de água e sódio e da pressão arterial, e esse controle encontra-se alterado na hipertensão, podendo estar relacionado a um defeito renal da produção de NO. A atividade da NOS dependente do cálcio (ecNOS ou nNOS indistingüivelmente), foi consideravelmente alta na medula renal em comparação com outros tecidos estudados em rato WKY e SHR. A medula e o coração de SHR mostraram uma alta atividade da NOS dependente do cálcio, quando comparada com ratos WKY. Não foram encontradas diferenças na atividade da NOS independente do cálcio (iNOS), exceto no córtex renal dos SHR, onde encontrava-se mais alta que no restante dos tecidos. Essas observações indicam que a medula renal tem uma alta capacidade ligada à síntese de NO e sugere que o controle medular renal defeituoso da pressão arterial de hipertensão genética não é devido a uma redução da produção de NO pelo rim<sup>27</sup>.

Estudos renais atuais, junto com estudos em coração e aorta, sugerem fortemente que na hipertensão, um aumento da atividade da ecNOS pode fornecer um papel homeostático protetor em todos os órgãos que são alvos da lesão hipertensiva<sup>28</sup>. Realizaram-se estudos dos níveis de RNAm da NOS em rins de ratos, em situações de estímulo e redução da expressão gênica da renina, para descobrir se os níveis renais de RNAm da NOS estão correlacionados com a atividade do sistema renina. A estimulação do sistema renina foi conseguida pela clipagem unilateral da artéria renal (ratos 2rins/1 clipe), tratamento com um inibidor da ANG II (losartan - 40mg/kg), aplicação de furosemida (12mg, kg no primeiro dia) e dieta baixa em sódio (0,02% w/w Na+). A inibição do sistema renina-angiotensina foi obtida em rins não clipados (contralaterais) dos ratos 2rins/1 clipe e nos rins de ratos que foram alimentados com dieta alta em sódio. Em ambos os casos os níveis de RNAm da renina diminuiu cerca de 50% dos valores controles. Realizou-se uma primeira avaliação da expressão da NOS (nNOS, ecNOS e iNOS) durante todas estas alterações do sistema renina, indicando que somente os níveis do RNAm da nNOS se alteraram de acordo com os níveis de renina. Essas mudanças nos níveis de RNAm da nNOS foram registradas por vários estudos, os quais provaram que os seus níveis renais estavam aumentados de quase 50% depois de uma dieta hipossódica e hipoperfusão do rim. Dado um papel estimulador do NO no sistema renina, estes achados podem fornecer a primeira evidência que aumentos dos níveis renais do RNAm da nNOS e como consequência, formação de NO renal podem ser importantes mediadores do famoso efeito de entrada de sal e hipoperfusão no sistema renina<sup>29</sup>.

O papel da nNOS na pressão arterial, hemodinâmica renal e excreção renal, em ratos Dahl resistentes (DR) ou

sensíveis (DS) ao sal, durante alterações na entrada de Na, é um outro aspecto interessante da expressão desta isoforma da NOS. A expressão da nNOS nestes dois tipos de animais foi avaliada pela sua inibição com 7-nitroindazol (7NI). Depois de sete dias de 7NI, ratos DS com alta ingestão sódica, que tinham um controle da pressão arterial 31 mmHg mais alto que comparado a ratos DR, aumentaram suas pressões arteriais para 114 +/- 3% dos controles, cujas pressões não foram significativamente diferentes dos ratos DS que não receberam alta ingestão de sódio. Não ocorreu nenhuma alteração, devida à ingestão de 7NI, na taxa de filtração glomerular, fluxo renal plasmático efetivo, excreção urinária de sódio, ou volume urinário. Por outro lado, a atividade da renina plasmática diminuiu significativamente em ratos DR e DS, que receberam pouco Na e infusão de 7NI. Os dados mostram que rato DR altamente resistente ao sal se torna sensível durante a inibição da nNOS com 7NI. De qualquer forma, a pressão arterial do rato DS não foi afetada pelo 7NI. Isto sugere que o NO produzido pela nNOS no rato DR normalmente ajuda a prevenir a hipertensão sensível ao sal, e que níveis baixos de nNOS no rato DS podem contribuir para a sua sensibilidade ao sal<sup>30</sup>.

Os mecanismos relacionados aos efeitos hipertensinogênicos centrais dos mineralocorticóides permanecem obscuros. Considerando-se a possibilidade de que o NO age em sítios autonômicos cerebrais para regular a pressão arterial, investigaram-se os efeitos dos potentes mineralocorticóides, aldosterona e 19-noraldosterona, na avaliabilidade do RNAm da nNOS. Comparado com controles, ratos tratados com estes mineralocorticóides, por quatro semanas, mostraram significativa queda na quantidade do RNAm da nNOS no hipotálamo e medula ventrolaterais rostral e caudal. Esses dados sugerem que a atividade da nNOS reduzida pode contribuir para o aumento na pressão sanguínea em ratos com hipertensão induzida por mineralocorticóide<sup>31</sup>.

Uma revisão criteriosa deve incluir dados sobre situações especiais envolvendo hipertensão arterial pela pré-eclâmpsia, coarctação aórtica e ciclosporina. O sinciotrofoblasto (ST) da vilosidade da placenta humana expressa NOS. Como o NO é um potente relaxante de músculo liso vascular e inibidor de atividade plaquetária, é possível considerar que uma exagerada agregação de plaquetas nestas intervilosidades e que a redução do fluxo sanguíneo fetoplacentário na pré-eclâmpsia possam resultar da redução da expressão da NOS (e produção de NO) pelo sinciotrofoblasto. Mas, contrariando estas expectativas, a expressão da NOS não é significativamente diferente entre as vilosidades da placenta obtida de primigestas e de mulheres pré-eclâmpicas. As NOSs da placenta também foram comparadas entre múltipara normal e mulher pré-eclâmpica, assim como em mulheres com hipertensão gestacional. Quando comparadas as atividade enzimática das vilosidades e das camadas uterinas basais, a atividade da NOS estava reduzida pela metade em todas as placentas. A atividade independente do cálcio foi, consistentemente, 40 vezes menor que a atividade dependente do cálcio, e foi similar entre as vilosidades e camadas basais, e entre placentas de mulheres nor-

mais e hipertensas. Estes dados sugerem que a expressão da NOS não é diferente em placentas obtidas de mulher normal e pré-eclâmptica<sup>32</sup>.

A correlação da atividade da nNOS com hipertensão renal tem sido investigada em modelo de coarctação da aorta. Houve significativa elevação da pressão sanguínea, junto com hipertrofia ventricular esquerda, oito semanas após a coarctação. A atividade da nNOS também foi significativamente reduzida nos animais coartados. Os resultados dessas investigações sugerem que há uma correlação inversa entre atividade da nNOS e nível de pressão sanguínea na coarctação da aorta<sup>33</sup>.

O uso clínico da ciclosporina (CsA) tem melhorado muito os resultados dos transplantes de órgãos. Contudo, a CsA pode causar nefrotoxicidade e hipertensão. A administração de CsA resulta num significativo aumento na pressão sanguínea arterial junto com uma diminuição na excreção urinária de NOx, sugerindo uma produção de NO deprimida, acompanhada de uma significativa redução na proteína iNOS existente no rim e aorta torácica, o que não ocorre na mudança do teor da proteína ecNOS. A queda na proteína iNOS renal em ratos tratados com CsA foi acompanhada por um declínio paralelo do RNAm da iNOS e atividade enzimática. Em conclusão, administração de CsA por três semanas resultou em um significativo aumento na pressão arterial junto com marcada redução na excreção urinária de NOx, e expressão de iNOS renal e vascular. Estas observações sugerem que a hipertensão induzida pela CsA pode estar, em parte, relacionada com defeito na produção de NO. Se verdade, estratégias planejadas para restaurar a disponibilidade de NO podem suavizar a hipertensão e outras complicações vasculares da terapia com CsA<sup>34</sup>.

As mudanças adaptativas que ocorrem no ventrículo esquerdo e vasos como resposta à hipertensão, especialmente hipertrofia/hiperplasia muscular, disfunção endotelial e aumento da matriz extracelular não dependem somente da elevação da pressão sanguínea. Estas mudanças são na realidade, uma má adaptação, desde que elas são precursoras de insuficiência cardíaca, derrame e insuficiência renal. Realizaram-se investigações sobre a relação entre ventrículo esquerdo e atividade da ecNOS aórtica, com hipertrofia do ventrículo esquerdo e aórtica em ratos SHR e ratos Dahl sensíveis ao sal (DS), combinadas com pressão sanguínea e idade. Comparadas com seus controles em duplicata, a atividade da ecNOS aórtica estava aumentada em SHR, mas reduzida em ratos DS. A correlação entre pressão sanguínea e atividade da ecNOS aórtica foi positiva em SHR e negativa em ratos DS. A atividade da ecNOS do ventrículo esquerdo estava aumentada em SHR comparada com ratos Wistar-Kyoto normotensos. Por outro lado, atividade da ecNOS do ventrículo esquerdo não estava aumentada em ratos hipertensos DS comparados com ratos normotensos DS. Em ratos SHR, a hipertrofia aórtica aumentou significativamente e a hipertrofia do ventrículo esquerdo somente 15%, enquanto que nos ratos hipertensos DS, a aorta e ventrículo esquerdo hipertrofiaram 36% e 88%, respectivamente. Além disso, nos ratos DS houve uma correlação negativa entre

atividade da ecNOS e hipertrofia aórtica. Esses estudos indicam que a estimulação da atividade da ecNOS vascular tem um papel protetor da homeostase cardiovascular na hipertensão. Clinicamente, a variabilidade das lesões orgânicas observadas em indivíduos com gravidade semelhante de hipertensão pode ser explicada, pelo menos em parte, pelas diferenças genéticas na atividade da ecNOS vascular em resposta à hipertensão<sup>35</sup>.

**Diabetes mellitus** - Realizaram-se investigações da atividade da NOS plaquetária em pacientes diabéticos insulino dependentes (DMID) e não dependentes (DMNID), os quais foram caracterizados pelo aumento da ativação plaquetária e da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase da membrana de plaquetas em 19 pacientes DMID, 21 DMNID e, como controle, em 31 pacientes saudáveis. A expressão da NOS mostrou uma relação positiva significativa com a atividade de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase em pacientes diabéticos, tornando possível a hipótese de que uma atividade diminuída da NOS possa ter um papel na patogênese das complicações vasculares diabéticas<sup>36</sup>.

O radical NO é um possível mediador precoce das lesões das células beta-pancreáticas no diabetes DMID. Existem diferentes isoformas da NOS no contexto das lesões imunológicas das células beta, sendo que o papel da iNOS é o mais relevante. A iNOS da célula beta é semelhante e codificada pelo mesmo gene no cromossomo 17 da iNOS expressada em macrófagos e em outras células nucleadas. A ativação da iNOS depende da transcrição do gene e da re-síntese da enzima, e o NO parece induzir um *feedback* negativo na expressão da iNOS. Enquanto o RNAm da iNOS é induzido somente pela interleucina-1 beta (IL-1 beta), nas células produtoras de insulina em roedores são necessárias a combinação de duas (IL-1 beta + interferon gama [IFN-gama]) ou três (IL-1 beta + IFN-gama + TNF alfa) citocinas. Para a ativação da iNOS em células pancreáticas humanas, a regulação dos genes da iNOS e outros genes relacionados com as células beta é complexa e difere, em vários aspectos, do que se observa em macrófagos. Existem também importantes diferenças na regulação da iNOS entre células pancreáticas de roedores e células humanas. Um conhecimento detalhado da regulação molecular destes genes nas células beta pode ser um instrumento experimental no desenvolvimento de novas abordagens para a prevenção da destruição precoce das células pancreáticas beta em pacientes DMID<sup>37</sup>.

Evidências indicam que a insulina pode, *in vivo*, infra-regular a via de liberação da iNOS. A via da iNOS é supra-regulada em ratos e camundongos com tendência ao diabetes e associa-se no processo auto-imune. Alguns experimentos, entretanto, indicam que a produção de NO por macrófagos e a expressão do RNAm da iNOS estão também aumentadas em roedores tornados diabéticos pela injeção de estreptozotocina (STZ) em que não há um componente auto-imune primário. A administração de insulina reduz a produção de NO em roedores com tendência ao diabetes e naqueles com diabetes induzido pela STZ. Finalmente, a insulina diminui a produção de NO por macrófagos em animais normais. Estes resultados indicam que o paradigma auto-imune é inadequado para explicar o aumento do NO no diabetes.

Como um mecanismo potencial para explicar a regulação da produção do NO mediada pela insulina, o TGF-beta 1 pode estar envolvido porque: 1) macrófagos de ratos diabéticos produzem menos TGF-beta1 do que macrófagos de animais normais; 2) o nível circulante de TGF-beta1 é mais baixo em ratos diabéticos e; 3) a administração de insulina aumenta a TGF-beta1 em ratos normais. Estes resultados juntos evidenciam que o aumento de NO no diabetes não é somente a causa mas, também, um efeito da destruição de células beta e resultante, em parte, de uma atividade imunorreguladora da insulina até aqui desconhecida<sup>38</sup>.

A produção aumentada de NO é descrita no rim diabético e é considerada como envolvida na hiperfiltração glomerular. O mecanismo preciso da produção de NO no rim diabético é, entretanto, desconhecido. Um estudo recente compara a localização da expressão da isoforma ecNOS em tecido renal de ratos portadores de diabetes induzida pela STZ e ratos 5/6 nefrectomizados, clarificando o papel essencial da ecNOS na hiperfiltração glomerular nos estados precoces da nefropatia diabética. Em ratos diabéticos, o diâmetro das arteríolas aferentes, do volume glomerular, o *clearance* de creatinina e o  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  urinário aumentam após a indução de diabetes. As arteríolas eferentes, entretanto, não se alteram. O tratamento com insulina ou L-NAME restaura o diâmetro das arteríolas aferentes, o volume glomerular, o *clearance* de creatinina e os níveis de  $\text{NO}^2/\text{NO}^3$ . A expressão da ecNOS nas arteríolas aferentes e nos glomérulos de ratos diabéticos aumenta durante os estágios precoces da doença, mas não se alteram nas arteríolas eferentes. O tratamento com insulina ou L-NAME diminui a expressão da ecNOS em arteríolas aferentes e nos glomérulos. Em contraste, a expressão da ecNOS encontra-se supra-regulada em ambas as arteríolas aferente e eferente e nos glomérulos de ratos 5/6 nefrectomizados, onde se observam dilatação das arteríolas aferentes e eferentes e aumento dos glomérulos. Tratamento com L-NAME melhora a expressão da ecNOS e a dilatação das arteríolas. Conclui-se que o aumento da síntese de NO pela ecNOS em arteríolas aferentes e células endoteliais glomerulares, em resposta ao estado hiperglicêmico, pode causar uma dilatação preferencial de arteríolas aferentes, o que, em consequência, induz a dilatação e hiperfiltração glomerulares<sup>39</sup>. Um outro estudo foi dirigido para investigar o papel do NO na patogênese da hiperfiltração e hiperperfusão glomerulares em ratos com diabetes induzido pela STZ. Para a avaliação do papel do NO na hiperfiltração, mediram-se as concentrações plasmáticas e urinárias de  $\text{NO}_2/\text{NO}_3^-$ , produtos metabólicos estáveis do NO e a expressão protéica das três isoformas da NOS em ratos com diabetes induzida pela STZ. Investigaram-se, também, as alterações hemodinâmicas renais, como a velocidade de filtração glomerular (VFG) e o fluxo renal plasmático (FRP), em resposta à administração aguda e crônica de L-NAME em ratos diabéticos e controles. Os ratos diabéticos exibiram níveis plasmáticos e urinários de  $\text{NO}^2/\text{NO}^3$  aumentados após 28 dias de injeção de STZ, e a excreção total de  $\text{NO}_2/\text{NO}_3^-$  foi, aproximadamente cinco vezes maior nos ratos diabéticos do que nos ratos controles. As três

isoformas da NOS (nNOS, iNOS e ecNOS) estavam todas aumentadas no córtex renal, enquanto permaneceram inalteradas na medula renal no 28º dia. A VFG e o FRP estavam significativamente elevados nos ratos diabéticos, e a inibição aguda da síntese de NO pelo L-NAME atenuou as alterações hemodinâmicas renais nos ratos diabéticos. Esses estudos concluem que a síntese de NO está aumentada em ratos diabéticos, devido a um aumento da expressão da NOS, e que o bloqueio crônico atenua a hiperfiltração e hiperperfusão renais nesses animais. Em adição, os ratos diabéticos exibem melhora das respostas hemodinâmicas renais pela inibição aguda do NO com aumento da excreção urinária de  $\text{NO}_2/\text{NO}_3^-$ . Esses resultados sugerem que a produção excessiva de NO pode contribuir para a hiperperfusão e hiperfiltração renais nos estágios precoces da diabetes<sup>40</sup>.

Possíveis papéis da expressão nNOS na patogênese da neuropatia diabética, nocicepção e expressão da nNOS no gânglio da raiz dorsal de ratos diabéticos pela STZ foram avaliados experimentalmente. O limiar de retirada da pata a um estímulo mecânico mínimo diminuiu, em ratos normais e diabéticos, quando tratados pelo L-NAME. O número de neurônios positivos para nNOS (pela histoquímica encontrava-se significativamente diminuído em ratos diabéticos não tratados, quando comparados com ratos controles). O decréscimo da expressão da proteína da nNOS foi confirmado por técnicas de biologia molecular. O tratamento com a insulina preveniu completamente a diminuição do limiar de retirada da pata ao estímulo mecânico e a expressão da nNOS. O conteúdo de GMPc acompanhou a expressão da nNOS em animais experimentais, sugerindo que o comprometimento do sistema nNOS-GMP em gânglios das raiz dorsal pode ter um papel na patogênese da neuropatia sensorial diabética<sup>41</sup>.

A respeito da retinopatia diabética: 1) a atividade da NOS foi estudada em retinas de ratos normais e em retinas de dois grupos de ratos diabéticos pela STZ (8 dias e 4 meses). Em cada grupo de animais, a atividade da nNOS foi correlacionada com a concentração de aminoácidos relacionados ao metabolismo e absorção tecidual da L-arginina; 2) retinas de ambos os grupos diabéticos (8 dias e 4 meses) mostraram um aumento da atividade da NOS, quando comparadas com retinas normais. Em lisatos de retinas normais, a atividade da NOS foi mais potentemente inibida pela L-NOARG (1 mM), enquanto, em ambos os grupos de diabetes induzida pela STZ, a atividade da NOS foi mais potentemente inibida pelo inibidor da iNOS aminoguanidina (0.5 mM); 3) os níveis basais de aminoácidos relacionados ao metabolismo da L-arginina (L-arginina, L-citrulina, L-ornitina e L-glutamina) em retina de ambos os grupos de ratos com diabetes induzido pela STZ, encontraram-se diminuídos em relação aos ratos normais; 4) a absorção tecidual de L[3H]arginina em retinas dos grupos de ratos diabéticos mostrou-se aumentada, quando comparada com retinas de ratos normais. Estudos têm demonstrado uma estreita relação entre nNOS imunorreativa (nNOS-IR) neuronal com a vasculatura retiniana e, tem sido proposto que a ativação destes neurônios pode ser um mecanismo pelo qual o fluxo sanguíneo retiniano e seu metabolismo estão relacionados. Estes estudos su-

gerem que a ação da AMG em restaurar o número de neurônios retinianos contendo nNOS é mediado pela inibição de formação de produtos finais da glicolização avançada (AGEs). A depleção de neurônios contendo nNOS pode contribuir para as alterações na autorregulação do fluxo sanguíneo que ocorre no diabetes<sup>42</sup>.

ONO é um importante neurotransmissor inibitório no intestino. Alterações em respostas funcionais intestinais têm sido descritas em animais diabéticos. A presença da NOS reflete o potencial para a síntese de NO e é encontrada em neurônios do plexo mioentérico. Um estudo foi planejado para determinar-se as alterações histoquímicas da expressão da NOS no plexo mioentérico do trato gastrointestinal de ratos diabéticos após três meses de administração de STZ. Os animais diabéticos mostraram diminuição da expressão da NOS no antro gástrico, quando comparados com animais controles. A expressão da NOS no duodeno, íleo e colo de animais diabéticos, não foi estatisticamente diferente da dos controles. O decréscimo da expressão da NOS no antro pode contribuir para o esvaziamento gástrico alterado observados em diabéticos<sup>43</sup>.

Finalmente, é importante tentar estabelecer ligações entre NOS, insulina e hipertensão arterial. Tem sido descrito que o tratamento com a insulina melhora a hipertensão em pacientes com diabetes mellitus. Os mecanismos do efeito anti-hipertensivo da insulina, entretanto, necessita ser completamente elucidado. Um bom estudo investigou um possível envolvimento do NO na redução da pressão arterial pela insulina em ratos diabéticos obesos Zucker (*ZDF – Zucker diabetic fatty*), um modelo experimental de diabetes não dependente da insulina. Os animais foram divididos em três grupos e tratados por quatro semanas com injeções subcutâneas diárias de insulina (25U/k) com ou sem a administração do inibidor inespecífico L-NAME, (50mg/kg/dia). Solução salina foi injetada subcutaneamente nos grupos controles. Durante o período experimental, o ganho de peso foi maior no grupo tratado com insulina do que nos animais controles, ao passo que a injeção de água foi, consideravelmente menor no grupo tratado com insulina. O tratamento com a insulina resultou em decréscimo da glicemia e da pressão arterial e em um aumento plasmático de metabólitos do NO (NOx) e da atividade da NOS em tecido aórtico. O tratamento com L-NAME não só bloqueou o efeito anti-hipertensivo da insulina, mas também as alterações da NOx e da atividade da NOS. Estes achados sugerem que a insulina reduz a pressão arterial em ratos ZDF por estimular a expressão da NOS e a produção de NO<sup>44</sup>.

**Hipercolesterolemia** - A hipercolesterolemia está associada com comprometimento do relaxamento vascular dependente do endotélio. Paradoxalmente, a produção endotelial de NO está aumentada no estágio precoce da hipercolesterolemia. Lipoproteínas oxidáveis de baixa densidade (LDL-ox) inibem o relaxamento vascular pela queda na síntese ou rápida degradação do NO. Neutrófilos humanos, os quais também geram NO, por ação das lipoproteínas, foram incubados com LDL nativo, LDL-ox, HDL ou HDL+LDL-ox, e a atividade da NOS foi medida pela conversão de [3H]L-

arginina a [3H]L-citrulina. A LDL-ox, mas não LDL nativa ou HDL, diminuiu significativamente a expressão da NOS. Esse efeito da LDL-ox foi dependente do tempo de incubação e da concentração. A incubação de células com HDL ou L-arginina diminuíram os efeitos da LDL-ox na NOS. Portanto, LDL-ox diminui a atividade da NOS, e esse seu efeito pode ser modificado pelo HDL e pela L-arginina<sup>45</sup>. Lipoproteínas de baixa densidade oxidáveis (LDL) tem ambos efeitos estimulatórios e inibidores na expressão da ecNOS e a lisofosfatidil-colina (LPC) tem sido focalizada como um componente da LDL-ox, a qual pode modular este efeito. Um outro componente biologicamente ativo da LDL-ox é o ácido 13-hidroperoxioctadecadienóico (13-HPODE), uma forma oxidável do ácido linoléico. Vinte quatro horas de tratamento de células endoteliais de aorta bovina com HPODE causou um aumento dependente da dose nos níveis de RNAm da ecNOS. Os estudos dos tempos de resposta mostram que tratamento com HPODE aumenta significativamente os níveis de RNAm da ecNOS em 12 e 24h, induzindo uma ativação da expressão da ecNOS. Estas observações sugerem que células endoteliais podem tentar compensar o dano oxidativo pelo aumento da expressão da ecNOS nos estágios precoces da hipercolesterolemia<sup>46</sup>.

A hipercolesterolemia é um fator patogênico central de disfunção endotelial causada, em parte, por um defeito na produção de NO através de mecanismos que permanecem pobremente caracterizados. A atividade da ecNOS foi recentemente demonstrada como modulada pela sua interação recíproca com o estimulador complexo cálcio-calmodulina e o inibidor proteína caveolina. A hipercolesterolemia pode reduzir a produção de NO através da alteração deste equilíbrio regulatório. Células endoteliais de aorta bovina foram cultivadas na presença de soro obtido de voluntários humanos normocolesterolêmicos (NC) ou hipercolesterolêmicos (HC). A exposição de células endoteliais aos soros de pacientes HC supra-regulou a disponibilidade de caveolina sem nenhum efeito mensurável dos níveis protéicos de ecNOS. Este efeito do soro HC foi associado com um defeito na liberação basal de NO paralelo a um aumento na formação do complexo inibidor caveolina-ecNOS. Tratamento similar com soro HC, significativamente atenuado, estimulou a produção de NO pelo ionóforo do cálcio A23187. Conseqüentemente, altos níveis de calmodulina foram necessários para interromper o aumento do heterocomplexo caveolina-ecNOS de células tratadas com soro HC. Finalmente, a exposição isolada de células à fração LDL a reproduziu, de modo dependente da dose, a inibição da liberação basal e estimulada do NO, assim como a supra-regulação da expressão de caveolina e a formação do seu heterocomplexo com a ecNOS, os quais não foram afetados pelo co-tratamento com anti-oxidantes. Ao mesmo tempo, esses dados estabelecem um novo mecanismo para o defeito de produção do NO induzido pelo colesterol através da modulação de abundante caveolina nas células endoteliais, um mecanismo que pode participar na patogênese da disfunção endotelial e efeitos pró-aterogênicos da hipercolesterolemia. A função da ecNOS é rapidamente regulada por agonistas e



pelo fluxo sanguíneo e, cronicamente, pelos fatores que regulam a estabilidade do RNAm e transcrição gênica. Recentemente, a localização da ecNOS nas cavéolas, invaginações especiais da membrana plasmática, tem sido proposta como condição para atividade máxima da ecNOS. As cavéolas são altamente ricas em colesterol, e hipercolesterolemia está associada com aumento da produção de NO. Espécies reativas do oxigênio (ERO) contribuem para disfunção endotelial na hipercolesterolemia. Tratamento experimental com colesterol aumenta a expressão da ecNOS, enquanto o tratamento com ERO diminui a expressão da ecNOS, sugerindo que o estresse oxidativo modula a função endotelial pela regulação da formação de cavéolas, expressão da ecNOS e interação ecNOS-caveolina<sup>47,48</sup>.

**Aterosclerose** - Vasos sanguíneos humanos normais e ateroscleróticos foram estudados por hibridização *in situ* e imunocitoquímica, utilizando-se probes específicos para as isoformas ecNOS, iNOS e nNOS. A ecNOS foi detectada em células endoteliais de aortas humanas normais, estrias gordurosas e em lesões ateroscleróticas avançadas. Uma comparação da relativa expressão da ecNOS com o fator de von Willebrand em cortes seriados de vasos normais e ateroscleróticos, indicou que existe uma diminuição no número de células endoteliais expressando ecNOS em lesões avançadas. A iNOS e a nNOS não foram detectadas em vasos normais, mas uma ampla produção destas isoformas foi encontrada, em lesões precoces e adiantadas, associadas com macrófagos, células endoteliais e células neo-mesenchimais da camada íntima. Estes dados sugerem que ocorre: 1) uma perda da expressão da ecNOS pelas células endoteliais sobre lesões ateroscleróticas avançadas e 2) um aumento significativo global da síntese de NO por outros tipos de células em lesões avançadas compostas das isoformas ecNOS, nNOS e iNOS. O aumento da expressão da NOS e, presumivelmente, do NO nas placas ateroscleróticas pode estar relacionado com morte celular e necrose nestes tecidos<sup>49</sup>.

Uma recente e apropriada revisão estabelece o papel da NOS no contexto da aterosclerose e da hiperlipidemia: 1) o NO tem importantes papéis fisiológicos na vasodilatação, citotoxicidade e doença vascular. O NO e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), ambos liberados pelo endotélio, atuam sinergicamente na inibição da agregação e adesão plaquetárias. Estes autócóides também inibem a adesão e a migração de leucócitos e, em algumas artérias, eles têm ações sinérgicas em termos de vasodilatação; 2) o desenvolvimento de aterosclerose e hiperlipidemia per se, acompanha-se de comprometimento da vasodilatação dependente do endotélio; 3) a aterosclerose associa-se com marcantes alterações na atividade das isoformas da NOS na parede arterial, incluindo aumento da expressão da iNOS em lesões humanas complexas, bem como na neointima de modelos experimentais animais; 4) a falha de liberação de NO pelo endotélio por estimulação fisiológica normal, a qual tem sido atribuída a um defeito operacional da ecNOS, cria condições favoráveis para a adesão de leucócitos, vasoespasmo, trombose e, em adição, pode promover aumento na proliferação da íntima

vascular; 5) o NO e os ânions superóxidos, gerados por células inflamatórias na aterosclerose, reagem para formar radicais peroxinitrito citodestrutivos, potencialmente causando lesão do endotélio e dos miócitos, podendo este efeito ser um fator para apoptose de células levando à ruptura da placa<sup>50</sup>.

A respeito da expressão de ecNOS na aterosclerose, estudos em artérias mamárias normais e carótidas ateroscleróticas mostraram uma redução da liberação de NO em segmentos ateroscleróticos, acompanhada de uma marcante redução de ecNOS imunorreativa em células endoteliais do lúmen vascular. As células endoteliais do *vasa vasorum* de segmentos ateroscleróticos, entretanto, permanecem positivas para ecNOS, assim como o endotélio de artérias normais. Esses estudos mostram que, na aterosclerose humana clinicamente relevante, a expressão da proteína da ecNOS e a liberação de NO estão importantemente reduzidas. Isto pode estar envolvido na progressão da aterosclerose<sup>51</sup>.

Com relação aos efeitos das lipoproteínas na expressão da ecNOS, estudos de biologia molecular indicam que tanto o RNAm como a proteína da ecNOS estão infra-regulados pelas concentrações aterogênicas de nLDL (180 e 240mg colesterol/dl) após 48h de incubação, talvez ao nível transcricional. Em adição, o tratamento de células com lipoproteínas de alta densidade, em concentrações humanas fisiológicas (45mg colesterol/dl), não parece alterar a expressão da ecNOS, o que pode indicar que nLDL afeta a velocidade da transcrição gênica por um mecanismo específico e dependente da concentração. Estes achados podem ter importantes implicações porque eles determinam um novo mecanismo pelo qual a hipercolesterolemia induz alterações precoces nas células endoteliais que podem ter significância fisiopatológica no processo aterosclerótico<sup>52</sup>.

A expressão da iNOS bem como a sua atividade funcional tem sido, recentemente, relatada em lesões ateroscleróticas. A expressão da iNOS não foi detectada em artérias de coelhos normais e em estrias gordurosas encontradas nas artérias carótidas e femoral de coelhos hipercolesterolêmicos. Em lesões transitórias de aortas torácicas e abdominais, artérias coronárias e pulmonares, colorações puntiformes foram detectadas na íntima. Quando as lesões eram mais avançadas, encontrou-se uma expressão da iNOS mais intensa e difusa e localizada em camadas subendoteliais, bem como na camada média. O acúmulo de células musculares lisas nas camadas íntimas das artérias é um marcador do grau de evolução da lesão aterosclerótica. Com base nessas observações é possível assumir a correlação entre a infiltração de células musculares lisas na íntima e a expressão da iNOS nas camadas íntima e subendotelial, sugerindo uma ligação entre a severidade da lesão e a expressão da iNOS<sup>53</sup>. Citoquinas inflamatórias associadas com aterosclerose podem ser capazes de estimular a síntese e a atividade da iNOS, a qual pode favorecer as características patológicas associadas com esta doença. Estudos determinando a localização da iNOS em vasos humanos normais e ateroscleróticos confirmaram a presença de iNOS em vasos ateroscleró-

ticos, nos quais foi especificamente localizada em macrófagos, células espumosas, e na musculatura lisa vascular. A distribuição da imunocoloração para a nitro tirosina, que significa formação de peroxinitrito, foi virtualmente idêntica àquela observada para a iNOS e, também, estava presente em macrófagos, células espumosas e musculatura lisa vascular. Em conclusão, estes estudos têm demonstrado que a expressão estimulada de iNOS associa-se com aterosclerose e que a atividade desta enzima, sob certas condições, promove a formação e a atividade do peroxinitrito. Isto pode ser importante na patologia da aterosclerose, a qual contribui para a peroxidação e lesão vascular<sup>54</sup>.

O ADMA é um inibidor endógeno circulante da NOS dimetilarginina assimétrica (*asymmetric dimethylarginine* – ADMA) tem sido detectada no plasma humano. Pelo menos um estudo foi planejado para examinar a relação entre a ADMA plasmática e a aterosclerose em humanos investigados através de uma história completa e exame físico, determinações de componentes químicos séricos e níveis de ADMA, além de *duplex scanning* de artérias carótidas. Esses indivíduos não apresentavam nenhum sintoma de doença arterial periférica ou coronariana e não estavam fazendo uso de nenhuma medicação. Análises univariadas e multivariadas revelaram que os níveis plasmáticos de ADMA foram positivamente correlacionados com a idade, pressão arterial média e, glicose Sigma (um índice de tolerância à glicose). Curiosamente, uma análise de regressão revelou que os níveis plasmáticos da ADMA foram significativamente correlacionados com o espessamento íntima-média da artéria carótida (medida por ultra-sonografia de alta resolução). Esse estudo revelou que os níveis de ADMA plasmática são positivamente correlacionados com fatores de risco para aterosclerose. Além disto, o nível plasmático de ADMA é significativamente correlacionado com a espessura média-íntima da carótida, sugerindo que este antagonista endógeno da NOS pode ser um marcador de aterosclerose<sup>55</sup>.

**Insuficiência cardíaca** - Acumulam-se evidências de que as alterações na síntese do NO são de grande importância na fisiopatologia da insuficiência cardíaca. Em corações humanos insuficientes, em comparação com corações normais, os níveis do RNAm da ecNOS (NOS III) encontram-se aumentados de 180% na cardiomiopatia dilatada, 200% na doença isquêmica do coração, e, de 210% na cardiomiopatia pós-miocardite. Os estudos de biologia molecular mostraram que, a expressão da proteína da ecNOS, está aumentada aproximadamente para o dobro na insuficiência cardíaca, quando comparada com corações normais. Os estudos imuno-histoquímicos com um anticorpo seletivo para a ecNOS I não mostraram nenhuma diferença óbvia entre o endotélio de vasos sanguíneos em corações humanos insuficientes e normais. Entretanto, a imunorreatividade da NOS III nos cardiomiócitos era significativamente mais intensa na insuficiência cardíaca, quando comparada com corações normais. A baixa expressão do RNAm da ecNOS foi detectada em somente 2 de 30 corações humanos insuficientes e não encontrada em corações normais. Esses estudos concluíram que a expressão aumentada desta isoforma no miocárdio ventricular de

corações humanos insuficientes pode contribuir para a disfunção contrátil observada na insuficiência cardíaca e/ou pode ter um papel em alterações morfológicas tais como hipertrofia e a apoptose dos cardiomiócitos<sup>56</sup>.

Alguns estudos mostraram uma produção alterada de NO pela isoforma constitutiva da NOS (ecNOS), mas não existem informações muito numerosas sobre o papel da isoforma induzível. A iNOS ou NOS II gera uma liberação prolongada de grandes quantidades de NO que pode ser citotóxica e/ou inibir a contratilidade do miócito. Sugeriu-se que este mecanismo contribui especificamente para a fisiopatologia da insuficiência cardíaca da cardiomiopatia dilatada. Para testar esta hipótese um estudo interessante, coletando-se biópsia de corações doentes durante transplantes cardíacos, comparou a quantidade e a localização da iNOS miocárdica em biópsias miocárdicas de pacientes com insuficiência cardíaca causada pela cardiomiopatia dilatada ou pela doença isquêmica do coração. Vinte e dois pacientes incluídos neste estudo estavam em classe III e IV da NYHA. A iNOS foi detectada em todas as biópsias. A quantidade do RNAm da iNOS, intrigantemente, não diferiu de modo significativo entre os dois grupos. Não se observou, da mesma forma, nenhuma diferença entre os grupos na quantidade da proteína da iNOS. A iNOS estava, invariavelmente localizada no endotélio vascular e nas células musculares lisas. Com base nestes estudos, pode-se afirmar que a iNOS expressa-se no miocárdio de todos os pacientes com insuficiência cardíaca causada pelas cardiomiopatias dilatada ou isquêmica. A iNOS, reafirma-se, é encontrada, primariamente e invariavelmente, no endotélio e nas fibras musculares lisas dos vasos miocárdicos e a sua expressão parece estar associada com a condição de insuficiência cardíaca per se, independente da etiologia. Isto também é verdadeiro para a doença valvar cardíaca<sup>57,58</sup>.

A insuficiência cardíaca associa-se com a ativação de citocinas e com expressão da iNOS, que gera NO a partir da L-arginina. Demonstrou-se que o NO modula o desempenho miocárdico, levantando-se a possibilidade que a sua geração pela ação da iNOS, também participa do processo da insuficiência cardíaca. A produção cardíaca de NO pela iNOS atenua os efeitos inotrópicos positivos da estimulação beta-adrenérgica e precipita o relaxamento em corações humanos insuficientes. Uma atividade significativa da iNOS foi, recentemente, relatada em biópsias de corações insuficientes devido à cardiomiopatia dilatada. Assim, sugere-se um potencial papel fisiopatológico da iNOS neste tipo de doença cardíaca. Medindo-se a expressão da proteína da iNOS e o índice de GMPC no miocárdio ventricular esquerdo, de corações humanos normais e insuficientes, foi possível concluir, que a indução da iNOS pode desempenhar um papel na disfunção contrátil observada no choque séptico. Por outro lado, parece improvável que tenha importância fisiopatológica fundamental na insuficiência cardíaca terminal de qualquer etiologia. A iNOS, é capaz de produzir grandes quantidades de NO quando induzida pela ação de mediadores tais como a interleucina (IL-1, IL-2, IL-6), fator de necrose tumoral (TNF-alfa) e interferon-gama. A ecNOS

está presente: no coração no endocárdio, nos miócitos cardíacos e no tecido cardíaco de condução. Já a iNOS está presente em miócitos cardíacos, no endocárdio, em fibras musculares lisas dos vasos, e em células infiltrativas inflamatórias. A evidência dos modelos animais e humanos sugere que o NO exerce um efeito inotrópico negativo. Aumentos de iNOS, TNF-alfa e IL-6 foram encontrados em pacientes com insuficiência cardíaca. Em alguns estudos encontrou-se uma diminuição da ecNOS em pacientes com insuficiência cardíaca. TNF-alfa e IL-6 podem ser produzidos na insuficiência cardíaca e podem estimular a expressão da iNOS que produz o NO, o qual tem efeito inotrópico negativo. Uma diminuição da ecNOS pode ocorrer em consequência de uma infra-regulação causada por TNF-alfa ou iNOS. O possível papel destes mediadores na insuficiência cardíaca necessita de avaliações adicionais, porque estes achados poderiam ter novas implicações terapêuticas<sup>59</sup>.

Os pacientes com insuficiência cardíaca exibem níveis elevados plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx), de um metabólito estável do NO, e de citoquinas. A atividade aumentada da iNOS no tecido cardíaco dos pacientes com cardiomiopatia dilatada, aumenta a possibilidade de superprodução local ou sistêmica de NO induzida por citoquinas. Este exerce um efeito inotrópico negativo crônico no miocárdio e pode ter efeitos hemodinâmicos sistêmicos prejudiciais em pacientes com insuficiência cardíaca. Níveis plasmáticos de ADMA, um inibidor endógeno circulante do NO, foram medidos em pacientes normais e com doenças valvares cardíacas, hipertensiva, isquêmicas ou cardiomiopatia idiopática. Os níveis plasmáticos de NOx e de ADMA, avaliados pela cromatografia líquida de alto desempenho, foram significativamente elevados nos pacientes com insuficiência cardíaca. NOx e ADMA foram correlacionados positivamente com a classe funcional de insuficiência cardíaca da NYHA. Observou-se uma correlação inversa significativa entre o NOx plasmático e a fração de ejeção estimada pela ecocardiografia. Uma correlação significativa entre NOx e ADMA plasmáticas foi encontrada somente nos pacientes com insuficiência cardíaca moderada a grave. Estes dados sugerem um papel compensatório do fator inibidor endógeno circulante da atividade da NOS em pacientes com insuficiência cardíaca<sup>60</sup>.

Acresça-se que a insuficiência de bomba ventricular esquerda com baixo débito cardíaco e as alterações estruturais e metabólicas do músculo esquelético, são fatores que podem contribuir para intolerância ao exercício, que ocorre em portadores de insuficiência cardíaca. Estudos usando miócitos cardíacos implicaram o NO produzido pela ação da iNOS como um agente potencial associado à gênese da cardiomiopatia dilatada. Estudos projetados para encontrar NOS no músculo esquelético de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva mostraram que a expressão da enzima esteve restringida aos miócitos do músculo esquelético e aumentada cinco a nove vezes nos pacientes com insuficiência cardíaca crônica. Não houve nenhuma diferença estatística significativa na expressão da iNOS entre pacientes com cardiomiopatia dilatada e aqueles com cardiomiopatia

isquêmica. Encontraram-se uma expressão localmente aumentada de iNOS e uma evidência experimental de que o NO diminui o desempenho contrátil do músculo esquelético. Este fato sugere que a expressão da iNOS pode ser responsável pela intolerância ao exercício observada em pacientes com insuficiência cardíaca crônica<sup>61</sup>.

Existem evidências de que uma disponibilidade de NO está reduzida na vasculatura periférica de pacientes com insuficiência cardíaca. Em animais com insuficiência cardíaca, a localização de ecNOS na aorta encontra-se alterada: a expressão da proteína endotelial encontra-se reduzida substancialmente, ao passo que a expressão de ecNOS no músculo liso está aumentada. A ecNOS aórtica total encontra-se diminuída na insuficiência cardíaca em relação aos animais controles. Ao contrário, nenhuma diferença na expressão da proteína da ecNOS foi observada em músculos esqueléticos. Além disso, a iNOS não foi detectada em alguns dos tecidos considerados. Estes dados permitem concluir que a insuficiência cardíaca experimental causa um reajuste na expressão da proteína da ecNOS na aorta descendente mas não nos músculos esqueléticos. A marcante redução da ecNOS no endotélio aórtico é consistente com o comprometimento da função vasodilatadora relatada nos pacientes com insuficiência cardíaca<sup>62</sup>.

Os mecanismos moleculares subjacentes à intolerância ao exercício na insuficiência cardíaca ainda não são claros. A expressão da iNOS e reduzida re-síntese da fosfocreatina foram descritas no músculo esquelético de pacientes com insuficiência cardíaca. Uma expressão aumentada da iNOS no músculo esquelético de pacientes com insuficiência cardíaca foi, inversamente, correlacionada com a expressão de mi-CK e a capacidade de exercício. Estes dados ampliam o conhecimento da fisiopatologia da intolerância ao exercício na insuficiência cardíaca<sup>61</sup>.

A vasodilatação das artérias periféricas, mediada pelo fluxo sanguíneo, pode ser comprometida na insuficiência cardíaca, o que poderia contribuir para o aumento da resistência periférica e para a intolerância ao exercício ocorrida nesta doença. O exercício físico melhora esta vasodilatação nas grandes artérias, mas se ocorre o mesmo em pequenas artérias, ainda é desconhecido. A insuficiência cardíaca abole a dilatação mediada pelo fluxo em pequenas artérias pelo comprometimento da via de liberação do NO, aumentando o estresse oxidativo, e liberando um fator prostanóide vasoconstritor. O exercício restaura, parcialmente, este fluxo pelo aumento da expressão da ecNOS e pela prevenção da produção de prostanóides vasoconstritores e radicais livres. Estes mecanismos podem contribuir para o aumento da capacidade ao exercício na insuficiência cardíaca<sup>63</sup>.

Investigações da expressão celular e das atividades da ecNOS e da iNOS em corações insulficientes, com especial referência à lesão básica e ao tratamento medicamentoso, têm sido tentadas. A expressão da ecNOS, mas não da iNOS, nos miócitos está intimamente associada com a terapêutica beta-adrenérgica, sendo mais abundante em pacientes em uso de beta-bloqueadores, quando comparada com uma presença diminuída em pacientes em uso de beta-agonistas<sup>64</sup>.

Alguns estudos têm identificado a iNOS dentro dos miócitos do coração insuficiente, sabendo-se, como já mencionado, que o NO diminui a amplitude de contração de miócitos ventriculares isolados. Mas, o tratamento de miócitos de corações humanos insuficientes com um inibidor de síntese da NOS (L-NMMA), na tentativa de restaurar a função contrátil, não aumentou a relação isoprenalina/Ca<sup>2+</sup> em miócitos de corações insuficientes, não sugerindo um papel funcional para a produção tônica do NO neste modelo de insuficiência cardíaca. É improvável, também, uma dessensibilização beta-adrenérgica em miócitos de ventrículos humanos insuficientes<sup>65</sup>.

Se inibidores de citoquinas, os quais diminuem a expressão da iNOS, poderão vir a ser uma nova abordagem terapêutica da insuficiência cardíaca, é matéria especulativa. À medida que aumentam os conhecimentos sobre os papéis fisiopatológicos e patogênicos das citoquinas na insuficiência cardíaca, poderá ser possível o planejamento de melhores e mais específicos agentes terapêuticos. Além disso, a investigação de agentes inotrópicos efetivos contra a produção de citoquinas poderá ajudar na classificação destes agentes<sup>66</sup>.

### Conclusão

Para concluir esta revisão seria importante incluir informações gerais sobre terapêutica genética e analisar, ainda que sucintamente, as particularidades da expressão da NOS de acordo com o tipo de doença cardiovascular.

A terapêutica genética envolve a transferência de um gene funcional para células hospedeiras com a finalidade de corrigir a disfunção de um gene específico ou aliviar os sintomas da doença. Para a transferência gênica no sistema cardiovascular, a utilização de adenovírus vetores representa, na atualidade, o recurso mais eficiente. Recentemente, a transferência e expressão funcional de genes recombinantes da NOS para o cérebro e leitos vasculares têm sido demonstrada tanto *in vitro* como *in vivo*. Estudos têm demonstrado, com sucesso, a transferência do RNAm da ecNOS em artérias coronárias de porcos, como se verifica pela localização histoquímica de proteína recombinante com um aumento da liberação de NO, demonstrada pelo aumento da produção de nitrito e alteração da função vasomotora. Apesar de que a possibilidade da transferência gênica vem sendo demonstrada em modelos animais, os vetores atualmente disponíveis apresentam grandes limitações técnicas e de segurança, as quais precisam ser resolvidas antes de se tentar a terapêutica genética com a NOS em humanos para o tratamento de doenças vasculares proliferativas. Mais de 100 protocolos têm sido propostos para a terapêutica genética em humanos nos Estados Unidos, mas nenhum resultado efetivo tem sido apresentado neste campo. As deficiências da terapêutica genética resultam, principalmente, da falta de vetores eficientes de transferência gênica. Acresça-se que, quanto mais longínqua se encontre a terapêutica genética somática, mais difícil será o controle das doenças sistêmicas, mesmo após o desenvolvimento de sis-

temas vetores mais poderosos. Entretanto, doenças localizadas poderão ser melhor controladas pela terapêutica genética, com as doenças cardiovasculares sendo alvos promissores para a terapêutica gênica<sup>67,68</sup>.

O gene da ecNOS é efetivo em inibir a formação da neoíntima na carótida de ratos. Este achado experimental indica a possibilidade da terapêutica genética na prevenção de reestenose após angioplastia. A reestenose consiste na maior limitação da cardiologia intervencionista. A reestenose ocorre quando a hiperplasia da íntima é induzida pela angioplastia bem como pelo remodelamento resultante na limitação de fluxo por reestreitamento da luz vascular no local da angioplastia. A hiperplasia da íntima é uma importante candidata para terapêutica gênica, uma vez que ela se relaciona com a proliferação de células musculares lisas, as quais são um alvo convidativo para as estratégias moleculares anti-proliferativas. Até o momento, os adenovírus vetores são, de longe, os mais eficientes vetores para a realização *in vivo* da transferência genética. Estes vetores, assim como outros, têm sido recentemente utilizados para a demonstração de que genes terapêuticos codificados com produtos citotóxicos (herpes vírus timidino quinase) ou citostáticos (Rb hipofosforilável, Cox. NOS) inibem, com sucesso, a proliferação de células musculares lisas relacionadas com a hiperplasia da íntima vascular. Apesar de progressos substanciais, técnicas teciduais mais refinadas, incluindo a toxicidade da primeira geração de adenovírus, a transdução ineficiente em artérias ateroscleróticas, e o risco de transferência extra-arterial, permanecem como problemas a serem resolvidos antes que a terapêutica genética possa ser aplicada clinicamente na reestenose<sup>69,70</sup>.

Tratamentos antitrombóticos convencionais com antiplaquetários, anticoagulantes ou drogas fibrinolíticas não apresentam sucesso uniforme e associam-se com efeitos colaterais hemorrágicos. Portanto, são desejáveis novas abordagens para a prevenção e tratamento da trombose arterial. A abordagem pela transferência gênica é particularmente atraente, porque ela apresenta uma habilidade única de expressar um gene antitrombótico em locais selecionados da parede arterial (onde ocorre a zona de risco para a trombose), ao mesmo tempo em que se evita a anticoagulação sistêmica. Condições clínicas, potencialmente amenizadas pela terapêutica genética antitrombótica, incluem os enxertos vasculares coronarianos, a angioplastia coronariana percutânea, a angioplastia ou tromboembolctomia de artérias periféricas, *stents* intravasculares, e próteses vasculares. A terapêutica genética pode ter seu efeito comprovado na prevenção de trombose subaguda nestas situações e, eventualmente, desempenhar um papel adjuvante na trombólise sistêmica no tratamento da oclusão arterial aguda. A introdução de genes antitrombóticos na parede arterial pode ser obtida tanto por transferência *in vivo* (por exemplo, pela administração luminal do vírus vetor), quanto pela manipulação genética *in vitro* de células, antes de serem implantadas em próteses vasculares, *stents* ou artérias desnudadas. A transferência gênica direta tem sido utilizada para a introdução *in vivo* de genes antitrombóticos em arté-

rias animais. Genes antitrombóticos usados, até o momento, incluem aqueles que codificam enzimas da via de síntese da prostaciclina, NOS, do inibidor trombínico hiruquina e trombosmodulina. A transferência gênica *in vitro* tem sido usada para melhorar a atividade fibrinolítica de próteses vasculares pelo aumento da expressão de ativadores do plasminogênio. Se os sucessos iniciais da terapêutica genética para a doença trombótica em modelos animais forem confirmados por experimentos a longo prazo, e se novos vetores forem desenvolvidos, que permitam uma expressão transgênica prolongada sem inflamação, os estudos humanos poderão ser iniciados<sup>71</sup>.

O entendimento das reais funções das isoformas da NOS nas doenças cardiovasculares é uma tarefa gigantesca. A idéia mais simples é considerar as isoformas constitutivas (ecNOS e nNOS) como “heroínas” e a isoforma induzível (iNOS) como “vilã”. Mas, esta simples idéia não é verdadeira, porque a expressão das isoformas da NOS têm, muitas vezes, um duplo efeito. Em outras palavras, a expressão da NOS pode atuar como herói e/ou vilão em certas situações relacionadas com a mesma doença cardiovascular.

Considerando a isquemia miocárdica, dados *in vivo* demonstram um papel cardioprotetor do NO derivado da ecNOS no coração de rato submetido a isquemia/reperfusão. A lesão de isquemia-reperfusão encontra-se exacerbada na ausência de ecNOS (“herói”). Por outro lado, estudos indicam que o NO desempenha um duplo papel no condicionamento (pré-condicionamento) tardio contra o atordamento (*stunning*) miocárdico, atuando inicialmente como um fator desencadeante e, subsequentemente, como mediador da proteção. Como revisado neste texto, a administração da dexametasona, um inibidor da iNOS, antes do pré-condicionamento isquêmico, bloqueia completamente o seu efeito infarto limitante (iNOS como “herói”). Além disso, a administração de aminoguanidina, um inibidor relativamente seletivo da iNOS, 60min antes da isquemia sustentada, também aboliu a proteção tardia conferida pelo pré-condicionamento isquêmico (iNOS como “herói”). Nem a aminoguanidina e nem a dexametasona por si só tiveram um efeito na redução do tamanho do infarto (nem “herói”, nem “vilão”). Estes dados mostram evidências farmacológicas de que a expressão da iNOS, após períodos de oclusão coronariana, está associada com um aumento da tolerância miocárdica ao infarto após 48h, mostrando um papel de cardioproteção da iNOS (“herói”). Expressão da iNOS após 72h de infarto agudo do miocárdio contribui para o desenvolvimento de disfunção ventricular (“vilão”), e, a modulação da atividade do inibidor STM melhora o desempenho ventricular e pode ser um benefício após o infarto agudo do miocárdio. Estes dados sugerem que a inibição seletiva da atividade da iNOS pode ser uma estratégia terapêutica em doenças cardíacas como o infarto agudo do miocárdio, melhorando a disfunção ventricular (“herói”) e reduzindo o tamanho do infarto agudo do miocárdio (o que não está claro, pois um mesmo grupo de investigadores não comprovaram se a inibição da iNOS é, ou não, capaz de reduzir efetivamente o tamanho do infarto).

Na hipertensão, é claro o papel de “herói” da ecNOS, porque a sua atividade diminui e a sua expressão comprometida pode contribuir para o desenvolvimento de hipertensão. O aumento da expressão da iNOS pode ser uma consequência do estado patológico dos vasos associados com a hipertensão em modelos SHR, porque o aumento da sua expressão pode ser atenuada por medicações anti-hipertensivas, sugerindo que uma expressão anormal da iNOS está associada com a hipertensão (“vilão”). Mas, revendo as publicações de estudos relacionados com a hipertensão arterial e NOS, é possível observar que a grande maioria dos investigadores, através de experimentos clínicos e laboratoriais, mostram um marcante papel de “vilão” para a nNOS. Um dado experimental curioso, relativo à expressão da nNOS na hipertensão e seu aparente efeito controverso em ratos geneticamente desprovidos de ecNOS, sugerem que o NO liberado por isoformas, que não a ecNOS, aumenta a pressão arterial. Se isto for verdade, a nNOS pode ser eleita como a “grande vilã”. Liberar um tipo de “NO vasoconstritor” é demais, mesmo para os maiores vilões.

Na diabetes, dentro do contexto da lesão imunológica das células beta pancreáticas, a iNOS parece ser a maior “vilã”, e, evidências indicam que a insulina pode, *in vivo*, regular para baixo a via da iNOS.

Na hipercolesterolemia, as observações sugerem que as células endoteliais podem tentar compensar a lesão oxidativa pelo aumento da expressão da ecNOS nos estágios mais precoces da doença (“herói”). Dados experimentais sugerem que: 1) há uma perda da expressão da ecNOS nos estágios precoces da hipercolesterolemia (“herói”); e 2) um aumento significativo, como um todo, da síntese de NO por outros tipos de células em lesões avançadas, liberação esta mediada pelas três isoformas da NOS. O aumento da expressão da NOS e, presumivelmente, do NO em placas ateroscleróticas pode estar relacionada com morte celular ou necrose nestes tecidos. Estudos têm demonstrado que a expressão estimulada da iNOS está associada com aterosclerose e que a atividade desta enzima, sob certas condições, promove preferencialmente a formação de peróxido nítrico. De acordo com estes dados, todas as três isoformas da NOS podem ser “vilãs”, considerando as placas ateroscleróticas.

Estudos de biologia molecular têm demonstrado que a expressão da ecNOS está aumentada até em dobro quando comparada em corações normais e insuficientes. Muitos estudos concluíram que expressão da ecNOS na disfunção ventricular miocárdica de corações humanos insuficientes, pode contribuir para a disfunção contrátil observada em corações insuficientes e/ou, desempenhar um papel nas alterações morfológicas como encontradas na hipertrofia e na apoptose de cardiomiócitos (aqui um papel da ecNOS como vilã?). A quantidade reduzida de ecNOS no endotélio da aorta é consistente com o comprometimento da função vasodilatadora descrita em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (novamente “heroína” em uma mesma disfunção cardiovascular). A iNOS é expressada no miocárdio de todos os pacientes com insuficiência cardíaca causada por cardiomiopatia dilatada ou isquêmica (“vilã”). O aumento

da atividade da iNOS no tecido cardíaco de pacientes com cardiomiopatia dilatada, levanta a possibilidade de que a superprodução sistêmica de NO induzida por citocinas exerça um efeito inotrópico negativo crônico no miocárdio e pode ter efeitos deletérios na hemodinâmica sistêmica em pacientes com insuficiência cardíaca (“vilão”).

Estas considerações podem ser conseqüências das nossas dificuldades em compreender alguns conceitos relativos à expressão da NOS. A idéia principal desta revisão é chamar a atenção para estas dificuldades e expressar sentimentos de que “o final da questão” está muito longe. Finalmente, restaria a idéia de pensar nas isoformas da NOS e no

NO (liberado pela expressão de cada uma delas), sempre como “heróis”, voltando à clássica representação da balança de dois pratos equilibrados por fatores relaxantes de um lado, e por fatores contráteis do outro lado. Assim, a expressão das isoformas da NOS poderiam ser interpretadas como “heróis” que perderam a guerra para “vilões”. Infelizmente, esta guerra muitas vezes é, definitivamente, perdida como na vida real. Para isso, experimentos deveriam ser delineados estudando-se paralelamente as expressões genéticas dos fatores vasodilatadores, antitrombótico e antiproliferativos e expressões genéticas de fatores com efeitos opostos a estes.

### Referências

1. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997; 48: 489-509.
2. Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3375-8.
3. Wang Y, Marsden PA. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 71-90.
4. Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Forstermann U, Murad F. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. *Cell Calcium* 1992; 13: 427-34.
5. Fleming I, Busse R. NO: the primary EDRF. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 5-14.
6. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-31.
7. Forstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. Department of Pharmacology, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1995; 352: 351-64.
8. Kiechle FL, Malinski T. Indirect detection of nitric oxide effects: a review. *Ann Clin Lab Sci* 1996; 26: 501-11.
9. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 1141-6.
10. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 147-56.
11. Ursell PC, Mayes M. Anatomic distribution of nitric oxide synthase in the heart. *Int J Cardiol* 1995; 50: 217-23.
12. Balligand JL, Cannon PJ. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1846-58.
13. Jones SP, Girod WG, Palazzo AJ, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 1999; 276: H 1567-73.
14. Giraldez RR, Panda A, Xia Y, Sanders SP, Zweier JL. Decreased nitric-oxide synthase activity causes impaired endothelium-dependent relaxation in the postischemic heart. *J Biol Chem* 1997; 272: 21420-6.
15. Bolli R, Manchikalapudi S, Tang XL, et al. The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by NOS. Evidence that NO acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res* 1997; 81: 1094-107.
16. Takano H, Manchikalapudi S, Tang XL, et al. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation* 1998; 98: 441-9.
17. Imagawa J, Yellon DM, Baxter GF. Pharmacological evidence that inducible nitric oxide synthase is a mediator of delayed preconditioning. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 701-8.
18. Zhao L, Weber PA, Smith JR, Comerford ML, Elliott GT. Role of inducible nitric oxide synthase in pharmacological “preconditioning” with monophosphoryl lipid A. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 1567-76.
19. Wildhirt SM, Dudek RR, Suzuki H, Pinto V, Narayan KS, Bing RJ. Immunohistochemistry in the identification of nitric oxide synthase isoenzymes in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 526-31.
20. Suzuki H, Wolf WP, Akiyama K, et al. Effect of inhibitors of inducible form of nitric oxide synthase in infarcted heart muscle. *Proc Assoc Am Physicians* 1996; 108: 173-8.
21. Wildhirt SM, Suzuki H, Horstman D, et al. Selective modulation of inducible nitric oxide synthase isozyme in myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96: 1616-23.
22. Wang D, Yang XP, Liu YH, Carretero OA, LaPointe MC. Reduction of myocardial infarct size by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Am J Hypertens* 1999; 12: 174-82.
23. Bologna CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Lévy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res* 1998; 83: 1271-8.
24. Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31: 1248-54.
25. Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 1998; 31: 643-8.
26. Chen PY, Gladish RD, Sanders PW. Vascular smooth muscle nitric oxide synthase anomalies in Dahl/Rapp salt-sensitive rats. *Hypertension* 1998; 31: 918-24.
27. Nava E, Llinás MT, Gonzalez JD, Salazar FJ. Nitric oxide synthase activity in renal cortex and medulla of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1996; 9: 1236-9.
28. Chricker K, Pötzl B, Hamann M, Kurtz A. Coordinate changes of renin and brain-type nitric-oxide-synthase (b-NOS) mRNA levels in rat kidneys. *Pflugers Arch* 1996; 432: 394-400.
29. Hayakawa H, Raij L. Nitric oxide synthase activity and renal injury in genetic hypertension. *Hypertension* 1998; 31: 266-70.
30. Tan DY, Meng S, Manning RD Jr. Role of neuronal nitric oxide synthase in Dahl salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 1999; 33: 456-61.
31. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, et al. Brain nitric oxide synthase messenger RNA in central mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 1997; 30: 953-6.
32. Conrad KP, Davis AK. Nitric oxide synthase activity in placenta from women with pre-eclampsia. *Placenta* 1995; 16: 691-9.
33. Hegde LG, Shukla R, Srimal RC, Dikshit M. Attenuation in rat brain nitric oxide synthase activity in the coarctation model of hypertension. *Pharmacol Res* 1997; 36: 109-14.
34. Vaziri ND, Ni Z, Zhang YP, Ruzics EP, Maleki P, Ding Y. Depressed renal and vascular nitric oxide synthase expression in cyclosporine-induced hypertension. *Kidney Int* 1998; 54: 482-91.
35. Hayakawa H, Raij L. The link among nitric oxide synthase activity, endothelial function, and aortic and ventricular hypertrophy in hypertension. *Hypertension* 1997; 29: 235-41.
36. Rabini RA, Staffolani R, Fumelli P, Mutus B, Curatola G, Mazzanti L. Decreased nitric oxide synthase activity in platelets from IDDM and NIDDM patients. *Diabetologia* 1998; 41: 101-4.
37. Eizirik DL, Flodström M, Karlsen AE, Welsh N. The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 1996; 39: 875-90.
38. Stevens RB, Sutherland DE, Ansie JD, et al. Insulin down-regulates the inducible nitric oxide synthase pathway: nitric oxide as cause and effect of diabetes? *J Immunol* 1997; 159: 5329-35.
39. Sugimoto H, Shikata K, Matsuda M, et al. Increased expression of endothelial cell nitric oxide synthase (ecNOS) in afferent and glomerular endothelial cells is involved in glomerular hyperfiltration of diabetic nephropathy. *Diabetologia* 1998; 41: 1426-34.

40. Choi KC, Lee SC, Kim SW, Kim NH, Lee JU, Kang YJ. Role of nitric oxide in the pathogenesis of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Intern Med* 1999; 14: 32-41.
41. Sasaki T, Yasuda H, Maeda K, Kikkawa R. Hyperalgesia and decreased neuronal nitric oxide synthase in diabetic rats. *Neuroreport* 1998; 9: 243.
42. Roufail E, Soulis T, Boel E, Cooper ME, Rees S. Depletion of nitric oxide synthase-containing neurons in the diabetic retina: reversal by aminoguanidine. *Diabetologia* 1998; 41: 1419-25.
43. Wrzos HF, Cruz A, Polavarapu R, Shearer D, Ouyang A. Nitric oxide synthase (NOS) expression in the myenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 2106-10.
44. Kawaguchi M, Koshimura K, Murakami Y, Tsumori M, Gonda T, Kato Y. Antihypertensive effect of insulin via nitric oxide production in the Zucker diabetic fatty rat, an animal model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 1999; 140: 341-9.
45. Mehta JL, Bryant JL Jr, Mehta P. Reduction of nitric oxide synthase activity in human neutrophils by oxidized low density lipoproteins. Reversal of the effect of oxidized low-density lipoproteins by high-density lipoproteins and L-arginine. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 1181-5.
46. Ramasamy S, Parthasarathy S, Harrison DG. Regulation of endothelial nitric oxide synthase gene expression by oxidized linoleic acid. *J Lipid Res* 1998; 39: 268-76.
47. Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1999; 103: 897-905.
48. Peterson TE, Poppa V, Ueba H, Wu A, Yan C, Berk BC. Opposing effects of reactive oxygen species and cholesterol on endothelial nitric oxide synthase and endothelial cell caveolae. *Circ Res* 1999; 85: 29-37.
49. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2479-88.
50. Dusting GJ, Fennessy P, Yin ZL, Gurevich V. Nitric oxide in atherosclerosis: vascular protector or villain? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1998; 25: S34-41.
51. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Luscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 1998; 97: 2494-8.
52. Vidal F, Colome C, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem* 1998; 252: 378-84.
53. Behr D, Rupin A, Fabiani JN, Verbeuren TJ. Distribution and prevalence of inducible nitric oxide synthase in atherosclerotic vessels of long-term cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1999; 142: 335-44.
54. Buttery LD, Springall DR, Chester AH, et al. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 1996; 75: 77-85.
55. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 1141-6.
56. Stein B, Eschenhagen T, Rudiger J, Scholz H, Forstermann U, Gath I. Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, but not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 1179-86.
57. Vejstrup NG, Bouloumie A, Boesgaard S, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human heart: expression and localization in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 1215-23.
58. Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 1996; 93: 1087-94.
59. Birks EJ, Yacoub MH. The role of nitric oxide and cytokines in heart failure. *Coron Artery Dis* 1997; 8: 389-402.
60. Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci* 1998; 62: 2425-30.
61. Winkler S, Yu J, Niebauer J, Jiang H, Fiehn E, Schuler G. Exercise intolerance in patients with chronic heart failure and increased expression of inducible nitric oxide synthase in the skeletal muscle. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 174-9.
62. Comini L, Bachetti T, Gaia G, et al. Aorta and skeletal muscle NO synthase expression in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 2241-8.
63. Varin R, Mulder P, Richard V, et al. Exercise improves flow-mediated vasodilation of skeletal muscle arteries in rats with chronic heart failure. Role of nitric oxide, prostanoids, and oxidant stress. *Circulation* 1999; 99: 2951-7.
64. Fukuchi M, Hussain SN, Giaid A. Heterogeneous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure: their relation to lesion site and beta-adrenergic receptor therapy. *Circulation* 1998; 98: 132-9.
65. Harding SE, Davies CH, Money-Kyrle AM, Poole-Wilson PA. An inhibitor of nitric oxide synthase does not increase contraction or beta-adrenoceptor sensitivity of ventricular myocytes from failing human heart. *Cardiovasc Res* 1998; 40: 523-9.
66. Matsumori A. The use of cytokine inhibitors. A new therapeutic insight into heart failure. *Int J Cardiol* 1997; 62(suppl 1): S3-12.
67. Chen AF, O'Brien T, Katusic ZS. Transfer and expression of recombinant nitric oxide synthase genes in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19: 276-86.
68. Cable DG, O'Brien T, Kullo JJ, Schwartz RS, Schaff HV, Pompili VJ. Expression and function of a recombinant endothelial nitric oxide synthase gene in porcine coronary arteries. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 553-9.
69. Feldman LJ, Tahlil O, Steg PG. Adenovirus-mediated arterial gene therapy for restenosis: problems and perspectives. *Semin Interv Cardiol* 1996; 1: 203-8.
70. Kaneda Y, Morishita R. Development of in vivo gene transfer methods towards future gene therapy. *Rinsho Byori* 1997; 45: 99-105.
71. Vassalli G, Dichek DA. Gene therapy for arterial thrombosis. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 459-69.